

ELOISA APARECIDA RIBEIRO

**EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DOS
HIDROCARBONETOS POLIAROMÁTICOS ESPECÍFICOS BTX
(BENZENO, TOLUENO E XILENO) NO PEIXE Sphoeroides testudineus
(LINNAEUS, 1758) ATRAVÉS DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E
HISTOLÓGICOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal Paraná, como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dra. Edith S. E. Fanta

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Helena C. S. de Assis

CURITIBA

2007

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	5
RESUMO.....	6
INTRODUÇÃO GERAL.....	7
CAPÍTULO 01: RESPOSTAS DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E HISTOLÓGICOS NO FÍGADO DO PEIXE <i>Sphoeroides testudineus</i> EXPOSTO EXPERIMENTALMENTE A CONTAMINAÇÃO SUBLETAL COM BTX (BENZENO, TOLUENO E XILENO).....	
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2.1 Peixes experimentais.....	18
2.2 Determinação do Lc ₅₀ para o Benzeno.....	18
2.3 Bioensaios com dose sub letal de BTX.....	19
2.4 Análises bioquímicas de enzimas hepáticas.....	19
2.5 Análise estatística.....	21
2.6 Análises microscópicas.....	21
3. RESULTADOS.....	23
3.1 Biomarcadores bioquímicos.....	23
3.2 Biomarcadores morfológicos.....	25
4. DISCUSSÃO.....	28
CAPÍTULO 02: AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO FÍGADO E BRÂNKIAS DO PEIXE <i>Sphoeroides testudineus</i> APÓS CONTAMINAÇÃO SUBLETAL COM BTX (BENZENO, TOLUENO E XILENO).....	
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
2.1 Área de coleta.....	37
2.2 Peixes experimentais.....	37
2.3 Determinação do Lc ₅₀ para o Benzeno.....	38
2.4 Coleta do material.....	38
2.5 Processamento para microscopia.....	39
2.6 Morfometria.....	40
2.7 Análise estatística.....	40
3. RESULTADOS.....	41
3.1 Histologia hepática.....	41
3.2 Histologia branquial.....	44
4. DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÃO FINAL.....	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 01

Figura 01. Atividade da 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) no fígado do peixe <u>S. testudineus</u> exposto à dose subletal de BTX.....	23
Figura 02. Atividade da Catalase no fígado do peixe <u>S. testudineus</u> exposto à dose subletal de BTX.....	24
Figura 03. Atividade da GST no fígado do peixe <u>S. testudineus</u> exposto à dose subletal de BTX.....	24
Figura 04. Atividade da LPO no fígado do peixe <u>S. testudineus</u> exposto à dose subletal de BTX.....	25
Figura 05. Tecido hepático do peixe <u>S. testudineus</u> controle.....	26
Figura 06. Tecido hepático do peixe <u>S. testudineus</u> após 4 dias de exposição ao BTX.....	27
Figura 07. Tecido hepático do peixe <u>S. testudineus</u> após 7 dias de exposição ao BTX.....	27

CAPÍTULO 02

Figura 01. Tamanho dos hepatócitos em espécimes de <u>S. testudineus</u> exposto à dose subletal de BTX.....	41
Figura 02. Quantidade de núcleos normais e anormais nos hepatócitos de <u>S. testudineus</u> exposto à dose subletal de BTX.....	42
Figura 03. Histopatologia do tecido hepático do peixe <u>S. testudineus</u> controle.....	43
Figura 04. Quantidade de descolamentos leves e severos nas lamelas branquiais de <u>S. testudineus</u> exposto à dose subletal de BTX.....	44
Figura 05. Quantidade de fusões lamelares e de células de muco nas lamelas branquiais de <u>S. testudineus</u> exposto à dose subletal de BTX	45
Figura 06. Histopatologia do tecido branquial do peixe <u>S. testudineus</u> controle, após 24, 48, 96 e 168 hs de exposição ao BTX.....	46
Figura 07. Histopatologia do tecido branquial do peixe <u>S. testudineus</u> evidenciando células de muco nos animais controle, após 24, 48, 96 e 168 hs de exposição ao BTX.....	47

Aos meus pais

Israel Ribeiro e Olívia Ribeiro

que dedicaram grande parte de suas vidas
na educação de seus filhos

...aqui estou...

Muito obrigada por fazerem de mim
uma mulher de bem!!!!!!.

...Parabéns meu pai neste dia...sei que este é meu
maior presente ... sempre terei sua presença nos
meus melhores pensamentos e orações.

DEDICO

A Edith

...que me ensinou a ser uma pescadora de conhecimentos e de sonhos...

...e por ter acreditado e me incentivado...sempre..!!!!

Ao meu irmão..

Rogério por ter possibilitado o início deste sonho com a oportunidade trabalhar com toda a sua grande família: Everest...

Ao meu outro irmão..

Antonio Carlos que tem me mostrado o "real" valor da vida e os sentimentos mais puros que uma pessoa possa ter...

Aos meus "outros" pais...

Matson e Marilza...que me incentivaram com carinho, afeto, fé e muito amor.

AGRADEÇO

Agradeço sempre a Deus e aos meus amigos espirituais por cada momento deste trabalho, por cada bom pensamento, por cada alegria e tristeza tão fundamentais para minha evolução na Terra, pela fé que me mantém íntegra...
MUITO OBRIGADA....

A VIDA que tem me ensinado tantas coisas mas principalmente, o real sentido do amor !!

Ao Cristiano que tem sido um amigo verdadeiro e um companheiro leal em tantos momentos...

Ao Luizão
...que é grande e generoso em sentimentos e atitudes.....não esquecerei das nossas pescarias e conversas tão essenciais !!.

Ao meu querido Pedro...que participou em “todos” os momentos deste trabalho com atenção, interesse, disposição e principalmente, com amizade !!!

A profª Helena Silva por me co-orientar de maneira tão atenciosa nestes últimos meses...

Ao Sr. Nino que em muito me ajudou...e por me transmitir tanta paz...

A Lucélia Donatti e Helena Kawall que me acompanham desde “sempre” !!!

A Alessandra e Nete...por terem estado presente em tantos momentos da minha vida e simplesmente, por serem amigas verdadeiras !!

A todos os meus amigos e inimigos, afinal o que seria de nós em um mundo só de anjos ???

AGRADEÇO

RESUMO

Uma grande diversidade faunística e reprodutiva são encontradas em regiões estuarinas e apresentam muitas espécies de peixes que estão suscetíveis a impactos antropogênicos. Espécimes juvenis de Sphoeroides testudineus foram expostos à dose sub letal de 10: 5: 1 de BTX (4.386ml de benzeno, 2.215ml de tolueno e 0.445ml de xileno) por 24, 48, 96 e 168 horas de contaminação em 75 litros de água. Depois de 96 horas (4 dias) e 168 horas (7 dias) de contaminação, o fígado foi extraído e preparado para as análises bioquímicas. Maiores efeitos foram observados na atividade da enzima 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) que apresentou um aumento significativo, após 4 dias de contaminação. No entanto, não houve aumento significativo na atividade das enzimas como a catalase e glutathione S-transferase, e a produção de lipídio hidropoxidase foi mínima e não significativamente aumentada. Nas análises morfológicas do fígado foram observados hepatócitos afetados pela contaminação em todos os períodos experimentais, com aumento de tamanho significativo após 168 horas. Vacúolos lipídicos, núcleos anormais e lateralizados foram observados em todos os períodos de exposição ao BTX e as mitocôndrias inchadas. Nas brânquias foram observadas em todos os períodos experimentais, descolamentos severos das lamelas secundárias, presença não significativa de fusão destas lamelas, assim como de hiperplasias e hipertrofias. Quantidades decrescentes de células de muco foram observadas, após 24, 48 e 96 horas evidenciando a reação do peixe às substâncias xenobióticas, assim como edemas presentes após 168 horas de contaminação. Os resultados indicaram que o BTX atuou no organismo destas espécies juvenis de peixes, causando alterações histopatológicas e bioquímicas nos fígados de S. testudineus.

INTRODUÇÃO GERAL

O petróleo é o mais sério contaminante dos oceanos e dos mares da Terra. Todos os anos 6.000 toneladas de petróleo bruto são derramados em acidentes durante o transporte, rebentamentos de poços de petróleo, descargas ilegais de efluentes industriais e limpeza de tanques dos navios no mar (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

O derrame de petróleo no meio aquoso é impulsionado pelos ventos e pelas correntes locais dispersando-se nas águas. Inicialmente, o petróleo encontra-se numa fase, mas a ação dos processos físicos faz com que os seus componentes mais voláteis (naftas) evaporem; os de média densidade (óleos) se emulsionem com a água, formando um barro flutuante e os mais pesados, após adsorção das partículas em suspensão (alquitranes) sedimentam (HARTE, *et al.*, 1991).

Algumas frações mais polares e mais tóxicas, são solúveis na água do mar. Tanto a dissolução quanto à emulsão do poluente, originam uma maior área de contato do produto com o meio ambiente e conseqüentemente, um aumento da abrangência da poluição.

Além do petróleo decorrente do derramamento devem ser acrescentadas as perdas naturais provenientes de lençóis petrolíferos submarinos, os hidrocarbonetos evaporados ou produzidos pela combustão incompleta nos motores e a degradação natural das plantas e animais marinhos (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

Os hidrocarbonetos constituem a maior parte do petróleo, sendo que o efeito destes sobre a fauna e a flora depende em grande parte da sua composição química, que é muito variável. Hidrocarbonetos saturados de elevados e baixos pontos de ebulição e hidrocarbonetos aromáticos estão presentes nos diversos tipos de óleo cru com características químicas, biológicas e toxicológicas bastante semelhantes (McNAUGHTON *et al.*, 1984).

Quando em suspensão na água, ou após deposição, os hidrocarbonetos são biodegradados por ação bacteriana, sobretudo se o meio é rico em nitratos e fosfatos. No entanto, os compostos mais tóxicos são também mais resistentes a esta ação. Uma película de hidrocarbonetos na superfície da água reduz as trocas gasosas com

a atmosfera e, por conseguinte, a fotossíntese e a produtividade primária (McNAUGHTON *et al.*, 1984).

A fotossíntese é reduzida em cerca de 50% pela ação dos cresóis (derivados dos hidrocarbonetos) em teores de 5 a 10 ppm, sobre as algas. As bactérias capazes de atacar o petróleo multiplicam-se, ocasionando um empobrecimento da água do mar em oxigênio, o que causa a morte do plâncton e a fuga dos peixes (McNAUGHTON *et al.*, 1984). No caso do produto tóxico não provocar a morte imediata dos organismos, vai ocasionar-lhes distúrbios fisiológicos e metabólicos.

Frações complexas do petróleo (hidrocarbonetos saturados de baixo e elevado pontos de ebulição, hidrocarbonetos aromáticos de baixo e elevado ponto de ebulição, hidrocarbonetos parafínicos e olifínicos) são as principais responsáveis pelo seu efeito deletério. Os hidrocarbonetos aromáticos de baixo ponto de ebulição incluem produtos como o benzeno, o tolueno e o xileno, muito tóxicos para os seres vivos (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

Após a absorção, o benzeno é distribuído para os órgãos em tempos variáveis, de acordo com o tempo decorrido após sua exposição. Inicialmente deposita-se no sistema nervoso central e posteriormente nos tecidos lipóides, no fígado, sangue e na medula óssea (SPIES *et al.*, 1996). Sob o ponto de vista da toxicidade aguda, o benzeno possui efeitos neurotrópicos não específicos que caracterizam de uma maneira geral os solventes voláteis em função da lipossolubilidade, e se fixam nos centros nervosos (LARINI *et al.*, 1997).

O tolueno é facilmente absorvido pelas vias aéreas de mamíferos, tendo absorção mais lenta pelo trato gastrointestinal, e é irregularmente distribuído pelo sistema nervoso. Concentra-se mais no bulbo e ponte, e menos no hipotálamo e tálamo. O mecanismo de ação tóxica do tolueno é ainda desconhecido. Identicamente a outros solventes orgânicos, apresenta uma ação predominantemente depressora do sistema nervoso central. Estudos em animais, expostos durante três dias a concentrações de 500, 1.500 ou 3.000 ppm de tolueno, demonstram aumento considerável na concentração hepática do citocromo P-450 (LARINI, 1997).

O xileno é facilmente absorvido pelo sistema respiratório e cerca de 95% absorvido é biotransformado e excretado, sendo que seus isômeros são capazes de induzir o sistema enzimático microsomal de oxidases mistas que contêm o

citocromo P-450, sendo facilmente absorvido pelo tegumento. Como efeito, apresenta uma atividade depressora sobre o sistema nervoso central (LARINI, 1997).

Efeitos subletais podem resultar ou da acumulação gradual de substâncias em níveis que causam efeitos biológicos nos organismos ou do contínuo estresse exercido pelos poluentes. A concentração relativa de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) no ecossistema aquático é elevada em sedimentos, média na biota aquática e baixa na coluna de água (TUVIKENE, 1995).

Devido à sua natureza lipofílica, os PAHs podem penetrar facilmente nas membranas biológicas e se acumular nos organismos vivos (TUVIKENE, 1995), sendo que a taxa de hidrocarbonetos aromáticos acumulados nos organismos aquáticos é altamente específica (NORTON, *et al.*, 1985).

Peixes e invertebrados são considerados bons bioindicadores, sendo que nos últimos anos têm sido amplamente utilizados em estudos de toxicologia e monitoramento ambiental, na saúde dos ecossistemas aquáticos, tanto em relação à presença quanto aos efeitos de poluentes (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005).

Nos últimos anos tem sido documentada uma diminuição da população de peixes como, por exemplo, Anguilla rostrata, Microgadus tomcod, Morone saxatilis, em conseqüência das mudanças físicas no meio ambiente, da pesca excessiva e de doenças infecciosas, somadas aos possíveis efeitos da poluição química (ROUSSEAU *et al.*, 1994).

Os efeitos da exposição de óleo bruto em órgãos de peixes adultos têm sido documentados em diversos estudos laboratoriais no aspecto bioquímico, enzimas de biotransformação existem em quase todos os órgãos vitais, mas a sua atividade é comprovadamente maior no fígado, pele, pulmão, intestino e órgãos reprodutores (KRAHN *et al.*, 1984; MARTY *et al.*, 1999).

Biomarcadores bioquímicos envolvidos nos processos de biotransformação são comumente utilizados em programas de monitoramento ambiental. Estes processos compreendem a fase I e a fase II do metabolismo orgânico (GOKSØYR e FÖRLIN, 1992; GEORGE, 1994; BUCHELI e FENT, 1995). O citocromo P450 e as monoxigenases de função mista a ele associadas, é o sistema enzimático mais importante da fase I (STEGEMAN e HAHN, 1994), localizado nas membranas do

retículo endoplasmático de células de vários tecidos eucarióticos, principalmente no fígado, nos rins e no intestino. A enzima GST (Glutathione S-Transferase) pertence à fase II do metabolismo, sendo importante na desintoxicação de compostos xenobióticos.

Histologicamente, quantidades subletais de hidrocarbonetos podem provocar danos estruturais e funcionais nas brânquias, fígado, tecido cerebral e nas gônadas dos peixes (McDONALD *et al.*, 1996).

Os efeitos da exposição ambiental aos derramamentos de óleo têm sido muito documentados, mas ainda requerem estudos mais aprofundados que possibilitem uma maior compreensão e os possíveis tratamentos (MARTY *et al.*, 1999; NERO *et al.*, 2006; THAMMAKHET, *et al.*, 2007).

Os tetraodontídeos, vulgarmente denominados de baiacu ou peixe-bola, habitam as regiões tropicais de todos os oceanos e mais especificamente, as regiões estuarinas. O Sphoeroides testudineus Linnaeus, 1758 ocorre no Brasil como uma espécie de baixo valor econômico, já que seu preparo geralmente não é adequado para o consumo humano (CORRÊA, *et al.*, 1992, ROCHA *et al.*, 2002). Desperta o interesse entre as diversas espécies estuarinas pela sua abundância, escassez de literatura e pela sua importância na cadeia trófica, e distribuiu-se nas principais regiões tropicais desde a Nova Jersey (EUA) até o estado de Santa Catarina (Brasil) (ROCHA *et al.*, 2002).

Baseando-se no fato de que estes compostos causam efeitos tóxicos, subletais e letais em peixes, em diferentes níveis celulares e bioquímicos, este trabalho teve como objetivo estudar o que a exposição subletal aos três compostos, benzeno, tolueno e xileno, (BTX) causam em alguns tecidos do Sphoeroides testudineus, enfatizando a necessidade crescente de se conhecer diferentes biomarcadores que sejam efetivos no diagnóstico de possíveis impactos ambientais.

CAPÍTULO 01

**RESPOSTA DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E
HISTOLÓGICOS NO FÍGADO DO PEIXE Sphoeroides testudineus
EXPOSTO EXPERIMENTALMENTE À CONTAMINAÇÃO SUB LETAL
COM O BTX (BENZENO, TOLUENO E XILENO).**

RESUMO

Espécimes juvenis de Sphoeroides testudineus foram expostas à dose subletal de 10: 5: 1 de BTX (4.386ml de benzeno, 2.215ml de tolueno e 0.445ml de xileno) em 75 litros de água. Depois de 4 dias (96 horas) e 7 dias (168 horas) de contaminação, o fígado foi extraído e preparado para as análises bioquímicas e morfológicas. Maiores efeitos foram observados na atividade da enzima 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) que apresentou um aumento significativo, após 4 dias de contaminação. No entanto, não houve aumento significativo na atividade das enzimas como a catalase e glutathione S-transferase, e a produção de lipídio hidropoxidase foi mínima e não significativamente aumentada. Hepatócitos foram afetados pela contaminação, depois de 4 dias de exposição ao BTX, mostrando um aumento no depósito de lipídios, mitocôndrias inchadas que perderam parte da sua crista. Também apareceram no fígado, congestão sangüínea, macrófagos e linfócitos. Os resultados indicaram que o BTX atuou no organismo destas espécies juvenis de peixes, causando alterações histopatológicas e bioquímicas nos fígados de S. testudineus. A reação do peixe para as substâncias xenobióticas varia com a espécie. No entanto foi importante o uso de um peixe nativo da costa brasileira para bioensaios e estudos de biomarcadores bioquímicos e ultraestruturais para a compreensão das conseqüências de sua exposição às substâncias derivadas do petróleo e comuns no meio ambiente.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos poliaromáticos específicos (PAH); Peixe, Fígado; Biomarcador; 7-etoxiresorufin-O-deetilase (EROD); Lipídio hidropoxidase (LPO); Catalase; Glutathione S-transferase (GST); Histopatologia.

ABSTRACT

Specimens of Sphoeroides testudineus juveniles were exposed to the sub lethal dose of BTX (10:5:1) of 4.386 mL benzene, 2.215 mL toluene and 0.445 mL xylene, in 75 litres of water. After 4 days (96 hours) and 7 days (168 hours) of contamination, the liver was extracted and prepared for biochemical and morphological analyses. After 4 days of contamination the enzyme 7-etoxyresorufine-*O*-deethylase (EROD) level increased significantly. However the two other enzymes that were tested, catalase and glutathione S-transferase presented no changes in their activity levels. The production of lipid hydroperoxides was minimal and did not change significantly after exposure to BTX. Hepatocytes were affected after 4 days of contamination: there was an increase in the number of lipid deposits, and the mitochondria showed less cristae. Blood congestion and the presence of lymphocytes and macrophages were observed in the liver. Results indicated that BTX acted on these juvenile fish organisms, causing histopathologies and biochemical changes in the liver. The reaction to xenobiotics varies with the species. Therefore it was important to test a native fish of the Brazilian coast to help to understand the potential consequences of their exposure to petrol derivatives that are common in the environment.

Key-words: Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH); Sub lethal effects; Fish; Liver; Biomarker; 7-etoxyresorufine-*O*-deethylase (EROD); Lipid hydroperoxides (LPO); Catalase; Glutathione S-transferase (GST); Histopathology.

1. INTRODUÇÃO

Estuários e águas costeiras adjacentes são geralmente vulneráveis à presença de compostos xenobióticos. Estas regiões têm apresentado níveis crescentes de contaminação como consequência das atividades antropogênicas, seja através de resíduos industriais e urbanos, deposição atmosférica ou drenagem terrestre (KENNISH, 1992; SHAILAJA e CLASSY D'SILVA, 2003; FERNANDES *et al.*, 2006).

Nos últimos anos tem sido constante a necessidade de detectar e avaliar os diferentes efeitos de contaminação em organismos marinhos que habitam estas regiões costeiras. Entre as técnicas de avaliação, o uso integrado de análises químicas e bioquímicas e as respostas celulares para os poluentes são os procedimentos mais usuais para a detecção do impacto de contaminantes no ecossistema aquático (FERNANDES *et al.*, 2006).

Os hidrocarbonetos benzeno, tolueno e xileno (BTX) constituem um importante volume da produção de petróleo nas refinarias, compondo derivados de importância econômica e social como a gasolina (CUNHA e LEITE, 2000).

Estudos relacionados aos efeitos deletérios de hidrocarbonetos nos organismos vivos têm sido realizados há muitas décadas, destacando-se os efeitos carcinogênicos do benzeno nos seres humanos (THAMMAKHET, *et al.*, 2007) e sérios danos à saúde dos organismos vivos, sejam estes vertebrados ou invertebrados, causados pela associação ordenada do benzeno com os hidrocarbonetos tolueno e xileno formando o BTX (JEONG e CHO, 2007).

As enzimas citocromo P450 microssomais envolvidas na biotransformação de xenobióticos pertencem a três principais famílias, que apresentam mais de 40% de similaridade: são agrupadas na mesma família (CYP1, CYP2 e CYP3), sendo que cada uma destas famílias pertence a uma única subfamília que é representada por uma letra após o número arábico indicativo da família (CYP1A, CYP3A e CYP4A) (GOKSØYR e FÖRLIN, 1992).

A biotransformação dos hidrocarbonetos do petróleo tem fundamental importância na eliminação desses compostos do organismo. Aproximadamente 90% do xileno, 80% do tolueno e 60% do benzeno absorvidos passam pela etapa da

biotransformação, principalmente hepática, através do complexo enzimático P-450, antes de serem eliminados do organismo (WHO, 1993).

Existem muitos relatos a respeito do papel da subfamília CYP1A em vários processos de ativação metabólica, incluindo metagênese ou carcinogênese em animais experimentais. De um modo geral esta subfamília está envolvida no metabolismo oxidativo de substâncias exógenas como os hidrocarbonetos poliaromáticos específicos (PAHs), aminas heterocíclicas e aminas aromáticas (OLIVEIRA e PACHECO, 2006). Esses compostos podem induzir a CYP1A, e os PAHs com fração aromática entre os C5 e C9, como o BTX, são muito tóxicos para os seres vivos, inclusive para os organismos aquáticos como os peixes (VARANASI *et al.*, 1989; OLIVEIRA e PACHECO, 2006).

Uma das maneiras de medir a indução do CYP1A é pela atividade catalítica da EROD (7-etoxiresorufina-O-deetilase) que tem sido reconhecida como um útil biomarcador em várias espécies de peixes expostos a compostos xenobióticos como PAHs. Ao contrário do observado na fase de hidrólise, redução e oxidação, enzimas ligadas à membrana microssomal da fase II são solúveis e encontradas livres na fração citosólica, principalmente de procariotos (NICARETA, 2004).

A enzima GST (Glutathione S-Transferase) que pertence à fase II do metabolismo catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com uma variedade de compostos endógenos e exógenos, tendo uma importância crucial na conjugação e desintoxicação de compostos xenobióticos (GEORGE, 1994) e na prevenção da peroxidação lipídica. Atualmente é utilizada como biomarcador no estudo de vertebrados e invertebrados, assim como em distúrbios metabólicos e danos celulares em órgãos específicos (CASILLAS *et al.*, 1983; LENARTOVA *et al.*, 1997; CASTRO *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2004; MOREIRA e GUILHERMINO, 2005; VENKATESWARA RAO, 2006).

Durante o metabolismo dos xenobióticos pode haver a formação de radicais livres que são eliminados pelas enzimas antioxidantes. A catalase é responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular. Além de seu papel como espécie reativa de oxigênio e portanto, causadora de estresse oxidativo, o H_2O_2 , em excesso causa oxidação da hemoglobina e, conseqüentemente, diminuição das concentrações de oxigênio, acarretando

infecções, úlceras e até necroses nos organismos (CLAIBORNE, 1985; SAINT-DENIS *et al.*, 1999).

Se ocorrer um desequilíbrio no sistema das enzimas antioxidantes, os hidroperóxidos de lipídios são indicadores do processo de peroxidação lipídica (LPO), constituindo o evento citotóxico primário que desencadeia as injúrias mediadas por diferentes agentes tóxicos (LIMA *et al.*, 2002). Por ser definida como uma reação em cadeia, a LPO se propaga continuamente, levando à formação de lipoperóxidos e à destruição e morte celular. O aumento da LPO, como uma consequência da deterioração oxidativa dos lipídios das membranas é, geralmente, utilizado como referência em tecidos biológicos de estresse oxidativo, influenciando vários caminhos metabólicos (KAPPUS e SIES, 1981; McMORD, 2000) e ainda, nas condições patogênicas e carcinogênicas (CERUTTI, 1989; MATES *et al.*, 2000; VURAL *et al.*, 1999; AHMED *et al.*, 1999).

Os biomarcadores histopatológicos são também ferramentas importantes nos programas de monitoramento ambiental. O tecido hepático é comumente estudado no metabolismo de substâncias tóxicas, embora outros tecidos também demonstrem com eficiência lesões causadas por agentes xenobióticos (REYNOLDS *et al.*, 2003).

Respostas oxidativas e histopatológicas de peixes diferem dependendo da espécie, do habitat e hábito alimentar, sendo que os biomarcadores têm a vantagem de medir respostas quantitativamente com informações valiosas de relevância ecológica nos efeitos agudos e crônicos da poluição aquática.

O modo de ação dos contaminantes nos organismos e as respostas dos biomarcadores podem ser significativamente afetados pela rota de exposição do contaminante no organismo, seja por via respiratória ou oral, o que sugere a necessidade de realizarmos experimentos diversificados e/ou abrangentes para uma melhor compreensão e consequente, colaboração no âmbito científico (FANTA *et al.*, 2003). Além disso, muitas pesquisas envolvendo condições patológicas têm enfoque em mamíferos e, em contraste, existem relativamente poucas informações disponíveis em peixes dulcícolas e marinhos.

A utilização de hidrocarbonetos poliaromáticos específicos (PAHs) como exemplos típicos de contaminantes ambientais e a resposta de biomarcadores enzimáticos e histológicos para nosso estudo, tornam-se muito importantes, por utilizarem uma espécie nativa com ampla distribuição na costa brasileira, abundante

em zonas estuarinas, aonde freqüentes episódios de contaminação podem ser observados. Assim, este trabalho teve por objetivo, avaliar o efeito de uma mistura de Benzeno, Tolueno e Xileno (BTX) em concentração subletal, no peixe Sphoeroides testudineus, através de biomarcadores bioquímicos (atividade enzimática da EROD, CATALASE, GST e LPO) no fígado, e possíveis conseqüências para a integridade da ultraestrutura dos hepatócitos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Peixes experimentais

A espécie estuarina escolhida para este estudo foi o Sphoeroides testudineus Linnaeus, 1758, da família Tetraodontidae que engloba os peixes conhecidos vulgarmente como baiacus. Habitam abundantemente as baías e os estuários, ao longo de toda a costa brasileira. São espécies tolerantes a baixas salinidades (FIGUEIREDO e MENEZES, 2000), bem como se adaptam facilmente a condições de tanques e laboratórios.

Exemplares juvenis de Sphoeroides testudineus com aproximadamente 12 cm de comprimento e 50g de peso foram coletados na Barra do Saí, litoral norte de Santa Catarina (Brasil), utilizando-se da pesca artesanal com linha e anzol, durante a maré de enchente.

Os peixes foram aclimatados por um período de sete dias no Laboratório de Biologia Integrativa de Peixes (BioPx) da Universidade Federal do Paraná - UFPR, baseado em experiência prévia pessoal com a espécie, sob condições abióticas controladas e constantes: fotoperíodo (12 horas Luz/ 12 horas Escuro), salinidade (34‰), temperatura (25°C) e aeração constante, em aquários de 75litros, abastecidos com água marinha do local de coleta.

2.2 Determinação do LC₅₀ para o Benzeno

Para determinação da dose subletal do BTX foram realizados 10 bioensaios com a contaminação pelo benzeno, determinante das concentrações de tolueno e xileno (GOBATO e LANÇAS, 2001). Em cada um deles, após aclimação, 20 exemplares foram separados aleatoriamente como grupo controle e 20 peixes foram separados em dois grupos experimentais com dez peixes cada. Os dois grupos experimentais foram contaminados com uma fração dos hidrocarbonetos que foi misturada nos aquários até que fosse determinada a dosagem subletal. As

concentrações benzeno utilizadas para a determinação desta dosagem foram 0,586; 0,686; 0,786; 0,886; 0,986; 1,886; 2,886; 3,886; 4,886; e 5,886 mL de benzeno, utilizadas como parâmetro para as concentrações subseqüentes de tolueno e xileno, na proporção de 10:5:1 (GOBATO e LANÇAS, 2001). A dosagem letal foi a de 4,886 mL de benzeno, e conseqüentemente 2,467 mL de tolueno e 0,496 mL de xileno.

2.3 Bioensaios com dose subletal de BTX

Os bioensaios foram realizados contaminando-se os dois aquários experimentais de 75L de água, cada um contendo 10 peixes aleatoriamente escolhidos, com a dose subletal de BTX compreendendo 4,386mL de benzeno, 2,215mL de tolueno e 0,445mL de xileno, determinada por uma redução na quantidade dos compostos classificados anteriormente como letais. O aquário controle foi mantido sem contaminação. As condições abióticas dos aquários experimentais e do controle foram idênticas às da aclimação, incluindo alimentação dos grupos experimentais e controles, uma vez ao dia, com camarões frescos.

Após 4 e após 7 dias de exposição ao contaminante BTX, dez peixes controle e dez peixes experimentais foram sacrificados após secção medular. Quatro porções do fígado foram retiradas de cada peixe: uma delas foi fixada para microscopia eletrônica de transmissão, outra para microscopia de luz, e outras duas porções foram imediatamente, congeladas em nitrogênio líquido para a avaliação da LPO e das atividades da EROD, CATALASE e GST.

2.4 Análises bioquímicas de enzimas hepáticas

Uma porção do fígado foi homogeneizada e o sobrenadante diluído na concentração 1: 10 em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5 e adicionado NaCl 0,1M. As amostras homogeneizadas em tampão TRIS foram centrifugadas a 10.000 x g (gravidade) por 20 minutos para a extração da fração S₉. A atividade da **EROD** (7-etoxiresorufina-O-deetilase) foi determinada com base na metodologia descrita por

Burke e Mayer (1974) e modificada por Silva de Assis (1998). A concentração de substrato 7-etoxirresorufina utilizada foi de 2,6 μ M em tampão TRIS-NaCl (7 ER). A amostra e o tampão 7 ER foram incubados por 5 minutos por 27°C. Em seguida, 30 μ L de NADPH (2,6mM) foram adicionados e a fluorescência foi determinada usando-se um espectrofluorímetro Shimadzu com comprimentos de onda de 530/590 nm de excitação/extinção, com abertura da fenda de luz de 3mV durante 10 minutos. A atividade enzimática da EROD foi expressa em pmol. min⁻¹. mg prot⁻¹.

A atividade da **GST** (Glutathione S-Transferase) foi determinada de acordo com o método descrito por Habig *et al.* (1974) e Habig e Jacoby (1981). A mistura da reação continha 2,0mM de GSH (glutathione reduzida), tampão fosfato e 2,5mM de 1-cloro-2,5mM dinitrobenzeno (CDNB) dissolvido em 1,0 ml de etanol 100% . Uma alíquota de 100 μ L de amostra foi incubada em 200 μ L da mistura de reação, durante 3 minutos a 25° C para a leitura no espectrofotômetro TECAN, em comprimento de onda de 340nm, durante 1 minuto. A atividade enzimática da GST foi expressa em nmol. min⁻¹. mg prot⁻¹.

A atividade da **CATALASE** foi determinada pelo consumo direto de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), baseada no método de Aebi (1974). Em temperatura ambiente, 1mL de amostra foi diluído na proporção 1:10. A reação foi realizada utilizando-se tampão fosfato 0,1M, pH 6,5 e 40mM de H₂O₂ (30%) como substrato. O decréscimo na absorbância foi medido com leituras espectrofotométricas a 240nm em intervalos de 60seg. A atividade enzimática da catalase foi expressa em mmol. min⁻¹. mg prot⁻¹.

A outra porção do fígado foi homogeneizada em metanol 90%, pH 6,5, sonicada e centrifugada 200 x por 15 minutos a 4°C para a extração da fração S₉. A atividade do **LPO** (Hidroperóxido Lipídico) foi determinada pelo método de FOX (Ferrous Oxidation-Xylenol Orange) como descrito por Jiang *et al.* (1992). O método FOX é baseado na oxidação do Fe²⁺ (sulfato ferroso amoniacal) a Fe³⁺ pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de um pigmento complexador de Fe (III), o alaranjado de xilenol. A amostra de 30 μ L foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente, com 270 μ L de mistura reativa contendo 1mL de alaranjado de xilenol, 250 μ M de FeSO₄, 25mM de H₂SO₄ e 4mM de butilato hidroxitolueno metanol 90%. As leituras foram realizadas em 560nm no espectrofotômetro TECAN. Os resultados foram expressos em mmol de hidroperóxido. mg prot⁻¹.

Para determinação da concentração proteica, a medição da quantidade de proteína nas amostras baseou-se no método espectrofotométrico de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina bovina com padrão.

2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos nas análises enzimáticas foram expressos como média \pm erro padrão da média, obtidos após realizar o teste de Barlett's e posteriormente, analisados estatisticamente por ANOVA de uma via, seguido da prova de Tukey, com significância estatística quando $p < 0,05$.

2.6 Análises microscópicas

Para a microscopia eletrônica de transmissão, as peças foram fixadas em Karnovsky modificado por 4 horas (CULLING *et al.*, 1985), desidratadas em uma série crescente de álcoois (15%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%) e acetona P.A. e incluídas em resina Epon 812 (LUFT, 1961).

Os cortes ultrafinos (50nm), obtidos em ultramicrotomo Leica Ultracut UCT com navalhas de vidro, foram corados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo.

A observação dos cortes foi feita no Microscópio Eletrônico de Transmissão - Jeol JEM 1200 EX2, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, a 80Kv de voltagem acelerante.

Para a microscopia de luz as amostras de fígado foram fixadas em ALFAC (85mL de álcool 80%, 10mL de formol 40% e 5mL ácido acético glacial) por 16 horas, desidratadas em série alcoólica, diafanizadas com xilol e impregnadas e emblocadas com Paraplast Plus (Sigma®).

Os cortes de 3 μ m obtidos com um micrótomo tipo Minot, foram corados com hematoxilina e eosina (CLARK, 1981) e observados e fotografados no microscópio

fotográfico Olympus PM10 AD (Japão) do Laboratório de Biologia Integrativa de Peixes e Impacto Ambiental do Departamento de Biologia Celular da UFPR.

3. RESULTADOS

3.1 Biomarcadores bioquímicos

Os resultados das análises bioquímicas, decorrentes da exposição do baiacu S. testudineus à concentração subletal de BTX durante 4 dias e 7 dias estão apresentados nas Figuras 01 a 04.

Como representado na figura 1, foi observado um aumento significativo na atividade da 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) no tecido hepático de S. testudineus após 4 dias ($680,78 \pm 58,86$) e após 7 dias ($562,25 \pm 28,87$) de exposição ao BTX, quando comparados ao grupo controle ($243,28 \pm 43,63$).

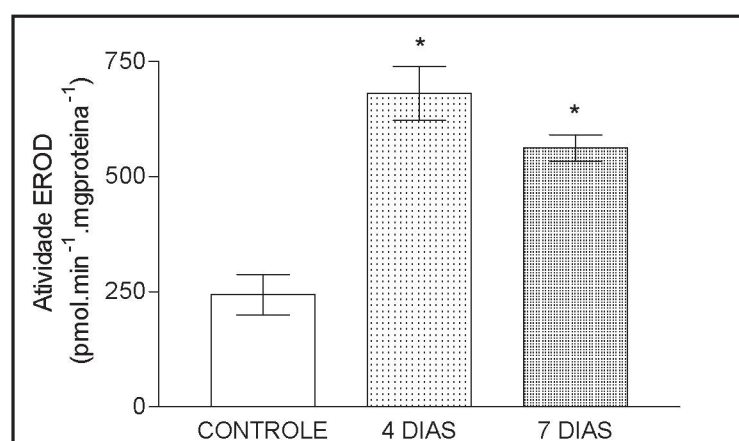


Figura 01: Média \pm erro padrão. Atividade da 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) no fígado do peixe S. testudineus exposto à dose subletal de BTX. (* $p < 0,01$ em relação ao controle)

Não foram observadas diferenças significativas na atividade da enzima catalase ($\text{mmol}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$) no tecido hepático de S. testudineus após 4 dias ($123,10 \pm 22,16$) e 7 dias ($137,93 \pm 7,59$) de exposição ao BTX, quando comparados ao grupo controle ($117,78 \pm 34,88$) (Figura 02).

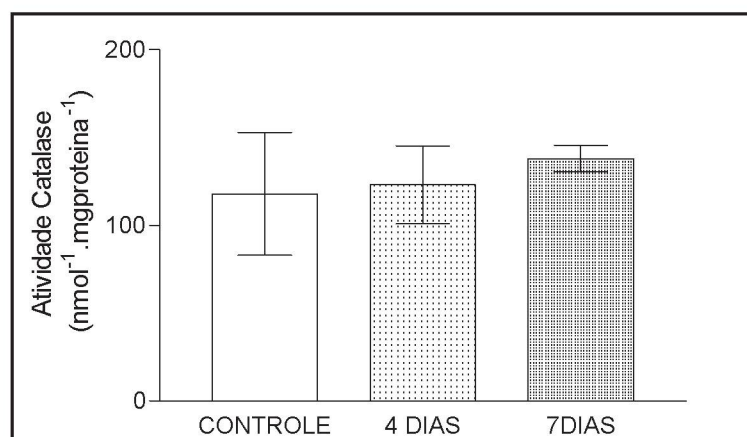


Figura 02: Média \pm erro padrão. Atividade da Catalase no fígado do peixe S. testudineus exposto à dose subletal de BTX

A atividade da enzima da GST ($\text{nmol}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) no tecido hepático de S. testudineus não apresentou diferenças significativas entre o grupo controle ($287,38 \pm 20,07$) e os grupos experimentais de 4 dias ($234,98 \pm 12,26$) e 7 dias ($264,61 \pm 23,96$), após exposição ao BTX (Figura 03).

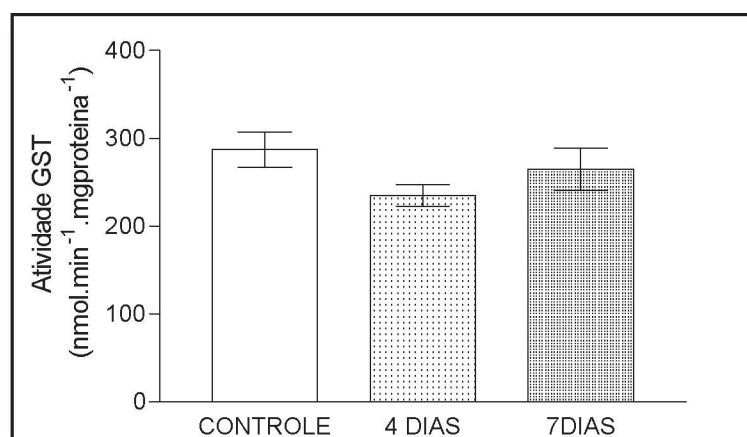


Figura 03: Média \pm erro padrão. Atividade da GST no fígado do peixe S. testudineus exposto à dose subletal de BTX.

Os resultados para os níveis de produção de hidroperóxido ($\text{mmol hidroperóxido} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) no tecido hepático de S. testudineus não foram significativos quando comparados o grupo controle ($4,05 \pm 0,68$) com o experimental de 4 dias ($3,03 \pm 0,18$) e 7 dias ($4,75 \pm 1,84$) de exposição ao BTX (Figura 04).

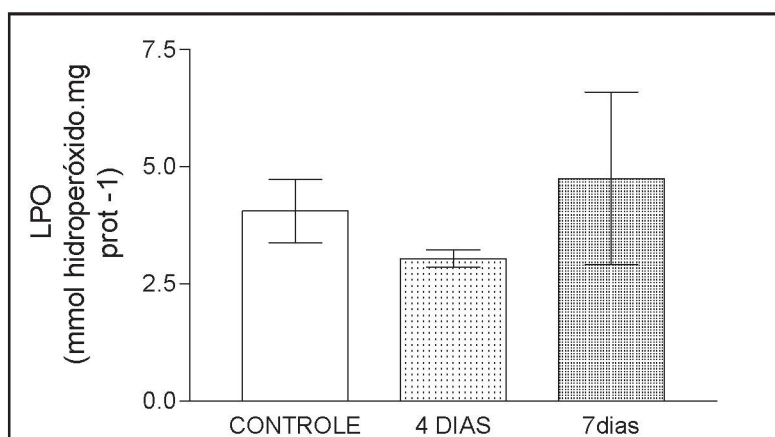


Figura 04: Média \pm erro padrão. Atividade da LPO no fígado do peixe S. testudineus exposto à dose subletal de BTX

3.2 Biomarcadores morfológicos

Vesículas lipídicas (Figura 05-b e 05-d), hepatopâncreas e numerosos cordões de sinusóides existem nos hepatócitos controle de S. testudineus (Figura 05-a).

O complexo de Golgi junto ao núcleo e mitocôndrias distribuídas, geralmente nas porções periféricas das células, também foram observados neste grupo de animais (Figuras 05-c).

Os resultados das alterações ultraestruturais nos hepatócitos, decorrentes de 4 e 7 dias de exposição a uma dose subletal de BTX estão apresentados nas Figuras 06 e 07.

O número de vesículas lipídicas manteve-se elevado em sua quantidade, após 4 dias (Figura 06-a) e 7 dias de exposição ao BTX (Figura 07-e), sendo também nítida a presença de lipídios de reserva neste último período experimental (Figura 07-f).

A estrutura das mitocôndrias estava alterada, após 4 dias de exposição ao BTX (Figura 06-b) e as membranas plasmática e nuclear apresentaram-se nitidamente limitando as estruturas hepáticas (Figura 06-c e 07-e), após 4 dias e 7 dias de exposição ao BTX.

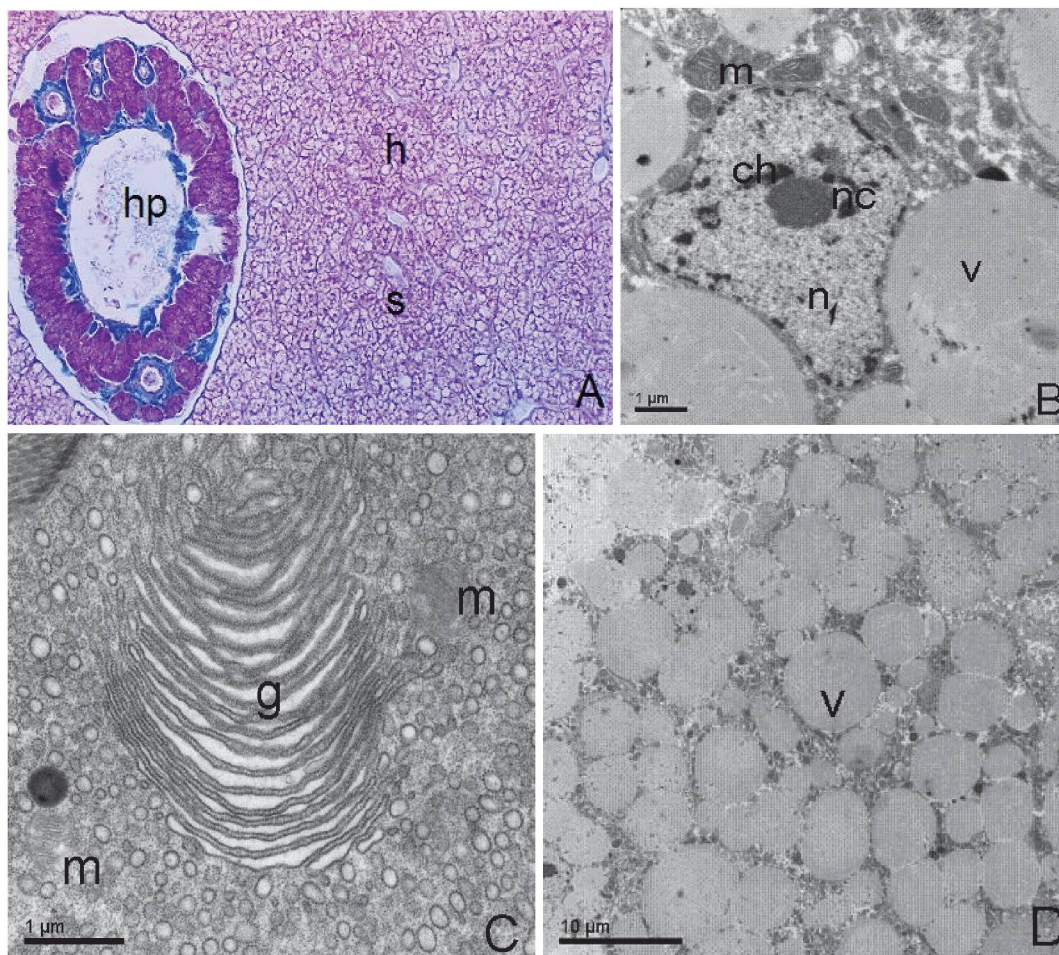


Figura 05: Tecido hepático do peixe *S. testudineus* controle: Hepatócitos (**h**) com hepatopâncreas (**hp**) e cordões de sinusóides evidenciado(**s**) (A); mitocôndrias (**m**) entre as numerosas vesículas lipídicas (**v**) (B, C e D); núcleo poligonal (**n**) com nucléolos (**nc**) e cromatina (**ch**) (B); complexo de golgi (**g**) entre algumas mitocôndrias levemente alteradas (C).

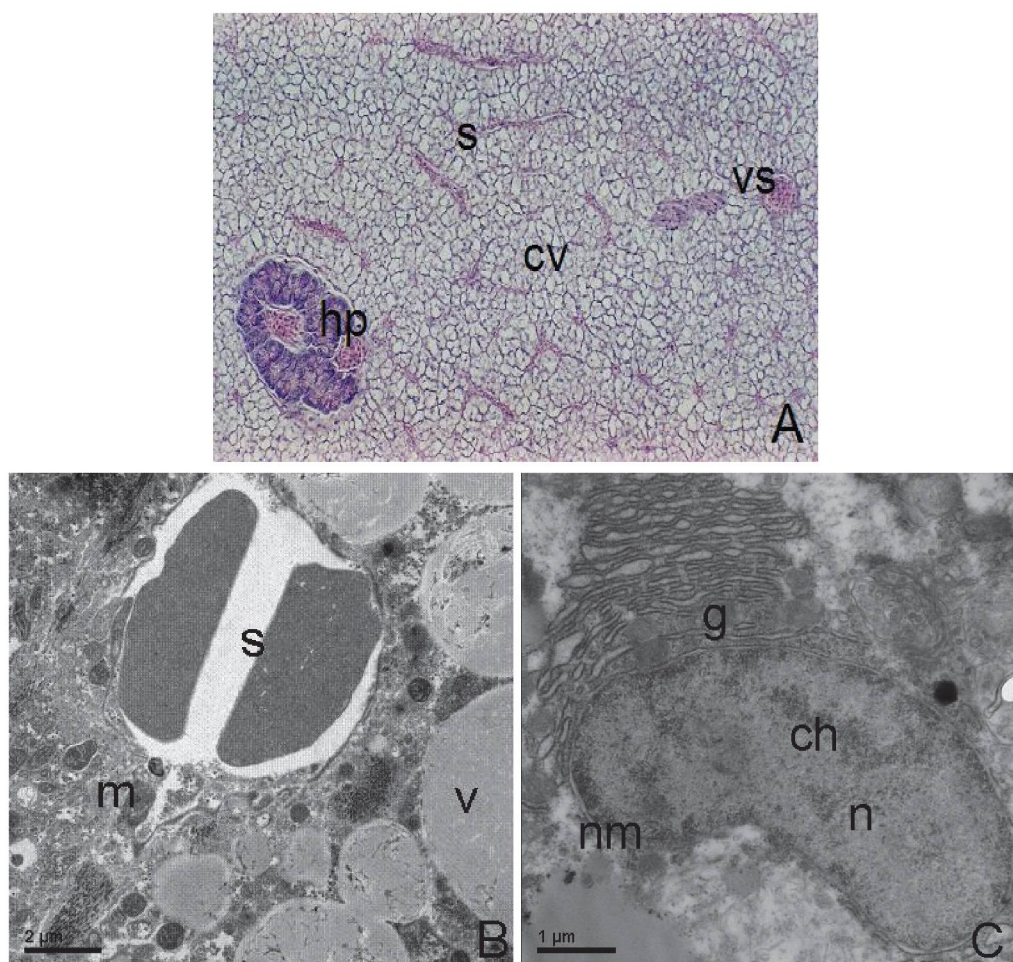


Figura 06: Tecido hepático do peixe *S. testudineus* após 4 dias de exposição ao BTX: Hepatócitos com numerosos sinusóides (**s**), hepatopâncreas (**hp**), vaso sanguíneo (**vs**) e vacuolização intracelular (**cv**) (A); mitocôndria alterada (**m**) entre o sinusóide (**s**) com eritrócito e as vesículas lipídicas (**v**) (B); núcleo com membrana nuclear (**nm**) e cromatina lateralizada (**ch**) e complexo de golgi (**g**) (C).

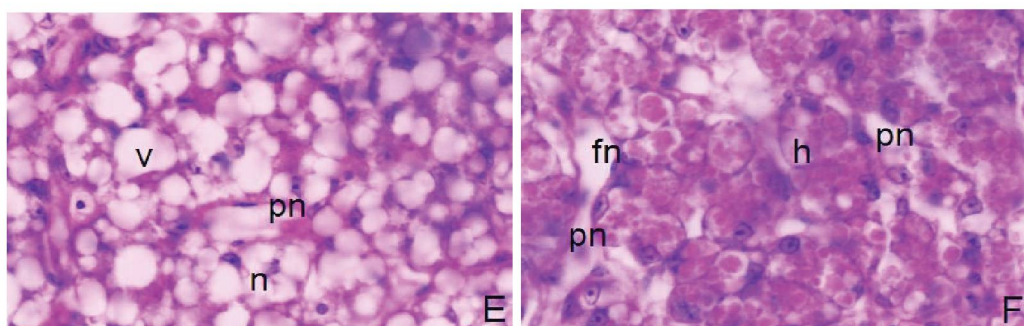


Figura 07: Tecido hepático do peixe *S. testudineus* após 7 dias de exposição ao BTX: Hepatócitos com numerosas vesículas lipídicas (**v**), núcleos periféricos (**n**) e pleomórficos (**pn**) (E); hepatócitos volumosos (**h**) entre os vacúolos lipídicos com focos de necrose (**fn**) e intensa basofilia.

4. DISCUSSÃO

Entre os diferentes tipos de poluentes, o petróleo e seus subprodutos são muito relevantes na ecotoxicologia aquática (PACHECO e SANTOS, 2001a). Além da gasolina que serve de combustível para grande parte dos automóveis que circulam no mundo, vários produtos derivados do petróleo como a parafina, o gás natural, os produtos asfálticos, a nafta petroquímica, o querosene, os solventes, os óleos combustíveis, os óleos lubrificantes, o óleo diesel e os combustíveis da aviação são potenciais contaminantes ambientais.

A contaminação de águas subterrâneas por hidrocarbonetos aromáticos representa sério problema à saúde animal e humana. Benzeno, tolueno e xilenos (BTXs) são freqüentemente encontrados em águas subterrâneas, devido a vazamentos de tanques de estocagem de gasolina (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

Hidrocarbonetos poliaromáticos são comumente encontrados em regiões industrializadas, muitas vezes litorâneas. O Benzo [a] pireno é o hidrocarboneto mais comumente encontrado e pelo seu grande poder carcinogênico tem sido alvo de diferentes programas de monitoramento ambiental (HARRISON *et al.*, 1975). Gravato *et al.* (2006) demonstraram que o Benzo [a] pireno, o Naftaleno e o Reteno aumentaram a atividade da EROD no fígado, após 16 horas de exposição (MARIA *et al.*, 2002, 2005), o que foi corroborado por Kirby *et al.* (2007) para o fígado de Platichthys flesus, após 10 dias de exposição ao PAH - Benzo [a] pireno, assim como para exemplares de Perca fluviatilis, coletados próximos a regiões com derramamento de óleo, após um período de 60 a 90 dias de exposição (LEE e ANDERSON, 2005), e o hidrocarboneto β -naftoflavano – BNF, após 24 horas de exposição em Anguilla anguilla L.

Dois períodos experimentais foram utilizados para a determinação da toxicidade do BTX no nosso trabalho com S. testudineus, sendo que observamos aumento na atividade da EROD, após 4 e 7 dias de exposição, indicando um período relativamente longo, de 96 horas, para que se dê a biotransformação destes PAHs no fígado.

Neste trabalho com S. testudineus não foi observado alteração da GST em nenhum dos períodos estudados. Ahmad *et al.* (2006) descrevem que a GST pode ser potencialmente inibida por interações sinérgicas ou por resposta não específica

de uma substância química concorrente, que no nosso estudo seria a mistura do benzeno, tolueno e xileno. Outros autores descreveram esta relação inversa entre os mecanismos de desintoxicação da fase I e II em invertebrados, após um período máximo de 28 dias (BEBIANNI *et al.*, 2007).

O aumento da atividade da GST nos tecidos pode indicar o desenvolvimento de um mecanismo de defesa aos efeitos tóxicos do BTX. Oreochromis mossambicus expostos a altas concentrações de fenantreno, apresentaram alterações significativas na GST após 7 dias de contaminação (SHAILAJA e D' SILVA, 2003). Prochilodus lineatus expostos a WSD (mistura de água a óleo diesel comercial) apresentaram variação significativa na atividade hepática de GST quando comparado aos grupos controle, após 96 horas e 15 dias (SIMONATO *et al.*, 2007).

A catalase é uma enzima induzível que protege o sistema biológico contra espécies de oxigênio reativo. Oruc *et al.* (2004) descreveram o aumento da atividade da catalase como uma resposta para o aumento do consumo de oxigênio consumido, gerando um aumento potencial na produção de H₂O₂.

S. testudineus não apresentou resposta na atividade da catalase em fígado, após exposição subletal aos hidrocarbonetos BTX. Jifa *et al.* (2006) também demonstraram que não houve significância no aumento de atividade da catalase, após exposição de 6-12 dias no invertebrado mexilhão, exposto ao hidrocarboneto Benzo [a] pireno (B[a]P).

Buet *et al.* (2006) concluíram que em espécies de carpa (Cyprinus carpio), a exposição crônica de agentes químicos induz mecanismos compensatórios de estimulação do mecanismo hepático, com respostas diferentes da atividade antioxidante do fígado, sendo que a catalase é estimulada por alguns compostos, mas inibida por outros (POPs - PAHs com 2 a 3 anéis aromáticos).

Espécies juvenis do peixe Prochilodus lineatus expostos a WSD (mistura de água a óleo diesel comercial) não apresentaram variação significativa na atividade hepática da catalase quando comparadas aos grupos controle, após 6, 24, 96 horas e 15 dias (SIMONATO *et al.*, 2007).

A peroxidação lipídica (LPO) vem sendo apontada como o maior contribuinte para a perda das funções celulares sob condições de estresse oxidante. Vários estudos mostram que a peroxidação lipídica nos organismos aquáticos é induzida por uma variedade de poluentes ambientais (MONTEIRO, 2006). A LPO tende a ser menor em espécies de peixes herbívoros do que em peixes onívoros, o que pode

ser relacionado à baixa atividade da catalase, mas em outra situação esta relação pode ser invertida com a maior atividade da LPO em peixes herbívoros. Quando comparados com outros vertebrados, os peixes apresentam níveis similares de peroxidação (AHMAD *et al.* 2004).

Embora muitos trabalhos relatem altas concentrações de LPO em organismos aquáticos expostos a poluentes e a sedimentos contaminados não observamos alteração significativa da atividade da LPO neste trabalho com S. testudineus, quando os espécimes foram contaminados com BTX. Isto corrobora a idéia de alguns autores (AHMAD *et al.* 2003) que demonstraram que o aumento da atividade da LPO não foi significativo após 08, 16 e 24 horas de exposição ao naftaleno. Embora todos os órgãos possuam resistência similar aos danos peroxidativos, as brânquias têm atividade antioxidante mais ativa que o fígado (AHMAD *et al.* 2006).

Estudos histológicos têm mostrado que hidrocarbonetos específicos provocam uma alta freqüência de neoplasias no tecido hepático de muitas espécies de peixes, indicando que os peixes podem ser suscetíveis a efeitos carcinogênicos desses agentes, nos níveis que podem ser encontrados no meio ambiente (HART *et al.* 1998).

Lesões histopatológicas possivelmente causadas pela presença das substâncias tóxicas no fígado foram observadas neste trabalho, como certa desestruturação do retículo endoplasmático e das mitocôndrias celulares, bem como células inchadas, a presença de núcleos deformados e perda de nucléolos (MARTY *et al.*, 2003).

Após exposição de S. testudineus ao BTX por 7 dias, foram encontradas algumas áreas focais com necrose de hepatócitos, o que após tempos mais prolongados poderia levar a carcinogênese hepática (RODRIGUES e FANTA, 1998).

Lipídios hepatocelulares são comumente justificados como uma importante forma de armazenamento energético para muitas espécies de peixes. A literatura tem documentado que espécies de peixes demersais Sebastes spp expostos a hidrocarbonetos derivados do petróleo apresentaram lipídios hepáticos, com o citoplasma dos hepatócitos contendo quantidades variáveis de vacúolos com aspecto claro e bem demarcado (MARTY *et al.*, 2003).

Após 4 e 7 dias de exposição ao BTX, S. testudineus apresentou neste trabalho, um aumento de vesículas lipídicas nos hepatócitos e mitocôndrias com

volume aumentado, indicando eventuais problemas no metabolismo celular decorrentes da ação deste agente contaminante.

Após 30 dias de exposição aos hidrocarbonetos, espécies de Platichthys flesus L. apresentaram nos hepatócitos um decréscimo da reserva de glicogênio, aumento no número de lipídios e proliferação do retículo endoplasmático rugoso, sugerindo um aumento da síntese proteica das células, mobilização e utilização de lipídio armazenado (REYNOLDS *et al.*, 2003). Khan e Kiceniuk (1983) mostraram que os hepatócitos do bacalhau Atlântico, após 6 semanas de exposição em óleo cru, também apresentaram a presença de vesículas de lipídicas nos hepatócitos.

Segundo Reynolds *et al.* (2003), espécies controle de Platichthys flesus L. coletados na natureza em regiões próximas a bacias petrolíferas apresentaram vesículas lipídicas e glicogênio armazenado no citoplasma dos hepatócitos, retículo endoplasmático e mitocôndria distribuídos na periferia das células e os seus núcleos com heterocromatina marginalizada o que foi corroborado neste trabalho em animais controle.

O baiacu, S. testudineus é uma espécie de peixe nativo que provou ser apropriado para ensaios em laboratório e, para estudos de biomarcadores tanto bioquímicos, quanto histopatológicos.

Das enzimas utilizadas para verificar a reação do S. testudineus à contaminação com doses subletais de BTX, apenas a EROD apresentou uma reação significativa. O efeito da contaminação do fígado de S. testudineus, mesmo em doses subletais, causou desestruturação focal no retículo endoplasmático rugoso dos hepatócitos, e alteração da estrutura das mitocôndrias após 4 dias de exposição ao BTX.

Assim, demonstramos neste trabalho, a necessidade de diversificar as atividades de biomonitoramento ambiental, sugerindo a utilização de biomarcadores bioquímicos e histológicos, como indicadores promissores de impacto em diferentes espécies de peixes nativos da costa brasileira, como o Sphoeroides testudineus.

CAPÍTULO 02

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO FÍGADO E BRÂNQUIAS DO PEIXE Sphoeroides testudineus APÓS CONTAMINAÇÃO SUB LETAL COM O BTX (BENZENO, TOLUENO E XILENO).

RESUMO

Regiões estuarinas apresentam uma grande diversidade faunística e reprodutiva para muitas espécies de peixes, estando suscetíveis a impactos antropogênicos. Espécimes juvenis de Sphoeroides testudineus foram expostos à dose sub letal de 10: 5: 1 de BTX (4.386ml de benzeno, 2.215ml de tolueno e 0.445ml de xileno) por 24, 48, 96 e 168 horas de contaminação. Porções do fígado e arcos branquiais foram extraídos e preparados para as análises morfológicas. No fígado foram observados hepatócitos afetados pela contaminação em todos os períodos experimentais, com aumento de tamanho significativo após 168 horas. Vacúolos lipídicos, núcleos anormais e lateralizados foram observados em todos os períodos de exposição ao BTX e as mitocôndrias inchadas. Nas brânquias foram observadas em todos os períodos experimentais, descolamentos severos das lamelas secundárias, presença não significativa de fusão destas lamelas, assim como de hiperplasias e hipertrofias. Quantidades decrescentes de células de muco foram observadas, após 24, 48 e 96 horas evidenciando a reação do peixe às substâncias xenobióticas, assim como edemas presentes após 168 horas de contaminação. Os resultados indicaram que as doses sub letais de BTX causam alterações histopatológicas no fígado e brânquias que são órgãos fundamentais para a eficiência dos processos metabólicos e fisiológicos dos peixes. Evidencia-se assim, a necessidade de estudos mais abrangentes sobre os efeitos da exposição a xenobióticos ao meio ambiente e principalmente, aos derivados do petróleo que contribuem com grande parte da problemática ambiental atual.

Palavras-chave: Histopatologia, Hidrocarbonetos poliaromáticos específicos, Peixe; Fígado, Brânquias, Microscopia de luz, Microscopia eletrônica, Morfometria.

ABSTRACT

Estuarine regions show a great diversity of fish and are the site of reproduction and development of many species. Anthropogenic impacts are frequent in these regions. Juvenile of Sphoeroides testudineus were exposed experimentally to a sub lethal dose of 4.386 mL/L of benzene, and 2.215 mL/L of Toluene and 0.445 mL/L of xylene, a mixture of these polyaromatic hydrocarbons (BTX) at the proportion of 10:5:1. After 24, 48, 96 and 168 hours of contamination, liver and gills were extracted and prepared for morphological analyses. The liver was affected by BTX at all times of exposure, showing an increased number of lipid vacuoles, abnormal and lateral nuclei and swollen mitochondria. The size of hepatocytes increased significantly after 168 hours of exposure. At all times gills presented a higher level of severe epithelial detachment at secondary lamellae, if compared to the control fish. After 168 hours, oedema was observed. Lamellar fusion, hypertrophy and hyperplasia were not significantly higher in experimental fish. The number of goblet cells decreased steadily along the experimental times. Results indicated that even in sub lethal levels BTX causes histopathologies of liver and gills, which are important organs for the metabolism and physiology of fish. This shows the need for more studies of the effects of exposure of native fish to xenobiotics in the environment, such as derivatives of petrol.

Key words: Histopathology; Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH); Fish, Liver; Gill; Optical microscopy, Transmission electron microscopy; Morphometry.

1. INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos Poliaromáticos Específicos (PAHs) são importantes poluentes ambientais pela sua onipresença e carcinogenicidade, sendo os mais tóxicos dentre a família dos hidrocarbonetos. Possuem alto peso molecular, baixa volatilidade e solubilidade (TUVIKENE, 1995). Como resposta ao crescente processo de industrialização, a presença de PAHs no ambiente pode ser observada na superfície da água ou no solo, causando sérios riscos tóxicos para espécies de invertebrados aquáticos ou terrestres, assim como em vertebrados, especificamente nos mamíferos (BROWN, 2004).

Muitos poluentes aquáticos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e suas formas halogenadas são quimicamente estáveis e, devido sua natureza lipofílica podem facilmente penetrar nas membranas biológicas e se acumular nos organismos. A biotransformação do xenobiótico em peixes é o maior determinante da toxicidade, distribuição e habilidade de ser excretado. São absorvidos, durante a exposição a alimentos contaminados, água e sedimento apresentam-se em altas concentrações nos sedimentos, médias concentrações na biota aquática e, baixas na coluna de água (TUVIKENE, 1995).

Dentre os hidrocarbonetos poliaromáticos específicos, o benzeno, o tolueno e o xileno (BTX) constituem um importante volume da produção de petróleo nas refinarias, compondo derivados de importância econômica e social como a gasolina (CUNHA e LEITE, 2000).

Os ecossistemas estuarinos são importantes para a reprodução e desenvolvimento de várias espécies de peixes, os quais geralmente possuem alta capacidade de adaptação às variações abióticas características destes ambientes. Geralmente, vulneráveis à presença de compostos xenobióticos, estas regiões têm apresentado níveis crescentes de contaminação como consequência das atividades antropogênicas, seja através de resíduos industriais e urbanos, deposição atmosférica ou drenagem terrestre (KENNISH, 1992; ROCHA *et al.*, 2002; SHAILAJA e CLASSY D'SILVA, 2003; FERNANDES *et al.*, 2006).

Os tetraodontídeos habitam as regiões tropicais de todos os oceanos e mais especificamente as regiões estuarinas, sendo que o Sphoeroides testudineus

Linnaeus, 1758 (baiacu pintado) encontra-se tanto em canais do manguezal, chamados de gamboas, como nas planícies de maré adjacentes, com água em diferentes salinidades (PRODOCIMO e Freire, 2001).

Análises histopatológicas têm sido reconhecidas como ferramentas muito úteis no estudo e diagnóstico dos efeitos agudos e crônicos de poluentes em teleósteos (FANTA *et al.*, 2003; OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2005). Características histopatológicas de órgãos alvos específicos podem expressar condições ambientais e representar o tempo de exposição aos quais estão submetidos os organismos (SCHMALZ *et al.*, 2002). Sendo assim, aparecem como uma resposta a estressores subletais fornecendo um método rápido na avaliação do comprometimento de tecidos e órgãos de espécimes expostos a agentes químicos estressores (JOHNSON *et al.*, 1993).

O fígado é o principal órgão com potencial de biotransformação, bioativação e excreção de xenobiontes sendo, portanto um dos principais órgãos alvos que podem refletir a exposição aos contaminantes (BERNET *et al.*, 1999; FANTA *et al.*, 2003). As brânquias exibem extensas superfícies que estão em contato com o ambiente externo. Estas possuem células na sua estrutura que desempenham um importante papel na proteção do epitélio a substâncias tóxicas e patogênicas, bem como na fisiologia da osmorregulação além do papel na troca de gases (BERNET *et al.*, 1999; FANTA *et al.*, 2003).

Considerando a constância de acidentes ambientais envolvendo óleos como produtos destilados do petróleo e, a crescente necessidade de aquisição de informações biológicas básicas relacionadas às conseqüências histopatológicas da exposição de contaminantes em organismos aquáticos. Neste trabalho foram avaliadas as alterações histológicas do fígado e brânquias em Sphoeroides testudineus, após exposição subletal aos hidrocarbonetos benzeno, tolueno e xileno (BTX), buscando assim, informações que contribuam para o conhecimento do efeito deste composto nesta espécie de peixe tropical e estuarina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de coleta

Os exemplares de Sphoeroides testudineus utilizados neste trabalho foram coletados em dois pontos próximos a Baía de Guaratuba, inicialmente, na região estuarina do Rio Saí Mirim e posteriormente, na Barra do Saí no litoral norte de Santa Catarina (25° 12' 44 "S, 48° 01' 15"W) (SOUZA, *et. al.*, 2001).

A Baía de Guaratuba apresenta marisma, gamboas (canal de manguezal) e planícies de maré; a abundância e a diversidade de peixes em regiões estuarinas e lagunares estão relacionadas diretamente à salinidade, que é um fator que varia sazonal e diariamente (SAENGER e McIVOR, 1975).

A salinidade no local de coleta varia amplamente com o ciclo das marés, embora nos pontos de coleta e em períodos pré-estabelecidos esta variação não tenha sido tão evidenciada: 34 ‰.

2.2 Peixes experimentais

A espécie estuarina escolhida para este estudo foi o Sphoeroides testudineus Linnaeus, 1758, da família Tetraodontidae que engloba os peixes conhecidos vulgarmente como baiacus. Habitam abundantemente as baías e os estuários, ao longo de toda a costa brasileira. São espécies tolerantes a baixas salinidades (FIGUEIREDO e MENEZES, 2000), bem como se adaptam facilmente a condições de tanques e laboratórios.

Exemplares juvenis de Sphoeroides testudineus com aproximadamente 12 cm de comprimento e 50g de peso foram coletados na Barra do Saí, litoral norte de Santa Catarina (Brasil), utilizando-se da pesca artesanal com linha e anzol, durante a maré de enchente.

Os peixes foram aclimatados por um período de sete dias no Laboratório de Biologia Integrativa de Peixes (BioPx) da Universidade Federal do Paraná - UFPR, baseado em experiência prévia pessoal com a espécie, sob condições abióticas

controladas e constantes: fotoperíodo (12 horas Luz/ 12 horas Escuro), salinidade (34 ‰), temperatura (25°C) e aeração constante, em aquários de 75 litros, abastecidos com água marinha do local de coleta.

2.3 Determinação do LC₅₀ para o Benzeno

Para determinação da dose subletal do BTX foram realizados 10 bioensaios com a contaminação pelo benzeno, determinante das concentrações de tolueno e xileno (GOBATO e LANÇAS, 2001). Em cada um deles, após aclimação, 20 exemplares foram separados aleatoriamente como grupo controle e 20 peixes foram separados em dois grupos experimentais com dez peixes cada. Os dois grupos experimentais foram contaminados com uma fração dos hidrocarbonetos que foi misturada nos aquários até que fosse determinada a dosagem subletal. As concentrações benzeno utilizadas para a determinação desta dosagem foram 0,586; 0,686; 0,786; 0,886; 0,986; 1,886; 2,886; 3,886; 4,886; e 5,886 mL de benzeno, utilizadas como parâmetro para as concentrações subseqüentes de tolueno e xileno, na proporção de 10:5:1 (GOBATO e LANÇAS, 2001). A dosagem letal foi a de 4,886 mL de benzeno, e conseqüentemente 2,467 mL de tolueno e 0,496 mL de xileno.

2.5 Coleta do material

Após 24, 48, 96 e 168 horas de exposição ao contaminante BTX, dez peixes controle e dez peixes experimentais de cada grupo foram sacrificados após secção medular. Uma porção do fígado e outra das brânquias foram retiradas de cada peixe, sendo que cada uma destas porções foi fixada para microscopia eletrônica de transmissão e a outra para microscopia óptica, no Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná.

A manipulação do BTX, como agente tóxico foi feita com os cuidados requeridos nas análises laboratoriais, após os períodos experimentais, todos os tecidos orgânicos não utilizados e água recolhida dos aquários foram devidamente etiquetados e direcionados para a coleta de lixo tóxico da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Cuidados com a assepsia do material e aquários foram essenciais para o sucesso dos experimentos, todos os aquários foram reformados com a acoplagem de filtros internos e melhor sistema de oxigenação da água, garantindo assim a sobrevivência e melhor aclimação dos animais, sendo que antes da contaminação dos aquários os filtros foram retirados para evitar a perda dos contaminantes.

2.6 Processamento para microscopia

Para a microscopia eletrônica de transmissão, as peças foram fixadas em Karnovsky modificado por 4 horas (CULLING *et al.*, 1985), desidratadas em uma série crescente de álcoois (15%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%) e acetona P.A. e incluídas em resina Epon 812 (LUFT, 1961).

Os cortes ultrafinos (50nm), obtidos em ultramicrotomo Leica Ultracut UCT com navalhas de vidro, foram corados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo.

A observação dos cortes foi feita no Microscópio Eletrônico de Transmissão - Jeol JEM 1200 EX2, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, a 80Kv de voltagem acelerante.

Para a microscopia de luz as amostras de fígado foram fixadas em ALFAC (85mL de álcool 80%, 10mL de formol 40% e 5mL ácido acético glacial) por 16 horas, desidratadas em série alcoólica, diafanizadas com xilol e impregnadas e emblocadas com Paraplast Plus (Sigma®).

Os cortes de 3 μ m obtidos com um microtomo tipo Minot, foram corados com hematoxilina e eosina (CLARK, 1981) e observados e fotografados no microscópio fotográfico Olympus PM10 AD (Japão) do Laboratório de Biologia Integrativa de Peixes e Impacto Ambiental do Departamento de Biologia Celular da UFPR.

2.7 Morfometria

Os tecidos hepático e branquial foram analisados em um grupo de dez animais controle e dez animais de cada um dos quatro grupos experimentais sendo que, as estruturas foram analisadas a partir de fotos de 10,0 x 15,0 cm, aonde foram feitas as contagens histopatológicas, e posteriormente, a conversão na escala fotomicroométrica (μm).

O tecido hepático foi analisado através da contagem e medida das estruturas, em um quadrante pré-estabelecido dentro das fotos, com medida de 8,0 x 8,0 cm, onde foram contados: núcleos normais e anormais e o tamanho de hepatócitos. O tecido branquial foi analisado em um grupo de dez lamelas (Fotomicroscópio Olympus-Aumento: 400x). Nestas contagens foram observados a quantidade de descolamentos de epitélios caracterizado pelo descolamento de células epiteliais na lamela secundária, sendo os mesmos classificados como leves (1.0-5.0 μm) e severos (6.0-10.0 μm); quantidade de células de muco e de fusões lamelares; quantidade de hiperplasias e hipertrofias.

2.8 Análise estatística

Medidas e contagens morfométricas dos tecidos hepáticos e branquiais foram trabalhados através do programa estatístico (GraphPad Prism 3.0)

Os resultados obtidos nas análises enzimáticas foram expressos como média \pm erro padrão da média, obtidos após realizar o teste de Barlett's e posteriormente, analisados estatisticamente por ANOVA de uma via, seguido da prova de Tukey, com significância estatística quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Histologia hepática

Os resultados das análises histológicas no fígado de *S. testudineus*, após 24, 48, 96 e 168 horas de exposição à concentração sub letal de BTX foram analisados, estatisticamente e morfologicamente, segundo a maior incidência de lesões em cada grupo de animais experimentais em relação aos controles (Figuras 01 e 02).

Os hepatócitos apresentaram um aumento em seu tamanho, caracterizado como inchaço, após 168 horas ($20,90 \pm 1,52$) de exposição ao BTX, quando comparados ao controle ($13,60 \pm 0,97$) (Fig. 01). Este aumento de volume também foi evidenciado na morfologia em todos os períodos experimentais e controle, sendo que nos animais controle foram evidenciados hepatócitos regularmente dispostos com núcleos poligonais e periféricos (Fig. 03–a) com cromatina laterizada (Fig. 03-b).

Após 96 e 168 horas de exposição aos hidrocarbonetos, os hepatócitos apresentaram-se totalmente inchados, embora a membrana celular limitando os mesmos tenha se mantido íntegra e com aspecto de normalidade. Observaram-se ainda nestes períodos experimentais, uma proliferação do retículo endoplasmático liso e nítida desorganização do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 03-f).

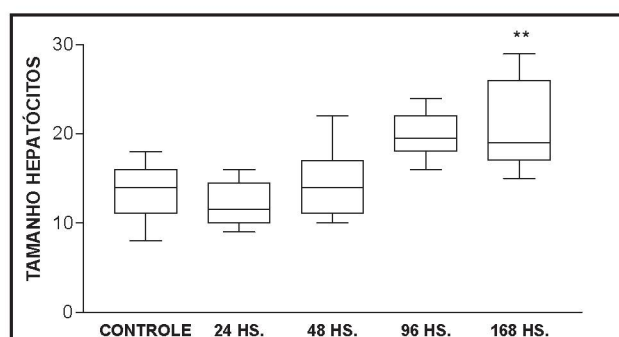


Figura 01: Tamanho dos hepatócitos em espécimes de *S. testudineus* exposto à dose subletal de BTX. (** $p < 0.001$ em relação ao controle) (GraphPad Prism 3.0).

Núcleos arredondados e centralizados foram classificados como normais e constituíram a maior parte nos animais controle ($62,90 \pm 2,05$), quando comparados

aos animais experimentais, após 24, 48, 96 e 168 horas ($6,70 \pm 0,51$; $6,60 \pm 0,58$; $4,10 \pm 0,82$; $3,90 \pm 1,00$).

Núcleos classificados como anormais apresentaram-se alongados ou distribuídos irregularmente na periferia dos hepatócitos de animais expostos a 48, 96 e 168 horas ($41,00 \pm 2,14$; $54,60 \pm 4,13$; $73,30 \pm 3,01$) de exposição ao BTX quando comparados aos animais controles ($12,00 \pm 1,18$) (Fig. 02). Morfologicamente, os hepatócitos corroboraram estas análises (Figuras 03-c, 03-d, 03-e, 03-g e 03-h).

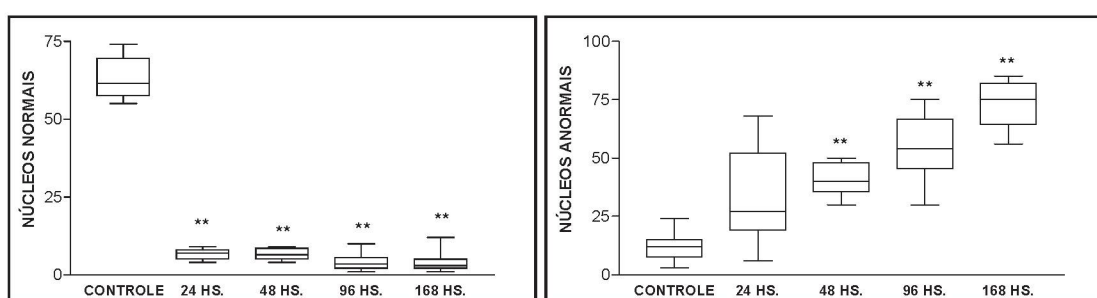


Figura 02: Quantidade de núcleos normais e anormais nos hepatócitos de S. testudineus exposto à dose subletal de BTX. (** $p < 0.001$ em relação ao controle) (GraphPad Prism 3.0).

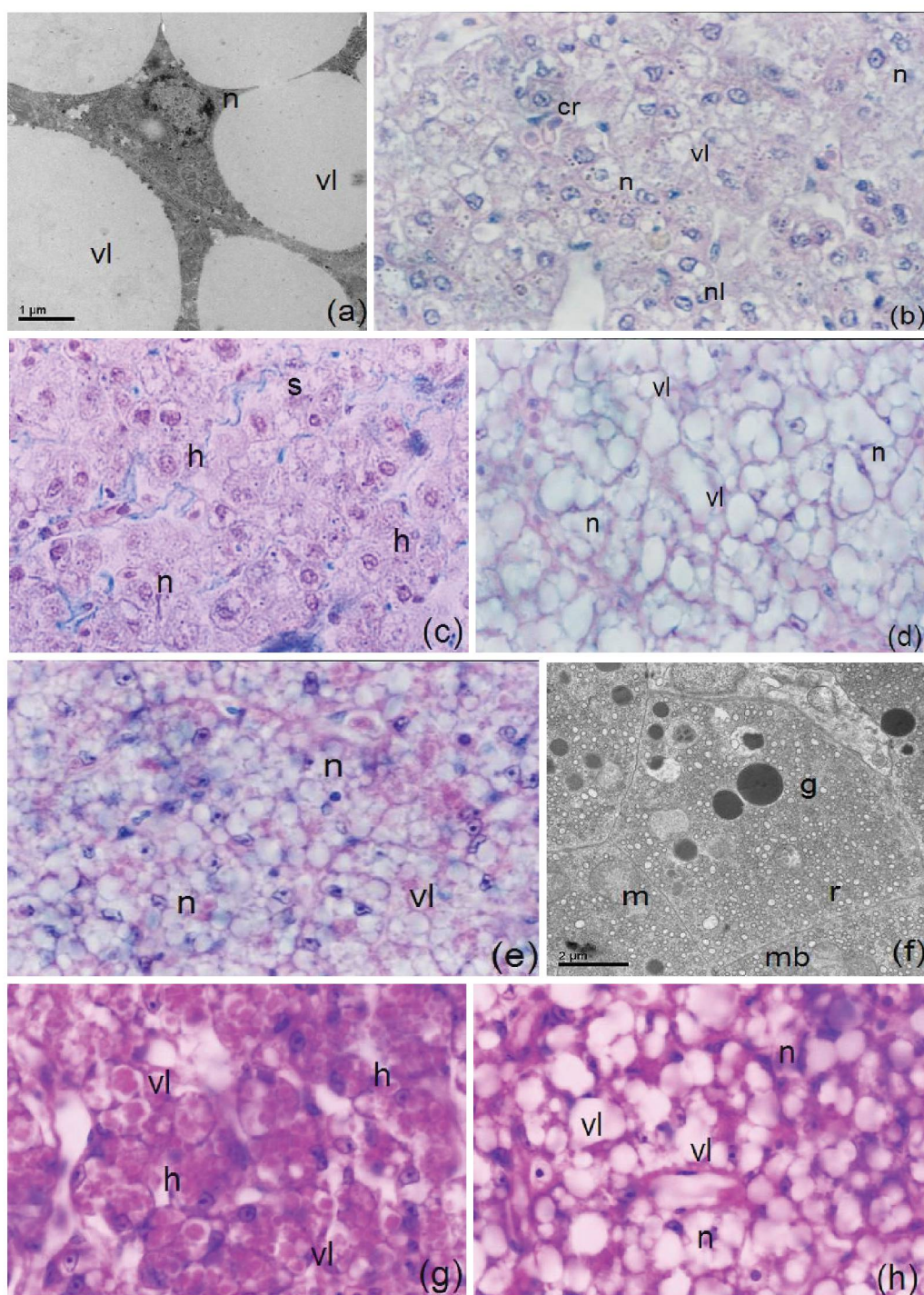


Figura 03: Histopatologia do tecido hepático do peixe *S. testudineus* controle (a) e (b) com cromatina (**cr**) lateralizada (**nl**); cordões de sinusóides (**s**) e hepatócito (**h**) evidenciados, após 24 horas de exposição ao BTX (c); núcleos (**n**) lateralizados entre as vesículas lipídicas (**vl**), após 48 horas (d); após 96 horas (e) e (f) hepatócitos com glicogênio (**g**) evidente e mitocôndrias inchadas (**m**); após 168 horas de exposição (g) e (h) numerosos vacúolos lipídicos (**vl**) com núcleo poligonal (**n**) e nucléolos.

3.2 Histologia branquial

Os resultados das análises histológicas nas brânquias de S. testudineus, após a exposição à concentração subletal de BTX durante 24, 48, 96 e 168 horas foram analisados, estatisticamente, segundo a maior incidência de lesões em cada grupo de animais experimentais em relação aos controles (Figuras 04 a 06).

O tecido branquial não apresentou diferença significativa na quantidade de descolamentos leves em todos os períodos experimentais, descritos em ordem crescente ($1,70 \pm 0,50$; $1,80 \pm 0,64$; $2,00 \pm 0,68$; $2,80 \pm 0,64$), quando comparados ao controle ($1,30 \pm 0,53$). Um significativo aumento na quantidade de descolamentos severos foi observado, após 96 e 168 horas ($4,50 \pm 0,85$; $5,30 \pm 0,59$), quando comparados ao controle ($0,10 \pm 0,1$) (Fig. 04).

Os resultados das análises morfológicas no tecido branquial de S. testudineus, após a exposição à concentração sub letal de BTX durante 24, 48, 96 e 168 horas (Figura 07) foram corroborados com as análises estatísticas. As lamelas secundárias apresentam-se normalmente dispostas em animais controle com presença de hemáceas nas lamelas garantindo a eficiência nas trocas gasosas dos animais com o meio. Descolamentos classificados como leves foram encontrados nas lamelas secundárias de alguns animais coletados da natureza e suscetíveis aos diferentes impactos antropogênicos.

Descolamentos severos foram inicialmente observados após 48, 96 e 168 horas de exposição aos hidrocarbonetos (Figs. 07-d, e, f e i).

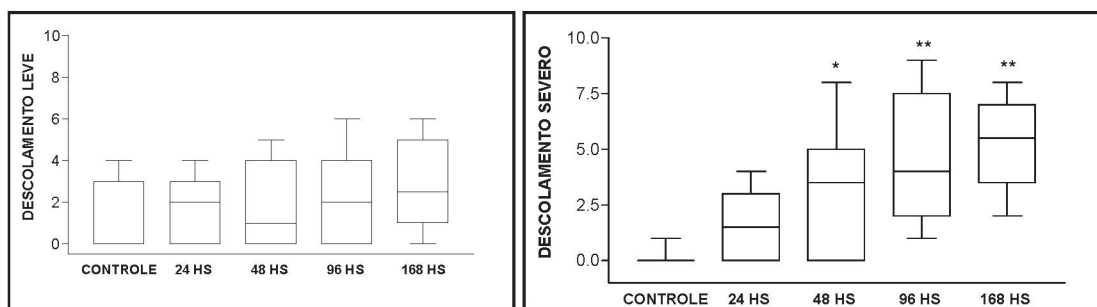


Figura 04: Quantidade de descolamentos leves e severos nas lamelas branquiais de S. testudineus exposto à dose subletal de BTX. (** $p < 0.05$; $p < 0.001$ em relação ao controle) (GraphPad Prism 3.0).

Não foram observadas diferenças significativas na quantidade de fusões entre duas ou mais lamelas respiratórias, após 24 horas ($0,30\pm 0,21$), 48 horas ($0,60\pm 0,40$), 96 horas ($0,70\pm 0,47$) e 168 horas ($1,00\pm 0,51$), quando comparados ao grupo controle ($0,00\pm 0,00$).

Após 24, 48 e 96 horas ($61,80\pm 4,60$; $51,30\pm 6,08$; $43,50\pm 3,53$) não foram observadas diferenças significativas na quantidade de células de muco presentes nas lamelas respiratórias; após 168 horas observamos um decréscimo significativo na quantidade de células de muco ($43,10\pm 5,31$), quando comparados ao controle ($65,90\pm 7,68$) (Fig. 05).

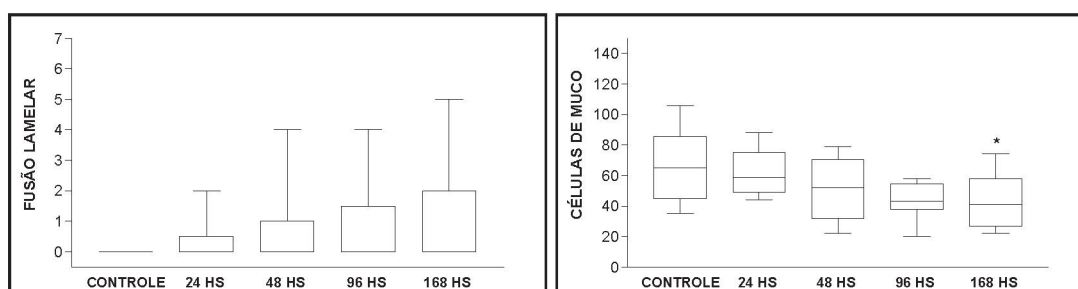


Figura 05: Quantidade de fusões lamelares e de células de muco nas lamelas branquiais de *S. testudineus* exposto à dose subletal de BTX. (* $p < 0.001$ em relação ao controle) (GraphPad Prism 3.0).

Poucos animais apresentaram fusão entre as lamelas respiratórias, hipertrofia ou hiperplasia no epitélio branquial (Figs. 06-g e 06-k), ao contrário com o início do período experimental até o seu período máximo, foram observados enrugamentos do epitélio das lamelas secundárias, internamente, formando edemas na membrana basal (Fig. 06-j).

Embora, estatisticamente, apenas após 168 horas de exposição dos animais ao BTX, foi observado morfológicamente, acentuado decréscimo na quantidade de células de muco (Fig. 06).

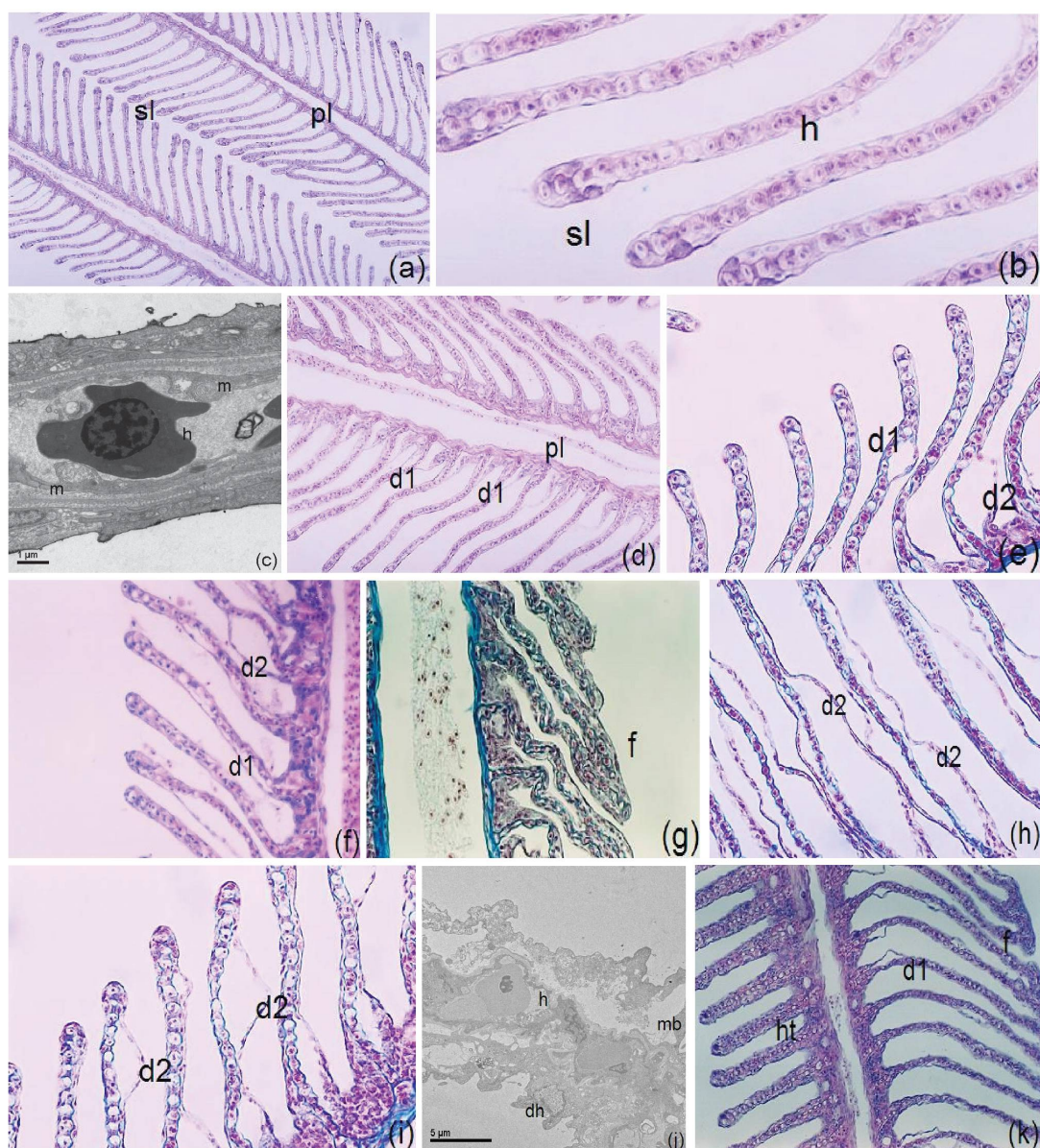


Figura 06: Histopatologia do tecido branquial do peixe *S. testudineus* controle (a) e (b); após 24 horas de exposição ao BTX (c) e (d); após 48 horas (e) e (f); após 96 horas (g) e (h) e após 168 horas de exposição (i), (j) e (k): Lamela primária (**pl**); lamela secundária (**sl**); hemáceas (**h**); hemácia com deformação (**dh**); mitocôndria (**m**); descolamento leve (**d1**); descolamento severo (**d2**); fusão lamelar com características hiperplásicas; (**f**), edema abaixo do epitélio (**mb**) e características hipertróficas das células epiteliais (**ht**).

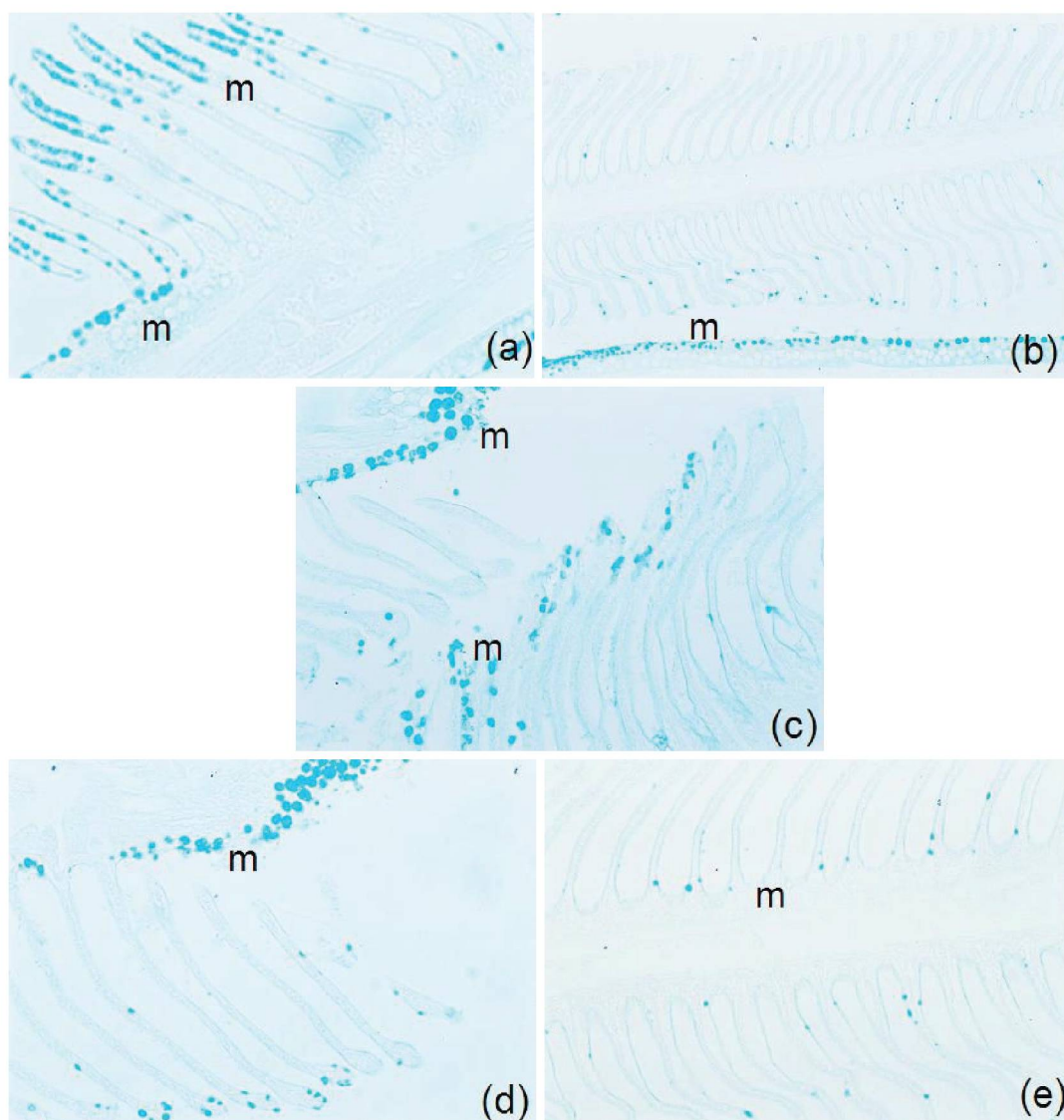


Figura 07: Histopatologia do tecido branquial do peixe *S. testudineus* evidenciando células secretoras de muco (**m**): nos animais controle (a); após 24 horas (b); 48 horas (c); 96 horas (d) e após 168 horas de exposição (e) ao BTX.

4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos têm aumentado a preocupação sobre a possível degradação do meio ambiente aquático por poluentes químicos e, a conseqüente necessidade de aumentar os esforços para compreender os efeitos da exposição de diferentes contaminantes ambientais nos organismos aquáticos (REYNOLDS *et al.*, 2003).

Testes laboratoriais com níveis sub letais de poluentes são recomendados por alguns autores por indicarem as primeiras contaminações em peixes, ocorrendo usualmente em nível celular e subcelular, assim como por serem bons indicadores de toxicidade (FANTA *et al.*, 2003).

A maior parte dos organismos vivos tem pequena habilidade para metabolizar xenobióticos (TUVIKENE, 1995). Os peixes têm um grande número de mecanismos para impedir a acumulação de muitas substâncias no organismo, e após exposição a tóxicos potentes, um número de caminhos bioquímicos são induzidos a detoxificar e excretar os compostos estranhos (JOBLING, 1995). Alguns parâmetros biológicos podem ser usados para exame dos efeitos subletais de diferentes poluentes no metabolismo dos organismos marinhos, como efeitos morfológicos e alterações bioquímicas (ANDERSON, 1979; REYNOLDS *et al.*, 2003).

Como o fígado dos peixes exerce uma função básica na conversão dos alimentos, armazenamento de compostos de reserva, biotransformação e detoxificação de compostos antropogênicos (KÖHLER e PLUTA, 1995), uma disfunção de grandes áreas deste tecido pode alterar a saúde dos espécimes, assim como suas habilidades reprodutivas (ROUSSEAUX *et al.*, 1994).

As brânquias são estruturas vitais para a saúde dos peixes, pois além de serem o principal ponto de trocas gasosas, também estão envolvidas nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de compostos nitrogenados. Portanto, qualquer alteração nessas estruturas certamente comprometerá a sobrevivência dos peixes (LEONARDO *et al.*, 2001).

Mudanças histopatológicas em peixes expostos a óleo bruto, incluem o aumento no número de células epiteliais produtoras de muco, dilatação capilar, hiperplasia lamelar e fusão de filamentos adjacentes nas brânquias. Formação de

microvesículas nos hepatócitos do fígado, atraso na espermatogênese com células multinucleadas ultratubulares e, um aumento de centros de melanomacrófagos no baço e nos rins (KHAN e KICENIUK, 1983).

Cinco períodos experimentais foram utilizados neste trabalho para a determinação da toxicidade do BTX com Sphoeroides testudineus, sendo que foram identificadas algumas lesões histopatológicas causadas pela presença das substâncias tóxicas no fígado e nas brânquias.

Após 168 horas de exposição ao BTX, o fígado de S. testudineus apresentou um aumento no tamanho dos hepatócitos e alterações morfológicas do núcleo, corroborando a idéia de alguns autores que demonstraram um aumento no volume das células hepáticas e dos núcleos, como respostas do organismo a exposição sub letal com a espécie Prochilodus lineatus ao óleo diesel. Sendo que, esta hipertrofia é causada pela proliferação de membranas endoplasmáticas, após exposição longa a hidrocarbonetos poliaromáticos específicos (PAHs) (NERO *et al.*, 2006; SIMONATO *et al.*, 2007).

O processo de vacuolização lipídica alterando a morfologia dos hepatócitos foi observado em todos os períodos experimentais deste trabalho e processo também observado por alguns autores, após a exposição de Perca flavescens e Carassius auratus aos PAH. Estes afirmaram que este processo é decorrente da abundância de reservas lipídicas e de glicogênio, demonstrado na microscopia eletrônica como uma extrema dilatação do espaço perinuclear, comumente observada em outros tipos celulares de vertebrados superiores, em resposta ao estresse da exposição química (STEHR e MYERS, 1998).

Peixes demersais coletados em regiões contaminados por óleo também apresentaram acúmulo de lipídios hepáticos e são justificados como importantes reservas energéticas para muitas espécies de peixes ou ainda, como um mecanismo de imobilização de compostos lipofílicos (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005).

Os núcleos dos hepatócitos também se apresentaram anormais, quando observamos uma deformação na sua forma original, após 48, 96 e 168 de exposição aos hidrocarbonetos, observação esta também feita em outros trabalhos com a presença de núcleos deformados, alongados, estreitados ou elípticos (STEHR e MYERS, 1998; STENTIFORD *et al.*, 2003).

Não foram observados neste trabalho, patologias hepáticas como a depleção significativa de glicogênio, cariomegalias graves, como descrito por vários autores, em peixes expostos ao derramamento de diferentes misturas de óleos na água, já que em níveis subletais de contaminação observam-se diferentes respostas celulares do organismo aos tóxicos, ainda que estes não apresentem relação específica com certos contaminantes (TUVIKENE, 1995; MARTY *et al.*, 1998, 1999; STENTIFORD *et al.*, 2003).

As brânquias são consideradas sensíveis à longa cadeia de hidrocarbonetos (NORTON, 1985) sendo que este tecido geralmente é considerado como bom indicador da qualidade da água e conseqüentemente, como eficiente modelo de estudo para o impacto ambiental (FANTA *et al.*, 2003).

Após 48, 96 e 168 horas de exposição ao BTX, as brânquias apresentaram um número significativo de descolamentos nas lamelas secundárias de S. testudineus. Simonato *et al.* (2007) descrevem alterações histológicas como é o caso do descolamento epitelial em Prochilodus lineatus exposto ao óleo diesel em período subletal, podendo ser consideradas adaptativas, desde que estas protejam o organismo da entrada de xenobióticos.

Norton (1985) descreveu a presença de lamelas secundárias distendidas em Pimephales promelus, após 24 e 48 horas de exposição à mistura heterogênea de benzeno, tolueno e xileno. Nero *et al.* (2006) descrevem a fusão lamelar e proliferação de células de muco, hipertrofia e edemas nas lamelas em Perca flavescens em tempos experimentais similares e após contaminação com óleo.

Neste trabalho foi observado uma diminuição significativa na quantidade de células de muco, após 168 horas de exposição ao BTX, ao contrário do que é descrito na literatura. A ocorrência de proliferação das células de muco em indivíduos coletados em áreas contaminadas relaciona-se ao mecanismo de proteção orgânica aos efeitos danosos dos tóxicos. No entanto, observamos que os hidrocarbonetos poliaromáticos específicos levam a diferentes respostas fisiológicas ao estresse causado pelo contaminante aquático (MOORE e RAMAMOORTHY, 1984) e eventualmente, prejudicando a produção de células de muco, o que pode justificar a diminuição na produção destas substâncias protetoras.

Após 24 horas de exposição ao BTX foram observadas hipertrofias e hiperplasias no tecido respiratório, embora em proporção não significativa. Em

períodos longos de exposição alguns autores exposto observaram que o óleo cru causa hiperplasias e edemas na lamela secundária de Salmo clarkii (VAL *et al.*, 1996). Outros autores também relataram que o peixe Fundulus heteroclitus apresentou hiperplasia do epitélio branquial e hipertrofia do epitélio branquial, após 15 dias de exposição ao naftaleno (DiMICHELE e TAYLOR, 1978; MARTY *et al.*, 1998) em sítios com grande incidência de óleo, mas peixes de áreas menos contaminadas não apresentam histopatologias significativas.

Outras estruturas celulares como células de cloreto, associadas com brânquias de teleósteos, apresentaram rompimento estrutural e funcional podendo diminuir a habilidade do organismo em manter a pressão osmótica na condição normal (NORTON, 1985) em exposição sub letal aos hidrocarbonetos.

Nero *et al.* (2006) afirmam que as análises histopatológicas usadas para a avaliação das alterações no fígado e brânquias são ferramentas eficientes na detecção dos efeitos subletais do óleo sobre o organismo dos peixes, assim como no biomonitoramento de áreas supostamente impactadas (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005).

As razões para diferentes espécies de animais apresentarem diferenças nas repostas patológicas podem estar associadas às diferenças nas suas histórias de vida, hábito alimentar, tempo de vida em regiões contaminadas ou modo em que cada espécie metaboliza os contaminantes químicos (STEHR e MYERS, 1998). Assim, torna-se fundamental o estudo de espécies nativas e a resposta destas aos diferentes impactos antropogênicos.

CONCLUSÃO GERAL

A espécie estuarina de peixe Sphoeroides testudineus mostrou um comportamento adequado no desenvolvimento dos ensaios em laboratório e ainda, como bioindicadora dos efeitos tóxicos do BTX. Os biomarcadores bioquímicos e histológicos, utilizados neste trabalho, fornecem uma ferramenta útil na avaliação dos impactos ambientais provocados pelos hidrocarbonetos poliaromáticos específicos, sendo continuamente despejados no meio ambiente.

A utilização de ensaios biológicos em laboratório desenvolvida aqui descrita constitui uma importante ferramenta de trabalho científico, visto que reproduz a imediata resposta biológica dos animais.

No capítulo I determinou-se que a atividade das enzimas de fase I e II, de biotransformação de xenobióticos é essencial para uma análise mais detalhada da toxicidade de certos compostos no organismo, tendo a enzima 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) apresentado um aumento significativo de atividade, quando comparado com o controle.

No capítulo II as análises quantitativas e morfométricas do tecido hepático e do tecido branquial revelaram-se eficientes, quando utilizadas em conjunto, demonstrando através das patologias observadas a ação do BTX em nível sub letal, corroborando com a necessidade de incrementar as diferentes análises histológicas.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que à utilização de diferentes biomarcadores indicam, de maneira incontestável, que os animais expostos a diferentes períodos de contaminação sub letal apresentaram lesões leves e severas nas estruturas hepáticas e branquiais, que levam a afetar a saúde dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase. In: BERGMAYER, H.U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. London, p.671–684, 1974.
- AHMAD, I.; Pacheco, M.; Santos, M. A. Naphthalene-induced differential tissue damage association with circulating fish phagocytes induction. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 54, p. 7–15, 2003.
- AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in Anguilla anguilla L. following in situ harbor water exposure. **Ecotoxicol. Environ., Saf.**, New York, v. 57, p. 290–302, 2004.
- AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Anguilla anguilla L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 952–962, 2006.
- AHMED, M. L.; FEYED, S. T.; HOSSEIN, H.; TASH, F.M. Lipid peroxidant status in human cervical carcinoma. **Dis. Markers**, New York, v. 15, p. 03–21, 1999.
- ANDERSON, J.; W. An assessment of knowledge concerning the fate and effects of PAHs in the marine environment. **Mar. Pollut.**, New York, 108 pp., 1979.
- BEBIANNI, M. J.; LOPES, B.; GUERA, L.; HOARAU, P.; FERREIRA, A. M. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in Mytilus galloprovincialis from the South coast of Portugal: effect of abiotic factors. **Environ. Int.**, New York, v. 33, p. 550–558, 2007.
- BERNET, D.; SCHIMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHRADT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish Dis.**, Oxford, v. 22, p. 25–34, 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, New York, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BROWN, P. J.; LONG S. M.; SPRGEON, D. J.; SVENDSEN, C.; HANKARD, P. K. Toxicological and biochemical responses of the earthworm Lumbricus rubellus to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon, **Chemosphere**, Oxford, v. 57, p. 1675-1681, 2004.
- BUCHELI, T.D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Rev. Environ. Sci. Technol.**, Oxford, v. 25, p. 201–268, 1995.
- BUET, A.; BANAS, D.; COULET, E.; ROCHE, H. Biomarker responses in European eel (Anguilla anguilla) exposed to persistent organic pollutants. A field study in the Vaccarès lagoon (Camargue, France). **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 1846–1858, 2006.

BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene. **Drug. Metab. Dispos.**, Baltimore, v. 2, p. 583–588, 1974.

CASILLAS, E.; MEYERS, M.; AMES, W. Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histopathology in English sole (Parophrys values) after acute exposure to carbon tetrachloride. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 3, p. 61–78, 1983.

CASTRO, B.B.; SOBRAL, O.; GUILHERMINO, L.; RIBEIRO, R. An in situ bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. **Ecotoxicology**, London, v. 13, p. 667–681, 2004.

CERUTTI, P.A. Prooxidant states and tumor promotion. **Science**, Washington, v. 227, p. 375–381, 1989.

CLAIBORNE, A. Catalase activity. In: GREENWALD, R.A. (Ed), **Handbook of Methods for Oxygen Research**, p. 283–284, 1985.

CLARK, G. **Staining procedures**. Baltimore: Williams and Wilkins, 312 pp., 1981.

CORRÊA, M. F. M.; KONOLSAISEN, J. F.; ASSANUMA, M. H.; ABRÃO, G. M.; SILVA, L. R. Oral toxicity of checkered pufferfish Sphoeroides testudineus and caribbean pufferfish S. greeleyi (OSTEICHTHYES-TETRAODONTIFORMES) and symptomatology of intoxication on mice (Mus musculus), **Arq. Biol. Tecnol**, Curitiba, v. 35, n. 3, p. 431-447, 1992.

CULLING, C.F.A.; ALISSON, R.T.; BARR, W.T. **Cellular pathology technique**. London, Butterworth's & Co, 642 pp., 1985.

CUNHA, C. D.; LEITE, S.G.F. Gasoline biodegradation in different soil microscoms. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 31, p. 45–49, 2000.

DiMICHELE, L.; TAYLOR, M. H. Histopathological and physiological responses of Fundulus Heteroclitus to naphthalene exposure. **J. Fish. Res. Board Can.**, Ottawa, v. 35, p.1060-1066, 1978.

ERIKSSON, M.; SWARTLING, A.; DALHAMMAR, G. Biological degradation of diesel fuel in water and soil monitored with solid-phase microextraction and GC-MS. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Heidelberg, v. 50, p. 124–129, 1998.

FANTA, E.; RIOS, F. S.; VIANA, A. C.; ROMÃO, S.; FREIBERG, S. Histopathology and behavioral symptoms of the fish Corydoras paleatus experimentally exposed to sublethal levels of organophosphorus in water, or in food. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, Curitiba, v. 54, p. 119–130, 2003.

FERNANDES, D.; PORTE, C.; BEBIANO, M.J. Chemical residues and biochemical responses in wild and cultured European sea bass (Dicentrarchus labrax L.). **Environ. Res.**, San Diego, v. 90, p. 169–178, 2006.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil II. Teleostei**, São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, v. 5, 110 pp., 2000.

GEORGE, S.G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: MALLINS D.C., OSTRANDER G.K. **Aquatic Toxicol.: molecular, biochemical and cellular perspectives**. London, p. 37–85, 1994.

GOBATO, E.A.A.; LANÇAS, F.M. Comparação entre injeção na coluna (“on-column”) e headspace dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xileno (BTX) em amostras de água. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, p. 176–179, 2001.

GOKSØYR, A.; FÖRLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 22, p. 287–312, 1992.

GRAVATO, C.; TELES, M. OLIVEIRA, M.; SANTOS, M.A. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in Anquilla anguilla L. – the influence of pre-exposure to β -naphthflavone. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 10, p. 1821–1830, 2006.

HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods Enzymol.**, New York, v. 77, p. 398–405, 1981.

HABIG, W.H.; PABST M.J.; JAKOBY. W.B. Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 249, p. 7130–7139, 1974.

HARRISON, R.M.; PERRY, R.; WELLINGS, R.A. Polynuclear aromatic hydrocarbons in raw, potable and waste waters. **Water Res.**, New York, v. 9, p. 331–346, 1975.

HART, L.J.; SMITH, S.A.; SMITH, B.J.; ROBERTSON, J.; BESTEMAN, E.G.; HOLLADAY, D. Subacute immunotoxic effects of the polycyclic aromatic hydrocarbon 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) on spleen and pronephros leukocytic cell counts and phagocytic cell activity in tilapia (Oreochromis niloticus). **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 41, p. 17–29, 1998.

HARTE, J.; HOLDREN, C.; SCHUEIDER, R.; SHIRLEY, C.; RUIVO, M. **Toxics A to Z: a guide to everyday pollution hazard**. Berkely: University of California Press, 576 pp., 1991.

JEONG, W-G.; CHO, S. M. Long-term effect of polycyclic aromatic hydrocarbon on physiological metabolisms of the Pacific oyster, Crossostrea gigas. **Aquaculture**, Institute of Marine Industry and Department of Marine Biology and Aquaculture, College of Marine Science, Gyeongsang National University, 445 Inpyeong, Tongyeong, Gyeongnam 650–160, Republic of Korea, v. 265, p. 343–350, 2007.

JIANG Z-Y.; HUNT J. V.; WOLFF. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analyt. Biochem.**, New York, v. 202, p. 384–389, 1992.

JIFA, W.; ZHIMING, Y.; XIUXIAN S.; YOU, W. Response of integrated biomarkers of fish (Lateolabrax japonicus) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. **Ecotoxicol. Environ.**, China, v. 65, p. 230–236, 2006.

JOBLING, M. Fish and fisheries series, 16. **Environ. Biol. of Fishes**. Chapman & Hall, London, p. 415–435, 1995.

JOHNSON, L.L.; CASILLAS, E.; SOL, S.; COLLIER, T.; STEIN, J.; VARANASI, U. Contaminant effects on reproductive success in selected benthic fish. **Marine Environ. Res.**, Washington, v. 35, p. 165–170, 1993.

KAPPUS, H.; SIES, H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, Generalia, v. 37, p. 1233–1358, 1981.

KENNISH, M.J. **Ecology of Estuaries: anthropogenic effects**. Boca Raton: **CRC Press**, p. 183–248, 1992.

KHAN, R.A.; KICENIUK, J. Histopathological effects of crude oil on Atlantic cod following chronic exposure. **Can. J. Zool.**, v. 62, p. 2038–2043, 1984.

KIRBY, M.F.; SMITH, A.J.; ROOKE, J.; NEALL, P.; SCOTT, A.P.; KATSIADAKI, I. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (Platichthys flesus): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. **Aquat. Toxicol.**, United Kingdom, v. 81, p. 233–244, 2007.

KÖHLER, A.; PLUTA, H. J. Lysosomal Injury and MFO activity in the liver of flounder (Platichthys flesus L.) in relation to histopathology of hepatic degeneration and Carcinogenesis. **Mar. Environ. Res.**, Hamburg, v. 39, p. 255–260, 1995.

KRAHN, M. M.; MYERS, M. S.; BURROWS, D. G.; MALINS, D. C. **Xenobiotica**, v. 14, p. 633–646, 1984.

LARINI, L. **Toxicologia**, 3. ed, Manole, São Paulo, p. 95–114, 1997.

LEE, R.F.; ANDERSON, J.W. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. **Mar. Pollut. Bull.**, USA, v. 50, p. 705–723, 2005.

LENARTOVA, V.; HOLOVSKA, K.; PEDRAJAS, J.R.; LARA, E.M.; PEINADO, J.; LOPEZ-BAREA, J.; ROSIVAL, I.; KOSUTH, P. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarker of river pollution. **Biomarkers.**, v. 2, p. 247–252, 1997.

LEONARDO, J. M. L. O.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; NATALI, M. R. M.; VOLSKI, T.; CAVICHILO, F. Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, Oreochromis niloticus (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina. C. **Acta Scientiarum Maringá**, Maringá, p. 863-870, 2001.

LIMA, E.S.; CARATIN, R.F.; DOLIS, V.S. Peroxidação dos ácidos graxos. In: CURI, R. et al. **Entendendo a gordura : os ácidos graxos**. Barueri, p. 402–418, 2002.

LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **The J. Cell Biol.**, Rockefeller University Press, Department of Anatomy, University of Washington, Seattle, v. 9, p. 409–414, 1961.

MARIA, V.L.; CORREIA, A.C.; SANTOS, M.A. Anguilla anguilla L. biochemical and genotoxic responses to Benzo[a] pireno. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 53, p. 86–92, 2002.

MARIA, V.L.; CORREIA, A.C.; SANTOS, M.A. Anguilla anguilla L. liver EROD induction and genotoxic responses after retene exposure. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 61, p. 230–238, 2005.

MARTY, G. D.; HOFFMANN, A.; OJIHIRO, M.S.; HEPLER, K.; HANES, D. Retrospective analysis: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon valdez oil spill. **Mar. Environ. Res.**, USA, v. 56, p. 569–584, 2003.

MARTY, G. D.; OKIHIRO, M. S.; BROWN, E. D.; HANES, D.; HINTON, D. E. Histopathology of adult Pacific herring in Prince William Sound , Alaska, after the Exxon Valdez oil spill, **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, Canadá, v. 56, p. 419–426, 1999.

MARTY, G. D.; FREIBERG, E. F.; MEYERS, T. R.; WILCOCK, J.; FARVER, T. B.; HINTON, D. E. Viral hemorrhagic septicemia virus, Ichthyophonus hoferi, and other causes of morbidity in Pacific herring Clupe pallasii spawning in Prince William Sound, Alaska. **Dis. Aquat. Org.**, Canadá, v. 32, p. 15–40, 1998.

MATES, J.M.; PEREZ-GOMEZ, C.; BIANCA, M. Chemical and biological activity of free radical scavengers in allergic diseases. **Clin. Chim. Acta.**, Malaga Spain, v. 296, 1–15, 2000.

McCORD, J. M. The evolution of radicals and oxidative stress. **Am. J. Med. Sci.**, USA, v. 108, p. 652–659, 2000.

McDONALD, S. J.; WILLET, K. L.; SAFE, S. H.; BEATTY, K. B.; STEINBERG, M.; MAYOR, P.; KENNICUTT, M. C. Validation of biomass for assessing the contamination of marine environments. **Polycyclic aromatic compounds**, Amsterdam, v. 11, p.57–65, 1996.

McNAUGHTON, S. J.; WOLF, S. J.; LARRY, L. **Ecologia General**: Barcelona: Omega, p. 500– 528, 1984.

MONTEIRO, D.A. **Efeito do organofosforado metil paration (Folisuper 600BR®) sobre biomarcadores do estresse oxidante no teleósteo de água doce matrinxã Brycon cephalus (Günther, 1869) e o papel da suplementação de selênio na dieta.** 163 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

MOORE, J.; RAMAMOORTHY, S. **Organic chemical in natural waters applied monitoring and impact assessment.** New York, p. 68–83, 1984.

MOREIRA, S.M.; GUILHERMINO, L. The use of Mytilus galloprovincialis acetylcholinesterase and glutathione S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest portuguese coast. **Environ. Monitoring Assessm.**, Portugal, v. 105, p. 309–325, 2005.

MOREIRA, S.M.; MOREIRA-SANTOS, M.; RIBEIRO, R.; GUILHERMINO, L. The 'Coral bulker' fuel oil spill on the north coast of Portugal: spatial and temporal biomarker responses in Mytilus galloprovincialis. **Ecotoxicology**, Portugal, v. 13, p. 619–630, 2004.

NERO, V.; FARWELL, A.; LISTER, A.; VAN DER KRAAK, G.; MEER, T. V.; MACKINNON, M. D.; DIXON, D. G. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (Perca flavescens) and goldfish (Carassius auratus) exposed to oil sands process- affected water. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, Canadá, v. 63, p. 365–377, 2006.

NICARETA, L. **Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltrametrina em Ancistrus multipinnis**. 82 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

NORTON, W.N.; MATTIE, D. R.; KEARNS, C.L. Lesions induced by aromatic hydrocarbons, **Am. J. Pathol.**, Louisiana, v. 118 , n. 3, p. 387–397, 1985.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the Effects of Organochlorine Pesticides, PAHs and Heavy Metals in Ells (Anguilla anguilla) from the Camargue Biosphere Reserve. **Aquat.Toxicol.**, Orsay Cedex, v. 74, p. 56–69, 2005.

OLIVEIRA, M.; PACHECO, M., S. Cytochrome P-4501a, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (Liza aurata) following short-term exposure to phenanthrene. **Chemosphere** , Oxford, v. 66, n. 7 p. 1284–1291, 2007.

ORUC E. O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comp. Biochem. Physiol.**, Turkey, v. 137, p. 43–51, 2004.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of Anguilla anguilla L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 49, p. 64-75, 2001.

PRODOCIMO, V.; FREIRE, C. A. Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine pufferfish submitted to sea water dilution. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, Curitiba, v. 262, p. 243–253, 2001.

REYNOLDS, W.J.; FEIST, S.W.; JONES, G.J.; LYONS, B.P.; SHEAHAN, D.A.; STENDIFORD, G.D. Comparison of biomarker and pathological responses in flounder (Platichthus flesus L.) induced by ingested polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 1135–1145, 2003.

ROCHA, C.; FAVARO, L.F.; SPACH, H., S. Biologia reprodutiva de Sphoeroides testudineus (Linnaeus) (Pisces, Osteichthyes, Tetraodontidae) da gamboa do

Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 57–63, 2002.

RODRIGUES, E. L.; FANTA, E. Liver histopathology of the fish Branchydanio rerio Hamilton-Buchman after exposure to sublethal levels of the organophosphate dimethoate 500. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 15, n. 2, p. 441–450, 1998.

ROUSSEAU, C. G.; BRANCHAUD, A.; SPEAR, P. Evaluation of liver histopathology and Erod activity in St. Lawrence lake sturgeon (Acipenser flilvescens) in comparison with a reference population. **Environ. Toxicol. Chem.**, USA, v. 14, p. 843–849, 1995.

SAENGER, P.; McIVOR, C. C. **Water quality and fish populations in a mangrove estuary modified by residential canal developments**. The International Symposium on Biology and Management of Mangroves, Florida, v. 2, p. 753–765, 1975.

SAINT-DENIS, M.; NARBONNE, J.F.; ARNAUD, C.; THYBAUD, E.; RIBERA, D. Biochemical responses of the earthworm Eisenia fetida andrei exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene. **Soil Biol. Biochem.**, v. 31, p. 1837-1846, 1999.

SCHMALZ, W.F.; HERNANDEZ, A.D.; WEIS, P. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, Fundulus heteroclitus. **Mar. Environ. Res.**, USA, v. 54, p. 539–542, 2002.

SHAILAJA, M.S.; CLASSY D'SILVA, C. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, Oreochromis mossambicus using multiple biomarkers. **Chemosphere**, India, v. 53, p. 835–841, 2003.

SILVA de ASSIS, H. C. **Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen**. 99 f. Tese (doutorado), Universidade Técnica de Berlim, Berlim, 1998.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish Prochilodus lineatus exposed to disesel oil. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 68, 9 pp., Londrina, 2007.

SOUZA, M. C.; ANGULO, R. J.; PESSEDA, L. C. R. Evolução paleogeográfica da planície costeira de Itapóá, litoral norte de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Geociências**, Curitiba, v. 31, n. 2, p. 223–230, 2001.

SPIES, B. R.; STEGEMAN, J.J.; HINTON, D.E.; WOODIN, B.; SMOLOWITZ, R.; OKIHIRO, M.; SHEA, D. Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid fishes from a natural petroleum seep in the Santa Barbara Channel. **Aquat. Ecol.**, USA, v. 34, p. 195–219, 1996.

STEGEMAN, J. J.; HAHN, M.E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of

cytochrome P450 in aquatic species. In: D.C. Mallins & G.K. Ostrander. **Aquat. Toxicol.**, USA, p. 87–206, 1994.

STENTIFORD, G. D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B. P.; JONES, G.; GREEN, M.; FEIST, S. W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Mar. Environ. Res.**, USA, v. 55, p. 137–159, 2003.

STEHR, C. M.; JOHNSON, L. L.; MYERS, M. S. Hydropic vacuolation in liver of three species of fish from the U. S. West Coast: lesion description and risk assessment associated with contaminant exposure. **Dis. Aquat. Org.**, Washington, v. 32, p. 119–135, 1998.

THAMMARKHET, C.; MUNEESAWANG, V.; THAVARUNGKUL, P.; KANATHARANA, P. Cost effective passive sampling device for volatile organic compounds monitoring. **Atm. Environ.**, Thailand, v. 40, p. 4589–4596, 2007.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27 n. 3, p. 441–446, 2004.

TUVIKENE, A. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Ann. Zool. Fennici**, Tartu, v. 32, p. 295–309, 1995.

VAL, A.; RANDAL, D.; MACKINLAY, D. **The physiology of tropical fish symposium proceedings**. International Congress on the Biology of fishes, San Francisco, p. 14–18, 1996.

VARANASI, U.; STEIN, J.E.; NISHIMOTO, M. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In: VARANASI, U. (Ed.) **Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 93–149.

VENKATESWRA RAO, J. Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of organophosphorus insecticide, monocrotophos. **Chemosphere**, India, v. 65, p. 1814–1820, 2006.

VURAL, P.; CANBAZ, M.; SELCUKI, D. Plasma antioxidant defense in actinic keratosis and basal cell carcinoma. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol**, Turkey, v. 13, p. 96-101, 1999.

World Health Organization [WHO] - International Program of Chemical Safety -IPCS. Selected petroleum products, **Environmental Health Criteria**, Geneva, v. 20, 1982.