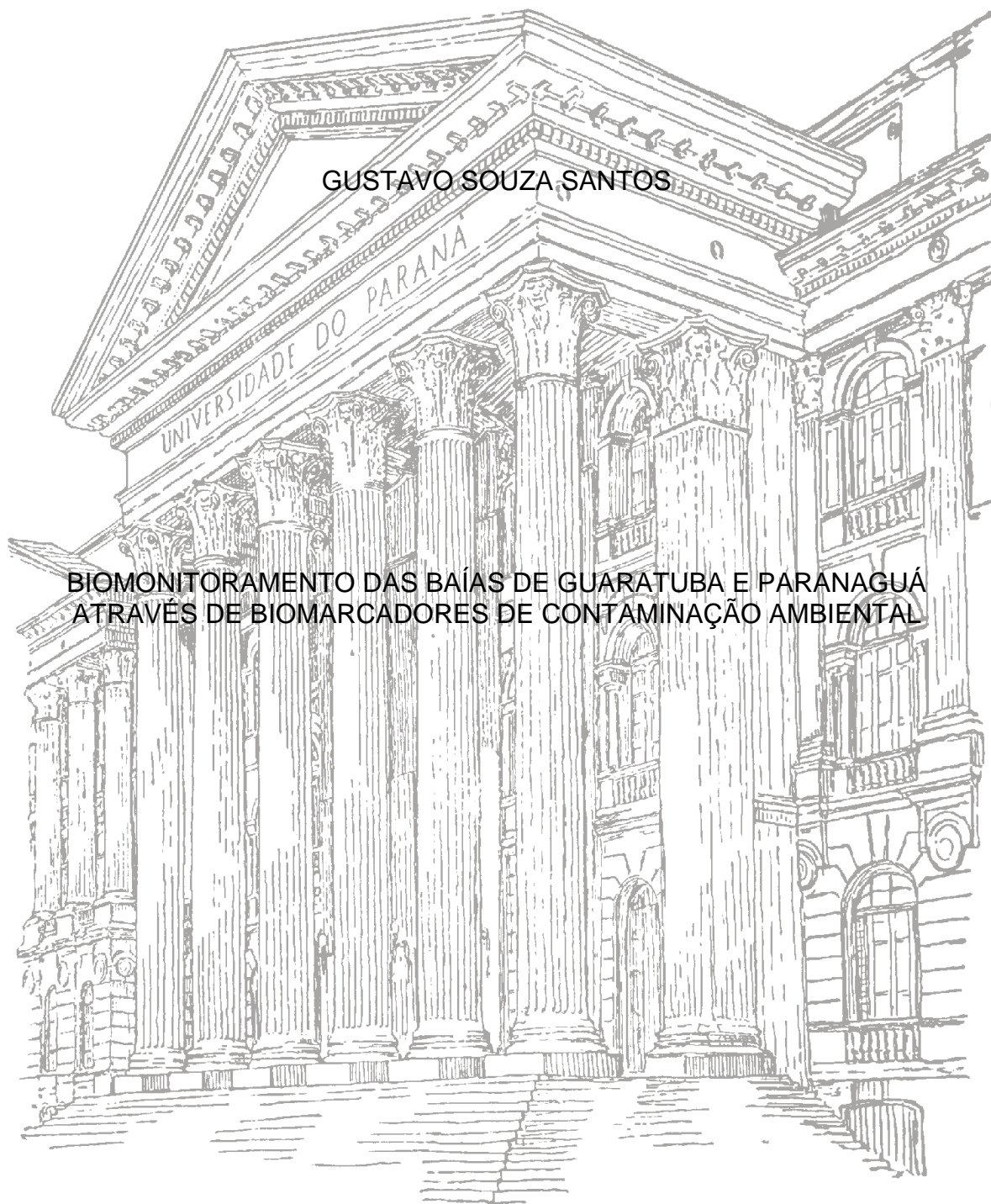


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO SOUZA SANTOS

BIOMONITORAMENTO DAS BAÍAS DE GUARATUBA E PARANAGUÁ
ATRAVÉS DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL



CURITIBA
2013

GUSTAVO SOUZA SANTOS

BIOMONITORAMENTO DAS BAÍAS DE GUARATUBA E PARANAGUÁ
ATRAVÉS DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação, no Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Margarete Cestari

CURITIBA
2013



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu **Gustavo Souza Santos** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão do candidato.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 27 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.ª. Dra. Marta Margarete Cestari
Orientadora e Presidente

Prof.ª. Dra. Wanessa Algarte Rantsdorf
Membro

Prof.ª. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis
Membro

Visto:

Prof.ª. Dra. Maria Regina Torres Boeger
Coordenadora do PPG-ECO

Dedico este trabalho aos meus pais e à Deus,
que sempre estiveram do meu lado sendo meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Marta Margerete Cestari, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança depositada em mim, mas principalmente pela amizade nesses anos de laboratório.

À professora Wanessa, por ter me ensinado quase tudo no lab e ter me ajudado desde a época que eu entrei na vida de pesquisador.

Aos professores da banca Denis Moledo Abessa de Souza e Helena Cristina da Silva de Assis, por aceitarem o convite e pelas contribuições importantes neste trabalho.

Aos professores Ciro Alberto Oliveira Ribeiro, Helena Cristina da Silva de Assis e Luiz Fernando Fávaro que sempre foram muito solícitos e me ajudaram muito no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do PPGECO, pelos ensinamentos durante as disciplinas que foram importantes para o meu desenvolvimento como profissional.

Ao pessoal do Lab, os quais eu convivo todo dia e que são grandes amigos, em especial Laercio, Tay, Gabi, Toni, Flavio, Tati, Manu, Gê, Kézia.

Aos colegas de outros laboratórios que me ajudaram durante as coletas e análises dos resultados, Flavinha, Cris, Dayana, Ana Carolina.

Aos estagiários do lab, que sempre me ajudaram com as minhas bagunças e sempre foram muito prestativos.

Aos funcionários da UFPR, em especial as tias da limpeza, seu Luiz e o Tião.

Aos meus colegas de Mestrado, que foram companhias importantes durante as disciplinas além de grandes amigos.

Aos meus colegas da Biologia, que depois de todos estes anos ainda são pessoas importantes na minha vida.

Aos pescadores Dinho, João Carlos e Itamar, que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À todos os meus amigos, que são pessoas muito importantes e me fazem ser uma pessoa mais feliz a cada dia que passa, em especial meus amigos do Deaco.

À minha família que sempre me apoiou, me incentivou e foram responsáveis pela minha formação.

Aos meus pais, que são os principais personagens da minha vida, sempre me

apoiando, me incentivando, e compreendendo todas as decisões tomadas por mim. Mas principalmente pelo amor e carinho demonstrados.

À Deus, por ser meu equilíbrio e porto seguro em todos os momentos da minha vida.

"O jovem que quer ser cientista e à ciência dedicar todo o seu tempo e amor, tem pelo menos três certezas:
a de que morrerá um dia (como todo mundo),
a de que não ficará rico (como quase todo mundo)
e a de que se divertirá muito (como pouca gente)."

Newton Freire-Maia

RESUMO

Os estuários são muitas vezes referidos como o tipo de habitat mais degradado do mundo. São vulneráveis a diversas perturbações causadas por atividades humanas, incluindo a agricultura, a indústria, os assentamentos humanos, a pesca e as atividades portuárias. O estuário de Guaratuba é afetado principalmente pelo desenvolvimento das atividades agrícolas e pelas modificações hidrológicas provenientes da construção de barragens. Já o complexo estuarino de Paranaguá recebe regularmente escoamentos provenientes do Porto, de indústrias locais e atividades agrícolas, além do esgoto doméstico, o que acarreta numa variedade muito grande de substâncias químicas que diariamente entram neste ambiente. A fim de avaliar a qualidade da água nestes estuários, bem como os efeitos da sazonalidade na disponibilidade de xenobióticos, foram utilizados os seguintes biomarcadores: Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), Glutathione S-transferase (GST), Lipoperoxidação (LPO), Acetilcolinesterase (AChE), Metalotioneínas (MTs), Teste do micronúcleo pisco (TMP), Ensaio cometa, Ensaio de difusão do DNA, Histopatologia de fígado, além da análise de metais (As, Pb, Sn e Hg) no músculo e no fígado das espécies *Cathorops spixii* e *Atherinella brasiliensis*. Foram realizadas duas coletas (verão e inverno) em dois pontos de cada estuário. De acordo com os dados obtidos para os biomarcadores, tanto a baía de Guaratuba quanto a de Paranaguá são impactadas pela presença de xenobióticos, causando efeitos adversos a saúde das espécies pesquisadas. Os biomarcadores sugerem também que o aporte de xenobióticos nestes locais apresenta fontes diferentes, sendo as mais impactantes, as plantações ao redor da baía em Guaratuba e as atividades relacionadas ao porto em Paranaguá. A relação entre a sazonalidade e as respostas dos biomarcadores também foi avaliada, com os pontos mais internos das baías apresentando maiores variações para a espécie *C. spixii*. A contaminação por metais também foi evidenciada, sendo que o Hg foi mais encontrado em Guaratuba (relacionado a utilização de fertilizantes na agricultura) e o As em Paranaguá, que ocorre naturalmente na região, mas também tem fonte nas indústrias de fertilizantes. A presença destes metais pode estar relacionada a alterações na saúde dos peixes das baías. As espécies *C. spixii* e *A. brasiliensis* podem ser consideradas como bioindicadores adequados quando utilizamos a abordagem de biomarcadores, e são indicadas para futuros programas de monitoramentos.

Palavras-chave: Biomarcador. Bioindicador. *Cathorops spixii*. *Atherinella brasiliensis*. Paranaguá. Guaratuba. Metais.

ABSTRACT

Estuaries are often referred as the most degraded type of habitat in the world. They are vulnerable to various disturbances caused by human activities, including agriculture, industry, human settlements, fishing and port activities. The Guaratuba bay is affected mainly by the agricultural development, domestic sewage and hydrologic modifications from the dam constructions. On the other hand, Paranaguá bay regularly receives discharges from the Port, local industries and agricultural activities, as well as domestic sewage, resulting in a very large variety of chemicals that daily enter this environment. In order to evaluate the water quality in these estuaries and the seasonal effects on the xenobiotic availability we used the following biomarkers: Ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD), Glutathione S-transferase (GST) Lipid peroxidation (LPO) Acetylcholinesterase (AChE), Metallothioneins (MTs), Piscine micronucleus test (PMT), Comet assay, DNA diffusion assay, Liver histopathology in addition to the metal analysis (As, Pb, Sn and Hg) in muscle and liver of *Cathorops spixii* and *Atherinella brasiliensis*. Two sampling surveys (summer and winter) were conducted in two sites of each estuary. Data showed that both Guaratuba bay as Paranaguá bay are affected by the presence of xenobiotics, causing adverse health effects of the studied species. Biomarkers also suggest that the xenobiotic uptake in these sites has different sources, possibly being related to plantations around the Guaratuba bay and port activities in the Paranaguá bay. The relationship between seasonality and the biomarker responses was also evaluated, with the upper points of the bays featuring larger variations for the *C. spixii* specie. The metal contamination was also evident, with more mercury found in Guaratuba (related to fertilizer use in agriculture) and arsenic in Paranaguá (naturally occurring in the region, but also has industrial source). The presence of these metals may be related to changes in fish health. The species *C. spixii* and *A. brasiliensis* may be regarded as suitable bioindicators when using the biomarkers approach and are indicated for future monitoring programs.

Key-words: Biomarker. Bioindicator. *Cathorops spixii*. *Atherinella brasiliensis*. Paranaguá. Guaratuba. Metals.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - INTERAÇÕES ENTRE OS XENOBIÓTICOS E ORGANISMOS NO AMBIENTE. RETIRADO DE MARKERT *ET AL.* (2003). 20
- FIGURA 2** - EXEMPLAR DE *Cathorops spixii* COLETADO NAS BAÍAS DE GUARATUBA E PARANAGUÁ (ESCALA = 2 CM). (FONTE: TATIANE KLINGELFUS) 22
- FIGURA 3** - EXEMPLAR DE *Atherinella brasiliensis* COLETADO NAS BAÍAS DE GUARATUBA E PARANAGUÁ..... 24
- FIGURA 4** - BAÍAS DE GUARATUBA E PARANAGUÁ E OS PONTOS DE AMOSTRAGEM (SENDO G1 E G2 OS DOIS PONTOS NA BAÍA DE GUARATUBA, P1 E P2 OS DOIS PONTOS NA BAÍA DE PARANAGUÁ). 46
- FIGURA 5** - BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Cathorops spixii* COLETADO EM GUARATUBA E PARANAGUÁ. A- ETOXIRESORUFINA-O-DEETILASE, EROD (KRUSKAL-WALLIS= 6.896). B- GLUTATIONA S-TRANSFERASE, GST (KRUSKAL-WALLIS= 39.37). C- LIPOPEROXIDAÇÃO, LPO (KRUSKAL-WALLIS= 17.62). D- ACETILCOLINESTERASE, ACHE (KRUSKAL-WALLIS= 48.77). E- METALOTIONEÍNA, MT (KRUSKAL-WALLIS= 11.97). CARACTERES LATINOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO VERÃO (a, b), CARACTERES GREGOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO INVERNO (α , β , γ), * INDICA DIFERENÇAS SAZONAIS NOS PONTOS..... 54
- FIGURA 6** - ENSAIO COMETA (A E B) E ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA (C E D) EM *Cathorops spixii* COLETADOS EM GUARATUBA (G1 E G2) E PARANAGUÁ (P1 E P2). A- ESCORE DE DANO GENÉTICO EM ERITRÓCITOS (KRUSKAL-WALLIS= 26.28), B- ESCORE DE DANO GENÉTICO EM CÉLULAS DO FÍGADO (KRUSKAL-WALLIS= 51.12), C- FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS EM APOPTOSE (KRUSKAL-WALLIS= 22.47), D- FREQUÊNCIA DE CÉLULAS DO FÍGADO EM APOPTOSE (KRUSKAL-WALLIS=

31.31). CARACTERES LATINOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO VERÃO (a,b), CARACTERES GREGOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO INVERNO (α,β,γ), * INDICA DIFERENÇAS SAZONAIS NOS PONTOS..... 57

FIGURA 7 - ÍNDICE DE LESÃO NO FÍGADO DE *Cathorops spixii* (KRUSKAL-WALLIS= 3.613)..... 58

FIGURA 8 - HISTOLOGIA DO FÍGADO DE *Cathorops spixii* COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ. A- INDIVÍDUO APRESENTANDO UM FÍGADO SEM ALTERAÇÕES, COM HEPATÓCITOS POLIÉDRICOS E PEQUENOS CAPILARES. B- NECROSE DO PARÊNQUIMA HEPÁTICO (↑), ONDE HÁ PERDA DE DELIMITAÇÃO CELULAR (ROMPIMENTO CELULAR), COM ALTERAÇÃO DO NÚCLEO E DO FORMATO DOS HEPATÓCITOS, TAMBÉM OBSERVA-SE ALGUNS PARASITAS (♣). C- PRESENÇA DE CENTROS DE MELANOMACRÓFAGOS (*)E UMA NEOPLASIA (TUMOR BENIGNO ENCAPSULADO, ↑). D- NEOPLASIA (TUMOR BENIGNO ENCAPSULADO, ↑) E PARASITAS (♣). E- INDIVÍDUO APRESENTANDO UMA GRANDE HEMORRAGIA (H), NECROSE (↑) E PARASITAS (♣). F – OUTRA TIPO DE PARASITAS (♣) OCUPANDO GRANDE PARTE DO PARÊNQUIMA HEPÁTICO. G- FOCO EOSINÓFILO (▲), ONDE OS HEPATÓCITOS DEMONSTRAM-SE HIPETRÓFICOS E COM CITOPLASMA MAIS BASÓFILO. H- ALTERAÇÃO NUCLEAR (HIPERTROFIA NUCLEAR, ▲). 60

FIGURA 9 - ANÁLISE DE CLUSTER PARA TODOS OS PONTOS DE COLETA BASEADO NA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE BRAY-CURTIS CALCULADA A PARTIR DAS MÉDIAS DAS RESPOSTAS DOS BIOMARCADORES NO VERÃO (S) E NO INVERNO (W) (COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO= 0.9392). 61

FIGURA 10 - BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Atherinella brasiliensis* COLETADO EM GUARATUBA E PARANAGUÁ. A- ETOXIRESORUFINA-O-DEETILASE, EROD (KRUSKAL-WALLIS= 34.10). B- GLUTATIONA S-TRANSFERASE, GST (KRUSKAL-

WALLIS= 46.99). C- LIPOPEROXIDAÇÃO, LPO (KRUSKAL-WALLIS= 18.20). D- ACETILCOLINESTERASE, ACHE (KRUSKAL-WALLIS= 70.97). E- METALOTIONEÍNA, MT (KRUSKAL-WALLIS= 18.88). CARACTERES LATINOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO VERÃO (a, b), CARACTERES GREGOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO INVERNO (α , β , γ), * INDICA DIFERENÇAS SAZONAIS NOS PONTOS..... 83

FIGURA 11 - ENSAIO COMETA E ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA EM *Atherinella brasiliensis* COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ. A- ESCORE DE DANO GENÉTICO EM ERITRÓCITOS (KRUSKAL-WALLIS= 62.20), B- ESCORE DE DANO GENÉTICO EM CÉLULAS DO FÍGADO (KRUSKAL-WALLIS= 48.56), C- FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS EM APOPTOSE (KRUSKAL-WALLIS= 41.51), D- FREQUÊNCIA DE CÉLULAS DO FÍGADO EM APOPTOSE (KRUSKAL-WALLIS= 38.76). CARACTERES LATINOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO VERÃO (a, b), CARACTERES GREGOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO INVERNO (α , β , γ), * INDICA DIFERENÇAS SAZONAIS NOS PONTOS..... 86

FIGURA 12 - ÍNDICE DE LESÃO NO FÍGADO DE *Atherinella brasiliensis* COLETADO EM GUARATUBA E PARANAGUÁ (KRUSKAL-WALLIS= 10.44)..... 87

FIGURA 13 - HISTOLOGIA DO FÍGADO DE *Atherinella brasiliensis* COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ. A – INDIVÍDUO APRESENTANDO UM FÍGADO COM NECROSE DO PARÊNQUIMA HEPÁTICO (↑), COM ALTERAÇÃO DO NÚCLEO E DO FORMATO DOS HEPATÓCITOS. B – NECROSE (↑) COM CICATRIZAÇÃO, HEPATÓCITOS DIFERENCIADOS (▲). C, D – NEOPLASIA EXTENSA (TUMOR BENIGNO ENCAPSULADO, ↑). E – VACUOLIZAÇÃO DOS HEPATÓCITOS, COM ACÚMULO LIPÍDICO NOS ADIPÓCITOS (L). F – PARASITA (▲) APRESENTANDO APARENTE ACÚMULO LIPÍDICO. G –

PRESENÇA DE CENTROS DE MELANOMACRÓFAGOS (*). H – ALTERAÇÃO NO SISTEMA CIRCULATÓRIO, APRESENTANDO UMA EXTENSA HEMORRAGIA (H)..... 89

FIGURA 14 - ANÁLISE DE CLUSTER PARA TODOS OS PONTOS DE COLETA BASEADO NA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE BRAY-CURTIS CALCULADA A PARTIR DAS MÉDIAS DAS RESPOSTAS DOS BIOMARCADORES NO VERÃO (S) E NO INVERNO (W) (COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO= 0.8812). 91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS METEOROLÓGICOS DAS ÁREAS DE ESTUDO NAS BAÍAS DE GUARATUBA E PARANAGUÁ (DADOS FORNECIDOS PELO SIMEPAR).....	51
TABELA 2 - DADOS MORFOMÉTRICOS DE <i>Cathorops spixii</i> EM CADA PONTO DE COLETA.....	52
TABELA 3 – QUANTIFICAÇÃO DE METAIS NOS TECIDOS (PPM) DOS PEIXES COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ, E VALORES DE REFERÊNCIA (BRASIL, 1965).....	52
TABELA 4 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES E FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS OBSERVADOS EM <i>Cathorops spixii</i> COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ	56
TABELA 5 - FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES OBSERVADAS NO FÍGADO DE <i>Cathorops spixii</i> COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ	59
TABELA 6 - DADOS MORFOMÉTRICOS DE <i>Atherinella brasiliensis</i> EM CADA PONTO DE COLETA.....	81
TABELA 7 – QUANTIFICAÇÃO DE METAIS NOS TECIDOS (PPM) DOS PEIXES COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ, E VALORES DE REFERÊNCIA (BRASIL, 1965).....	82
TABELA 8 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES E FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS OBSERVADOS EM <i>Atherinella brasiliensis</i> COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ.	85
TABELA 9 - FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES OBSERVADAS NO FÍGADO DE <i>Atherinella brasiliensis</i> EM GUARATUBA E PARANAGUÁ.....	88

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 BIOMONITORAMENTO	18
2.2 BIOMONITORES	21
2.2.1 <i>Cathorops spixii</i>	21
2.2.2 <i>Atherinella brasiliensis</i>	23
2.3 BIOMARCADORES	25
2.3.1 Biomarcadores bioquímicos.....	27
2.3.1.1 Atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)	27
2.3.1.2 Atividade da glutathione S-transferase (GST)	28
2.3.1.3 Lipoperoxidação (LPO)	29
2.3.1.4 Atividade da acetilcolinesterase (AChE)	29
2.3.1.5 Metalotioneínas (MTs)	30
2.3.2 Biomarcadores genéticos	31
2.3.2.1 Teste do micronúcleo píceo (TMP)	32
2.3.2.2 Ensaio cometa	34
2.3.2.3 Ensaio de Difusão do DNA	35
2.3.3 Biomarcador histopatológico.....	36
3 OBJETIVO GERAL	38
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 CAPÍTULO I	39
4.1 RESUMO.....	40
4.2 INTRODUÇÃO	41
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.3.1 Área de estudo	44
4.3.2 Amostragem dos peixes	45
4.3.3 Fator de condição	46
4.3.4 Análises químicas	47
4.3.5 Biomarcadores.....	47
4.3.5.1 Biomarcadores bioquímicos.....	47
4.3.5.2 Biomarcadores genéticos	49
4.3.5.3 Biomarcador histopatológico.....	50
4.3.6 Análise estatística	50
4.4 RESULTADOS	51
4.4.1 Sazonalidade	51
4.4.2 Tamanho, peso e Fator de condição	51
4.4.3 Quantificação de metais	52
4.4.4 Biomarcadores bioquímicos.....	53
4.4.5 Genotoxicidade	55
4.4.6 Histopatologia	57
4.4.7 Análise de similaridade	61
4.5 DISCUSSÃO	62
4.6 CONCLUSÕES	67
5 CAPÍTULO II	69
5.1 RESUMO.....	70
5.2 INTRODUÇÃO	71
5.3 MATERIAL E MÉTODOS	74

5.3.1 Área de estudo	74
5.3.2 Amostragem dos peixes	75
5.3.3 Fator de condição	76
5.3.4 Análises químicas	76
5.3.5 Biomarcadores.....	76
5.3.5.1 Biomarcadores bioquímicos.....	77
5.3.5.2 Biomarcadores genéticos	78
5.3.5.3 Biomarcador histopatológico.....	79
5.3.6 Análise estatística	80
5.4 RESULTADOS	80
5.4.1 Sazonalidade	80
5.4.2 Tamanho, peso e Fator de condição	80
5.4.3 Quantificação de metais	81
5.4.4 Biomarcadores bioquímicos.....	82
5.4.5 Genotoxicidade	84
5.4.6 Histopatologia	86
5.4.7 Análise de similaridade	90
5.5 DISCUSSÃO	91
5.6 CONCLUSÕES	96
6 CONCLUSÕES GERAIS	98
7 REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO GERAL

Estuários consistem em ecossistemas de extrema importância, oferecendo recursos alimentares de grande diversidade e abundância, proteção contra predadores e outras condições ambientais que favorecem o desenvolvimento e a sobrevivência de diversas espécies de peixes (CORRÊA, 2001; PATERSON, 2000). Muitas das etapas reprodutivas, incluindo dispersão de ovos e larvas, distribuição de juvenis e migrações, estão sincronizadas com o funcionamento destes ambientes (BOCHLERT; MUNDY, 1988).

As populações biológicas dentro dos estuários podem flutuar de acordo com os ciclos naturais. A qualidade da água também varia, normalmente em ciclos sazonais e anuais. Por isso a avaliação neste tipo de ecossistema é um desafio, e a distinção entre os impactos causados pelas ações humanas ou pelas variações naturais é difícil de ser realizada (MARONE *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que este ambiente se destaca pela abundância e diversidade de peixes, e que essas características estão relacionadas com fatores abióticos como a salinidade e o tipo e substrato. Em estações chuvosas ocorre a penetração nestas regiões de algumas espécies dulciaquícolas e em estações secas a maior abundância é de peixes marinhos. Outros fatores expressivos são a temperatura, oxigênio dissolvido na água, ventos e profundidade (VAZOLLER; SOARES; CUNNINGHAM, 1999). E todos esses fatores em conjunto proporcionam uma grande variação no número de espécies e indivíduos (CIPRIANO, 2005).

Os estuários são muitas vezes referidos como o tipo de habitat mais degradado do mundo (CLARK *et al.*, 1997). São vulneráveis a diversas perturbações causadas por atividades humanas, incluindo a agricultura, a indústria, os assentamentos humanos, a pesca e as atividades portuárias (KENNISH, 2002), entre outros.

Quando nos referimos à poluição nos ambientes estuarinos devemos considerar algumas questões importantes como:

- Que tipo de material é despejado nos estuários como resultado de atividades humanas;

- Quais os efeitos dessas descargas sobre as plantas e animais que vivem neste ambiente;
- Quais as implicações que esses efeitos têm sobre a saúde humana, recursos alimentares, interesses comerciais, conservação da vida selvagem, bens e serviços ambientais ou ecossistemas em geral;
- O que tem sido feito, o que pode ser feito, ou o que deveria ser feito para reduzir ou remover os efeitos prejudiciais dessas descargas no ambiente estuarino;
- Quais seriam as consequências de não liberar esses materiais para o mar e se tais consequências seriam melhores ou piores que a situação existente (CLARK *et al.*, 1997).

A contaminação por metais se destaca entre os diversos tipos de problemas ambientais decorrentes das atividades antrópicas nestes ambientes. Este tipo de contaminante é encontrado naturalmente em sistemas aquáticos, porém as atividades antrópicas, associadas ao alto poder tóxico dos metais, podem provocar efeitos irreversíveis sobre a biota. Esses contaminantes são transportados associados ao material particulado em suspensão, dissolvidos na coluna d' água ou por deposição atmosférica (SOLOMONS; FÖRSTNER, 1984).

Em estuários, a mudança do pH e do potencial redox como nas zonas de mistura entre águas doces e marinhas causa intensa floculação de argila e outras partículas, gerando aumento da adsorção de metais e outros materiais nos flocos. A maior parte das descargas liberadas em ambientes estuarinos é composta por materiais orgânicos que são sujeitos a processos oxidativos e posteriores quebras em compostos inorgânicos como CO₂, H₂O e NH₃, realizados por bactérias. Além dos metais se moverem lentamente e apresentarem grande persistência neste ambiente (CLARK *et al.*, 1997).

A baía de Guaratuba, localizada na parte sul da costa do estado do Paraná, é afetada principalmente pelo desenvolvimento das atividades agrícolas e pelas modificações hidrológicas provenientes da construção de barragens (PATCHINEELAM *et al.*, 2011). A dragagem e o esgoto são destinados diretamente nos rios, e juntamente com a eliminação de vegetação ciliar e a construção de duas usinas hidrelétricas em 1930 e 1957, estão entre

os fatores antrópicos que contribuem para causar impacto no estuário (PIETZSCH *et al.*, 2010).

A região ao redor do estuário não é muito industrializada, e as plantações de banana e arroz são as principais atividades econômicas, seguido da pesca e do turismo, sendo que este último tem se desenvolvido bastante nos últimos anos. Ao sul da baía encontramos o município de Guaratuba com uma população de aproximadamente 32.000 habitantes e ao norte da baía encontramos o município de Matinhos com aproximadamente 30.000 habitantes. A ocupação e urbanização nesta região começaram depois de 1960, sendo que antes desse período esta área era significativamente isolada do resto do Estado (TODESCHINI, 2004). Com a construção das estações de ferry boat para ligar as duas cidades, assim como uma marina na cidade de Matinhos, o isolamento foi rompido, favorecendo o crescimento urbano (PIETZSCH *et al.*, 2010).

A baía de Guaratuba está localizada dentro de uma Área de Proteção Ambiental (APA) de 1.995,86 km² de Mata Atlântica, envolvendo os municípios de Guaratuba e Matinhos. É cercada por florestas de mangue bem desenvolvidas, e apresenta dois rios de água doce importantes, o rio Cubatão e o rio São João, que se originam na Serra do Mar (SANDERS *et al.*, 2008). Esta área apresenta várias restrições em relação ao uso e ocupação do solo, qualidade da água e de descarga de efluentes, no entanto, uma das maiores plantações de banana do sul do Brasil é vizinha a ela (PIETZSCH *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos avaliaram o fluxo de mercúrio nesta baía, notando que ele permanece constante. Acreditava-se que esse mercúrio era de fonte atmosférica, em função da proximidade de algumas centenas de quilômetros de fontes industriais. Mas a utilização de mercúrio nas indústrias passou a ser regulamentado em 1979 no Brasil, gerando uma diminuição dessas descargas (LACERDA, 1997). Então se esperava uma diminuição do fluxo de mercúrio neste ambiente, o que não foi observado nos últimos anos (SANDERS *et al.*, 2006). Partindo da premissa de que as plantações de banana e arroz nessa região aumentaram aproximadamente 6% ao ano a partir de 1990, segundo a Secretaria da Agricultura e Abastecimento do estado do Paraná – SEAB acredita-se a contaminação seja proveniente de fertilizantes que utilizam o

mercúrio como subproduto nestas plantações (GODOY *et al.*, 2002; SANDERS *et al.*, 2006).

Em um trabalho recente observou-se que a qualidade da água na baía de Guaratuba parece ser controlada pelos aportes de material inorgânico e orgânico associados à pluviosidade e por variações ocorridas nas fases de maré vazante e enchente (MIZERKOWSKI *et al.*, 2012).

A baía de Paranaguá está localizada ao centro da costa do estado do Paraná, com uma área de 677 mil km², e representa o terceiro estuário mais importante da costa brasileira. A importância econômica dela está relacionada às atividades pesqueiras, as áreas urbanas, ao turismo, as indústrias (principalmente de fertilizantes), o terminal de combustíveis além do principal porto de embarque de grãos da América do Sul, sendo o terceiro mais importante em operações de carga e descarga com mais de 44 milhões toneladas em 2012 (APPA, 2013). O estuário é englobado por uma Área de Proteção Ambiental (APA) e tem uma importante função ecológica, agrupando pelo menos 10 unidades de conservação, com uma grande diversidade de ambientes, tais como ilhas, manguezais, restingas, rios, riachos de maré, costões rochosos e praias (LANA *et al.*, 2001).

Apesar da importância ecológica e econômica da baía de Paranaguá, ele tem sido influenciado por descargas antrópicas de diferentes fontes, incluindo de esgotos domésticos, do porto e de indústrias. A população de aproximadamente 180 mil pessoas vive às margens deste estuário, sendo que Paranaguá (~125.000 habitantes) e Antonina (~20.000 habitantes) são as cidades mais importantes da região. Essas cidades têm um sistema de esgotos muito deficitário e a maioria dos esgotos da cidade de Paranaguá é descarregada em dois rios (Itiberê e Emboguaçú) ou diretamente no estuário (KOLM *et al.*, 2002).

A cidade de Paranaguá, localizada as margens da baía, tem na atividade de pesca uma grande fonte de subsistência, que é responsável pela geração de muitos empregos para a população. Atualmente os mais de 2000 pescadores ligados a Associação de Pescadores de Paranaguá, vivem da pesca de peixes e camarão e da cultura de ostras (LAUTERT *et al.*, 2006).

O maior porto do Sul do Brasil, o Porto de Paranaguá, está localizado dentro da baía de Paranaguá e apresenta as atividades de carga e descarga

de grãos e contêineres como mais importantes (LAUTERT *et al.*, 2006). As atividades constantes de dragagem necessárias para as operações do porto removem mais de dois milhões de metros cúbicos de sedimento por ano, resultando na resuspensão de diversos contaminantes (MARONE *et al.*, 2005).

Em 15 de novembro de 2004 o chileno petroleiro Vicuña explodiu em frente ao porto, liberando um total de 1.416 toneladas de petróleo, a maioria (87%) do tipo bunker. Apesar da colocação de boias de contenção ao redor do navio naufragado, a contaminação da baía não foi contida, e aproximadamente 285 toneladas de petróleo não recuperadas se espalharam (IAP, 2005).

A baía de Paranaguá é afetada por muitos tipos de contaminantes, tendo sido encontrado DDT em peixes, mexilhões, ostras e esponjas coletados (LIEBEZEIT *et al.*, 2011). Alguns estudos recentes detectaram a contaminação por metais e compostos orgânicos nos sedimentos e na água em algumas áreas da baía de Paranaguá (SÁ *et al.*, 2006; CHOUERI *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2010). Diversos trabalhos utilizaram a abordagem de biomarcadores para a avaliação desta baía (DOMINGOS *et al.*, 2007, 2009; KATSUMITI *et al.*, 2009; MARANHO, 2010; SOUZA-BASTOS; FREIRE, 2011; TORTELLI *et al.*, 2006; ZANETTE *et al.*, 2006).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOMONITORAMENTO

O monitoramento representa a medição contínua de uma variável em um determinado período de tempo. E quando nos referimos a uma medição em um organismo biológico este conceito é tratado como biomonitoramento (DA SILVA *et al.*, 2003). O biomonitoramento aquático é a avaliação contínua da qualidade de águas e efluentes por meio de biomonitores. Enquanto o biomonitoramento fornece uma avaliação da qualidade do corpo de água em longo prazo, o monitoramento da água por meio de parâmetros físicos, químicos e bacteriológicos fornece resultados pontuais, que representam a situação do corpo d' água no momento da amostragem (KNIE; LOPES, 2004).

O biomonitoramento pode também ser definido como um método de observação do impacto de fatores externos em ecossistemas e o seu

desenvolvimento ao longo do tempo, ou de diferenciação entre duas localidades (sendo uma referência e outra poluída) (MARKERT *et al.*, 2003)

Existem três principais situações que indicam a necessidade de um biomonitoramento: (i) quando há razões para se acreditar que espécies nativas se encontram ameaçadas; (ii) quando existem implicações para a saúde humana quanto ao consumo de organismos potencialmente afetados e (iii) quando há o interesse em se conhecer a qualidade ambiental de um determinado local (DA SILVA *et al.*, 2003).

Podemos ver na Figura 1 retirada de Markert *et al.* (2003), que um xenobiótico qualquer afeta um organismo A. Tanto o organismo A quanto o xenobiótico vão interagir com outros compartimentos do ecossistema. O organismo A é, portanto, influenciado por um grande número de fatores bióticos e abióticos e pode, muitas vezes, ser sujeito à ação de vários xenobióticos. O xenobiótico observado pode interagir com uma série de outros compartimentos como fatores bióticos, fatores abióticos e a presença de outro xenobiótico tornando este tipo de análise difícil de ser interpretada. Outra situação pode ser observada, se o xenobiótico gera uma mudança na densidade de população de outro organismo B mais sensível (que compete diretamente ou indiretamente com o organismo A), o organismo A pode apresentar “vantagens” competitivas. Portanto, a busca por avaliações mais completas e que compreendam todos os compartimentos que foram citados acima é a melhor forma de se descobrir os efeitos reais de um xenobiótico no ambiente.

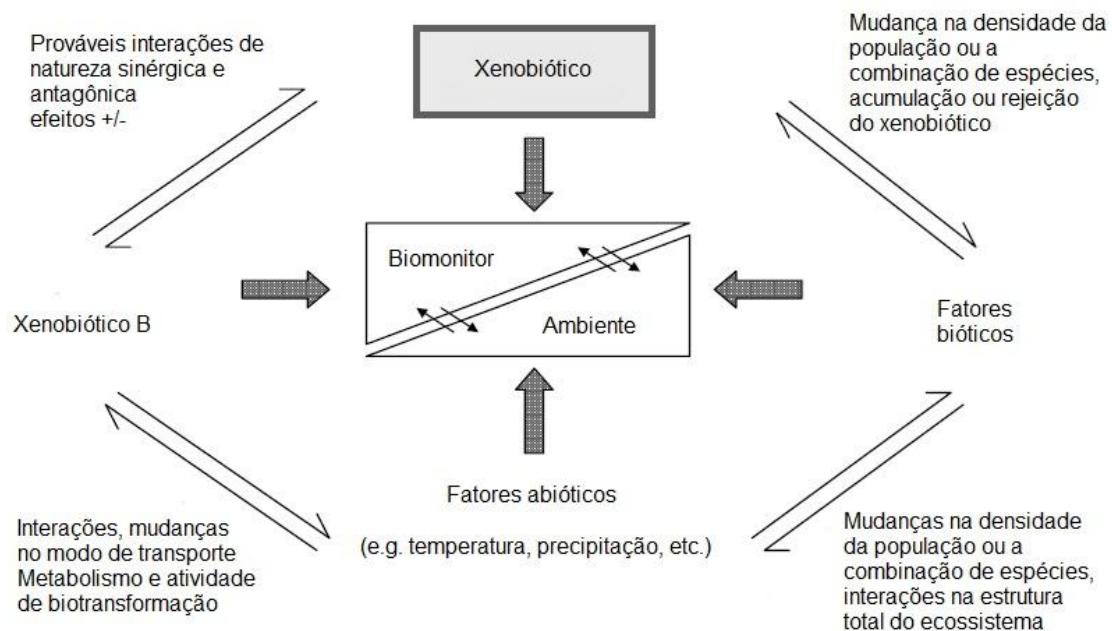


FIGURA 1 - INTERAÇÕES ENTRE OS XENOBIÓTICOS E ORGANISMOS NO AMBIENTE. ADAPTADO DE MARKERT *ET AL.* (2003).

Trabalhos de biomonitoramento têm sido desenvolvidos visando determinar a qualidade ambiental de diferentes localidades, como os trabalhos de Hose *et al.* (1987) que verificaram elevada frequência de micronúcleos em peixes de locais contaminados na Califórnia; Pandrangi *et al.* (1995) que realizaram o ensaio cometa para avaliar animais coletados em sete diferentes localidades na Região dos Grandes Lagos, no Canadá; Bresler *et al.* (1999) trabalhando com a espécie *Platichthys flesus* avaliou a qualidade das regiões litorais do Mar Vermelho, Mar Mediterrâneo e Mar do Norte através do teste do micronúcleo písceo. Na Escócia, Bombail *et al.* (2001) avaliaram a frequência de micronúcleos e as quebras no DNA pelo ensaio cometa em *Pholis gunnellus*; e de Aarab *et al.* (2008), que avaliou os efeitos histopatológicos e histoquímicos em mexilhões coletados próximos a uma indústria de fundição de alumínio na Noruega.

No Brasil, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos, sendo a maioria deles recentes. Domingos *et al.* (2009) detectou alterações bioquímicas, histopatológicas e genotóxicas em *Cathorops spixii* coletados em dois estuários no Brasil. Katsumiti *et al.* (2009) avaliou através de diversos biomarcadores na espécie *C. spixii*, os danos causados pela explosão do navio Vicuña na baía de

Paranaguá em 2004. Azevedo *et al.* (2009) utilizando diversos biomarcadores, também na espécie *C. spixii*, avaliou a qualidade das águas do complexo estuarino de Santos - São Vicente. Fernandez *et al.* (2011) avaliou os danos ao fígado e as anormalidades nucleares de *A. brasiliensis* causados pela poluição em duas praias de São Paulo.

2.2 BIOMONITORES

Biomonitores, também conhecidos como organismos sentinelas, são organismos expostos à contaminação no ambiente, e que sua análise periódica origina um biomonitoramento (KNIE; LOPES, 2004). Na seleção de um biomonitor alguns aspectos importantes devem ser considerados: a) os animais devem dividir o mesmo ambiente com o homem; b) devem responder de forma semelhante a agentes químicos; c) devem desenvolver patologias similares como resposta a estes efeitos (DA SILVA *et al.*, 2003); d) além de serem ecologicamente significativos, amplamente distribuídos, preferencialmente de importância econômica e disponíveis o ano todo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Dentre os principais organismos utilizados como biomonitores estão espécies de moluscos, peixes, anfíbios, mamíferos (COTELLE; FÉRARD, 1999) e algas (AOYAMA *et al.*, 2003). Os peixes são amplamente utilizados por apresentarem respostas similares aos vertebrados aos agentes tóxicos, e são um dos principais vetores de transferência de contaminantes da água para humanos (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Além disso, os peixes, assim como mamíferos, sofrem bioacumulação, são capazes de responder a agentes químicos em baixas concentrações e são capazes de ativar o sistema enzimático do citocromo P450 para biotransformação (DA SILVA *et al.*, 2003) entre outros efeitos passíveis de ocorrer.

2.2.1 *Cathorops spixii*

Os bagres marinhos da família Ariidae são considerados o grupo de peixes mais importante em termos de números de espécies, densidade e biomassa (BARLETTA; BLABER, 2007; BARLETTA *et al.*, 2008; LOWE-

MCCONNELL, 1987). Eles são considerados recursos pesqueiros abundantes e economicamente importantes na pesca artesanal na região sul do Brasil (REIS, 1986). Este grupo também tem sido constantemente utilizado em estudos de ecologia de regiões costeiras (MARCENIUK, 2005).

A família Ariidae apresenta uma morfologia externa bastante uniforme, e em função disso, são classificados principalmente pela forma e disposição das placas dentárias relacionadas ao vômer e das placas acessórias (MARCENIUK, 2005).

Eles ocorrem principalmente em ambientes marinhos, estuarinos e de água doce, mais especificamente em águas costeiras rasas e com fundos lodosos (ANDREATA *et al.*, 1990; AZEVEDO *et al.*, 1999). Vários aspectos permeiam a história de vida deste grupo como a migração para o curso inferior dos estuários para a desova, cuidado da ninhada realizado pelos machos pela incubação oral por aproximadamente dois meses, o desenvolvimento precoce dos jovens ocorrendo em baías e estuários, e a migração para as zonas costeiras quando se tornam adultos (ARAÚJO, 1988).

A espécie *Cathorops spixii* (FIGURA 2), mais conhecida como bagre-amarelo, se distribui desde a Guiana Francesa até a região sul do Brasil, habitando principalmente estuários e rios costeiros em profundidades de no máximo 50 m (FIGUEREIREDO; MENEZES, 1978; MARCENIUK, 2005). Esta espécie apresenta comprimento total máximo de 30 cm e alimenta-se principalmente de pequenos peixes e invertebrados bentônicos (WAKABARA *et al.*, 1996).



FIGURA 2 - EXEMPLAR DE *Cathorops spixii* COLETADO NAS BAÍAS DE GUARATUBA E PARANAGUÁ (ESCALA = 2 CM). (FONTE: TATIANE KLINGELFUS)

Este ariídeo é a espécie mais abundante no Complexo Estuarino de Paranaguá, além de ter o ciclo de vida completo neste ambiente. Ela é significativamente comercializada no mercado de peixes de Paranaguá, localizado na mesma região (FÁVARO *et al.*, 2005).

Cathorops spixii têm sido utilizado como espécie bioindicadora em diversos estudos como nos trabalhos de Boldrini e Navas-Pereira (1987) e Farias (2005). Estes trabalhos apresentaram resultados a respeito da bioacumulação nesta espécie após uma comparação entre uma área poluída (baía de Santos) e uma área não poluída (Cananéia). Outro estudo, também nessa área, recomendou esta espécie como ideal para programas de biomonitoramento ambiental, para avaliar a evolução da contaminação por metais (AZEVEDO *et al.*, 2009).

2.2.2 *Atherinella brasiliensis*

Os peixes da ordem Atheriniformes são principalmente distribuídos em águas tropicais marinhas, embora algumas espécies possam ser encontradas em água doce (HOSTIM-SILVA *et al.*, 1995). Dentro dos Atheriniformes, a família Atherinopsidae está distribuída em 104 espécies dentro de 13 gêneros (DYER, 2003). *Atherinella brasiliensis* (QUOY; GAIMARD, 1825) (FIGURA 3), popularmente conhecida como peixe-rei, é uma espécie relativamente pequena quando comparada aos outros gêneros da família Atherinopsidae, com os adultos atingindo aproximadamente 16 cm de comprimento total. Esta espécie está distribuída em águas estuarinas desde a Venezuela até o sul do Brasil, sendo encontrada normalmente na desembocadura de rios e nas regiões de águas salobras. Alimenta-se basicamente de detritos vegetais; e em menor escala, de pequenos peixes e crustáceos e ocasionalmente de outros invertebrados (FIGUEIREDO; MENEZES, 1978).

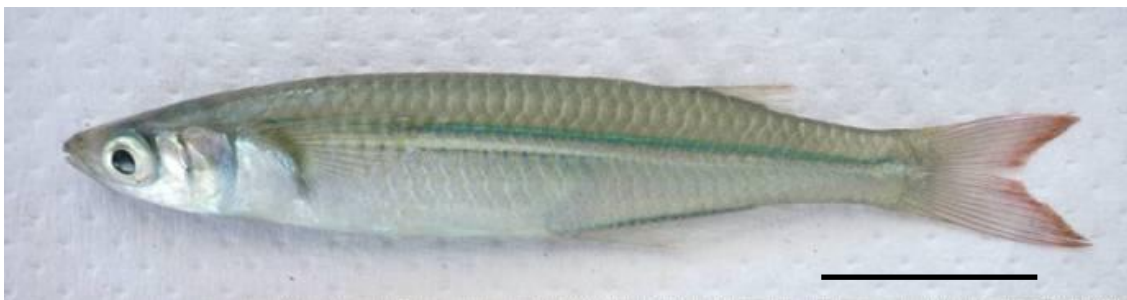


FIGURA 3 - EXEMPLAR DE *Atherinella brasiliensis* COLETADO NAS BAÍAS DE GUARATUBA E PARANAGUÁ (ESCALA = 2 CM). (FONTE: TATIANE KLINGELFUS)

Esta espécie é considerada tipicamente estuarina e residente (BARBIERI *et al.*, 1990; PESSANHA; ARAUJO, 2001), sendo descrita também como uma das mais abundantes em áreas rasas estuarinas do sudeste do Brasil (BARBIERI *et al.*, 1990; ANDREATA *et al.*, 1997; PESSANHA; ARAUJO, 2001).

Embora esta espécie não tenha importância comercial, ela é facilmente capturada por pescadores através de varas de pesca. Por exemplo, durante o verão, diversos deles têm o costume de ficar nas duas pontes que cobrem o canal Tramandaí, e capturam uma grande quantidade de animais (BERVIAN; FONTOURA, 2007). Sabe-se também que alguns pescadores na baía de Guaratuba e Paranaguá utilizam essa espécie como fonte de alimento.

O processo reprodutivo de *A. brasiliensis* é intimamente relacionado com a temperatura e com as variações sazonais que influenciam no comprimento e na massa corporal. Esta espécie também pode ser utilizada em estudos e avaliações de impacto ambiental bem como em ações de planos de manejo e conservação em ambientes estuarinos (FÁVARO *et al.*, 2007). Ela age também como peça importante nas cadeias tróficas, pois servem de alimento para diversas espécies animais como morcegos, aves e outros peixes (BORDIGNON, 2006; DIAS *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos relacionados à avaliação de impactos ambientais utilizaram a *A. brasiliensis*, sendo que esta espécie demonstrou ser uma boa bioindicadora (CORREIA *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2009; FERNANDEZ *et al.*, 2011; SOUZA-BASTOS; FREIRE, 2011).

2.3 BIOMARCADORES

Peakall (1994) definiu o termo biomarcador como uma mudança em uma resposta biológica (desde a molecular por meio de respostas celulares e fisiológicas à mudanças comportamentais) que pode estar relacionada à exposição ou efeitos tóxicos de substâncias químicas ambientais. Ele também classificou os biomarcadores em hematológicos, imunológicos, reprodutivos, endócrinos, fisiológicos, morfológicos, enzimáticos, genéticos, entre outros.

Gestel e Brummelen (1996) redefiniram este termo fazendo uma conexão com os diferentes níveis de organização biológica. Considerando o biomarcador como qualquer resposta biológica a um agente químico ambiental em nível subindividual, medido dentro de um organismo ou em seus produtos (urina, fezes, pelos, penas, etc.), indicando um desvio do estado normal que não pode ser detectado no organismo intacto.

Van der Oost *et al.* (2003) definiu que biomarcadores são alterações observadas em organismos em nível molecular, genético, bioquímico e histopatológico (que podem ou não gerar consequências ao indivíduo) que integram dados bióticos aos abióticos a fim de obter informações a respeito de um determinado ambiente. O estabelecimento de correlações entre diferentes biomarcadores é importante em relação à variabilidade de resposta entre espécies frente a um agente tóxico. Isto pode ser resultado de diferenças interespecíficas nas taxas de absorção, acumulação, metabolismo, excreção e eficiência de reparo do DNA. Desta forma, a adoção de múltiplos biomarcadores em uma variedade de espécies é importante para uma avaliação completa do impacto de poluentes sobre os organismos selecionados (JHA, 2008).

Muita informação a respeito dos efeitos biológicos de um poluente (além de sua quantificação) pode ser observada através da utilização dos biomarcadores. Para ser considerado bom, um biomarcador deve ser um indicador sensível de respostas biológicas e pode ser utilizado para obter sinais precoces de risco ambiental além de fornecer informações sobre o estado de saúde de um organismo (DA SILVA *et al.*, 2003).

Alguns critérios importantes devem ser considerados na escolha de um biomarcador, entre eles estão: (i) a facilidade de medida, que permite a

quantificação de múltiplos indivíduos; (ii) a resposta em relação à dose ou tempo ao contaminante, permitindo a avaliação da magnitude da exposição ou efeito; (iii) a compreensão e especificação de limites de variabilidade devido a outros fatores (sexo, idade, peso, manuseio e estação do ano, temperatura, salinidade, entre outros), que não a ação do contaminante em estudo; (iv) a significância biológica, que relaciona o biomarcador aos processos biológicos mais importantes (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os biomarcadores podem ser identificados nos níveis bioquímico, celular, individual, populacional, de comunidade ou de ecossistema. Porém, é nos níveis organizacionais mais básicos, nas respostas bioquímicas e moleculares, que os efeitos iniciais dos poluentes são observados. Nestas situações, as alterações dos poluentes podem ser reversíveis, de forma que medidas preventivas possam ser tomadas evitando o comprometimento mais severo do ambiente (VAN DER OOST *et al.*, 2003)

Os biomarcadores são divididos em: (i) biomarcadores de exposição: definidos como algum xenobiótico, seus metabólitos ou produtos da interação entre o xenobiótico e uma molécula ou célula que é medida nos organismos ou suas subunidades (DEPLEDGE, 1996); (ii) biomarcadores de efeito: que representam alguma alteração química, fisiológica, comportamental ou outra que pode modificar o bem-estar de um organismo. Diversos componentes moleculares e celulares em diferentes espécies de peixes têm sido usados como biomarcadores de exposição e efeito, incluindo parâmetros bioquímicos, imunológicos e genéticos, sendo que dentre os marcadores genéticos podemos incluir a análise da frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares, quebras cromossômicas e quebras e alterações na fita de DNA; e (iii) biomarcadores de susceptibilidade: indicam a habilidade inerente ou adquirida de um organismo em responder ao desafio da exposição a uma substância xenobiótica específica, incluindo fatores genéticos e mudanças nos receptores que alteram a susceptibilidade de um organismo a essa exposição (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

2.3.1 Biomarcadores bioquímicos

Os biomarcadores bioquímicos apresentam boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise, quando comparados às análises químicas (SCHLENK, 1999). As alterações bioquímicas são as primeiras respostas detectadas e quantificadas frente à variação ambiental, incluindo alterações no ambiente químico (BUCHELI; FENT, 1995). Por isso, biomarcadores bioquímicos são frequentemente mais sensíveis que outros em níveis mais elevados de organização biológica, como células, organismos e populações (STEGEMAN *et al.*, 1992). Devido a este efeito observado, que precede alterações maiores nas populações, eles são chamados de bioindicadores precoces de contaminação ambiental (PAYNE *et al.*, 1987).

Dentre os principais grupos de biomarcadores bioquímicos, podemos incluir os biomarcadores de biotransformação, de estresse oxidativo e de neurotoxicidade (OOST *et al.*, 2003).

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

2.3.1.1 Atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

O citocromo P450 (ou CYP) age como fator principal na fase I da biotransformação de uma gama muito grande de compostos exógenos e endógenos (NELSON *et al.*, 1996). Ele recebe esse nome porque Omura e Sato (1964) observaram que o complexo formado com o monóxido de carbono apresenta um pico de absorção característico no comprimento de onda de 450 nm. Numerosos estudos têm demonstrado indução do citocromo P450 em peixes por muitos contaminantes. A indução do CYP450 em fígado de peixes é reconhecida como um excelente biomarcador de exposição a contaminantes orgânicos antropogênicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), Bifenilas Policloradas (PCBs), dioxinas e furanos (GOKSOYR;

FÖRLIN, 1992). Através da alteração da estrutura química de compostos orgânicos, o citocromo P450 pode gerar compostos não tóxicos, menos ou mais tóxicos do que a substância original (SCHLENK, 2008).

O mecanismo de indução começa com a estimulação da transcrição do gene CYP1A. A indução da síntese de CYP1A está associada com a aceleração da biotransformação de hidrocarbonetos aromáticos, seguido pelo aumento da eliminação destes químicos como compensação, e dessa forma previne a bioacumulação de químicos que são substratos para a enzima CYP1A. Contudo, a indução de CYP1A pode ativar certas protoxinas e procarcinógenos assim como gerar espécies reativas de oxigênio (MACKENZIE, 2008).

A indução das isoenzimas do CYP450 é uma resposta sensível a determinados xenobióticos, podendo ser utilizada como biomarcador. A atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) é uma das reações catalizadas pela subfamília CYP1A1 (BUCHELI; FENT, 1995). Ela catalisa uma reação de O-desalquilação, dependente de NADPH, na qual o substrato é a 7-etoxiresorufina, o produto formado na reação, a resorufina, pode ser medida por espectrofluorímetro (STEGEMAN; HANN, 1994).

A reação promovida pela EROD é altamente induzida por tratamento com alguns agentes tóxicos, como PAHs, PCBs, dibenzo p-dioxinas policloradas (PCDDs) e policlorados dibenzofuranos (PCDFs). Por outro lado, a atividade de EROD é inibida em peixes expostos a organoestênicos, benzeno, cádmio e acrilamida (ANDERSSON; FÖRLIN, 1992; HUGGETT *et al.*, 1992; BUCHELI; FENT, 1995; OOST *et al.*, 2003; LU; WANG; ZHU, 2008).

2.3.1.2 Atividade da glutathiona S-transferase (GST)

A glutathiona S-transferase catalisa a conjugação da glutathiona a vários substratos hidrofóbicos eletrofílicos, durante a fase II da biotransformação, dessa forma atuando como uma enzima essencial na proteção contra compostos potencialmente reativos (GEORGE, 1993; MARIONNET *et al.*, 2006). A GST possui papel importante no metabolismo de produtos secundários, incluindo a estabilização de flavonoides; a redução de hidroperóxidos a monohidróxi-álcool em conjunto com as peroxidases durante

o estresse oxidativo (DIXON; LAPTHORN, 2002). Elas recebem este nome porque atuam como catalisadoras da conjugação de vários compostos eletrofílicos ou oriundos da fase I, com o tripeptídeo glutatona reduzida (GSH), reduzindo a probabilidade desses compostos se ligarem a outras moléculas celulares, como o DNA (HUGGETT *et al.*, 1992).

As GST são uma superfamília de enzimas diméricas que ocorrem em organismos procarióticos, plantas, moluscos, crustáceos, insetos, anfíbios, répteis, peixes e mamíferos (OOST *et al.*, 2003). Em vertebrados, elas estão mais presentes no fígado.

Elevação na atividade da GST hepática foi relatada após exposição de peixes a fungicidas, glifosato, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenilas policloradas e organoclorados (ALMLI *et al.*, 2002; BAGNYUKOVA *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2008; CONTARDO-JARA *et al.*, 2009; KLEINOW *et al.*, 1987).

2.3.1.3 Lipoperoxidação (LPO)

A lipoperoxidação é um processo fisiológico relacionado à maturação celular e mobilização de lipídios (SCHEWE *et al.*, 1986; FEUSSNER *et al.*, 1995). Alguns xenobióticos podem afetar esse processo, gerando perda na integridade da membrana com aumento de sua permeabilidade, alteração no fluxo de íons transmembrana, disfunção no transporte de Na⁺/K⁺, influxo excessivo de cálcio e ativação de enzimas como as proteases, fosfolipases e nucleases (OLIVEIRA, 1999; MEAGHER; FITZGERALD, 2000; BARREIROS *et al.*, 2006).

A LPO tem sido utilizada com sucesso como medida de estresse oxidativo induzido por xenobióticos em organismos expostos a uma variedade de substâncias químicas como metais (ferro, cádmio, mercúrio e cobre) e pesticidas como paraquat, malation, deltametrina e glifosato (KELLY *et al.*, 1998; SAYED *et al.*, 2003; OOST *et al.*, 2003; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

2.3.1.4 Atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase, que está presente no tecido muscular e cerebral, é uma enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina,

formando colina e ácido acético. Quando a atividade da AChE é inibida ocorre um bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos, o que pode paralisar algumas funções vitais do organismo (STENESH, 1998).

A AChE é um biomarcador específico para carbamatos e organofosforados, porém ela pode ser inibida ou estimulada por outras substâncias como metais, organoclorados e PAHs (PAYNE *et al.*, 1996; MARTINEZ-TABCHE *et al.*, 1997; AKAISHI *et al.*, 2004). A inibição ocorre de forma irreversível por organofosforados, devido à formação de um complexo enzimático muito estável (ADAMS, 1992), e de forma reversível por carbamatos.

2.3.1.5 Metalotioneínas (MT)

As metalotioneínas constituem uma família de proteínas de baixo peso molecular ricas em cisteínas, que atuam na regulação de metais essenciais como o Cu e Zn, e na detoxificação de metais que não são essenciais como Cd e Hg (ROESIJADI; ROBINSON, 1994). Elas se ligam a íons metálicos captados pela célula para removê-los através de alvos celulares de toxicidade (OOST *et al.*, 2003).

As interações celulares envolvendo as MT ocorrem primeiramente com a interceptação e ligação com íons metálicos que são capturados pelas células, e depois na remoção dos metais que não se ligam às moléculas de tioneínas, que incluem os que são tóxicos. Existem relatos de metalotioneínas se ligando a Cd, Cu, Zn, Hg, Co, Ni, Bi e Ag (STEGEMAN *et al.*, 1992; VIARENGO *et al.*, 2000).

Espécies de peixes expostas a metais demonstraram aumento nos níveis de MT em experimentos voltados para analisar relações de dose-resposta (GEORGE; YOUNG, 1986; GEORGE, 1989; HOGSTRAND; HAUX, 1991; CASTAÑO *et al.*, 1998) ou tempo-resposta (BEYER *et al.*, 1997). A indução dessa proteína pode variar, dependendo das espécies e dos tecidos analisados (ROESIJADI, 1992).

2.3.2 Biomarcadores genéticos

Os primeiros testes para a avaliação de genotoxicidade surgiram por volta dos anos de 1950 e 1960, quando os fundamentos da ecologia e da genética foram agregados, para iniciar os estudos na área de Genética Toxicológica (VILLELA *et al.*, 2003). Devido às implicações ecológicas diretas associadas com genotoxicidade, a detecção e a quantificação de danos genéticos são de grande interesse em estudos ambientais (NACCI *et al.*, 1996).

A função primária dos testes de toxicologia genética é investigar, usando células ou organismos, o potencial de agentes químicos induzirem mutações nas células somáticas, ou que possam ser transmitidas às futuras gerações (DA SILVA *et al.*, 2003).

Dois tipos de alterações devem ser levados em consideração quando nos referimos aos testes de genotoxicidade. Primeiramente devemos considerar a indução de mutação em células germinativas, que podem ter consequências em futuras gerações. E segundo, as mutações em células somáticas, relacionadas com a iniciação e a progressão de doenças como o câncer (RIBEIRO *et al.*, 2003). Esses dois efeitos podem ser visualizados quando nos referimos aos efeitos de agentes tóxicos em organismos aquáticos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998)

As alterações estruturais nos cromossomos (clastogenicidade) ou nas sequências de pares de bases do DNA (mutagenicidade) pela exposição a agentes tóxicos podem ser referidas como genotoxicidade (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Uma vez que as mutações são frequentemente associadas com o desenvolvimento de cânceres e defeitos ao nascimento, o conhecimento do potencial genotóxico de um agente químico industrializado ou naturalmente presente no ambiente é uma informação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de risco para o homem (RIBEIRO *et al.*, 2003).

O impacto de materiais tóxicos na integridade e no funcionamento do DNA da célula pode ser investigado em muitos organismos sob diferentes condições (McCARTHY; SHUGART, 1990). Dentre os principais testes, podemos citar os de avaliação da frequência de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, formação de adutos de DNA, ensaio cometa (que

avalia quebras no DNA) e medição da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares (BOMBAIL *et al.*, 2001).

2.3.2.1 Teste do micronúcleo písceo (TMP)

O Teste do Micronúcleo Písceo baseia-se na detecção de pequenos núcleos (micronúcleos) formados por fragmentos resultantes de danos cromossômicos induzidos por agentes mutagênicos, ou por cromossomos que se atrasaram em relação ao fuso mitótico (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1975).

Há quatro “mecanismos” reconhecidos pelos quais os micronúcleos podem surgir (HEDDLE *et al.*, 1991):

- (1) a perda de fragmento mitótico acêntrico;
- (2) Uma variedade de consequências mecânicas de quebra cromossômica e troca;
- (3) perda de cromossomos mitóticos inteiros;
- (4) apoptose.

Hoofman e De Raat (1982), tomando por base o teste do micronúcleo originalmente desenvolvido por Schmid (1975) para células da medula óssea de camundongos, introduziram-no nos estudos de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório. Esta modificação do teste original passou a ser conhecida como Teste do Micronúcleo Písceo (CARRASCO *et al.*, 1990).

Devido aos peixes terem um grande número de cromossomos, e muitas vezes de pequeno tamanho, as análises das metáfases para avaliação de aberrações cromossômicas são dificultadas, enquanto que o estudo de micronúcleos é fácil e possível de ser realizado em eritrócitos, devido ao fato destes serem nucleados (HAYASHI *et al.*, 1998).

Hose *et al.* (1987) descreveram as alterações morfológicas nos núcleos de eritrócitos circulantes de peixes. Estas alterações são passíveis de serem utilizadas como indicadores dos efeitos genotóxicos de substâncias químicas presentes na água ao serem incluídas nas contagens dos micronúcleos podendo ser classificadas segundo Carrasco *et al.* (1990) como:

- a) *Blebbid*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina. O tamanho destas

evaginações situa-se na faixa de pequenas protuberâncias até estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.

b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *Blebbed*. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.

c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.

d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Estes cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pelo envelope nuclear.

Sugere-se que as anomalias nucleares devem ser incluídas nas análises de genotoxicidade em peixes baseadas na contagem de micronúcleo, por apresentar resultados mais confiáveis e mais completos (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2001).

O TMP tem sido constantemente utilizado em biomonitoramentos, alguns trabalhos recentes apresentaram resultados que evidenciam a contaminação ambiental como Pacheco *et al.* (2005) que utilizou o teste do micronúcleo písceo em 3 espécies de peixes para monitorar o rio Aveiro em Portugal; Amado *et al.* (2006) utilizou dois gêneros de peixes para monitorar a Lagoa dos Patos no Brasil; Ramsdorf (2007) utilizando duas espécies de *Astyanax* monitorou a bacia hidrográfica do rio Iraí e a bacia hidrográfica do rio Iguaçu através do teste do micronúcleo em 3 tecidos diferentes (sangue, fígado e rim); e Katsumiti *et al.* (2009) utilizou o teste do micronúcleo juntamente com outros biomarcadores para avaliar a baía de Paranaguá utilizando o bioindicador *C. spixii*.

A utilização da laranja de acridina nos procedimentos de coloração é uma maneira interessante de aumentar a sensibilidade do TMP. Em peixes, ela foi utilizada primeiramente por Ueda *et al.* (1992), seguido por Hayashi *et al.* (1998), Bolognesi *et al.* (2006) e Costa e Costa (2007). A laranja de acridina é capaz de se ligar ao DNA e RNA, que quando em fluorescência, apresentam cores amarelo esverdeada e avermelhada, respectivamente (ÇAVAS;

GÖZÜKARA, 2005). Esta coloração também reduz a contabilização de artefatos, o processo de análise é mais rápido, além de permitir a análise da taxa de renovação celular através da contabilização de eritrócitos policromáticos (POLARD *et al.* 2011).

2.3.2.2 Ensaio cometa

O ensaio cometa também conhecido como SCGE (*Single-Cell Gel Eletrophoresis*), investiga danos no DNA ao nível celular individual através da medição da migração em gel do DNA de células depois de uma corrida eletroforética (SINGH *et al.*, 1988). O nome cometa refere – se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL *et al.*, 2001). Consiste num método versátil e relativamente barato para a avaliação da genotoxicidade. Pode ser utilizado praticamente em qualquer tipo de célula nucleada e de qualquer espécie.

O comprimento da cauda do cometa, que é uma medida de genotoxicidade, pode ser influenciado por vários fatores, como o tempo de desenovelamento do DNA antes da eletroforese (PROVOST *et al.*, 1993; SINGH; STEPHENS, 1997). Embora, no caso de ensaios bem padronizados esta variável seja irrelevante. O relaxamento da condensação e as quebras na estrutura molecular são ocasionados por danos diretos à molécula de DNA (COLLINS *et al.*, 2008; ROJAS *et al.*, 1999).

O ensaio cometa é uma ferramenta interessante para a demonstração de genotoxicidade de exposições a contaminantes e para investigar os impactos na integridade do DNA, reparo e recuperação em espécies de interesse ambiental (BELPAEME *et al.*, 1998). Apresenta alta sensibilidade, permitindo obter resultados a partir de poucas células, e os dados podem ser extraídos de cada célula individualmente (SASAKI *et al.*, 1997).

Segundo Jha (2008), apesar da ampla utilização do ensaio cometa em ecotoxicologia, existem aspectos onde a aplicação do teste tem sido limitada, como: (a) atualmente o ensaio é aplicado com sucesso a um número limitado de espécies nativas, principalmente para aplicação em monitoramento ambiental; (b) são escassos os estudos ecotoxicológicos que aplicam a técnica

nas células germinativas dos organismos; c) em espécies nativas existe pouca compreensão sobre os mecanismos de indução e reparo do DNA.

O tecido mais pesquisado através do ensaio cometa é o sanguíneo, devido aos eritrócitos serem facilmente coletados. Outros tecidos que também podem ser utilizados são do fígado, por se tratar do principal órgão do metabolismo, das brânquias, devido ao seu contínuo contato com a fase aquosa e do rim, tecido produtor de sangue em peixes (BELPAEME *et al.*, 1998). A característica de algumas substâncias genotóxicas em serem tecido-específicas torna o ensaio cometa ideal para avaliar os danos do contaminante sobre um tecido específico (RAMSDORF, 2007).

2.3.2.3 Ensaio de Difusão do DNA

O ensaio de difusão do DNA é uma versão modificada do Ensaio Cometa, mas sem a fase de eletroforese. Os núcleos das células apoptóticas são indefinidos, sem qualquer limite claro devido a difusão do DNA em agarose, além de apresentar um diâmetro de 3 vezes maior que o diâmetro médio nuclear. Núcleos de células necróticas têm um limite externo bem definido e uma aparência relativamente homogênea (SINGH, 2000).

Este ensaio foi desenvolvido primeiramente para linfócitos humanos, buscando a quantificação de apoptoses (SINGH, 2000). A apoptose ou morte celular programada nos tecidos de um organismo não está associada com inflamação ou cicatrizes, ao contrário da necrose. Apoptose é um evento normal que ocorre durante e após o desenvolvimento. É um evento importante e inevitável na remodelação de tecidos durante o desenvolvimento e envelhecimento (SEARLE *et al.*, 1982). Este fenômeno ocorre em células danificadas por determinados níveis de agentes tóxicos. Também é um processo crucial para eliminar as células cancerosas (GUCHELAAR *et al.*, 1997).

O ensaio de difusão do DNA é um método simples, sensível e rápido para estimar a apoptose em células individuais. As lâminas contendo as células em agarose são submetidas a uma solução de lise de sais e detergentes (para

permitir a difusão de DNA de baixo peso molecular em agarose) e, finalmente, a visualização do DNA por um corante fluorescente sensível (SINGH, 2000).

Com base nas diferenças estruturais entre os núcleos apoptóticos e necróticos, recomenda-se que o ensaio de difusão DNA seja usado para distinguir células apoptóticas, oriundas de células necróticas. No entanto, outros pesquisadores foram incapazes de diferenciar entre células apoptóticas e necróticas através deste ensaio (GICHNER *et al.*, 2005). O uso do ensaio de difusão do DNA para avaliar a apoptose foi revisado por Singh (2005) e sua aplicação em um pequeno número de estudos ambientais tem mostrado resultados promissores (NIGRO *et al.*, 2002; FRENZILLI *et al.*, 2004; BARGA *et al.*, 2006; FRENZILLI *et al.*, 2008; ROCCO *et al.*, 2010).

2.3.3 Biomarcadores histopatológicos

A histopatologia é uma ferramenta útil que pode demonstrar efeitos decorrentes da exposição de xenobióticos, representando um nível intermediário de organização biológica (MYERS; FOURNIE, 2002). A utilização da histopatologia em avaliações ambientais permite detectar os efeitos agudos e crônicos de exposição dos indivíduos à xenobióticos, pois permite avaliar seus efeitos diretamente ao nível das células e tecidos, em contraste aos biomarcadores bioquímicos, que detectam os efeitos do agente tóxico no nível de enzimas e proteínas (HINTON *et al.*, 1992). Segundo Akaishi *et al.* (2004), os biomarcadores histopatológicos, juntamente com os parâmetros bioquímicos, permitem analisar as respostas fisiológicas dos indivíduos, assim como estabelecer o grau de toxicidade dos contaminantes.

O fígado representa um órgão alvo importante e adequado para análises patológicas na procura de danos aos tecidos e células, já que possui um papel chave no metabolismo e subsequente excreção de xenobióticos. Considerado a maior glândula do corpo humano, este órgão é essencial para a homeostase do organismo sob condições ambientais variáveis (MELA *et al.*, 2007; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002)

Biomarcadores histopatológicos têm a capacidade de diferenciar lesões nos órgãos induzidas por doenças e outros fatores do meio ambiente daquelas provocadas pela exposição aos poluentes (SCHWAIGER *et al.*, 1997).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade ambiental das baías de Guaratuba e Paranaguá através de biomarcadores bioquímicos, genéticos e histopatológicos utilizando as espécies de peixes estuarinos *Cathorops spixii* e *Atherinella brasiliensis*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizar a abordagem de vários biomarcadores em conjunto a fim de avaliar a qualidade ambiental das baías de Guaratuba e Paranaguá;

Avaliar as diferenças sazonais nas respostas dos biomarcadores frente à contaminação nas baías de Guaratuba e Paranaguá;

Comparar a quantidade de metais acumulados no músculo e fígado das espécies *Cathorops spixii* e *Atherinella brasiliensis*;

Comparar as respostas dos biomarcadores nas espécies *Cathorops spixii* e *Atherinella brasiliensis* frente a contaminação ambiental.

4 CAPÍTULO I

BIOMARCADORES EVIDENCIANDO DIFERENTES FONTES DE POLUIÇÃO EM DOIS ESTUÁRIOS SUL-BRASILEIROS USANDO *Cathorops spixii* COMO BIOMONITOR

Santos, G.S.¹; Piancini, L.D.S.¹; Yamamoto, F.I.²; Guiloski, I.C.³; Oliveira
Ribeiro, C.A.²; Silva de Assis, H.C.³; Cestari, M.M.¹

¹ Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

² Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

³ Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná

4.1 RESUMO

Os estuários são muitas vezes referidos como o tipo de habitat mais degradado do mundo. São vulneráveis a diversas perturbações causadas por atividades humanas, incluindo a agricultura, a indústria, os assentamentos humanos, a pesca e as atividades portuárias. A baía de Guaratuba é afetado principalmente pelo desenvolvimento das atividades agrícolas, esgoto doméstico e por modificações hidrológicas provenientes da construção de barragens. Já a baía de Paranaguá recebe regularmente aportes provenientes do Porto, de indústrias locais e atividades agrícolas, além do esgoto doméstico, o que acarreta numa variedade muito grande de substâncias químicas que diariamente entram neste ambiente. A fim de avaliar a qualidade ambiental nestes estuários, bem como os efeitos da sazonalidade na disponibilidade de xenobióticos foram utilizados os seguintes biomarcadores: Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), Glutathione S-transferase (GST), Lipoperoxidação (LPO), Acetilcolinesterase (AChE), Metalotioneínas (MTs), Teste do micronúcleo píceo (TMP), Ensaio cometa, Ensaio de difusão do DNA, Histopatologia de fígado, além da análise de metais (As, Pb, Sn e Hg) no músculo e no fígado na espécie *Cathorops spixii*. Foram realizadas duas coletas (verão e inverno) em dois pontos de cada estuário. De acordo com os dados obtidos para os biomarcadores, tanto a baía de Guaratuba quanto a de Paranaguá são impactadas pela presença de xenobióticos, causando efeitos adversos à saúde das espécies pesquisadas. As respostas fornecidas pelos biomarcadores sugerem também que o aporte de xenobióticos nestes locais apresenta fontes diferentes, sendo as mais impactantes, as plantações o redor da baía em Guaratuba e as atividades relacionadas ao porto em Paranaguá. A relação entre a sazonalidade e as respostas dos biomarcadores também foi avaliada, com os pontos mais internos das baías apresentando maiores variações nas respostas. A contaminação por metais também foi evidenciada, sendo que o Hg foi mais encontrado em Guaratuba (relacionado a utilização de fertilizantes na agricultura) e o As em Paranaguá (ocorre naturalmente na região, mas também tem fonte nas indústrias de fertilizantes). A presença destes metais pode estar relacionada a alterações na saúde dos peixes das baías.

4.2 INTRODUÇÃO

Os estuários são muitas vezes referidos como o tipo de habitat mais degradado do mundo (CLARK *et al.*, 1997). São vulneráveis a diversas perturbações causadas por atividades humanas, incluindo a agricultura, a indústria, os assentamentos humanos, a pesca e as atividades portuárias (KENNISH, 2002). Entretanto, estes ecossistemas costeiros de transição mantêm recursos ecológicos e econômicos valiosos (COSTANZA *et al.*, 1997).

A presença de contaminantes orgânicos e inorgânicos nestes ambientes torna procedimentos de monitoramento e avaliação de risco essenciais para garantir a preservação da suas funções biológicas. Com isso, é necessária a busca de métodos de monitoramento mais robustos, sensíveis e representativos que possam expressar as implicações biológicas e ecológicas da poluição além da caracterização química ambiental (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

As baías de Guaratuba e Paranaguá apresentam diferentes tipos de habitats, entre eles estão os manguezais, marismas, gamboas e planícies de maré. Este mosaico é um fator essencial para inúmeras espécies de peixes, oferecendo recursos alimentares abundantes, proteção contra predação e outras condições que favorecem o crescimento e sobrevivência dos estágios iniciais do ciclo de vida de peixes (SASEKUMAR *et al.*, 1992; THAYER *et al.*, 1987). Muitas das etapas reprodutivas, incluindo dispersão de ovos e larvas, distribuição de juvenis e migrações, estão sincronizadas com o funcionamento dos ambientes estuarinos (BOCHLERT; MUNDY, 1988).

Os peixes são amplamente utilizados em monitoramentos por apresentarem respostas similares a outros vertebrados aos agentes tóxicos, sofrerem bioacumulação, serem capazes de transferir os contaminantes da água para os humanos, pela capacidade de responder a agentes químicos em baixas concentrações e de ativar o sistema enzimático do citocromo P450 para biotransformação (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A espécie *Cathorops spixii*, mais conhecida como bagre-amarelo, se distribui desde a Guiana Francesa até a região sul do Brasil, habitando principalmente estuários e rios costeiros em profundidades de no máximo 50m (FIGUEIREDO; MENEZES, 1978; MARCENIUK, 2005). Esta espécie apresenta

comprimento total máximo de 30 cm e alimenta-se principalmente de pequenos peixes e invertebrados bentônicos (WAKABARA *et al.*, 1996). Apresenta o ciclo de vida completo dentro do estuário (FÁVARO, *et al.*, 2005), além de ser referida como bioindicadora em diversos estudos recentes (e.g. FARIAS, 2005; AZEVEDO *et al.*, 2009; DOMINGOS *et al.*, 2009; KATSUMITI *et al.*, 2009; AZEVEDO *et al.*, 2011).

Biomarcadores são alterações observadas em organismos em nível molecular, genético, bioquímico, celular e histopatológico (que podem ou não gerar consequências ao indivíduo) que integram dados bióticos aos abióticos a fim de obter informações a respeito de um determinado ambiente (VAN DER OOST *et al.*, 2003). O estabelecimento de correlações entre diferentes biomarcadores é importante em relação à variabilidade de resposta entre espécies frente a um agente tóxico. Isto é resultado de diferenças interespecíficas nas taxas de absorção, acumulação, metabolismo, depuração excreção e eficiência de reparo DNA. Desta forma, a adoção de múltiplos biomarcadores é importante para uma avaliação completa do impacto de poluentes nos ecossistemas (JHA, 2008).

A etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) pertence à subfamília das CYP1A1 do grupo de enzimas do citocromo P450, relacionadas a fase I de biotransformação de xenobióticos. Na fase I ocorrem reações de oxidação, redução ou hidrólise, e os produtos formados são frequentemente mais reativos que os iniciais (SIROKÁ; DRASTICHOVÁ, 2004). A glutathione S-transferase (GST) catalisa a conjugação da glutathione, a fim de inativar e eliminar a uma gama de substratos hidrofóbicos eletrofílicos, durante a fase II da biotransformação (LEAVER *et al.*, 1993). A lipoperoxidação (LPO) ocorre quando há uma deficiência no sistema antioxidante, ocasionando a formação de hidroperóxidos, que vão gerar danos aos ácidos graxos da membrana celular (JIANG *et al.*, 1992).

A inibição da acetilcolinesterase é referida como um biomarcador de neurotoxicidade específico para organofosforados e carbamatos, além de responder também a metais, organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAYNE *et al.*, 1996; STURM *et al.*, 1999; MARTINEZ-TABCHE *et al.*, 1997; DOMINGOS *et al.*, 2009; KATSUMITI *et al.*, 2009).

As metalotioneínas constituem uma família de proteínas de baixo peso molecular ricas em cisteínas, que atuam na regulação de metais essenciais e na detoxificação de metais que não são essenciais. Elas se ligam a íons metálicos captados pela célula para removê-los através de alvos celulares de toxicidade (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

O teste do micronúcleo primeiramente sugerido por Heddle (1973) e Schmid (1975), sofreu diversas adaptações ao longo do tempo. Ele foi adaptado para células sanguíneas de peixes, as alterações morfológicas nucleares passaram a ser classificadas e contabilizadas, e a partir da coloração com laranja de acridina foi realizada a distinção entre eritrócitos jovens e maduros (HOOFTMAN; DE RAAT, 1982; CARRASCO *et al.*, 1990; UEDA *et al.*, 1992).

O ensaio cometa investiga danos no DNA ao nível celular individual através da medição da migração em gel do DNA de células depois de uma corrida eletroforética (SINGH *et al.*, 1988). Ele avalia genotoxicidade de exposições a contaminantes e investiga os impactos na integridade do DNA, reparo e recuperação em espécies de interesse ambiental (BELPAEME *et al.*, 1998). Apresenta sensibilidade alta, permitindo obter resultados a partir de poucas células e os dados podem ser extraídos de cada célula individualmente (SASAKI *et al.*, 1997).

O ensaio de difusão do DNA é uma versão modificada do ensaio cometa, mas sem a fase de eletroforese. Consiste num método simples, sensível e rápido para estimar a apoptose em células individuais. Os núcleos das células apoptóticas são indefinidos, sem qualquer limite claro devido a difusão do DNA em agarose, além de apresentar um diâmetro de 3 vezes maior que o diâmetro médio nuclear (SINGH, 2000). A sua aplicação como biomarcador tem mostrado resultados promissores, como demonstram alguns estudos ambientais (e. g. DEL BARGA *et al.*, 2006; FRENZILLI *et al.*, 2004, 2008; NIGRO *et al.*, 2002; ROCCO *et al.*, 2010).

A avaliação histopatológica pode ser considerada um bom biomarcador para estudos de biomonitoramento por demonstrar de forma clara e objetiva o grau de comprometimento de diferentes tecidos e órgãos alvos de acordo com a presença e frequência de alterações observadas. Além disso, representa um método simples, barato e relativamente rápido que informará as condições

patológicas de um indivíduo. O fígado representa um órgão alvo importante e adequado para análises patológicas na procura de danos aos tecidos e células, já que possui um papel chave no metabolismo e subsequente excreção de xenobióticos. Considerado a maior glândula do corpo humano, este órgão é essencial para a homeostase do organismo sob condições ambientais variáveis (MELA *et al.*, 2007; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002)

O objetivo deste estudo é avaliar a qualidade ambiental de dois estuários importantes da costa sul-brasileira (Guaratuba e Paranaguá) através de múltiplos biomarcadores (bioquímicos, genéticos e histopatológicos) e análises químicas (quantificação de metais) na espécie de bagre estuarino *Cathorops spixii* (Siluriformes, Ariidae).

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Área de estudo

A baía de Guaratuba está localizada no estado do Paraná ao sul da costa do estado, com uma área de 48.72 km². O clima é tipicamente subtropical com florestas úmidas e um verão chuvoso. Nesta baía ocorre o acesso entre as cidades de Matinhos e Guaratuba através de uma travessia por ferry-boat. Esta região apresenta recursos naturais importantes, e está envolvida por uma Área de Proteção Ambiental (APA) de 1995.86 km² que estabelece várias restrições em relação ao uso e ocupação do solo, qualidade da água e de descarga de efluentes. No entanto, uma das maiores plantações de banana do sul do Brasil está localizada em suas proximidades. Além das atividades agrícolas, esta região é influenciada por modificações hidrológicas provenientes da construção de barragens, dragagens, esgoto doméstico (destinados diretamente nos rios) e eliminação da mata ciliar (PIETZSCH *et al.*, 2010; PATCHINEELAM *et al.*, 2011).

A baía de Paranaguá está localizada ao centro da costa do estado do Paraná, com uma área de 677 mil km², e representa o terceiro estuário mais importante da costa brasileira. A importância econômica dela está relacionada às atividades pesqueiras, as áreas urbanas, ao turismo, as indústrias

(principalmente de fertilizantes), o terminal de combustíveis além do principal porto de embarque de grãos da América do Sul. O estuário é englobado por uma Área de Proteção Ambiental (APA) e tem uma importante função ecológica, agrupando pelo menos 10 unidades de conservação, com uma grande diversidade de ambientes, tais como ilhas, manguezais, restingas, rios, riachos de maré, costões rochosos e praias arenosas (LANA *et al.*, 2001). O impacto na baía está principalmente relacionado à presença dos Portos de Paranaguá e Antonina assim como a descarga de efluentes urbanos e industriais provenientes dos rios que chegam ao estuário. Além dos portos, a região abriga diversas marinas, atracadouros e estaleiros que recebem inúmeras embarcações de lazer, principalmente no período do verão, assim como movimentação de embarcações de pesca artesanal, fonte de subsistência de diversas comunidades ribeirinhas.

4.3.2 Amostragem dos peixes

Os exemplares de *Cathorops spixii* foram coletados através de arrasto de porta de 10 minutos nas estações de verão (Fevereiro de 2012) e inverno (Agosto de 2012) em dois pontos na baía de Guaratuba (G1 e G2) e dois pontos na baía de Paranaguá (P1 e P2) (Figura 4). Os exemplares foram transportados vivos em recipientes contendo a água do local de coleta e aeradores. No laboratório os organismos foram anestesiados com solução de benzocaína 0,01% e em seguida foi mensurado o comprimento total (CT), a massa (g) e determinado o sexo de cada indivíduo. Em seguida foram dissecados para a retirada de sangue (da veia caudal), fígado e músculo.



FIGURA 4 - BAÍAS DE GUARATUBA E PARANAGUÁ E OS PONTOS DE AMOSTRAGEM (SENDO G1 E G2 OS DOIS PONTOS NA BAÍA DE GUARATUBA, P1 E P2 OS DOIS PONTOS NA BAÍA DE PARANAGUÁ).

4.3.3 Fator de condição

Para a avaliação da relação comprimento/peso dos peixes amostrados foi utilizado o fator alométrico de condição (CF) que consiste primeiramente na obtenção de uma regressão linear entre os valores de massa (M) em gramas e comprimento total (CT) em centímetros, seguido pela aplicação da fórmula: $CF = M / CT^b$; onde b corresponde ao coeficiente angular obtido na curva de regressão.

4.3.4 Análises químicas de metais em músculo e fígado

Alíquotas do músculo e fígado dos peixes utilizados na análise de biomarcadores foram armazenadas em pequenos sacos plásticos e colocadas em freezer. No laboratório as amostras foram descongeladas e processadas através de um processo de digestão ácida seguido de um tratamento com peróxido de hidrogênio. As análises de quantificação de mercúrio (Hg), chumbo (Pb), estanho (Sn) e arsênio (As) foram realizadas através de espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES - Varian 720-ES) (Ceppa, 2010). As linhas analíticas para os metais foram As (193,696 nm), Pb (220,353 nm), Sn (189,925 nm) e Hg (253,652 nm) com os seguintes limites de quantificação: As (0,02 mg.dm⁻³), Pb (0,002 mg.dm⁻³), Sn (0,002 mg.dm⁻³) e Hg (0,01 µg.dm⁻³). O limite de detecção foi estabelecido com base no decreto n° 55.871 (BRASIL, 1965).

4.3.5 Biomarcadores

Foi retirado sangue da veia caudal para as análises do teste do micronúcleo píficeo, ensaio cometa e ensaio de difusão do DNA. O fígado foi utilizado para as análises bioquímicas (EROD, GST, LPO e Metalotioneínas), genotóxicas (ensaio cometa e de difusão, com hepatócitos) e histopatológica, e o músculo para a análise neurotóxica (atividade da AChE).

4.3.5.1 Biomarcadores bioquímicos

O fígado e músculo foram congelados em nitrogênio líquido, homogeneizados em PBS (pH 6,5(fígado), pH 7,0 (músculo)) e centrifugados a 10.000g por 20 min, a 4°C. Sobrenadantes foram armazenados em -80 °C. *Pools* de fígado de dois indivíduos foram utilizados para os ensaios de glutathione S-transferases (GST), 7-etóxi-resorulina-O-deetilase (EROD) e níveis de lipoperoxidação (LPO). A concentração proteica foi determinada utilizando o método de Bradford (1976), com soro albumina bovino como padrão.

Glutathione S-transferase (atividade da GST): 50 µL do sobrenadante e meio de reação (100µL, 1.5 mM GSH, 2.0 mM CDNB, 0.1 M de tampão fosfato-

potássio, pH 6.5) foram mantidos em uma microplaca de 96 espaços. Aumento da absorvância foi imediatamente medido a 340 nm em intervalos de 12 s e o coeficiente de extinção de $9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para calcular a atividade enzimática (KEEN *et al.*, 1976).

7-etóxi-resorulina-O-deetilase (atividade da EROD): foi medida através da fluorimetria como descrito por Burke e Mayer (1974) com modificações por Silva de Assis (1998).

Lipoperoxidação (LPO): 200 μl de sobrenadante e 800 μl de solução de reação (100 mM laranja xilenol, 25 mM H_2SO_4 , 4 mM BHT, hidrotolueno butilado e 250 μM $\text{FeSO}_4 \cdot \text{NH}_4$, sulfato de amônio ferroso em metanol puro) foram adicionados em tubos de 2mL. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 20 minutos e então centrifugados a 10.000 g por 10 min. Finalmente, 300 μl de sobrenadantes foram adicionados a microplacas de 96 espaços e a absorvância foi medida a 570nm. Para a determinação das concentrações de hidroperóxidos o coeficiente de extinção molar aparente para H_2O_2 e hidroperóxido cumene de $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi utilizado (JIANG *et al* 1992).

Acetilcolinesterase (atividade da AChE): O sobrenadante do músculo foi diluído (1:10, ou 10% v / v) em 0.1 M de tampão fosfato (pH 7.5). Depois da diluição, 50 μl foi colocado em uma microplaca de 96 espaços seguido por 200 μl de DTNB (5,5-Ditio-bis-benzoato) e 50 μl de ACT (acetiltiocolina iodada). Absorvância foi imediatamente medida a 415 nm em intervalos de 5 s pelo método de Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998).

Metalotioneínas (MT): A concentração das metalotioneínas foi estimada através da concentração de grupamentos sulfidrilas (VIARENGO *et al.*, 1997). A concentração de metalotioneína foi avaliada no sobrenadante utilizando-se uma fração parcialmente purificada de metaloproteína obtida em várias etapas de uma solução etanol/clorofórmio. As amostras foram secas aproximadamente de 4 a 6 horas e a concentração de metalotioneínas nos extratos foi quantificada espectrofotometricamente utilizando-se o reagente de Ellman (NaCl 2M, DTNB 0,43M em tampão fosfato 0,2M e pH 8,0) em 412 nm.

4.3.5.2 Biomarcadores genéticos

A fim de se verificar a frequência de micronúcleos em eritrócitos, foi empregada a técnica descrita por Heddle (1958) e Schimd (1975) para a montagem das lâminas. Com o sangue retirado da veia caudal foi realizado um esfregaço numa lâmina de vidro limpa posteriormente fixada com etanol por 30 minutos, e corado com laranja de acridina. Foram analisados 2000 eritrócitos por peixe num aumento de 1000x em um microscópio de epifluorescência. Além dos micronúcleos foram também contabilizadas as alterações morfológicas nucleares de acordo com Carrasco *et al.* (1990) e a frequência de eritrócitos policromáticos, segundo Ueda *et al.* (1992) e Çavas *et al.* (2005).

O ensaio cometa de eritrócitos e hepatócitos foi realizado de acordo com Speit e Hartmann (1999), com alterações de Ferraro *et al.* (2004) para eritrócitos e Ramsdorf *et al.* (2009) para hepatócitos. Primeiramente 10 μ L do sangue e do fígado homogeneizados em 1mL soro bovino fetal foram diluídos em 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão e plotados sobre uma lâmina coberta com agarose ultrapura. As lâminas foram colocadas em uma solução de lise composta de NaCl (2.5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (10%), Triton X-100 (1%) e DMSO (10%) por 72 h a 4°C. Posteriormente as lâminas foram imersas em uma solução de NaOH (10N) e EDTA (200 mM), pH>13 por 25 minutos, para desnaturar o DNA. Então foi realizada a eletroforese a 300mA e 25 V por 25 minutos. As lâminas foram neutralizadas em 0,4M Tris, pH 7,5 e fixadas em etanol por 10 minutos. Os cometas foram corados com 0,02 g/ml de brometo de etídeo e contabilizados usando um microscópio de epifluorescência Leica DMLS2. Foram analisados visualmente 100 cometas por lâmina e contabilizados em cinco classes de danos segundo Collins (2004).

O ensaio de difusão do DNA avaliou a frequência de células apoptóticas segundo método descrito por Singh (2000) baseado no mesmo protocolo descrito acima para o ensaio cometa com a omissão da etapa da eletroforese. Foram contabilizados 100 nucleóides e separados em células normais e em processo de apoptose.

4.3.5.3 Biomarcadores histopatológicos

Parte do fígado, coletado para histopatologia, foi colocado em um cassete e fixado em ALFAC (etanol, formol e ácido acético) por 16 h e depois transferido para Álcool 70%, onde permaneceu até o procedimento de inclusão. Para esta etapa, os órgãos foram desidratados em série crescente de etanol e posteriormente transferidos para o xilol e parafina a 58° C e em seguida emblocados. Cortes de 5µm de espessura foram obtidos através de Micrótomo Leica e distendidos nas lâminas com solução de albumina 20%. Para a coloração os cortes foram desparafinizados, hidratados e corados com Hematoxilina/Eosina. Em seguida, após desidratação e diafanização, foram montados com lamínula em Permount. O material foi analisado e as imagens registradas em uma câmera digital acoplada ao microscópio de luz.

As alterações histopatológicas do fígado foram analisadas de acordo com uma metodologia adaptada da proposta por Bernet *et al.* (1999). As principais alterações avaliadas no fígado foram: hemorragias, hipertrofia/atrofia, hiperplasia, infiltração leucocitária, vacuolização, centros de melanomacrófagos, ocorrência de parasitas, alterações nucleares, necroses, neoplasias. Para cada alteração foi atribuído um valor de importância para o cálculo do índice de lesão segundo Bernet *et al.* (1999).

4.3.6 Análise estatística

Biomarcadores (EROD, GST, LPO, AChE, Metalotioneínas, Teste do Micronúcleo píceo, Ensaio Cometa, Ensaio de difusão do DNA, índice histopatológico) foram reportados como médias \pm desvios padrões da média. Todos os dados foram testados para normalidade e homocedasticidade antes de realizar a análise de variância de um via (ANOVA). A análise de uma via não-paramétrica Kruskal-Wallis seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls com nível de significância de 0.05 foi realizada quando os dados não apresentaram distribuição normal e/ou variâncias equivalentes. Dados de quantificação de metais foram reportados descritivamente.

A média obtida das análises dos biomarcadores foi utilizada na montagem de uma matriz de similaridade (índice de Bray-Curtis) através de uma análise de cluster.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Sazonalidade

A sazonalidade foi claramente observada nos parâmetros físicos de temperaturas e pluviosidade (Tabela 1). O verão apresentou temperaturas mais altas e maior pluviosidade nas duas baías. O inverno apresentou temperaturas mais baixas e menor pluviosidade nas duas baías.

TABELA 1 - DADOS METEOROLÓGICOS DAS ÁREAS DE ESTUDO NA BAÍA DE GUARATUBA E PARANAGUÁ (DADOS FORNECIDOS PELO SIMEPAR).

Dados	Guaratuba		Paranaguá	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
T min (°C)	18.2	8.6	16.3	7.1
T máx (°C)	33.2	32.6	39.7	33.6
T méd (°C)	24.9	17.8	24.7	18.3
Pluviosidade (mm)	453.8	212	747.2	202.8

4.4.2 Tamanho, peso e Fator de condição

Os exemplares de *Cathorops spixii* amostrados diferiram significativamente tanto em massa quanto em tamanho nas comparações dos pontos nas diferentes estações do ano ($p < 0.05$) (Tabela 2). Entre G1 e G2 houve diferença no verão e no inverno para o tamanho e massa ($p < 0.05$).

Aplicando-se o CF nos bagres amostrados no verão, foi observada diferença entre os pontos, com G2 (0.008 ± 0.0008) diferindo significativamente dos pontos G1 (0.007 ± 0.001) e P1 (0.007 ± 0.0006) ($p < 0.05$). No inverno também foi observada diferença entre os pontos, com G2 (0.008 ± 0.0006) diferindo significativamente de P2 ($0,008 \pm 0,0005$) que diferiu significativamente de P1 (0.007 ± 0.0005) ($p < 0.05$).

TABELA 2 - DADOS MORFOMÉTRICOS DE *Cathorops spixii* EM CADA PONTO DE COLETA.

	n	CT(cm)	M(g)	CF
Verão				
G1	20	15,84±1,659a	29,29±9,510a	0,007257±0,001104a
G2	7	18,34±1,831b	52,60±15,17b	0,008407±0,0007623b
P1	20	15,62±1,674a	28,81±9,563a	0,007350±0,0006291a
P2	20	16,61±2,019ab	36,33±13,73a	0,007644±0,001088ab
Inverno				
G1	20	17,46±1,325α	39,97±9,463α	0,007401±0,0007162αβ
G2	20	19,58±1,373β	62,15±10,59β	0,008236±0,0005619γ
P1	20	16,23±2,021α	31,42±11,54α	0,007069±0,0005403α
P2	20	17,09±1,774α	38,92±12,81α	0,007555±0,0004956β

Dados em média±DP

n= nº de indivíduos coletados, CT(cm)= comprimento total, M(g)= massa, CF= Fator de condição

Caracteres latinos indicam diferenças significativas entre os pontos no verão (a, b)

Caracteres gregos indicam diferenças significativas entre os pontos no inverno (α, β, γ)

4.4.3 Quantificação de metais

O As apresentou valores muito superiores aos permitidos pela legislação brasileira (BRASIL, 1965) em todos os pontos, se acumulando principalmente no músculo. Metais como Pb e Sn não apresentaram valores acima aos referidos pela legislação. Hg apresentou valores próximos aos limites permitidos nos pontos G1 e G2 (Tabela 3).

TABELA 3 – QUANTIDADE DE METAIS NOS TECIDOS (PPM) DOS PEIXES COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ, E VALORES DE REFERÊNCIA (BRASIL, 1965).

	As		Pb		Sn		Hg	
	Fígado	Músculo	Fígado	Músculo	Fígado	Músculo	Fígado	Músculo
G1	3.86	1.55	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	0.034	0.152
G2	<0.10	6.09	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	0.19	0.029
P1	1.83	2.93	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	0.02	0.03
P2	2.74	8.54	<0.10	<0.10	0.32	<0.10	0.07	0.038
Valores de referência	1.00	1.00	2.00	2.00	250.00	250.00	0.5	0.5

4.4.4 Biomarcadores bioquímicos

Os resultados médios obtidos da atividade enzimática da EROD não diferiram significativamente ($p>0.05$) entre os pontos e nem entre as estações do ano (Figura 5 A), diferentemente da GST que diferiu no inverno, com valores mais altos nos pontos de Guaratuba, sendo notada inclusive diferença sazonal no ponto G1 ($p<0.05$) (Figura 5 B). Foi observada diferença sazonal também em P2 ($p<0.05$) com valores mais altos no verão.

Na análise da LPO foi observada diferença significativa entre os pontos no inverno, sendo que os valores mais altos foram observados em G1 e os mais baixos em P1 ($p<0.05$) (Figura 5 C). Na comparação sazonal, G1 apresentou valores mais altos no inverno e P1 apresentou valores mais altos no verão ($p<0,05$).

A atividade da AChE no músculo foi menor nos pontos G2 e P2 no verão, e G1 e G2 no inverno ($p<0.05$) (Figura 5 D). Analisando as diferenças sazonais, G1 apresentou valores mais altos no verão enquanto P2 apresentou valores mais altos no inverno ($p<0.05$).

Não foi observada diferença nem entre os pontos e nem entre as estações na avaliação da expressão das metalotioneínas nos fígados dos animais analisados ($p>0.05$) (Figura 5 E).

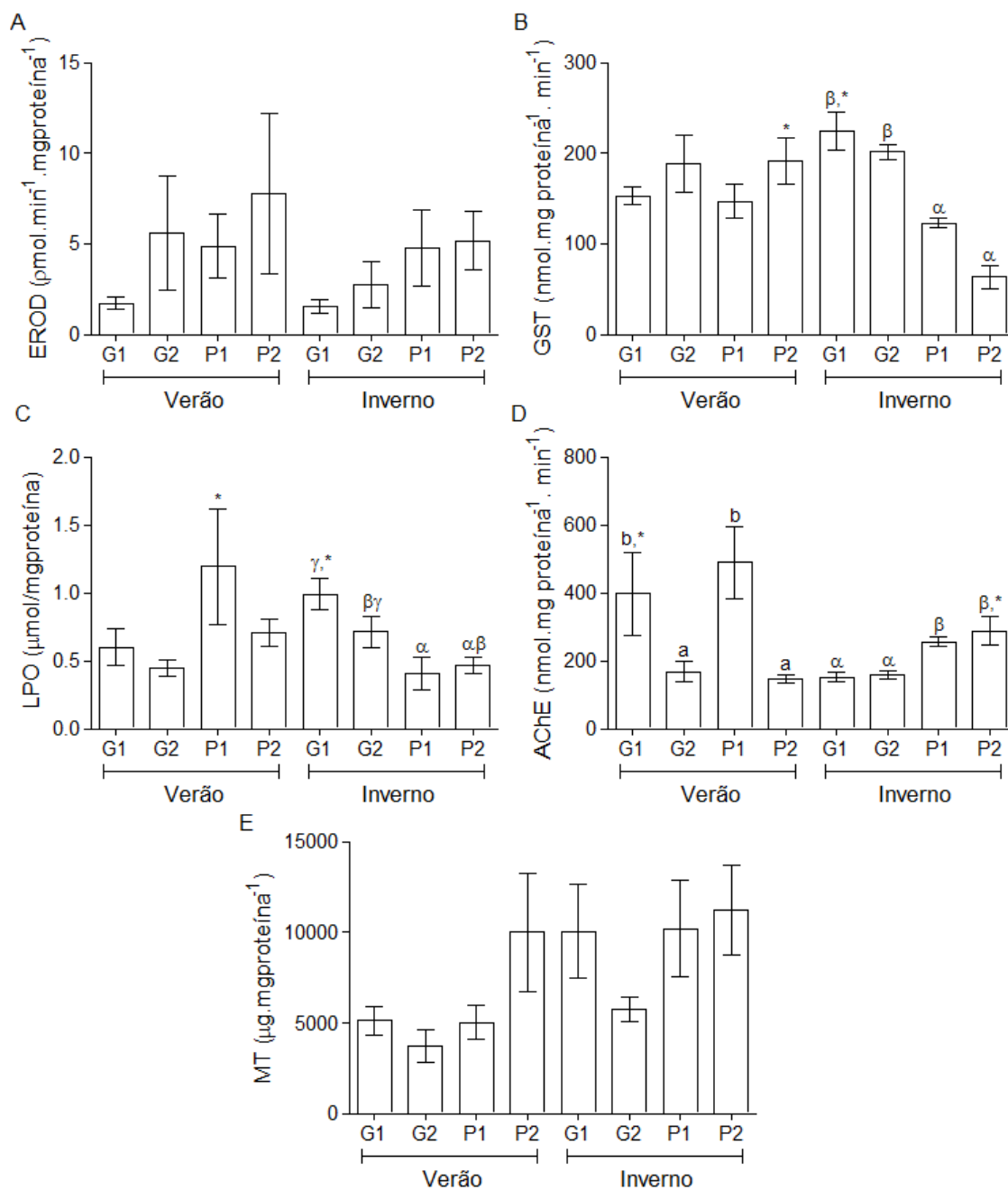


FIGURA 5 - BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Cathorops spixii* COLETADO EM GUARATUBA E PARANAGUÁ. A- ETOXIRESORUFINA-O-DEETILASE, EROD (KRUSKAL-WALLIS= 6.896). B- GLUTATIONA S-TRANSFERASE, GST (KRUSKAL-WALLIS= 39.37). C- LIPOPEROXIDAÇÃO, LPO (KRUSKAL-WALLIS= 17.62). D- ACETILCOLINESTERASE, AChE (KRUSKAL-WALLIS= 48.77). E- METALOTIONEÍNA, MT (KRUSKAL-WALLIS= 11.97). CARACTERES LATINOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO VERÃO (a, b), CARACTERES GREGOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO INVERNO (α, β, γ), * INDICA DIFERENÇAS SAZONAIS NOS PONTOS.

4.4.5 Genotoxicidade

Para o teste do micronúcleo písceo (Tabela 4), foram observadas diferenças significativas entre os pontos e entre as estações para as alterações do tipo Blebbed e Notched ($p < 0.05$), e também nas avaliações das alterações morfológicas nucleares totais ($p < 0.05$). No verão, foi observada uma maior quantidade de Blebbed em P2 enquanto que no inverno esta alteração foi mais frequente em G2 e P2 ($p < 0.05$). Na comparação sazonal, G2 apresentou mais alterações deste tipo no inverno. No inverno, foi observada uma maior quantidade de Notched em G2, e na comparação sazonal os dois pontos de Guaratuba apresentaram mais alterações deste tipo no inverno ($p < 0.05$). Quando avaliamos todas alterações observadas em conjunto, no verão os dois pontos de Paranaguá apresentaram maior quantidade de alterações que os pontos de Guaratuba ($p < 0.05$). No inverno, G1, G2 e P2 apresentaram maior frequência de alterações, sendo que em Guaratuba também foi observada diferença na comparação sazonal ($p < 0.05$).

No verão foi observada menor frequência de eritrócitos policromáticos em G1, enquanto que no inverno foi observada uma menor quantidade em G1 e P1 ($p < 0.05$). Não foi observada diferença sazonal na avaliação dos eritrócitos policromáticos ($p > 0.05$).

TABELA 4 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES E FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS OBSERVADOS EM *Cathorops spixii* COLETADOS EM GUARATUBA (G1 E G2) E PARANAGUÁ (P1 E P2).

	MN	Blebbed	Notched	AMN	%PCE
Verão					
G1	0 (0-0)	1 (1-2) ^a	3 (2-4.25)	5 (3.5-8) ^{ab}	0.68 (0.23-2.6) ^a
G2	0 (0-0)	0 (0-1.5) ^a	2 (1-2.5)	3 (1.5-4.5) ^a	3.35 (2.18-4.6) ^b
P1	0 (0-0)	2.5 (0-5) ^{ab}	3 (1-4)	7.5 (5.25-11.25) ^b	2.45 (0.95-4.11) ^b
P2	0.5 (0-1)	4 (1-6) ^b	3 (1.75-5)	9 (4-14) ^b	4.28 (1.99-6.85) ^b
Inverno					
G1	0 (0-1)	2 (1-4) ^{αβ}	7 (5-9.75) ^{βγ,*}	11 (7.25-16.75) ^{β*}	0.4 (0.28-4.85) ^α
G2	0 (0-2)	4.5 (3.75-6.5) ^{γ,*}	9 (6.75-12) ^{γ,*}	16.5 (11.75-18.5) ^{β,*}	2.2 (1.41-3.89) ^{αβ}
P1	0 (0-1)	1 (0.75-3) ^α	3 (1-4.25) ^α	4.5 (3-7) ^α	1.35 (0.39-3.43) ^α
P2	1 (0-2.5)	3 (2-6) ^{βγ}	4 (2-6.5) ^{αβ}	10 (6-16) ^β	3.75 (2.58-5.43) ^β

Dados em mediana e quartis (1-3)

Caracteres latinos indicam diferenças significativas entre os pontos no verão (a, b)

Caracteres gregos indicam diferenças significativas entre os pontos no inverno (α, β, γ)

* indicam diferenças sazonais nos pontos

Os resultados obtidos para o ensaio cometa de sangue demonstraram que no inverno os pontos em Paranaguá apresentaram mais danos ao material genético em relação a Guaratuba ($p < 0.05$) (Figura 6 A). E na comparação sazonal G2 apresentou mais danos no verão ($p < 0.05$). Para o ensaio cometa de fígado tanto no verão quanto no inverno os pontos de Paranaguá apresentaram mais danos ao DNA em relação à Guaratuba ($p < 0.05$) (Figura 6 B). Não foi observada diferença sazonal entre os pontos ($p > 0.05$).

Através do ensaio de difusão foram observadas diferenças na quantidade de eritrócitos em apoptose entre os pontos no inverno, sendo que G2 apresentou os valores mais altos ($p < 0.05$) (Figura 6 C). Na comparação sazonal G1 apresentou mais eritrócitos em apoptose no verão ($p < 0.05$). Quando o ensaio de difusão foi aplicado às células do fígado também foram observadas diferenças nas duas estações ($p < 0.05$) (Figura 6 D). No verão e no inverno, os pontos de Paranaguá apresentaram maior quantidade de células em apoptose ($p < 0.05$), e na comparação sazonal, os pontos G1 e P1 apresentaram mais células em apoptose no verão ($p < 0.05$).

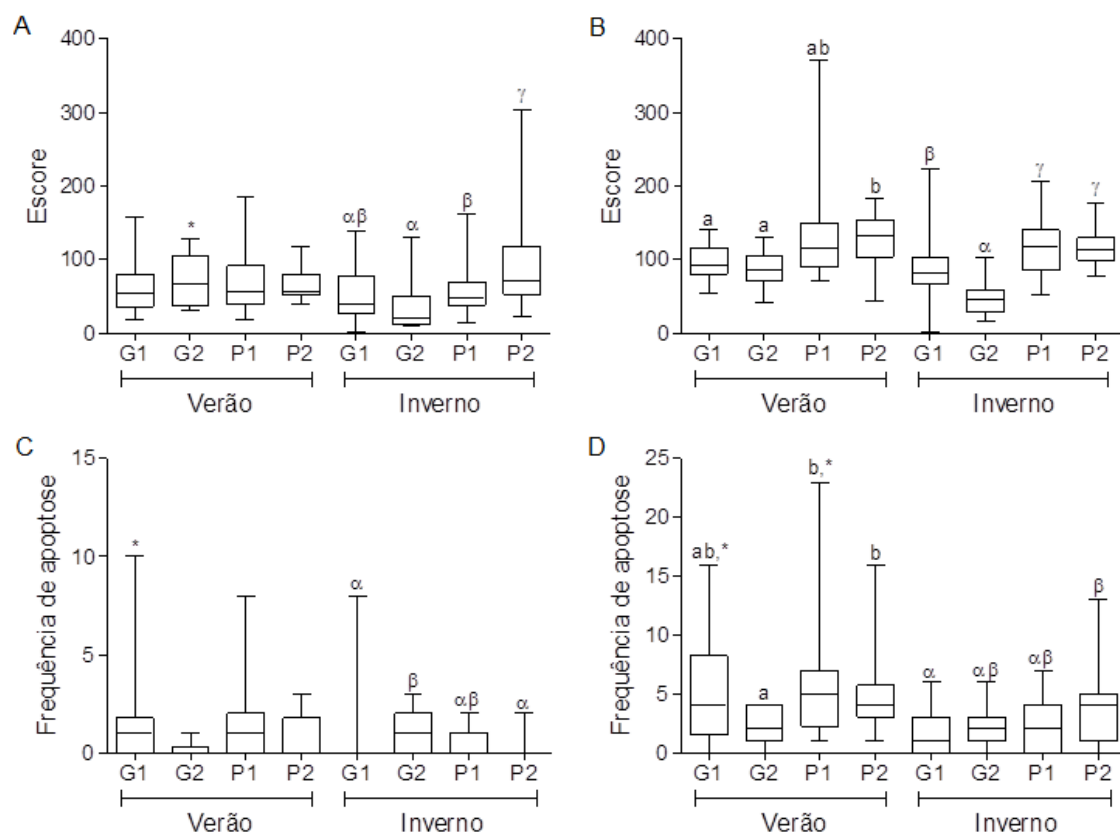


FIGURA 6 - ENSAIO COMETA (A E B) E ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA (C E D) EM *Cathorops spixii* COLETADOS EM GUARATUBA (G1 E G2) E PARANAGUÁ (P1 E P2). A- ESCORE DE DANO GENÉTICO EM ERITRÓCITOS (KRUSKAL-WALLIS= 26.28), B- ESCORE DE DANO GENÉTICO EM CÉLULAS DO FÍGADO (KRUSKAL-WALLIS= 51.12), C- FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS EM APOPTOSE (KRUSKAL-WALLIS= 22.47), D- FREQUÊNCIA DE CÉLULAS DO FÍGADO EM APOPTOSE (KRUSKAL-WALLIS= 31.31). CARACTERES LATINOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO VERÃO (a,b), CARACTERES GREGOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO INVERNO (α,β,γ), * INDICA DIFERENÇAS SAZONAIS NOS PONTOS.

4.4.6 Histopatologia

Não foram observadas diferenças significativas entre os índices de lesões do fígado entre os grupos de bagres coletados em Guaratuba e Paranaguá (Figura 7). As médias dos índices de lesão variaram de 19 em G1 no inverno a 26,9 em G1 no verão.

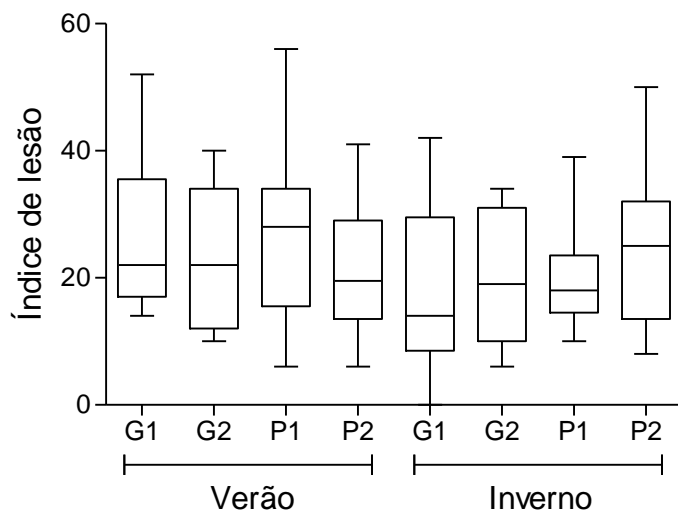


FIGURA 7 - ÍNDICE DE LESÃO NO FÍGADO DE *Cathorops spixii* (KRUSKAL-WALLIS= 3.613).

Apesar de não ter sido notada diferença significativa do índice de lesão entre os grupos, poucos indivíduos demonstraram apresentar um fígado saudável, sem nenhuma alteração (Figura 8 A). Através da análise foi possível observar a ocorrência de diferentes alterações neste órgão sendo a necrose (Figura 8 B) a lesão presente com maior frequência (de 75 a 100%, Tabela 5) nos indivíduos. Além desta lesão considerada irreversível, alguns indivíduos também apresentaram neoplasia (Figura 8 C-D). Já considerando um fator de importância intermediária, a alteração verificada com maior frequência foi a presença de parasitas (Figura 8 E-F), principalmente nos indivíduos coletados em Guaratuba (Tabela 5). Outras alterações observadas foram a ocorrência de centros de melanomacrófagos (Figura 8 C, 8 G-H), infiltração leucocitária (Figura 8 D), hipertrofia (Figura 8 G) e alterações nucleares (Figura 8 H). E para as alterações de menor importância patológica foram verificadas hemorragias e vacuolização. Além da frequência de alterações no fígado dos indivíduos deve-se levar em conta a elevada variação da intensidade destas entre os grupos.

TABELA 5 - FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES OBSERVADAS NO FÍGADO DE *C. spixii* COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ

	Verão				Inverno			
	G1	G2	P1	P2	G1	G2	P1	P2
Hemorragia	40%	25%	28,60%	50%	22,20%	36,40%	44,40%	33,30%
Hipertrofia/ Atrofia			14,3%					
Hiperplasia			7,14%					
Infiltração leucocitária	50%	50%	57,10%	50%	11,10%	27,30%	66,60%	44,40%
Vacuolização	10%		42,80%			27,30%	11,10%	22,20%
CMM	60%	12,50%	57,10%	100%	77,80%	36,40%	55,50%	100%
Parasitas	90%	62,50%	28,60%	50%	55,50%	90,90%	44,40%	44,40%
Diferenciação tecidual	10%		7,14%			18,20%		11,10%
Alteração nuclear	10%				22,20%			11,10%
Necrose	80%	75%	85,70%	100%	77,70%	100%	100%	100%
Neoplasia	20%	12,50%	14,30%	33,30%	11,10%			11,10%

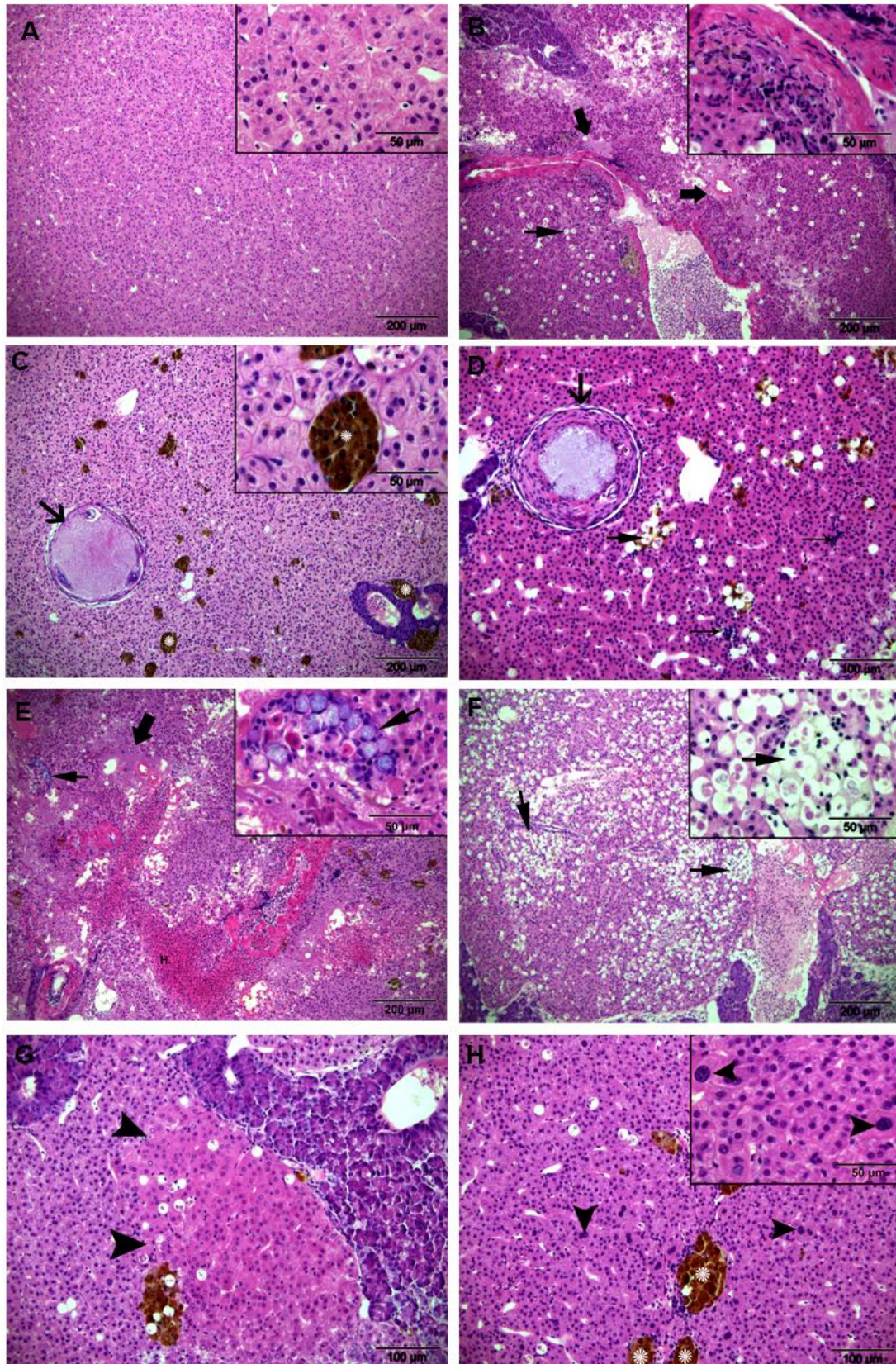


FIGURA 8 - HISTOLOGIA DO FÍGADO DE *Cathorops spixii* COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ. A- INDIVÍDUO APRESENTANDO UM FÍGADO SEM ALTERAÇÕES, COM HEPATÓCITOS POLIÉDRICOS E PEQUENOS CAPILARES. B- NECROSE DO

PARÊNQUIMA HEPÁTICO (▲), ONDE HÁ PERDA DE DELIMITAÇÃO CELULAR (ROMPIMENTO CELULAR), COM ALTERAÇÃO DO NÚCLEO E DO FORMATO DOS HEPATÓCITOS, TAMBÉM OBSERVA-SE ALGUNS PARASITAS (♣). C- PRESENÇA DE CENTROS DE MELANOMACRÓFAGOS (*)E UMA NEOPLASIA (TUMOR BENIGNO ENCAPSULADO, ↑). D- NEOPLASIA (TUMOR BENIGNO ENCAPSULADO, ↑) E PARASITAS (♣). E- INDIVÍDUO APRESENTANDO UMA GRANDE HEMORRAGIA (H), NECROSE (▲) E PARASITAS (♣). F – OUTRA TIPO DE PARASITAS (♣) OCUPANDO GRANDE PARTE DO PARÊNQUIMA HEPÁTICO. G- FOCO EOSINÓFILO (▲), ONDE OS HEPATÓCITOS DEMONSTRAM-SE HIPERTRÓFICOS E COM CITOPLASMA MAIS BASÓFILO. H- ALTERAÇÃO NUCLEAR (HIPERTROFIA NUCLEAR, ▲).

4.4.7 Análise de similaridade

A análise de cluster mostrou a similaridade alta entre as respostas dos biomarcadores em todos os pontos de coleta e estações do ano (Figura 9). Nota-se que os pontos P1 e G1 foram os que mais variaram sazonalmente em relação às respostas do biomarcadores.

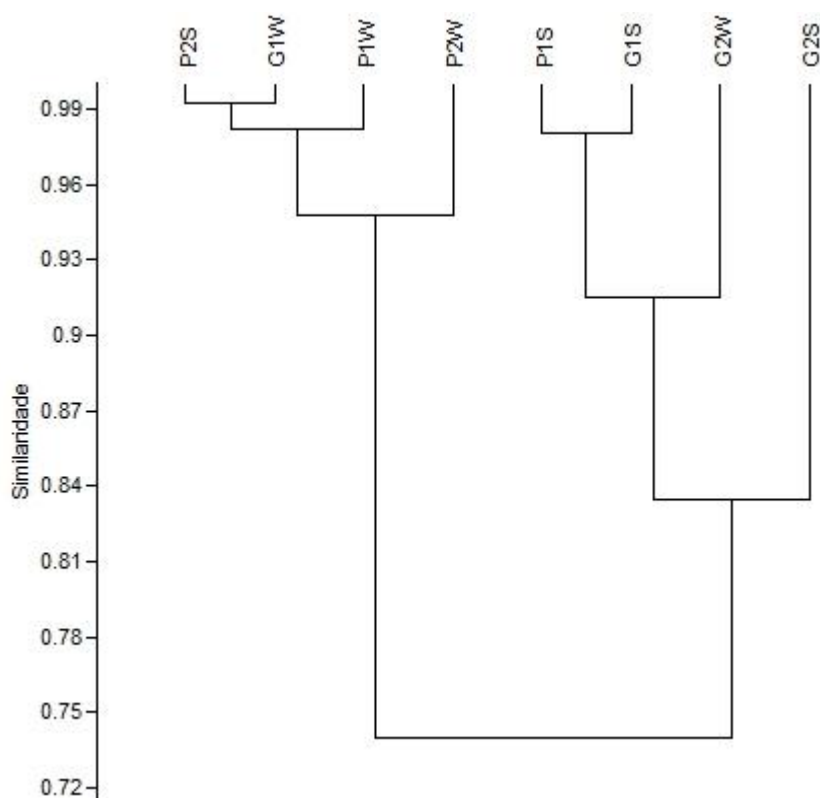


FIGURA 9 - ANÁLISE DE CLUSTER PARA TODOS OS PONTOS DE COLETA BASEADO NA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE BRAY-CURTIS CALCULADA A PARTIR DAS MÉDIAS DAS RESPOSTAS DOS BIOMARCADORES NO VERÃO (S) E NO INVERNO (W) (COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO= 0.9392).

4.5 DISCUSSÃO

O presente trabalho apresentou os resultados de uma abordagem de vários biomarcadores na espécie de peixe *Cathorops spixii* a fim de avaliar dois ambientes estuarinos muito importantes no sul do Brasil. Tanto os peixes de Guaratuba quanto os de Paranaguá apresentaram respostas nos biomarcadores relacionadas à contaminação ambiental, demonstrando que ambos os estuários estão sendo afetados por aportes diferentes de xenobióticos (KOLM *et al.*, 2002; PATCHINEELAM *et al.*, 2011) e em diferentes épocas do ano. Os resultados deste estudo mostraram a utilidade de integrar vários biomarcadores para definir a exposição e os efeitos de descargas antropogênicas em ambientes impactados.

Observando os dados de temperatura e pluviosidade, notamos que a região apresenta um verão quente e chuvoso e um inverno frio e menos chuvoso. Neste trabalho observou-se variações sazonais para a atividade da GST, LPO, AChE, TMP, ensaio cometa em eritrócitos e ensaio de difusão em eritrócitos e hepatócitos. Os pontos G1 e P1 foram os que mais variaram sazonalmente em relação a respostas dos biomarcadores, e isto pode estar relacionado ao fato destas regiões serem mais internas as baías e com isso, mais influenciadas pelas variações na pluviosidade, relacionado ao aporte de água dos rios. Estas variações refletem diretamente nas respostas do biomarcadores e na disponibilidade de xenobióticos. Por exemplo, em temperaturas baixas alguns mecanismos celulares relacionados à metabolização de xenobióticos podem apresentar atividade reduzida, desta forma afetando diretamente o processo de detoxificação (BUSCHINI *et al.*, 2003). Outro trabalho mostrou que a biodisponibilidade de xenobióticos na baía de Guaratuba é controlada por aportes de material inorgânico e orgânico associados à pluviosidade e por variações nas fases de maré vazante e enchente (MIZERKOWSKI *et al.*, 2012).

Os exemplares de *C. spixii* coletados variaram em relação ao comprimento e massa dentro dos estuários. Tanto no verão como no inverno os peixes coletados em G2 foram maiores do que os coletados em G1. Isso pode ser explicado pelo movimento que os peixes dessa espécie realizam dentro da baía, no verão é comum encontrar peixes mais jovens nas regiões

mais internas da baía, onde normalmente a salinidade é menor devido ao aporte de água dos rios (BARLETTA *et al.*, 2008). No inverno, isto ocorre devido a região ser relativamente chuvosa nesta época. Com isso, os indivíduos maiores que tendem a se mover para regiões mais externas da baía e assim são coletados em maiores quantidades. Este fato foi comprovado nos resultados obtidos neste trabalho, pois aqueles peixes maiores estão a mais tempo bioacumulando xenobióticos, como encontrado nos indivíduos coletados em G2 e P2 que apresentaram uma quantidade muito alta de As no músculo.

Quando avaliamos a saúde dos peixes através do fato de condição (CF), vimos que os peixes coletados em P1 apresentaram os valores mais baixos tanto no verão como no inverno. Próximo a este ponto está localizado um dos maiores terminais portuários do Brasil que recebe uma diversidade muito grande de xenobióticos que afetam diretamente a qualidade da água (LIEBEZEIT *et al.*, 2011). Apesar deste parâmetro não ser muito sensível e ser afetado por outros fatores, como doenças e disponibilidade de nutrientes, ele serve como biomarcador menos sensível para avaliação dos efeitos dos xenobióticos ou para fornecer informações sobre as reservas de energia (MAYER *et al.*, 1992). Outros trabalhos também correlacionaram valores baixos de CF com a presença de xenobióticos no ambiente (ALBERTO *et al.*, 2005; VAN DYK *et al.*, 2012; LINDE-ARIAS *et al.*, 2008).

Observando a resposta de GST, LPO e AChE no ponto G1, podemos sugerir que esta região está sofrendo impactos principalmente no inverno, que se caracteriza por uma época onde a população neste local é menos numerosa, além de ser uma época menos chuvosa, com menor arraste de contaminantes da agricultura ao redor deste ponto. Dessa forma, o aporte de xenobióticos provenientes da cidade de Guaratuba tem menos influência, e provavelmente essas alterações estão relacionadas à presença de pesticidas. Próximo a este ponto de amostragem existem muitas plantações de arroz, que comumente utilizam pesticidas (CREPEAU; KUIVILA, 2000), justificando assim a inibição da AChE (PAYNE *et al.*, 1996). No verão, vimos que neste mesmo ponto a AChE apresentou valores mais altos, o que pode estar relacionado a atividade desta enzima ser maior em peixes de águas mais quentes (DURIEUX *et al.*, 2011) Outros trabalhos demonstraram que certos pesticidas podem

aumentar a lipoperoxidação assim como a atividade da GST (KLEINOW *et al.*, 1987; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

Foi constatado na baía de Guaratuba uma elevada frequência de alterações morfológicas nucleares sendo que Notched se destacou nos dois pontos da baía no inverno (Tabela 4), possivelmente relacionadas as atividades citotóxicas destes pesticidas como já foi constatado em outros trabalhos (GRISOLIA, 2002; BIANCHI *et al.*, 2011; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). Fatores relacionados a proliferação celular medidos através da frequência de eritrócitos policromáticos também foram afetados por esta contaminação. Observamos que no ponto G1 a frequência de eritrócitos jovens foi menor tanto no inverno como no verão, demonstrando que os xenobióticos deste local apresentam atividade citotóxica que altera os parâmetros de renovação celular. Este tipo de alteração já foi observada em outros trabalhos (MURANLI; GÜNER, 2011; ÇAVAS *et al.*, 2005).

A contaminação por metais em Guaratuba e Paranaguá é muito conhecida, e sabe-se que ela é proveniente de diversas fontes. Neste trabalho encontramos valores muito acima do permitido pela legislação brasileira para o As nas duas baías. Parte do As na baía de Paranaguá é liberado naturalmente através do intemperismo de rochas ricas neste elemento, apesar disto há fontes antrópicas na região (através das indústrias de fertilizantes). Este elemento pode estar disponível para os peixes devido às frequentes dragagens realizadas neste local, pois vários trabalhos identificaram o sedimento dessa região rico em As (SÁ *et al.*, 2006). A utilização de fertilizantes em regiões próximas a baía de Guaratuba também contribui para que o As seja frequentemente encontrado nos peixes deste local (CASTELLO, 2010). Ainda sobre este elemento, pudemos observar que em todos os pontos de coleta observou-se valores maiores que 1ppm (valor de referência) nos músculos (Tabela 3), corroborando o fato da medição das metalotioneínas não apresentarem diferenças significativas, visto que o As induz o aumento dos níveis de MT (KREPPEL *et al.*, 1994). A presença de outros metais como Cd, Zn e Cu na região (RODRIGUES *et al.*, *in press*) também pode ter atuado para o aumento da atividade desta proteína. Os níveis de MT encontrados neste trabalho foram muito superiores aos encontrados em outro trabalho com a mesma espécie (AZEVEDO *et al.*, 2009).

A contaminação por mercúrio já é conhecida na baía de Guaratuba, porém as fontes dessa contaminação permanecem obscuras. Acredita-se que ela tenha origem das atividades agrícolas em volta da baía, pois a quantidade de Hg acompanhou o desenvolvimento da agricultura nesta região além de apresentar fonte terrestre por estar acumulado em sedimentos ricos em matéria orgânica (SANDERS *et al.*, 2006, 2008). Apesar de terem sido encontradas concentrações abaixo do valor de referência na legislação brasileira, sabe-se que o mercúrio pode sofrer biomagnificação e ser encontrado em maiores quantidades em peixes maiores que são utilizados para consumo humano (DANG; WANG, 2012).

Observamos também que as concentrações de metais variaram em relação os tecidos e pontos de coleta (Tabela 3). Em G1, por exemplo, foram encontrados 1.55ppm de As e 0.153ppm de Hg no músculo, enquanto foram encontrados 3.86ppm de As e 0.03ppm de Hg no fígado. Essa variação também ocorreu para os outros pontos. Sabe-se que as concentrações de metais podem variar em diferentes tecidos, devido as diferentes afinidades bioquímicas e metabolismo. Alguns órgãos tendem a acumular mais os metais, como é o caso do fígado e do rim. As concentrações de metais nestes órgãos podem ser muito superiores às encontradas no tecido muscular (KOJADINOVIC *et al.*, 2007; PARSONS, 2000), embora este fato não tenha sido observado para todos os pontos e metais avaliados.

A região próxima ao porto de Paranaguá recebe diariamente uma diversidade muito grande de xenobióticos, provenientes das atividades portuárias como atracação de navios e dragagens que biodisponibilizam xenobióticos que estavam ligados ao sedimento. O bagre *C. spixii* possui hábitos demersais e se alimenta principalmente de invertebrados bentônicos, e eventualmente grandes quantidades de sedimento são encontradas em seu conteúdo estomacal provenientes da assimilação acidental (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Esses bagres estão em contato direto com o sedimento, por isso acabam sendo alvos da assimilação dos xenobióticos presentes neste estrato. Dentre os xenobióticos presentes no sedimento de Paranaguá estão os compostos butílicos de estanho, como o tributilestanho (TBT), que foi por muitos anos utilizado como antincrustante de embarcações e hoje está banido devido aos diversos efeitos que ele causa a biota. Ele age como um

desregulador endócrino e apresenta toxicidade muito estudada, além de já ter sido reportada sua assimilação pelo *C. spixii* (SANTOS *et al.*, 2009).

Dentre todos os biomarcadores utilizados o Ensaio cometa e o Ensaio de difusão do DNA avaliaram danos as moléculas de DNA. Quando o ensaio cometa foi aplicado em eritrócitos, observamos mais danos ao DNA nos dois pontos de Paranaguá, principalmente em P2 no inverno (Figura 6 A). O ensaio de difusão apresentou resultados diferentes, pois a quantidade de células em apoptose foi maior em G2 no inverno, sendo que este ponto apresentou o valor mais baixo de danos no ensaio cometa (Figura 6 C). Sugerimos então que os xenobióticos presentes em G2 apresentam mais atividade citotóxica do que genotóxica, enquanto os xenobióticos presentes em P2 apresentam mais atividade genotóxica do que citotóxica. A utilização das duas técnicas em conjunto aumenta a confiabilidade da análise, visto que através do ensaio cometa não é possível avaliar as células em apoptose, o que é realizado pelo ensaio de difusão (COLLINS *et al.*, 2008; SINGH, 2000).

Quando o ensaio cometa foi aplicado em hepatócitos observamos novamente os pontos em Paranaguá apresentando mais danos ao DNA tanto no verão como no inverno (Figura 6 B). Esses resultados foram corroborados pelo ensaio de difusão em hepatócitos, com valores mais altos para os dois testes nos mesmos pontos, como já foi observado em outros trabalhos (Figura 6 D) (FRENZILLI *et al.*, 2004; NIGRO *et al.*, 2002; ROCCO *et al.*, 2010). Os dados obtidos para os dois testes no ponto G1 no verão corroboraram a importância da utilização dos dois testes, pois demonstraram que no período de verão a presença de xenobióticos com efeitos citotóxicos prevaleceu sobre aqueles com efeitos genotóxicos. Os danos genotóxicos podem ocasionar mutações que influenciam na adaptação de populações de peixes no ambiente aquático se não forem reparados (MOCHIDA; FUJI, 2009).

Apesar de não haver diferença entre as amostragens através do índice de lesão histopatológico, observamos muitas alterações como necroses, neoplasias, parasitas, centros de melanomacrófagos e infiltrações leucocitárias. Por exemplo, a necrose apresentou frequência de 100% nos peixes coletados em vários pontos. Este tipo de alteração irreversível causada pela exposição a xenobióticos, provoca inibição enzimática, alteração na membrana celular, perturbações da síntese de proteína e estresse oxidativo (OLIVEIRA RIBEIRO

et al., 2002). O estresse oxidativo pode induzir a formação de neoplasias no fígado, devido a formação de radicais livres, que são produtos da redução do oxigênio molecular, e apresentam alto poder oxidativo em macromoléculas celulares importantes, levando à inibição de enzimas, lipoperoxidação, danos ao DNA, e eventualmente a morte celular (BEN AMEUR *et al.*, 2012), como foi observado neste trabalho. Estas alterações podem eventualmente se tornar malignas e comprometer a saúde do organismo de forma irreversível (LAWRENCE; HEMINGWAY, 2003). A presença de parasitas está relacionada a susceptibilidade dos peixes a agentes infecciosos, que pode ser causada pela ação de agentes exógenos no sistema imunitário (KHAN; THULIN, 1991). Observamos também a presença de infiltrações leucocitárias e centros de melanomacrófagos em todas as amostragens, estas alterações foram relacionadas com a presença de xenobióticos em diversos trabalhos (BEN AMEUR *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2008; RABITTO *et al.*, 2005; SILVA, *et al.*, 2009).

Devido à complexidade dos estuários, é importante a utilização de diferentes ferramentas para a avaliação, portanto neste trabalho foram utilizados os biomarcadores CF, EROD, GST, LPO, AChE, MTs, TMP, Ensaio cometa, Ensaio de difusão do DNA e histopatologia, além da quantificação de metais no músculo e no fígado, considerada um marcador de bioacumulação. Com este tipo de abordagem foi possível distinguir os efeitos causados nos peixes por diferentes xenobióticos nos diferentes locais avaliados.

4.6 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos para os biomarcadores, tanto a baía de Guaratuba quanto a de Paranaguá são impactadas pela presença de xenobióticos e dessa forma afetando a saúde dos peixes da espécie *Cathorops spixii*. Os biomarcadores demonstraram também que o aporte de xenobióticos nestes locais apresenta fontes diferentes, sendo possivelmente as plantações ao redor da baía em Guaratuba e as atividades relacionadas ao porto e a cidade na baía de Paranaguá. É importante ressaltar que ambas as regiões são influenciadas por descargas de esgoto doméstico provenientes das cidades próximas.

A contaminação por metais também foi evidenciada, sendo o As mais encontrado em Guaratuba e Paranaguá. Observamos também que estas contaminações (que podem ter origem natural e antrópica) podem estar relacionadas a alterações na saúde dos peixes das baías.

A relação entre a sazonalidade e as respostas do biomarcadores também foi avaliada, com os pontos mais internos das baías apresentando maiores variações nas respostas dos biomarcadores, mostrando que os fatores naturais interferem nas respostas observadas.

Finalizando, os autores também sugerem que a espécie *C. spixii* é um bioindicador adequado quando utilizamos a abordagem de biomarcadores, podendo ser indicada como uma espécie importante para futuros programas de monitoramento, corroborando dados obtidos por outros autores.

5 CAPÍTULO II

BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS, GENÉTICOS E HISTOPATOLÓGICOS EM *Atherinella brasiliensis* COMO FERRAMENTAS NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE DOIS ESTUÁRIOS SUL-BRASILEIROS

Santos, G.S.¹; Piancini, L.D.S.¹; Klingelfus, T.¹; Yamamoto, F.I.²; Guiloski, I.C.³;
Oliveira Ribeiro, C.A.²; Silva de Assis, H.C.³; Cestari, M.M.¹

¹ Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

² Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

³ Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

5.1 RESUMO

Os estuários são muitas vezes referidos como o tipo de habitat mais degradado do mundo. São vulneráveis a diversas perturbações causadas por atividades humanas, incluindo a agricultura, a indústria, os assentamentos humanos, a pesca e as atividades portuárias. A baía de Guaratuba é afetada principalmente pelo desenvolvimento das atividades agrícolas, esgoto doméstico e pelas modificações hidrológicas provenientes da construção de barragens. Já a baía de Paranaguá recebe regularmente aportes provenientes do Porto, de indústrias locais e atividades agrícolas, além do esgoto doméstico, o que acarreta numa variedade muito grande de substâncias químicas que diariamente entram neste ambiente. A fim de avaliar a qualidade ambiental nestes estuários, bem como os efeitos da sazonalidade na disponibilidade de xenobióticos foram utilizados os seguintes biomarcadores: Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), Glutathione S-transferase (GST), Lipoperoxidação (LPO), Acetilcolinesterase (AChE), Metalotioneínas (MTs), Teste do micronúcleo píceo (TMP), Ensaio cometa, Ensaio de difusão do DNA, Histopatologia de fígado, além da análise de metais (As, Pb, Sn e Hg) no músculo e no fígado na espécie *Atherinella brasiliensis*. Foram realizadas duas coletas (verão e inverno) em dois pontos de cada estuário. De acordo com os dados obtidos para os biomarcadores, tanto a baía de Guaratuba quanto a de Paranaguá são impactadas pela presença de xenobióticos, causando efeitos adversos à saúde das espécies pesquisadas. As respostas fornecidas pelos biomarcadores sugerem também que o aporte de xenobióticos nestes locais apresenta fontes diferentes, sendo as mais impactantes, as plantações o redor da baía em Guaratuba e as atividades relacionadas ao porto em Paranaguá. A contaminação por metais também foi evidenciada, sendo que o As foi mais encontrado tanto em Guaratuba quanto em Paranaguá (ocorre naturalmente na região, mas também tem fonte na utilização de fertilizantes). A presença destes metais pode estar relacionada a alterações na saúde dos peixes das baías. *A. brasiliensis* pode ser considerada como bioindicadora adequada quando utilizamos a abordagem de biomarcadores, e é indicada para futuros programas de monitoramentos.

5.2 INTRODUÇÃO

Os estuários são muitas vezes referidos como o tipo de habitat mais degradado do mundo (CLARK *et al.*, 1997). São vulneráveis a diversas perturbações causadas por atividades humanas, incluindo a agricultura, a indústria, os assentamentos humanos, a pesca e as atividades portuárias (KENNISH, 2002). Entretanto, estes ecossistemas costeiros de transição mantêm recursos ecológicos e econômicos valiosos (COSTANZA *et al.*, 1997).

A presença de contaminantes orgânicos e inorgânicos nestes ambientes torna procedimentos de monitoramento e avaliação de risco essenciais para garantir a preservação das suas funções biológicas. Com isso, é necessária a busca de métodos de monitoramento mais robustos, sensíveis e representativos que possam expressar as implicações biológicas e ecológicas da poluição além da caracterização química ambiental (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

As baías de Guaratuba e Paranaguá apresentam diferentes tipos de habitats, entre eles estão os manguezais, marismas, gamboas e planícies de maré. Este mosaico é um fator essencial para inúmeras espécies de peixes, oferecendo recursos alimentares abundantes, proteção contra predação e outras condições que favorecem o crescimento e sobrevivência dos estágios iniciais do ciclo de vida de peixes (SASEKUMAR *et al.*, 1992; THAYER *et al.*, 1987). Muitas das etapas reprodutivas, incluindo dispersão de ovos e larvas, distribuição de juvenis e migrações, estão sincronizadas com o funcionamento dos ambientes estuarinos (BOCHLERT; MUNDY, 1988).

Os peixes são amplamente utilizados em monitoramentos por apresentarem respostas similares a outros vertebrados aos agentes tóxicos, sofrerem bioacumulação, serem capazes de transferir os contaminantes da água para os humanos, pela capacidade de responder a agentes químicos em baixas concentrações e de ativar o sistema enzimático do citocromo P450 para biotransformação (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A espécie *Atherinella brasiliensis* está distribuída em águas estuarinas desde a Venezuela até o sul do Brasil, sendo encontrada normalmente na desembocadura de rios e nas regiões de águas salobras. Alimenta-se basicamente de detritos vegetais; e em menor escala, de pequenos peixes e

crustáceos, ocasionalmente outros invertebrados (FIGUEIREDO; MENEZES, 1978). É considerada tipicamente estuarina e residente (BARBIERI *et al.*, 1990; PESSANHA; ARAUJO, 2001), sendo descrita também como uma das mais abundantes em áreas rasas estuarinas do sudeste do Brasil (BARBIERI *et al.*, 1990; ANDREATA *et al.*, 1997; PESSANHA; ARAUJO, 2001). Alguns trabalhos relacionados à avaliação de impactos ambientais utilizaram *A. brasiliensis*, sendo que esta espécie demonstrou ser uma boa bioindicadora (CORREIA *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2009; FERNANDEZ *et al.*, 2011; SOUZA-BASTOS; FREIRE, 2011).

Biomarcadores são alterações observadas em organismos em nível molecular, genético, bioquímico, celular e histopatológico (que podem ou não gerar consequências ao indivíduo), e que integram dados bióticos aos abióticos a fim de obter informações a respeito de um determinado ambiente (VAN DER OOST *et al.*, 2003). O estabelecimento de correlações entre diferentes biomarcadores é importante em relação à variabilidade de resposta entre espécies frente a um agente tóxico. Isto é resultado de diferenças interespecíficas nas taxas de absorção, acumulação, metabolismo, depuração, excreção e eficiência de reparo DNA. Desta forma, a adoção de múltiplos biomarcadores é importante para uma avaliação completa do impacto de poluentes nos ecossistemas (JHA, 2008).

A etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) pertence à subfamília das CYP1A1 do grupo de enzimas do citocromo P450, relacionadas a fase I de biotransformação de xenobióticos. Na fase I ocorrem reações de oxidação, redução ou hidrólise, e os produtos formados são frequentemente mais reativos que os iniciais (SIROKÁ; DRASTICHOVÁ, 2004). A glutathione S-transferase (GST) catalisa a conjugação da glutathione, a fim de inativar e eliminar a uma gama de substratos hidrofóbicos eletrofílicos, durante a fase II da biotransformação (LEAVER *et al.*, 1993). A lipoperoxidação (LPO) ocorre quando há uma deficiência no sistema antioxidante, ocasionando a formação de hidroperóxidos, que vão gerar danos aos ácidos graxos da membrana celular (JIANG *et al.*, 1992).

A inibição da acetilcolinesterase é referida como um biomarcador de neurotoxicidade específico para organofosforados e carbamatos, além de responder também metais, organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos (PAYNE *et al.*, 1996; STURM *et al.*, 1999; MARTINEZ-TABCHE *et al.*, 1997; DOMINGOS *et al.*, 2009; KATSUMITI *et al.*, 2009).

As metalotioneínas constituem uma família de proteínas de baixo peso molecular ricas em cisteínas, que atuam na regulação de metais essenciais e na detoxificação de metais que não são essenciais. Elas se ligam a íons metálicos captados pela célula para removê-los através de alvos celulares de toxicidade (OOST *et al.*, 2003).

O teste do micronúcleo primeiramente sugerido por Heddle (1973) e Schmid (1975), sofreu diversas adaptações ao longo do tempo. Ele foi adaptado para células sanguíneas de peixes, as alterações morfológicas nucleares passaram a ser classificadas e contabilizadas, e a partir da coloração com laranja de acridina foi realizada a distinção entre eritrócitos jovens e maduros (HOOFTMAN; DE RAAT, 1982; CARRASCO *et al.*, 1990; UEDA *et al.*, 1992).

O ensaio cometa investiga danos no DNA ao nível celular individual através da medição da migração em gel do DNA de células depois de uma corrida eletroforética (SINGH *et al.*, 1988). Ele avalia genotoxicidade de exposições a contaminantes e investiga os impactos na integridade do DNA, reparo e recuperação em espécies de interesse ambiental (BELPAEME *et al.*, 1998). Apresenta sensibilidade alta, permitindo obter resultados a partir de poucas células e os dados podem ser extraídos de cada célula individualmente (SASAKI *et al.*, 1997).

O ensaio de difusão do DNA é uma versão modificada do ensaio cometa, mas sem a fase de eletroforese. Consiste num método simples, sensível e rápido para estimar a apoptose em células individuais. Os núcleos das células apoptóticas são indefinidos, sem qualquer limite claro devido a difusão do DNA em agarose, além de apresentar um diâmetro de 3 vezes maior que o diâmetro médio nuclear (SINGH, 2000). A sua aplicação como biomarcador tem mostrado resultados promissores, como demonstram alguns estudos ambientais (DEL BARGA *et al.*, 2006; FRENZILLI *et al.*, 2004, 2008; NIGRO *et al.*, 2002; ROCCO *et al.*, 2010).

A avaliação histopatológica pode ser considerada um bom biomarcador para estudos de biomonitoramento por demonstrar de forma clara e objetiva o grau de comprometimento de diferentes tecidos e órgãos alvos de acordo com

a presença e frequência de alterações observadas. Além disso, representa um método simples, barato e relativamente rápido que informará as condições patológicas de um indivíduo. O fígado representa um órgão alvo importante e adequado para análises histopatológicas na procura de danos aos tecidos e células, já que possui um papel chave no metabolismo e subsequente excreção de xenobióticos. Considerado a maior glândula do corpo humano, este órgão é essencial para a homeostase do organismo sob condições ambientais variáveis (MELA *et al.*, 2007; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002).

Os objetivos deste estudo foram avaliar se o peixe estuarino *Atherinella brasiliensis* (Atheriniformes, Atherinidae) pode ser utilizada com um bom biomonitor e avaliar a qualidade ambiental de dois estuários importantes da costa sul-brasileira (Guaratuba e Paranaguá). Para podermos fazer estas avaliações foram utilizados múltiplos biomarcadores (bioquímicos, genéticos e histopatológicos) e análises químicas (quantificação de metais) no fígado e músculo dos exemplares de *Atherinella brasiliensis*.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Área de estudo

A baía de Guaratuba está localizada no estado do Paraná, ao sul da costa do estado, com uma área de 48.72 km². O clima é tipicamente subtropical com florestas úmidas e um verão chuvoso. Nesta baía ocorre o acesso entre as cidades de Matinhos e Guaratuba através de uma travessia por ferry-boat. Esta região tem recursos naturais importantes, e está envolvida por uma Área de Proteção Ambiental (APA) de 1995.86 km² que apresenta várias restrições em relação ao uso e ocupação do solo, qualidade da água e de descarga de efluentes. No entanto, uma das maiores plantações de banana do sul do Brasil está localizada próxima a ela. Além das atividades agrícolas, esta região é influenciada por modificações hidrológicas provenientes da construção de barragens, dragagens, esgoto doméstico (destinados diretamente nos rios) e eliminação da mata ciliar (PIETZSCH *et al.*, 2010; PATCHINEELAM *et al.*, 2011).

A baía de Paranaguá está localizada ao centro da costa do estado do Paraná, com uma área de 677 mil km², e representa o terceiro estuário mais importante da costa brasileira. A importância econômica dela está relacionada às atividades pesqueiras, as áreas urbanas, ao turismo, as indústrias (principalmente de fertilizantes), o terminal de combustíveis além do principal porto de embarque de grãos da América do Sul, sendo o terceiro mais importante em operações de carga e descarga com 44.574.384 toneladas em 2012 (APPA, 2013). O estuário é englobado por uma Área de Proteção Ambiental (APA) e tem uma importante função ecológica, agrupando pelo menos 10 unidades de conservação, com uma grande diversidade de ambientes, tais como ilhas, manguezais, restingas, rios, riachos de maré, costões rochosos e praias arenosas (LANA *et al.*, 2001). O impacto na baía está principalmente relacionado à presença dos Portos de Paranaguá e Antonina assim como a descarga de efluentes urbanos e industriais provenientes dos rios que chegam ao estuário. Além dos portos, a região abriga diversas marinas, atracadouros e estaleiros que recebem inúmeras embarcações de lazer principalmente no período do verão assim como movimentação de embarcações de pesca artesanal, fonte de subsistência de diversas comunidades ribeirinhas.

5.3.2 Amostragem dos peixes

Exemplares de *Atherinella brasiliensis* foram coletados através de arrasto de praia do tipo cambáu nas estações de verão (Fevereiro de 2012) e inverno (Agosto de 2012) em dois pontos na baía de Guaratuba (G1 e G2) e dois pontos na baía de Paranaguá (P1 e P2) (Figura 4). Os exemplares foram transportados vivos em recipientes contendo a água do local de coleta e aeradores durante o transporte até chegarem ao laboratório onde os organismos foram anestesiados com solução de benzocaína 0,01% e em seguida foi mensurado o comprimento total (CT), a massa (g) e determinado o sexo de cada indivíduo. Em seguida foram dissecados para a retirada de sangue (da veia caudal), fígado e músculo.

5.3.3 Fator de condição

Para a avaliação da relação comprimento/ peso dos peixes amostrados foi utilizado o fator alométrico de condição (CF) que consiste primeiramente na obtenção de uma regressão linear entre os valores de massa (M) em gramas e comprimento total (CT) em centímetros, seguido pela aplicação da fórmula: $CF = M / CT^b$; onde *b* corresponde ao coeficiente angular obtido na curva de regressão.

5.3.4 Análises químicas de metais em músculo e fígado

Alíquotas de músculo e fígado dos peixes foram armazenadas em pequenos sacos plásticos e colocadas em freezer. No laboratório as amostras foram descongeladas e submetidas a um processo de digestão ácida seguido de um tratamento com peróxido de hidrogênio. As análises de quantificação de mercúrio (Hg), chumbo (Pb), estanho (Sn) e arsênio (As) nos tecidos foram realizadas através de espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES - Varian 720-ES) (Ceppa, 2010). As linhas analíticas para os metais foram As (193,696 nm), Pb (220,353 nm), Sn (189,925 nm) e Hg (253,652 nm) com os seguintes limites de quantificação: As (0,02 mg.dm⁻³), Pb (0,002 mg.dm⁻³), Sn (0,002 mg.dm⁻³) e Hg (0,01 µg.dm⁻³). O limite de detecção foi estabelecido com base no decreto n° 55.871 (BRASIL, 1965).

5.3.5 Biomarcadores

O sangue foi retirado através de punção cardíaca com microcapilar heparinizado para as análises do teste do micronúcleo pístico, ensaio cometa e ensaio de difusão do DNA, o fígado foi utilizado para as análises bioquímicas (EROD, GST, LPO e Metalotioneínas), genotóxicas (ensaio cometa e ensaio de difusão do DNA) e histopatológicas, e o músculo para as análises neurotóxicas (atividade da AChE).

5.3.5.1 Biomarcadores bioquímicos

O fígado e músculo foram congelados em nitrogênio líquido, homogeneizados em PBS (pH 6,5 (fígado), pH 7,0 (músculo)) e centrifugados a 10.000g por 20 min, a 4°C. Sobrenadantes foram armazenados em -80 °C. Pools de fígado de dois indivíduos foram utilizados para os ensaios de glutathione S-transferases (GST), 7-etóxi-resorulina-O-deetilase (EROD) e níveis de lipoperoxidação (LPO). A concentração proteica foi determinada utilizando o método de Bradford (1976), com soro albumina bovino como padrão.

Glutathione S-transferase (atividade da GST): 50 µL do sobrenadante e meio de reação (100µL, 1.5 mM GSH, 2.0 mM CDNB, 0.1 M de tampão fosfato-potássio, pH 6.5) foram mantidos em uma microplaca de 96 espaços. Aumento da absorvância foi imediatamente medido a 340 nm em intervalos de 12 s e o coeficiente de extinção de $9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para calcular a atividade enzimática (KEEN *et al.*, 1976).

7-etóxi-resorulina-O-deetilase (atividade da EROD): foi medida através da fluorimetria como descrito por Burke e Mayer (1974) com modificações feitas por Silva de Assis (1998).

Lipoperoxidação (LPO): 200 µl de sobrenadante e 800 µl de solução de reação (100 mM laranja xilenol, 25 mM H₂SO₄, 4 mM BHT, hidrotolueno butilado e 250 µM FeSO₄:NH₄, sulfato de amônio ferroso em metanol puro) foram adicionados em tubos de 2mL. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 20 minutos e então centrifugados a 10.000 g por 10 min. Finalmente, 300 µl de sobrenadantes foram adicionados a microplacas de 96 espaços e a absorvância foi medida a 570nm. Para a determinação das concentrações de hidroperóxidos o coeficiente de extinção molar aparente para H₂O₂ e hidroperóxido cumene de $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi utilizado (JIANG *et al* 1992).

Acetilcolinesterase (atividade da AChE): o sobrenadante do músculo foi diluído (1:10, ou 10% v / v) em 0.1 M de tampão fosfato (pH 7.5). depois da diluição, 50 µl foi colocado em uma microplaca de 96 espaços seguido por 200µl de DTNB (5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzoato) e 50µl de ACT (acetiltiocolina iodada). Absorvância foi imediatamente medida a 415 nm em intervalos de 5 s

pelo método de Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998).

Metalotioneínas (MTs): A concentração das metalotioneínas foi estimada através da concentração de grupamentos sulfidrila (Viarengo *et al.*, 1997). A concentração de metalotioneína foi avaliada no sobrenadante utilizando-se uma fração parcialmente purificada de metaloproteína obtida em várias etapas de uma solução etanol/clorofórmio. As amostras foram secas aproximadamente de 4 a 6 horas e a concentração de metalotioneínas nos extratos foi quantificada espectrofotometricamente utilizando-se o reagente de Ellman (NaCl 2M, DTNB 0,43M em tampão fosfato 0,2M e pH 8,0) em 412 nm.

5.3.5.2 Biomarcadores genéticos

A fim de se verificar a frequência de micronúcleos em eritrócitos, foi empregada a técnica descrita por Heddle (1958) e Schimd (1975) para a montagem das lâminas. Com o sangue retirado da veia caudal foi realizado um esfregaço numa lâmina de vidro limpa posteriormente fixada com etanol por 30 minutos, e corado com laranja de acridina (Ueda *et al.*, 1992). Foram analisados 2000 eritrócitos por peixe num aumento de 1000x em um microscópio de epifluorescência. Além dos micronúcleos foram também contabilizadas as alterações morfológicas nucleares de acordo com Carrasco *et al.* (1990) e a frequência de eritrócitos policromáticos, segundo Ueda *et al.* (1992) e Çavas *et al.* (2005).

O ensaio cometa foi realizado de acordo com Speit e Hartmann (1999), com alterações de Ferraro *et al.* (2004) para eritrócitos e Ramsdorf *et al.* (2009) para hepatócitos. Primeiramente 10 μ L do sangue e do fígado homogeneizados em 1mL soro bovino fetal foram diluídos em 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão e plotados sobre uma lâmina coberta com agarose ultrapura. As lâminas foram colocadas em uma solução de lise composta de NaCl (2.5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (10%), Triton X-100 (1%) e DMSO (10%) por 72 h a 4°C. Posteriormente as lâminas foram imersas em uma solução de NaOH (10N) e EDTA (200 mM), pH>13 por 25 minutos, para desnaturar o DNA. Então foi realizada a eletroforese a 300mA e 25 V por 25 minutos. As lâminas foram neutralizadas em 0,4M Tris, pH 7,5 e

fixadas em etanol por 10 minutos. Os cometas foram corados com 0,02 g/ml de brometo de etídeo e contabilizados usando um microscópio de epifluorescência Leica DMLS2. Foram analisados visualmente 100 cometas por lâmina e contabilizados em cinco classes de danos segundo Collins (2004).

O ensaio de difusão do DNA avaliou a frequência de células apoptóticas segundo método descrito por Singh (2000) baseado no mesmo protocolo descrito acima para o ensaio cometa com a omissão da etapa da eletroforese. Foram contabilizados 100 nucleóides e separados em células normais e em processo de apoptose.

5.3.5.3 Biomarcadores histopatológicos

Parte do fígado de cada peixe foi coletado para histopatologia, sendo colocado em um cassete e fixado em ALFAC (etanol, formol e ácido acético) por 16 h e depois transferido para Álcool 70%, onde permaneceu até o procedimento de inclusão. Para esta etapa, os órgãos foram desidratados em série crescente de etanol e posteriormente transferidos para o xilol e parafina a 58° C e em seguida emblocados. Cortes de 5µm de espessura foram obtidos através de Micrótomo Leica e distendidos nas lâminas com solução de albumina 20%. Para a coloração os cortes foram desparafinizados, hidratados e corados com Hematoxilina/Eosina. Em seguida após desidratação e diafanização foram montados com lamínula em Permount. O material foi analisado e as imagens registradas em uma câmera digital acoplada ao microscópio de luz.

As alterações histopatológicas do fígado foram analisadas de acordo com uma metodologia adaptada da proposta por Bernet *et al.* (1999). As principais alterações avaliadas no fígado foram: hemorragias, hipertrofia/atrofia, hiperplasia, infiltração leucocitária, vacuolização, centros de melanomacrófagos, ocorrência de parasitas, alterações nucleares, necroses, neoplasias. Para cada alteração foi atribuído um valor de importância para o cálculo do índice de lesão segundo Bernet *et al.* (1999).

5.3.6 Análise estatística

Biomarcadores (EROD, GST, LPO, AChE, Metalotioneínas, Teste do Micronúcleo pisco, Ensaio Cometa, Ensaio de difusão do DNA, índice histopatológico) foram reportados como médias \pm desvios padrões da média. Todos os dados foram testados para normalidade e homocedasticidade antes de realizar a análise de variância de um via (ANOVA). A análise de uma via não-paramétrica Kruskal-Wallis seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls com nível de significância de 0.05 foi realizada quando os dados não apresentaram distribuição normal e/ou variâncias equivalentes. Dados de quantificação de metais foram reportados descritivamente.

A média obtida das análises dos biomarcadores foi utilizada na montagem de uma matriz de similaridade (índice de Bray-Curtis) através de uma análise de cluster.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Sazonalidade

A sazonalidade foi claramente observada nos parâmetros físicos de temperaturas e pluviosidade (Tabela 1). O verão apresentou temperaturas mais altas e maior pluviosidade nas duas baías. O inverno apresentou temperaturas mais baixas e menor pluviosidade nas duas baías.

5.4.2 Tamanho, peso e Fator de condição

Os exemplares de *Atherinella brasiliensis* amostrados diferiram significativamente tanto em massa (M) quanto em tamanho (CT) nas comparações dos pontos nas diferentes estações do ano ($p < 0.05$) (Tabela 6). Entre G1 e G2 houve diferença no verão e no inverno para o tamanho e massa ($p < 0.05$) sendo que em G2 os peixes eram maiores e mais pesados. Foi observada também diferença sazonal no tamanho no ponto G1 ($p < 0.05$) com peixes maiores e mais pesados no inverno.

Aplicando-se o CF nos peixes-rei amostrados no verão, foi observada diferença entre os pontos ($p < 0.05$), sendo que os pontos G1 e P1

apresentaram valores mais baixos iguais a 0.005 ± 0.0006 e 0.005 ± 0.0003 , respectivamente. No inverno, o ponto G1 apresentou CF igual a 0.005 ± 0.0005 , sendo menor que o observado em todos os outros pontos ($p < 0.05$). Na comparação sazonal, os pontos G1 e P1 foram significativamente maiores no inverno ($p < 0.05$).

TABELA 6 - DADOS MORFOMÉTRICOS MÉDIOS DE *Atherinella brasiliensis* EM CADA PONTO DE COLETA DAS BAÍAS DE GUARATUBA E PARANAGUÁ.

	N	CT(cm)	M(g)	CF
Verão				
G1	20	8,429±0,6272 ^a	2,924±0,7996a	0,004793±0,0005766a
G2	20	11,85±1,179c	9,276±3,151c	0,005383±0,0004726b
P1	20	9,760±0,4394ab	4,743±0,5963ab	0,005086±0,0002723a
P2	20	10,07±0,7533b	5,601±1,331b	0,005399±0,0002914b
Inverno				
G1	20	10,16±0,6840 α ,*	5,460±1,015 α ,*	0,005190±0,0005475 α ,*
G2	20	13,65±0,7837 β	14,31±2,627 β	0,005581±0,0003253 β
P1	20	10,44±0,6778 α	6,215±0,5668 α	0,005519±0,0006582 β ,*
P2	20	10,38±0,3892 α	6,229±0,6958 α	0,005566±0,0003529 β

Dados em média±DP

n = nº de indivíduos coletados; CT(cm) = comprimento total; M(g)= massa; CF= fator de condição

Caracteres latinos indicam diferenças significativas entre os pontos no verão (a, b)

Caracteres gregos indicam diferenças significativas entre os pontos no inverno (α , β)

* indicam diferenças sazonais nos pontos

5.4.3 Quantificação de metais

O As apresentou valores superiores aos permitidos pela legislação brasileira (BRASIL, 1965), se acumulando no fígado em G2, P1 e P2, e no músculo em P1 e P2. Metais como Pb, Sn e Hg não apresentaram valores acima aos referidos pela legislação (Tabela 7).

TABELA 7 – QUANTIDADE DE METAIS NOS TECIDOS (PPM) DOS PEIXES COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ, E VALORES DE REFERÊNCIA (BRASIL, 1965).

	As		Pb		Sn		Hg	
	Fígado	Músculo	Fígado	Músculo	Fígado	Músculo	Fígado	Músculo
G1	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	0.02	0.012
G2	2.88	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	0.023	0.014
P1	1,53	1,19	<0.10	<0.10	3.96	<0.10	<0.001	0.022
P2	3,14	1,94	<0.10	<0.10	0.32	<0.10	<0.001	<0.001
Valores de referência	1.00	1.00	2.00	2.00	250.00	250.00	0.5	0.5

5.4.4 Biomarcadores bioquímicos

Os resultados médios obtidos na dosagem da atividade enzimática da EROD diferiram significativamente entre os pontos e entre as estações do ano em Paranaguá ($p < 0.05$) sendo que no verão ela se apresentou valores mais baixos em P2 e no inverno ela apresentou valores mais baixos nos dois pontos de Paranaguá (Figura 10 A). Na comparação sazonal, foi observada diferença em P1, onde a atividade enzimática foi maior no verão ($p < 0.05$). A GST também diferiu significativamente entre os pontos e entre as estações do ano ($p < 0.05$) (Figura 10 B), no verão ela se apresentou mais alta no ponto G2 enquanto que no inverno ela esteve alta nos dois pontos de Guaratuba. Na comparação sazonal, os dois pontos de Paranaguá foram significativamente mais altos no verão ($p < 0.05$).

Na análise da LPO foi observada diferença significativa no verão, sendo os valores mais altos observados em P1 ($p < 0.05$) (Figura 10 C). No inverno os valores mais altos foram observados nos dois pontos de Paranaguá ($p < 0.05$). Foram observadas diferenças sazonais nos dois pontos de Guaratuba, sendo que a atividade enzimática foi mais alta no inverno ($p < 0.05$).

A atividade da AChE no músculo foi menor nos pontos G2 e P1 no verão, e G1 e G2 no inverno ($p < 0.05$) (Figura 10 D). Comparando as diferenças sazonais, G1 apresentou valores mais altos no verão ($p < 0.05$).

Foram observadas diferenças significativas para a expressão das metalotioneínas no fígado entres os pontos na mesma estação ($p < 0.05$) (Figura 10 E). No verão, G2, P1 e P2 apresentaram valores mais altos ($p < 0.05$),

enquanto que no inverno os valores mais altos foram observados em G2 e P2 e P2 (p<0.05).

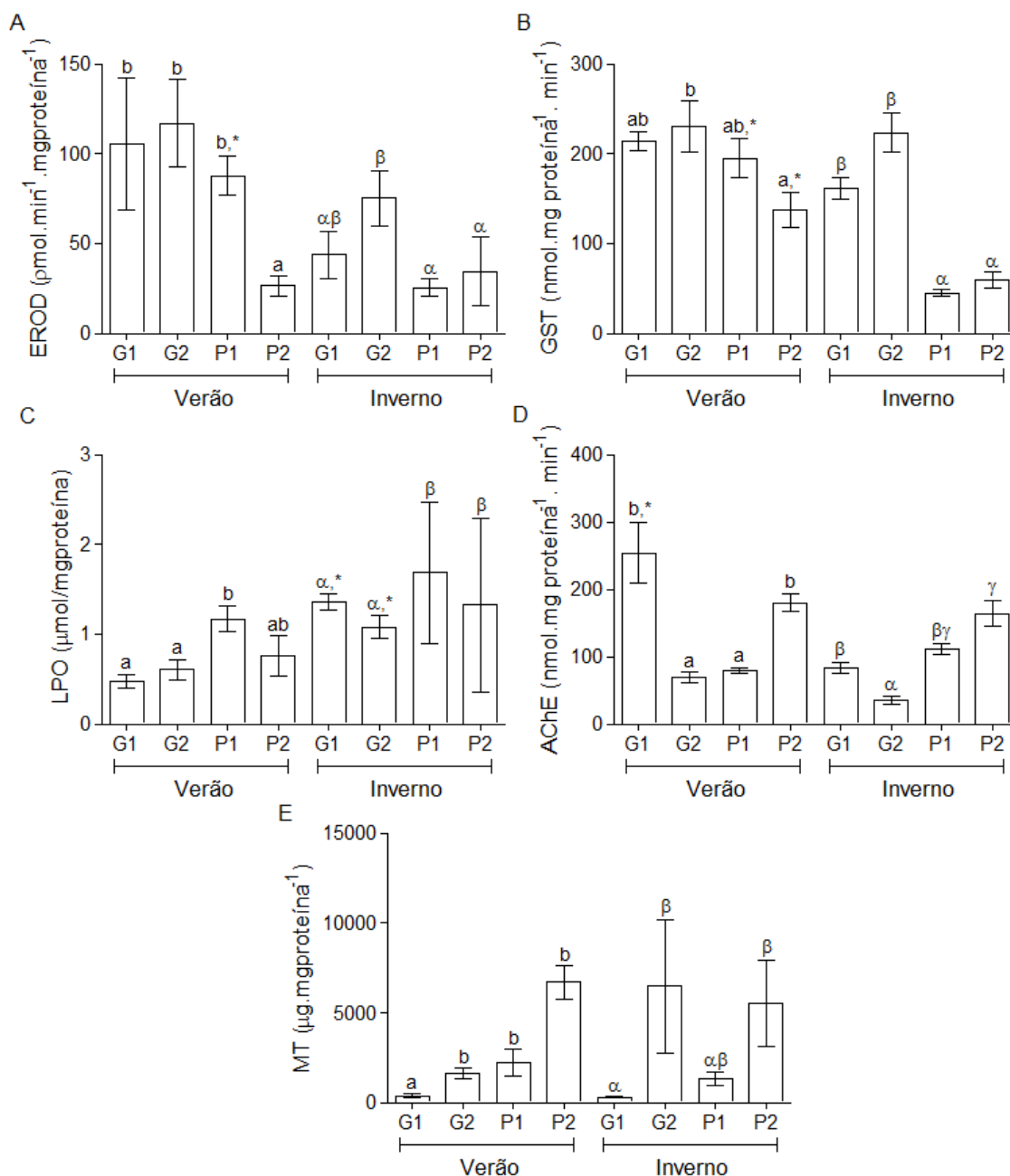


FIGURA 10 - BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Atherinella brasiliensis* COLETADO EM GUARATUBA E PARANAGUÁ. A- ETOXIRESORUFINA-O-DEETILASE, EROD (KRUSKAL-WALLIS= 34.10). B- GLUTATIONA S-TRANSFERASE, GST (KRUSKAL-WALLIS= 46.99). C- LIPOPEROXIDAÇÃO, LPO (KRUSKAL-WALLIS= 18.20). D- ACETILCOLINESTERASE, ACHE (KRUSKAL-WALLIS= 70.97). E- METALOTIONEÍNA, MT (KRUSKAL-WALLIS= 18.88). CARACTERES LATINOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO VERÃO (a, b), CARACTERES GREGOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO INVERNO (α, β, γ), * INDICA DIFERENÇAS SAZONAIS NOS PONTOS.

5.4.5 Genotoxicidade

Para o teste do micronúcleo písceo (Tabela 8), foram observadas diferenças significativas para as alterações do tipo Blebbed e Notched ($p < 0.05$), e também nas avaliações das alterações morfológicas nucleares totais ($p < 0.05$). No verão, os pontos de Paranaguá apresentaram maior quantidade de Blebbed ($p < 0.05$), enquanto que no inverno os pontos de Guaratuba apresentaram maior quantidade ($p < 0.05$). Na comparação sazonal, os pontos de Paranaguá apresentaram mais alterações no verão ($p < 0.05$), enquanto os pontos de Guaratuba apresentaram mais alterações no inverno ($p < 0.05$). Em relação à alteração do tipo Notched, foram observadas diferenças sazonais em Guaratuba e entre as baías no inverno, sendo encontradas mais alterações nos dois pontos de Guaratuba ($p < 0.05$). Quando avaliamos todas as alterações morfológicas nucleares em conjunto observamos diferenças significativas no verão, com P2 apresentando maior quantidade de alterações ($p < 0.05$). No inverno, G1 e G2 apresentaram mais alterações, apresentando inclusive diferença sazonal em relação ao verão nestes pontos ($p < 0.05$).

No verão foi observada menor frequência de eritrócitos policromáticos em P2, sendo que neste ponto também houve diferença sazonal ($p < 0.05$), com uma maior frequência de eritrócitos policromáticos no inverno.

TABELA 8 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES E FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS OBSERVADOS EM *Atherinella brasiliensis* COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ.

	MN	Blebbled	Notched	AMN	%PCE
Verão					
G1	0 (0-0.75)	2 (1-4.5)a	6 (3.5-9.75)	10 (5.5-14.75)a	4.2 (3.13-5.18)c
G2	0 (0-1)	7.5 (4-9.5)b	6 (4-14.25)	14.5 (12-25.5)ab	2.88 (1.45-4.53)bc
P1	0 (0-0)	7.5 (5-21)bc,*	5.5 (2-9.25)	12.5 (8-34)ab	2,1 (1.55-2.78)b
P2	0 (0-0)	15 (9-32)c,*	11 (6.5-16.5)	32 (15.5-55)b	0.9 (0.63-1.08)a
Inverno					
G1	0 (0-1)	9.5 (7-19.25)βγ,*	43.5 (31-81.75)β,*	55 (47-100.5)β,*	3.3 (1.4-4.75)
G2	0 (0-0.25)	17.5 (9-30)γ,*	57.5 (27-86.25)β,*	69 (56-108.5)β,*	2.2 (1.41-3.89)
P1	0 (0-0)	4 (3-6)α	15.5 (4.5-22)α	22 (10-30.75)	2.1 (1.05-5.04)
P2	0 (0-1)	6.5 (3-12.5)αβ	14.5 (7-26.5)α	22 (10-40)	3.63 (1.85-4.45)*

Dados em mediana e quartil (1-3)

Caracteres latinos indicam diferenças significativas entre os pontos no verão (a, b, c)

Caracteres gregos indicam diferenças significativas entre os pontos no inverno (α, β, γ)

* indicam diferenças sazonais nos pontos

Os resultados obtidos para o ensaio cometa de sangue (Figura 11 A) demonstraram que no verão, no ponto G1, os peixes apresentaram mais danos ao material genético ($p < 0.05$), enquanto que no inverno os pontos de Paranaguá apresentaram mais danos ($p < 0.05$). Na comparação sazonal os dois pontos de Guaratuba apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$), sendo mais altos no verão, enquanto o P2 no inverno apresentou mais danos em relação ao verão ($p < 0.05$). Para o ensaio cometa de fígado (Figura 11 B) foram observadas apenas diferenças sazonais, sendo que os dois pontos de Guaratuba e P2 apresentaram mais danos no verão.

Através do ensaio de difusão do DNA foram observadas diferenças na quantidade de eritrócitos em apoptose entre os pontos e entre as estações em Guaratuba (Figura 11 C). No verão, G2 apresentou mais eritrócitos em apoptose, enquanto que no inverno G2 e P1 apresentaram maior quantidade. Na comparação sazonal, os dois pontos de Guaratuba apresentaram mais eritrócitos em apoptose no verão. O ensaio de difusão em células do fígado (Figura 11 D) demonstrou que no verão os dois pontos de Guaratuba apresentaram mais células em apoptose. No inverno, G2 apresentou mais

células em apoptose. Na comparação sazonal, G1 e P1 apresentaram mais células em apoptose no verão.

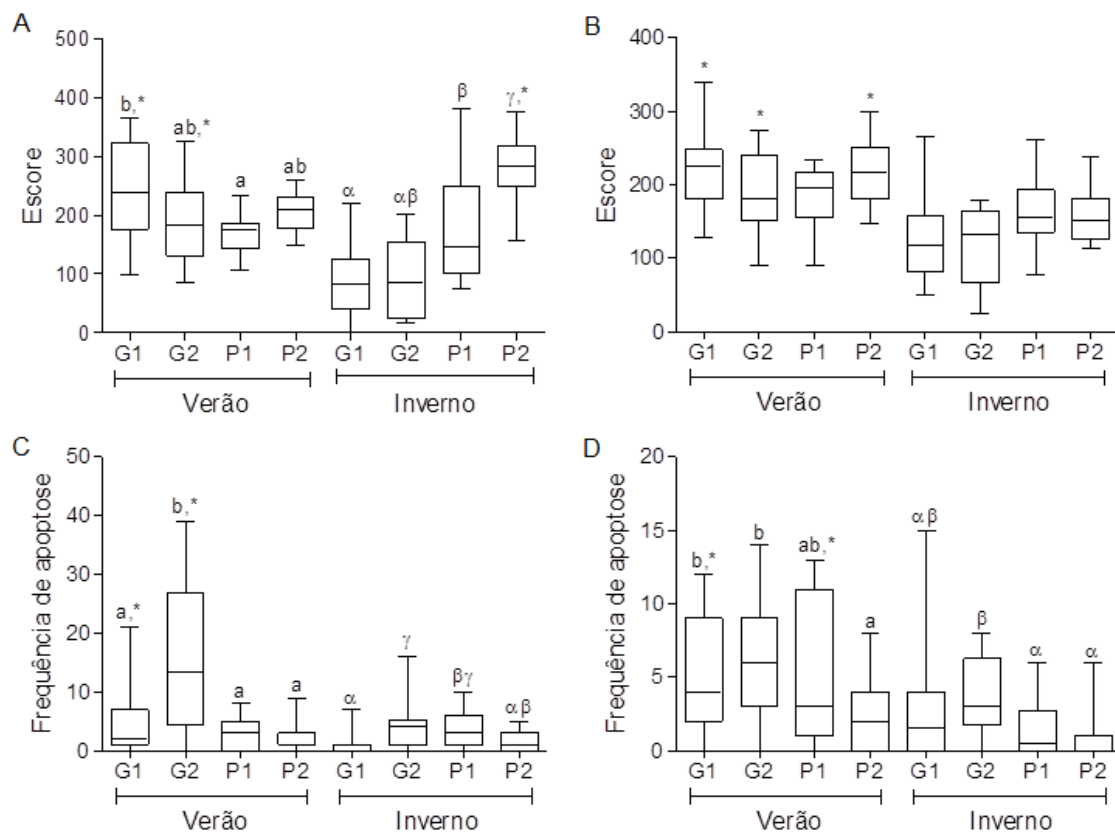


FIGURA 11 - ENSAIO COMETA (A E B) E ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA (C E D) EM *Atherinella brasiliensis* COLETADOS EM GUARATUBA (G1 E G2) E PARANAGUÁ (P1 E P2). A- ESCORE DE DANO GENÉTICO EM ERITRÓCITOS (KRUSKAL-WALLIS= 62.20), B- ESCORE DE DANO GENÉTICO EM CÉLULAS DO FÍGADO (KRUSKAL-WALLIS= 48.56), C- FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS EM APOPTOSE (KRUSKAL-WALLIS= 41.51), D- FREQUÊNCIA DE CÉLULAS DO FÍGADO EM APOPTOSE (KRUSKAL-WALLIS= 38.76). CARACTERES LATINOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO VERÃO (a, b), CARACTERES GREGOS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PONTOS NO INVERNO (α , β , γ), * INDICA DIFERENÇAS SAZONAIS NOS PONTOS.

5.4.6 Histopatologia

Não foram observadas diferenças significativas entre os índices de lesões do fígado entre os grupos de peixes-rei coletados em Guaratuba e Paranaguá (Figura 12). As médias dos índices de lesão variaram de 9,8 em G1 no inverno a 19,37 em G1 no verão.

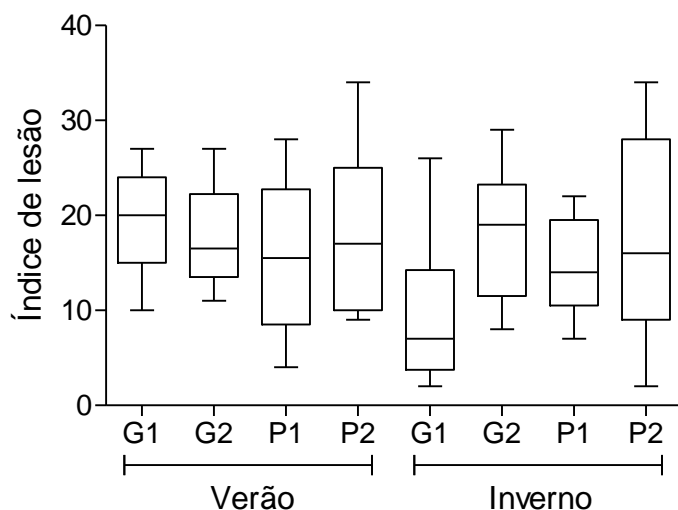


FIGURA 12 - ÍNDICE DE LESÃO NO FÍGADO DE *Atherinella brasiliensis* COLETADO EM GUARATUBA E PARANAGUÁ (KRUSKAL-WALLIS= 10.44).

Mesmo não havendo diferença significativa do índice de lesão entre os grupos, foi possível observar a ocorrência de diferentes alterações neste órgão, sendo a necrose (Figura 13 A-B) a lesão presente com maior frequência (de 75 a 100%, Tabela 9) nos indivíduos. Poucos apresentaram neoplasia (Figura 13 C-D), porém nestes, esta lesão demonstrou grande extensão. Apesar da menor importância patológica, outra alteração verificada com elevada frequência foi a presença de vacuolização dos hepatócitos (Figura 13 E), independente da época reprodutiva das fêmeas. Outras alterações observadas foram a ocorrência de parasitas (Figura 13 F), centros de melanomacrófagos (Figura 13 G) e infiltração leucocitária. Também foram verificadas hemorragias (Figura 13 H), principalmente nos indivíduos coletados em P1 no verão. Houve uma grande variação da intensidade das alterações observadas entre os grupos.

TABELA 9 - FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES OBSERVADAS NO FÍGADO DE *Atherinella brasiliensis* EM GUARATUBA E PARANAGUÁ.

	Verão				Inverno			
	G1	G2	P1	P2	G1	G2	P1	P2
Hemorragia	37,5%	41,66%	90,9%	50%	18,18%	30%	25%	50%
Infiltração leucocitária		8,33%	36,36%	25%		20%	25%	12,5%
Vacuolização	100%	100%	90,9%	75%	36,36%	40%	62,5%	50%
CMM		25%		12,5%	27,27%	70%	50%	50%
Parasitas	12,5%	8,33%		12,5%	9,09%	40%	37,5%	87,5%
Diferenciação tecidual								12,5%
Necrose	100%	100%	81,81%	87,5%	63,63%	80%	75%	87,5%
Neoplasia					9,09%	10%		

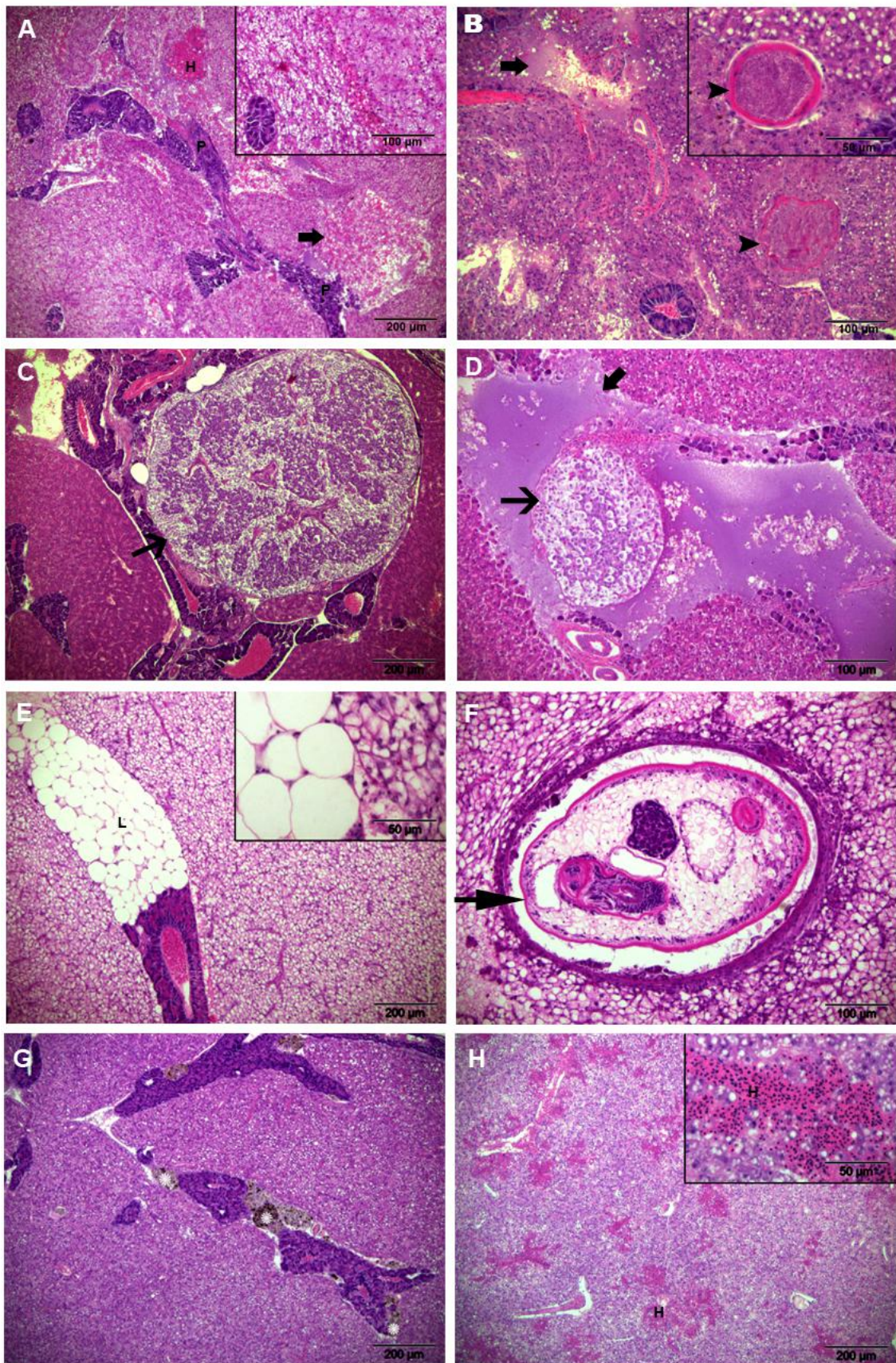


FIGURA 13 - HISTOLOGIA DO FÍGADO DE *Atherinella brasiliensis* COLETADOS EM GUARATUBA E PARANAGUÁ. A – INDIVÍDUO APRESENTANDO UM FÍGADO COM

NECROSE DO PARÊNQUIMA HEPÁTICO (↑),COM ALTERAÇÃO DO NÚCLEO E DO FORMATO DOS HEPATÓCITOS. B – NECROSE (↑) COM CICATRIZAÇÃO, HEPATÓCITOS DIFERENCIADOS (▲).C, D – NEOPLASIA EXTENSA (TUMOR BENIGNO ENCAPSULADO, ↑). E – VACUOLIZAÇÃO DOS HEPATÓCITOS, COM ACÚMULO LIPÍDICO NOS ADIPÓCITOS (L). F – PARASITA (↑) APRESENTANDO APARENTE ACÚMULO LIPÍDICO. G – PRESENÇA DE CENTROS DE MELANOMACRÓFAGOS (*). H – ALTERAÇÃO NO SISTEMA CIRCULATÓRIO, APRESENTANDO UMA EXTENSA HEMORRAGIA (H).

5.4.7 Análise de similaridade

A análise de cluster mostrou a similaridade alta entre as respostas dos biomarcadores em todos os pontos de coleta e estações do ano (Figura 14). Nota-se que G2 foi o ponto onde a variação sazonal foi mais marcante em relação às respostas dos biomarcadores, enquanto os outros pontos foram agrupados na matriz de correlação. Foram formados três grupos, um contendo P2S, G2W e P2W; outro contendo P1W, G2S e P1S; e outro contendo G1W e G1S.

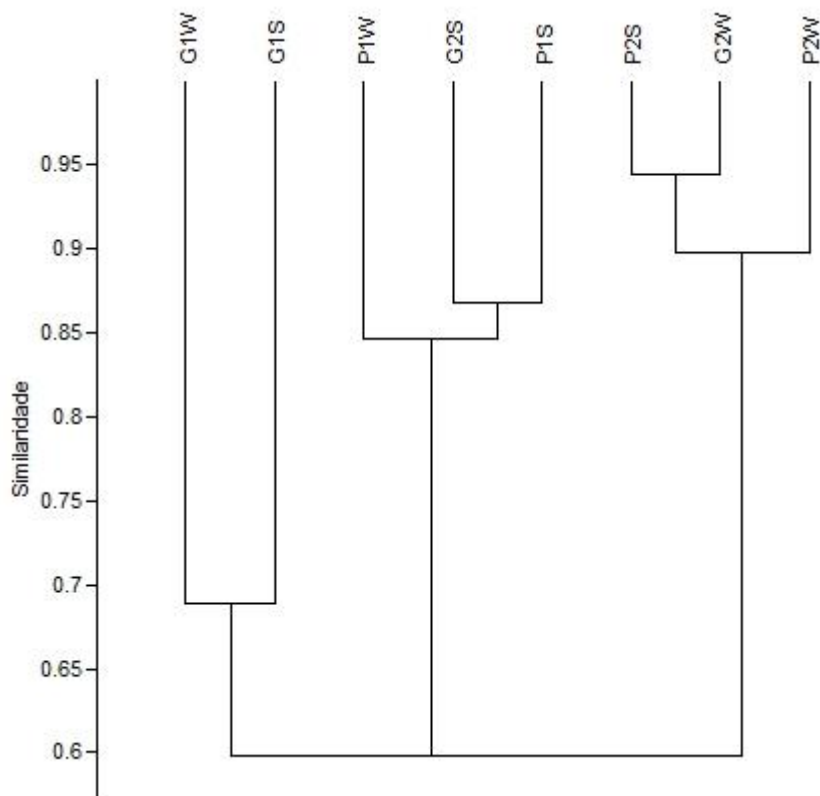


FIGURA 14 - ANÁLISE DE CLUSTER PARA TODOS OS PONTOS DE COLETA BASEADO NA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE BRAY-CURTIS CALCULADA A PARTIR DAS MÉDIAS DAS RESPOSTAS DOS BIOMARCADORES NO VERÃO (S) E NO INVERNO (W) (COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO= 0.8812).

5.5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram a utilidade de integrar vários biomarcadores para definir os efeitos da contaminação em ambientes estuarinos impactados nos organismos. Através da abordagem de múltiplos biomarcadores foi possível avaliar os efeitos de diferentes xenobióticos nos peixes, provenientes de diferentes locais. Este trabalho utilizou diversas ferramentas de avaliação, devido à complexidade dos estuários. Os biomarcadores utilizados foram CF, EROD, GST, LPO, AChE, MTs, TMP, Ensaio cometa, Ensaio de difusão do DNA e histopatologia, além da quantificação de metais no músculo e no fígado, considerada um marcador de bioacumulação.

É importante usar as informações para verificar se fatores naturais relacionados com a sazonalidade interferem nos resultados de cada variável medida nos peixes. A região onde este estudo foi realizado apresenta um verão

quente e chuvoso e um inverno frio e menos chuvoso. A biodisponibilidade de xenobióticos na baía de Guaratuba é controlada por aportes de material inorgânico e orgânico associados à pluviosidade e por variações nas fases de maré vazante e enchente (MIZERKOWSKI *et al.*, 2012). Neste trabalho observamos variações sazonais para a atividade da EROD, GST, LPO, AChE, TMP, ensaio cometa e ensaio de difusão. Em temperaturas baixas alguns mecanismos celulares relacionados à metabolização de xenobióticos podem apresentar atividade reduzida, desta forma afetando diretamente o processo de detoxificação (BUSCHINI *et al.*, 2003). O ponto G2 foi o que mais variou sazonalmente em relação as respostas dos biomarcadores, e isto pode estar relacionado as variações na população no entorno da baía, variação na circulação do ferry boat e conseqüentemente as variações na quantidade de esgoto doméstico lançado neste local. Guaratuba tem aproximadamente 33000 habitantes, e durante o período de verão esta região passa a ser frequentada por muitos turistas, elevando a população.

Os exemplares de *A. brasiliensis* coletados variaram em relação ao comprimento e massa dentro dos estuários. Tanto no verão como no inverno os peixes coletados em G2 foram maiores do que os coletados em G1. E este fato pode estar relacionado a disponibilidade de recursos, pois quando avaliamos a saúde dos peixes através do fator de condição (CF) vimos que a variação segue o mesmo padrão. Contente *et al.* (2010) mostraram que os hábitos alimentares de *A. brasiliensis* variam muito espacialmente e temporalmente de acordo com o gradiente de presas. Por isso podemos inferir que G1 e G2 apresentam diferentes gradientes de presas e por isso elas variaram no tamanho e no fator de condição (CF). O CF pode ser afetado por fatores como doenças e disponibilidade de nutrientes, além de ser utilizado como um biomarcador menos sensível para avaliação dos efeitos dos xenobióticos ou para fornecer informações sobre as reservas de energia (MAYER *et al.*, 1992). Observamos também uma variação sazonal no tamanho e no CF dos peixes no ponto G1, o que pode estar relacionados aos ciclos reprodutivos desta espécie, visto que o verão (onde foram coletados os peixes menores) é a estação seguinte após o período de reprodução (quando os peixes gastam maior parte da reserva energética) (FÁVARO *et al.*, 2007).

Observando a resposta da EROD, GST, LPO e AChE no ponto G1, podemos sugerir que esta região está sofrendo impactos nas duas estações. A atividade da EROD foi mais alta na baía de Guaratuba, o que pode estar relacionado a presença de HPA em grandes quantidades nessa região (PIETZSCH *et al.*, 2010). O HPA são conhecidamente indutores da atividade enzimática da EROD (CHOVANEC *et al.*, 2003; PADRÓS *et al.*, 2003). Por outro lado, a EROD se apresentou inibida em Paranaguá. Esta região apresenta grandes quantidades de compostos organoestânicos (como o TBT) no sedimento (SANTOS *et al.* 2009), que são conhecidamente inibidores da atividade enzimática da EROD. Em Paranaguá, a atividade da GST foi menor principalmente no inverno. A inibição da GST, enzima de fase II da biotransformação, pode ser ocasionada pela conjugação direta do TBT com a glutatona reduzida (GSH), ligando-se ao grupo SH e tornando-o indisponível para a atividade enzimática (HAMED *et al.*, 2003, ISHIHARA *et al.*, 2012). Em Guaratuba, próximo aos pontos de amostragem existem muitas plantações de arroz e banana, que comumente utilizam pesticidas (CREPEAU; KUIVILA, 2000), justificando assim a inibição da AChE (PAYNE *et al.*, 1996). No entanto no verão, vimos que em G1 a AChE apresentou valores mais altos, o que pode estar relacionado a atividade desta enzima ser maior em organismos presentes em águas mais quentes (DURIEUX *et al.* 2011). Em Guaratuba a atividade da GST também foi muito alta tanto no inverno como no verão, podendo ser explicado pela presença de pesticidas que podem aumentar a atividade desta enzima (VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

A contaminação por metais em Guaratuba e Paranaguá é muito conhecida, mas sabe-se que ela é proveniente de fontes diferentes. Neste trabalho encontramos valores acima do permitido pela legislação brasileira para o As nas duas baías no músculo. Parte do As na baía de Paranaguá é liberado naturalmente através do intemperismo de rochas ricas deste elemento, mas também pode ter fonte antrópica (através das indústrias de fertilizantes). Este elemento pode estar disponível para os peixes devido as frequentes dragagens realizadas neste local, pois vários trabalhos identificaram o sedimento dessa região rico em As (SÁ *et al.*, 2006) . A utilização de fertilizantes em regiões próximas a baía de Guaratuba também contribui para que o As seja frequentemente encontrado nos peixes deste local (CASTELLO, 2010). Ainda

sobre este elemento, pudemos observar que, com exceção de G1, todos os pontos de coleta apresentaram valores maiores que 1ppm (valor de referência) no fígado, corroborando o fato das medições das MTs apresentarem diferenças significativas, visto que o As induz o aumento dos níveis de MTs (KREPPEL *et al.*, 1994). A presença de outros metais como Cd, Zn e Cu na região (RODRIGUES *et al. In press*) também pode ter atuado para o aumento da atividade desta proteína. Mas devemos levar em consideração que a espécie *A. brasiliensis* apresenta um crescimento rápido e vida curta (CONTENTE *et al.*, 2010), justificando o fato dela não apresentar muitos metais acumulados nos tecidos. Quando avaliamos as quantidades de Hg vimos que as concentrações foram abaixo do valor de referência na legislação brasileira, mas sabe-se que o mercúrio pode sofrer biomagnificação, e ser encontrado em maiores quantidades em peixes maiores (DANG; WANG, 2012) que utilizam a *A. brasiliensis* como presa.

Observamos também que as concentrações de metais variaram em relação os tecidos e pontos de coleta. Em G2, por exemplo, foram encontrados <0.1ppm de As e 0.014ppm de Hg no músculo, enquanto foram encontrados 2.88ppm de As e 0.023ppm de Hg no fígado. Essa variação também ocorreu nos outros pontos. Sabe-se que as concentrações de metais podem variar em diferentes tecidos, devido as diferentes afinidades bioquímicas e metabolismo. Alguns órgãos tendem a acumular mais os metais, como é o caso do fígado e do rim. As concentrações de metais nestes órgãos podem ser muito superiores às encontradas no tecido muscular (KOJADINOVIC *et al.*, 2007; PARSONS, 2000), como foi observado neste trabalho. Consideramos então que os níveis observados de metais foram muito baixos em geral, portanto as variações que aparecem podem não ter um significado ambiental.

A citotoxicidade e a genotoxicidade foram avaliadas através do teste do micronúcleo pisco (TMP), Ensaio cometa e Ensaio de difusão do DNA. Através da análise da frequência de alterações morfológicas nucleares observamos que os dois pontos de Guaratuba apresentaram muitas alterações principalmente no inverno. Estas alterações foram classificadas como marcadores de genotoxicidade, pois resultam de alterações na segregação dos cromossomos durante a divisão celular (GUILHERME *et al.*, 2008), embora alguns autores classifiquem estas alterações como citotóxicas (BOLOGNESI *et*

al., 2006). A alta frequência de alterações pode estar relacionada a presença de pesticidas, como já foi constatado em outros trabalhos (BIANCHI *et al.*, 2011; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011; GHISI *et al.*, 2011; GRISOLIA, 2002). Quando o ensaio cometa foi aplicado em eritrócitos, observamos mais danos ao DNA nos dois pontos de Paranaguá, principalmente em P2 no inverno. Danos as moléculas de DNA tem sido identificados como marcadores de estresse oxidativo (COLLINS, 2008). E observamos níveis mais elevados de LPO neste mesmo ponto. Outros trabalhos também relacionaram os resultados obtidos para o Ensaio cometa e a LPO (AMADO *et al.*, 2006; CLEMENTE *et al.*, 2010). Observamos também uma variação sazonal em P2, na qual os danos no inverno foram significativamente maiores, o que pode ser explicado pela diminuição na eficiência do sistema de reparo de DNA em baixas temperaturas (PELLACANI *et al.*, 2006).

O ensaio de difusão em eritrócitos apresentou resultados diferentes, pois a quantidade de células em apoptose foi maior em G2 no inverno, sendo que este ponto apresentou o valor mais baixo de danos no ensaio cometa. A presença de xenobióticos com atividade citotóxica pode ser observada através do ensaio de difusão do DNA. Observamos que principalmente em G2 os xenobióticos apresentaram mais atividade citotóxica do que genotóxica. Enquanto que em P2 os xenobióticos apresentaram mais atividade genotóxica. A utilização das duas técnicas em conjunto aumenta a confiabilidade da análise, visto que através do ensaio cometa não é possível computar as células em apoptose, o que é realizado pelo ensaio de difusão (COLLINS *et al.* 2008; SINGH, 2000). Quando o ensaio cometa foi aplicado em hepatócitos observamos que as amostragens no verão apresentaram mais danos do que as de inverno. Este fato pode estar relacionado a metabolização mais rápida de xenobióticos no fígado em temperaturas altas como as observadas no verão (KLEINOW *et al.*, 1987). Esses resultados foram corroborados pelo ensaio de difusão em hepatócitos, com valores mais altos para os dois testes nos mesmos pontos, como já foi observado em outros trabalhos (FRENZILLI *et al.*, 2004; NIGRO *et al.*, 2002; ROCCO *et al.*, 2010).

Apesar de não haver diferença entre as amostragens através do índice de lesão histopatológico, observamos muitas alterações como necrose, a presença de parasitas e a vacuolização de hepatócitos não correlacionadas a

depósitos de glicogênio. Por exemplo, a necrose e a vacuolização apresentaram frequência de 100% nos peixes coletados em Guaratuba no verão. A necrose é uma alteração irreversível causada pela exposição a xenobióticos, provoca inibição enzimática, alteração na membrana celular, perturbações da síntese de proteína e estresse oxidativo (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005). A vacuolização pode estar relacionada a presença de HPAs ou outros xenobióticos, que podem interferir com o tráfego de vesículas e como consequência a acumulação de produtos de secreção (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005; CARROLA *et al.*, 2009; FERNANDEZ *et al.*, 2011). A presença de parasitas está relacionada a susceptibilidade dos peixes a agente infecciosos, que pode ser causada pela ação de agentes exógenos no sistema imunológico (KHAN; THULIN, 1991). Observamos também a presença de infiltrações leucocitárias e centros de melanomacrófagos algumas amostragens, que foram relacionadas a presença de xenobióticos em diversos trabalhos (BEM AMEUR *et al.* 2012; MIRANDA *et al.*, 2008; RABITTO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2009).

Esta espécie se mostrou adequada quando utilizada como biomonitor de ambientes estuarinos. Tanto os peixes de Guaratuba quanto os de Paranaguá apresentaram respostas nos biomarcadores relacionadas à contaminação ambiental, demonstrando que ambos os estuários estão sendo afetados por aportes diferentes de xenobióticos, como foi observado por Kolm *et al.*, (2002) e Patchineelam *et al.* (2011)

5.6 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos para os biomarcadores, tanto a baía de Guaratuba quanto a de Paranaguá são impactadas pela presença de xenobióticos e dessa forma afetando a saúde dos peixes da espécie *Atherinella brasiliensis*. Os biomarcadores demonstraram também que o aporte de xenobióticos nestes locais apresenta fontes diferentes, possivelmente sendo relacionada com as plantações ao redor da baía em Guaratuba e as atividades relacionadas ao porto e a cidade na baía de Paranaguá. É importante ressaltar que ambas as regiões são influenciadas por descargas de esgoto doméstico provenientes das cidades próximas.

Finalizando, os autores também sugerem que a espécie *A. brasiliensis* é um biomonitor adequado por demonstrar respostas variadas e correlacionadas aos diferentes biomarcadores utilizados, além de ser uma espécie residente tendo todo o seu ciclo de vida no mesmo local nas baías. Portanto a espécie de peixe *A. brasiliensis* pode ser considerado uma espécie sentinela para futuros biomonitoramentos ambientais.

6 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os dados obtidos para os biomarcadores, tanto a baía de Guaratuba quanto a de Paranaguá são impactadas pela presença de xenobióticos e dessa forma afetando a saúde dos peixes da espécie *Cathorops spixii* e *Atherinella brasiliensis*.

Os biomarcadores demonstraram também que o aporte de xenobióticos nestes locais apresenta fontes diferentes, sendo possivelmente as plantações ao redor da baía em Guaratuba e as atividades relacionadas ao porto e a cidade na baía de Paranaguá. É importante ressaltar que ambas as regiões são influenciadas por descargas de esgoto doméstico provenientes das cidades próximas.

A contaminação por metais também foi evidenciada, sendo o As mais encontrado em Guaratuba e Paranaguá. Observamos também que estas contaminações (que podem ter origem natural e antrópica) podem estar relacionadas a alterações na saúde dos peixes das baías.

A relação entre a sazonalidade e as respostas do biomarcadores também foi avaliada, com os pontos mais internos das baías apresentando maiores variações nas respostas dos biomarcadores, mostrando que os fatores naturais interferem nas respostas observadas.

Finalizando, os autores também sugerem que as espécies *Cathorops spixii* e *Atherinella brasiliensis* são bioindicadores adequados quando utilizamos a abordagem de biomarcadores, podendo ser indicadas para futuros programas de monitoramento, corroborando dados obtidos por outros autores.

7 REFERÊNCIAS

AARAB, N.; PAMPANIN, D M; NAEVDAL, A. et al. Histopathology alterations and histochemistry measurements in mussel, *Mytilus edulis* collected offshore from an aluminium smelter industry (Norway). **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, n. 6-12, p. 569-74, 2008.

ADAMS, H. R. Drogas que atuam sobre os sistemas nervosos somático e autonômico. In: **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. BOOTH N. H.; MCDONALD, L.E. (eds). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992.

AKAISHI, F. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; JAKOBI, S. C. G.; EIRAS-STOFELLA, D. R.; ST-JEAN, S. D.; COURTENAY, S. C.; LIMA, E. F.; WAGENER, A. L.R.; SCOFIELD, A. L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (wsf) of crude oil. **Archives of Environmental and Toxicology**, v. 46, p. 244–253, 2004.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 343, n. 2-3, p. 121-35, 1995.

ALBERTO, A.; CAMARGO, A. F. M.; VERANI, J. R.; COSTA, O. F. T.; FERNANDES, M. N. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 61, n. 2, p. 247-55, 2005.

ALMLI, B. EGAAS, E.; LODE, O. Effects of three fungicides alone and in combination on glutathione S-transferase activity (GST) and cytochrome P-450 (CYP1A1) in the liver and gill of brown trout (*Salmo trutta*). **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3-5, p. 237-240, 2002.

AMADO, L. L.; ROBALDO, R. B.; GERACITANO, L.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). **Marine pollution bulletin**, v. 52, n. 2, p. 207-13, 2006.

AMADO, L. L.; ROSA, C. E. DA; LEITE, A. M. et al. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei : Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. **Marine pollution bulletin**, v. 52, p. 199-206, 2006.

ANDERSSON, T.; FÖRLIN, L. Regulation of cytochrome P450 enzyme system in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 24, p. 1-20, 1992.

BEN AMEUR, W.; DE LAPUENTE, J.; EL MEGDICHE, Y. et al. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil*

- cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). **Marine pollution bulletin**, v. 64, n. 2, p. 241-51, 2012.
- ANDREATA, J. V.; BARBIERI, L. R. R.; SEBILIA, A. S. C. et al. Relação dos peixes da laguna de Marapendi, Rio de Janeiro, Brasil. **Atlantica Rio Grande**, v. 12, n. 1, p. 5-17, 1990.
- ANDREATA, J. V.; MARCA, A. G.; SOARES, C. L.; SANTOS, R. DA S. Distribuição mensal dos peixes mais representativos da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 14, n. 1, p. 121-134, 1997.
- AOYAMA, K.; IWAHORI, K.; MIYATA, N. Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 538, n. 1-2, p. 155-162, 2003.
- APPA, **Administração dos Portos de Paranaguá e Antonina**. Disponível em: <<http://www.portosdoparana.pr.gov.br>>. Acesso em: 07/02/2013.
- ARAÚJO, F. G. Distribuição, abundância relativa e movimentos sazonais de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) no estuário da Lagoa dos Patos (RS), Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 5, n. 4, p. 509-543, 1988.
- AYLLÓN, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 49, n. 3, p. 221-5, 2001.
- AZEVEDO, J. DE S.; FERNANDEZ, W. S.; FARIAS, L. A.; FAVARO, D. T.; BRAGA, E. S. Use of *Cathorops spixii* as bioindicator of pollution of trace metals in the Santos Bay, Brazil. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 5, p. 577-86, 2009.
- AZEVEDO, J. DE S.; SERAFIM, A.; COMPANY, R. et al. Biomarkers of exposure to metal contamination and lipid peroxidation in the benthic fish *Cathorops spixii* from two estuaries in South America, Brazil. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 8, p. 1001-10, 2009.
- AZEVEDO, M. C. C. DE; ARAÚJO, F. G.; CRUZ-FILHO, A. G. DA; GOMES, I. D.; PESSANHA, A. L. M. Variação espacial e temporal de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) na baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 3, p. 443-454, 1999.
- BAGNYUKOVA, T. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 142, n. 3, p. 335-341, 2005.
- BARBIERI, L. R. R.; ANDREATA, J. V.; SANTOS, MARCOS A; et al. Distribuição e ciclo de vida das espécies de peixes mais abundantes da laguna

de Marapendi, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 7, n. 3, p. 223-243, 1990.

DEL BARGA, I.; FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V. et al. Effects of algal extracts (*Polysiphonia fucooides*) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a biomarker approach. **Marine environmental research**, v. 62 Suppl, p. S283-6, 2006.

BARLETTA, M.; AMARAL, C. S.; CORRÊA, M. F. M. et al. Factors affecting seasonal variations in demersal fish assemblages at an ecocline in a tropical – subtropical estuary. **Journal of Fish Biology**, v. 73, p. 1314-1336, 2008.

BARLETTA, M.; BLABER, S. J. M. Comparison of fish assemblages and guilds in tropical habitats of the Embley (Indo-West Pacific) and Caete (Western Atlantic) estuaries. **Bulletin of Marine Science**, v. 80, n. 3, p. 647-680, 2007.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123. 2006.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 415, n. 3, p. 167-84, 1998.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; WAHLI, T.; BURKHARDT-HOLM, P. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25-34, 1999.

BERVIAN, G.; FONTOURA, N. F. Growth of the Silverside *Atherinella brasiliensis* in Tramandaí Estuary, Southern Brazil (Actinopterygii: Atherinopsidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 4, p. 485-490, 2007.

BEYER, J.; SANDVIK, M.; SKAARE, J. U.; EGAAS, E.; HYLLAND, K.; WAAGBØ, R.; GOKSØYR, A. Time and dose-dependent biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) exposed to benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium. **Biomarkers**, v. 2, p. 35-44, 1997.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 826-33, 2011.

BOCHLERT, G. W.; MUNDY, B. C. Roles of Behavioral and Physical Factors in Larval and Juvenile Fish Recruitment to Estuarine Nursery Areas. **American Fisheries Society Symposium**, v. 3, p. 51-67, 1988.

BOLDRINI, C. V.; NAVAS-PEREIRA, D. N. Metais pesados na baía de Santos e estuário de Santos e São Vicente. **Ambiente** v. 1, n. 3, p. 118-127, 1987.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205-213, 2011.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, DANIELA M; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 78 Suppl 1, p. S93-8, 2006.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 383-392, 2001.

BORDIGNON, M. O. Diet of the fishing bat *Noctilio leporinus* (Linnaeus) (Mammalia, Chiroptera) in a mangrove area of southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 1, p. 256-260, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, DECRETO 55.871 de 26 de março de 1965. Dispõe sobre normas regulamentadoras do emprego de aditivos para alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 9 abr. 1965, Sç. 1.

BRESLER, V.; ABELSON, A.; DIZER, H. et al. Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. **Helgoland Marine Research**, v. 53, n. 3-4, p. 219-243, 1999.

BUCHELI, T. B.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Sciences and Technology**, 5: 201-268, 1995.

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

BUSCHINI, A.; CARBONI, P.; MARTINO, A.; POLI, P.; ROSSI, C. Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 537, n. 1, p. 81-92, 2003.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990. NRC Research Press Ottawa, Canada.

CARROLA, J.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; MATOS, P.; ROCHA, E. Liver histopathology in brown trout (*Salmo trutta f. fario*) from the Tinhela River,

subjected to mine drainage from the abandoned Jales Mine (Portugal). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 83, n. 1, p. 35-41, 2009.

CASTAÑO, A.; CARBONELLI, G.; CARBALLO, M.; FERNANDEZ, C.; BOLEAS, S.; TARAZONA, J.V. Sublethal effects of repeated intraperitoneal cadmium injections on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicol. Environ. Safe**, v. 41, p. 29-35, 1998.

CASTELLO, B. DE F. L. **Avaliação dos teores de As, Cu, Cd, Ni e Zn em ostras, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), nas baías de Paranaguá e Guaratuba, Paraná**, 2010. Univerisdade Federal do Paraná.

ÇAVALO, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 569-574, 2005.

CHOUERI, R. B.; CESAR, A.; TORRES, R. J. et al. Integrated sediment quality assessment in Paranaguá Estuarine System, Southern Brazil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 7, p. 1824-31, 2009. Elsevier.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: B. A. Markert; A. M. Breure; H. G. Zechmeister (Eds.); **Bioindicators and biomonitoring**. p.639-676, 2003. Amsterdam: Elsevier Science Ltd.

CIPRIANO, R. R. **Estudos citogenéticos em teleósteos marinhos pertencentes a baía de Paranaguá - Paraná, Brasil**, 2005. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CLARK, R. B.; FRID, C.; ATTRILL, M. **Marine pollution, Fourth edition**. Clarendon Press, 1997.

CLEMENTE, Z.; BUSATO, R. H.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. et al. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 396-406, 2010.

COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. **Molecular Biotechnology**, v. 26, 2004.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-51, 2008.

CONTARDO-JARA, V.; KLINGELMANN, E.; WIEGAND, C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 57-63, 2009.

CONTENTE, R. F.; STEFANONI, M. F.; SPACH, H. L. Feeding ecology of the Brazilian silverside *Atherinella brasiliensis* (Atherinopsidae) in a sub-tropical

estuarine ecosystem. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 91, n. 06, p. 1197-1205, 2010.

CORREIA, T. G.; MARANHO, A.; GONÇALO, C. G. et al. Naphthalene effect on kingfish (*Atherinella brasiliensis*) metabolic rate. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, p. S74, 2007.

CORRÊA, M. F. M. **Ictiofauna demersal da baía de Guaraqueçaba (Paraná, Brasil). Composição, estrutura, distribuição espacial, variabilidade temporal e importância como recurso**, 2001. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; DE GROOT, R. et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 253-260, 1997.

COTELLE, S.; FÉRARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, n. 4, p. 246-55, 1999.

CREPEAU, K. L.; KUIVILA, K. M. Rice Pesticide Concentrations in the Colusa Basin Drain and the Sacramento River, California, 1990–1993. **Journal of Environment Quality**, v. 29, n. 3, p. 926, 2000. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.

DANG, F.; WANG, W.-X. Why mercury concentration increases with fish size? Biokinetic explanation. **Environmental pollution**, v. 163, p. 192-8, 2012.

DEPLEDGE, M. H. Genetic ecotoxicology : an overview. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 200, p. 57-66, 1996.

DIAS, JUNE FERRAZ; FERNANDEZ, W. S.; BOUFLEUR, L. A. et al. Biomonitoring study of seasonal anthropogenic influence at the Itamambuca beach (SP, Brazil). **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B**, v. 267, n. 11, p. 1960-1964, 2009. Elsevier B.V.

DIXON, D. P.; LAPTHORN, A. Plant glutathione transferases. **Genome Biol.** v. 3, p. 1-10, 2002.

DOMINGOS, F. X. V.; ASSIS, H. C. DA S. DE; SILVA, M. D. et al. Anthropropic Impact Evaluation of Two Brazilian Estuaries Trough Biomarkers in Fish. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 4, n. 1-3, p. 21-30, 2009.

DOMINGOS, F. X. V.; AZEVEDO, M.; SILVA, M. D. et al. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. **Environmental research**, v. 105, n. 3, p. 350-63, 2007.

DURIEUX, E. D. H.; FARVER, T. B.; FITZGERALD, P. S.; EDER, K. J.; OSTRACH, D. J. Natural factors to consider when using acetylcholinesterase

activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 21-9, 2011.

DYER, B. S. Family Atherinopsidae (Neotropical Silversides). Em: **Check List of the Freshwaters Fishes of South and Central America**, 1 ed, pp. 515–525. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

VAN DYK, J. C.; COCHRANE, M. J.; WAGENAAR, G. M. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. **Chemosphere**, v. 87, n. 4, p. 301-11, 2012.

ELLMAN, G. L.; COUTNEY, K. O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FARIAS, L. A.; AZEVEDO, J.; FÁVARO, D. I. T.; SARAIVA E. S. B. G. Evaluation of mercury, selenium and methylmercury in fish consumed by Santos Bay Communities, São Paulo, Brasil. **Anais do Encontro Nacional de Aplicações Nucleares—VII ENAN**, vol 1., p 1-9, 2005.

FAVARO, L. F.; FREHSE, F. D. A.; OLIVEIRA, R. N. DE; SCHWARZ-JUNIOR, R. Reprodução do bagre amarelo, *Cathrorops spixii* (Agassiz) (Siluriformes, Ariidae), da Baía de Pinheiros, região estuarina do litoral do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 4, p. 1022-1029, 2005.

FAVARO, L. F.; OLIVEIRA, E. C. DE; VERANI, N. F. Estrutura da população e aspectos reprodutivos do peixe-rei *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard) (Atheriniformes, Atherinopsidae) em áreas rasas do complexo estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 4, p. 1150-1156, 2007.

FERNANDEZ, W. S.; DIAS, JUNE FERRAZ; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; AZEVEDO, J. D. S. Liver damages and nuclear abnormalities in erythrocytes of *Atherinella brasiliensis* (ACTYNOPTERIGII, ATHERINOPSIDAE) from two beaches in southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 59, n. 2, p. 163-169, 2011.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C.; KINDL, H.; KÜHN, H. Lipoxygenase catalysed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination of cucumber. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 11849-11853, 1995.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil II. Teleostei (1)., 1978. São Paulo: Museu de Zoologia, USP.

- FRENZILLI, G.; FALLENI, A.; SCARCELLI, V. et al. Cellular responses in the cyprinid *Leuciscus cephalus* from a contaminated freshwater ecosystem. **Aquatic Toxicology**, v. 89, n. 3, p. 188-96, 2008.
- FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I. et al. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 552, n. 1-2, p. 187-95, 2004.
- GEORGE, S. G. Cadmium effects on plaice liver xenobiotic and metal detoxication systems: dose response. **Aquat. Toxicol.**, v. 15, p. 303-310, 1989.
- GEORGE, S. G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic – conjugating enzymes in fish. In: **Aquatic Toxicology**. MALINS, C. D.; OSTRANDER, G. R. (Eds) Boca Ranton, London, 1993.
- GEORGE, S. G.; YOUNG, P. The time course of effects of cadmium and 3-methylcholanthrene on activities of enzymes of xenobiotic metabolism and metallothionein levels in the plaice, *Pleuronectus platessa*. **Comparative Biochemistry and Physiology C.**, v 83, p. 37-44, 1986.
- GESTEL, C. A. M.; BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 217-225, 1996. Springer Netherlands.
- GHISI, N. DE C.; RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M. et al. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, p. 589-599, 2011.
- GICHNER, T.; MUKHERJEE, A.; WAGNER, E. D.; PLEWA, M. J. Evaluation of the nuclear DNA Diffusion Assay to detect apoptosis and necrosis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 586, n. 1, p. 38-46, 2005.
- GODOY, J. M.; PADOVANI, C. R.; GUIMARÃES, J. R. D. et al. Evaluation of the Siltation of River Taquari, Pantanal, Brazil, through ²¹⁰Pb Geochronology of Floodplain Lake Sediments. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 1, p. 71-77, 2002.
- GOKSOYR, A.; FORLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquatic Toxicology**, v. 22, p. 287-312, 1992.
- GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 518, p. 145-150, 2002.

GUCHELAAR, H. J.; VERMES, A.; VERMES, I.; HAANEN, C. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. **Pharmacy world & science : PWS**, v. 19, n. 3, p. 119-25, 1997.

GUILHERME, S.; VÁLEGA, M.; PEREIRA, M. E.; SANTOS, M A; PACHECO, M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 70, p. 411-421, 2008.

HAMED, R. R.; FARID, N. M.; ELOWA, S. E.; ABDALLA, A.-M. Glutathione Related Enzyme Levels of Freshwater Fish as Bioindicators of Pollution. **The Environmentalist**, v. 23, n. 4, p. 313-322, 2003.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K. et al. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2, p. 125-33, 1998.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, n. 2, p. 187-190, 1973.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M. et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 277-91, 1991.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELAN, R.A. & OKIHIRO, M.S. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histopathological markers of antropogenic stress**. Lewis Publishers, p. 155-208, 1992.

HOGSTRAND, C.; HAUX, C. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 100, p. 137-141, 1991.

HOOFTMAN, R. N.; DE RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation research**, v. 104, n. 1-3, p. 147-52, 1982.

HOSE, J. E.; CROSS, J. N.; SMITH, S. G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. **Marine Environmental Research**, v. 22, n. 3, p. 167-176, 1987.

HOSTIM-SILVA, M.; CLEZAR, L.; RIBEIRO G. C.; MACHADO C. Estrutura populacional de *Xenomelaniris brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) na Lagoa da Conceição, SC. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 38 ,n. 3, p. 949-960, 1995.

HUGGETT, R. J. et al. **Biomarkers: biochemical, physiological, and histological marker of antropogenic stress**. USA: Lewis Publishers, 1992.

IAP, INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ. Laudo técnico do acidente do navio Vicuña, ocorrido em Paranaguá no dia 15 de novembro de 2004
Environmental Institute of Paraná. Technical Report on the accident with the ship Vicuña, which occurred in Paranaguá on November 15, 2004. ,2005.

ISHIHARA, Y.; KAWAMI, T.; ISHIDA, A.; YAMAZAKI, T. Tributyltin induces oxidative stress and neuronal injury by inhibiting glutathione S-transferase in rat organotypic hippocampal slice cultures. **Neurochemistry international**, v. 60, n. 8, p. 782-90, 2012.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207-21, 2008.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384-389, 1992.

KATSUMITI, A.; DOMINGOS, F. X. V.; AZEVEDO, M. et al. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña oil spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 152, n. 1-4, p. 209-22, 2009.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KELLY, K. A.; HAVRILLA, C. M.; BRADY, T. C.; ABRAMO, K. H.; LEVIN, E. D. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 7, p. 375-384, 1998.

KENNISH, M. J. Environmental threats and environmental future of estuaries. **Environmental Conservation**, v. 29, n. 01, p. 78-107, 2002.

KHAN, R. A.; THULIN, J. Influence of pollution on parasites of aquatic animals. **Advances in parasitology**, v. 30, p. 201-38, 1991.

KLEINOW, K. M.; MELANCON, M. J.; LECH, J. J. Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. **Environmental health perspectives**, v. 71, p. 105-19, 1987.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA / GTZ, p. 289, 2004

KOJADINOVIC, J.; POTIER, M.; LE CORRE, M.; COSSON, R. P.; BUSTAMANTE, P. Bioaccumulation of trace elements in pelagic fish from the Western Indian Ocean. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 146, n. 2, p. 548-66, 2007.

KOLM, H. E.; SCHOENENBERGER, M. F.; PIEMONTE, M. D. R. et al. Spatial Variation of Bacteria in Surface Waters of Paranaguá and Antonina Bays, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 27-34, 2002.

KREPPEL, H.; LIU, J.; LIU, Y.; REICHL, F. X.; KLAASSEN, C. D. Zinc-induced arsenite tolerance in mice. **Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 32-7, 1994.

LACERDA, L. D. Evolution of mercury contamination in Brazil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 97, p. 247-255, 1997.

LANA, P. C., MARONE, E., LOPES, R. M., MACHADO, E. C. The subtropical estuarine complex of Paranaguá Bay, Brazil. **Ecological Studies**. 144: 131-145p, 2001.

LAUTERT, L. F.; SÁ, F.; MACHADO, E. DA C. et al. Diagnosis and Environmental Planning for Paranaguá - PR - Brazil. **Journal of Coastal Research**, v. Special Is, n. 39, p. 2004-2007, 2006.

LAWRENCE, A.; HEMINGWAY, K. **Effects of Pollution on Fish**. Blackwell ed. Oxford, 2003.

LEAVER, M. J.; SCOTT, K.; GEORGE, S. G. Cloning and characterization of the major hepatic glutathione S-transferase from a marine teleost flatfish, the plaice (*Pleuronectes platessa*), with structural similarities to plant, insect and mammalian Theta class isoenzymes. **Biochem. J.**, v. 292, n. 1, p. 189-195, 1993.

LIEBEZEIT, G.; BREPOHL, D.; RIZZI, J. et al. DDT in Biota of Paranaguá Bay, Southern Brazil: Recent Input and Rapid Degradation. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 220, n. 1-4, p. 181-188, 2011.

LINDE-ARIAS, A. R.; INÁCIO, A. F.; NOVO, L. A; DE ALBURQUERQUE, C.; MOREIRA, J. C. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. **Environmental pollution**, v. 156, n. 3, p. 974-9, 2008.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Ecological studies in tropical fish communities**. Cambridge University Press, 1987.

LU, G. H.; WANG, C.; ZHU, Z. The dose-response relationships for EROD and GST induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in *Carassius auratus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 2, p. 194-199, 2008.

MACKENZIE, E. L. Em: SMART, R.C., HODGSON, E. (Eds.), **Reactive Oxygen/Reactive Metabolites and Toxicity. Molecular and Biochemical Toxicology**. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 389-411, 2008.

MARANHO, L. A. **The use of biomarkers responses for the environmental quality assessment of two Brazilian estuaries - Santos and Paranaguá**, 2010. Univesidad de Cádiz.

MARCENIUK, A. P. Chave para identificação das espécies de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) da costa brasileira. **B. Inst. Pesca**, v. 31, n. 2, p. 89 - 101, 2005.

MARIONNET, D.; DESCHAUX, P.; REYNAUD, S. Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). **Fish Shellfish Immunol.** v. 21, p. 80-91, 2006.

MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. **Bioindicators & Biomonitoring**. Amsterdam: Elsevier, 2003.

MARONE, E.; MACHADO, E. DA C.; LOPES, R. M.; SILVA, E. T. DA. Land-ocean fluxes in the Paranaguá Bay estuarine system, southern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 53, n. 3-4, p. 169-181, 2005.

MARTINEZ-TABCHE, L.; RAMÍREZ, B. M.; GERMÁN-FAZ, C.; DIAZ-PARDO, E. Acetylcholinesterase activity of the freshwater cladoceran, *Moina macrocopa*, used as an in vitro screening tool for water quality. **Aquat Ecos Health Managem**, v. 1, p. 317-322, 1998.

MARTINS, C. C.; BRAUN, J. A. F.; SEYFFERT, B. H.; MACHADO, E. DA C.; FILLMANN, G. Anthropogenic organic matter inputs indicated by sedimentary fecal steroids in a large South American tropical estuary (Paranaguá estuarine system, Brazil). **Marine pollution bulletin**, v. 60, n. 11, p. 2137-43, 2010.

MAYER, F. L.; VERSTEEG, D. J.; MCKEE, M. J.; FOLMAR, L. C.; GRANEY, R. L.; McCUME, D. C.; RATTNER, B. A. Physiological and nonspecific biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. cap. 4, p. 155 – 196.

MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. Biological markers of environmental contamination. In: MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. (Eds.), **Biomarkers of Environmental Contamination**. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 3–16, 1990.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 12, p. 1745-1750, 2000.

MELA, M.; RANDI, M. A. F.; VENTURA, D. F.; CARVALHO, C. V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Dietary and sub-chronic effects of methylmercury on neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 68, p. 426-435, 2007.

MIRANDA, A. L.; ROCHE, H.; RANDI, M. A. F.; MENEZES, M. L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: histopathological, physiological, and immunological findings. **Environment International**, v. 34, n. 7, p. 939-49, 2008.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2, p. 135-47, 1998

MIZERKOWSKI, B. D.; MACHADO, E. D. C.; BRANDINI, NILVA; NAZARIO, M. G.; BONFIM, K. V. Environmental water quality assessment in Guaratuba bay, state of Paraná, southern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 60, n. 2, p. 109-115, 2012.

MOCHIDA, K.; FUJI, K. Toxicity for aquatic organisms. In: ARAI, T.; HARINO, H.; OHJI, M.; LANGSTON, W. J. **Ecotoxicology of Antifouling Biocides**. Springer, 149-160, 2009.

MURANLI, F. D. G.; GÜNER, U. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Mutation Research**, v. 726, n. 2, p. 104-8, 2011

MYERS, M.S. & FOURNIE, J.W. Histopathological biomarkers as integrators of anthropogenic and environmental stressors. In: **Biological indicators of aquatic ecosystem stress** (Adams S.M.) American Fisheries Society, v. 24, p. 221-287, 2002.

NACCI, D. E.; CAYULA, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**, v. 35, p. 197-210, 1996.

NELSON, D. R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J. J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D. J.; WATERMAN, M. R.; GOTOH, O.; COON, M. J.; ESTABROOK, R. W.; GUNSALUS, I. C.; NEBERT, D. W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v. 6, n. 1, p. 1-42, 1996.

NIGRO, M.; FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; GORBI, S.; REGOLI, F. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. **Marine environmental research**, v. 54, n. 3-5, p. 517-20, 2002.

OLIVEIRA, A. C. M.; MUTO, E. Y. ; SOARES, L. S. H. Alimentação do bagre amarelo *Cathorops spixii* no litoral do estado de São Paulo: resultados preliminares. In: **II CONGRESSO BRASILEIRO DE OCEANOGRAFIA**, Vitória, 2005.

OLIVEIRA, C. P. M. S. **Efeito da silimarina e verapamil no modelo murino de isquemia e reperfusão hepática: citoproteção e redução do estresse oxidativo.** Tese de doutorado, São Paulo, 1999.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SCHATZMANN, M.; ASSIS, H. C. DA S. DE; et al. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, n. 3, p. 161-7, 2002.

OMURA, T.; SATO, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. **Journal of Biological Chemistry**, v. 239, p. 2370-2378, 1964.

OVERSTREET, R. M. Aquatic pollution problems, Southeastern U. S. coasts: histopathological indicators. **Aquatic Toxicology**, v. 11, p. 213 – 239, 1988.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

PACHECO, M.; SANTOS, M A; TELES, M. et al. Biotransformation and genotoxic biomarkers in mullet species (*Liza sp.*) from a contaminated coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 107, n. 1-3, p. 133-53, 2005.

PADRÓS, J.; PELLETIER, É.; RIBEIRO, C. O. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 192, n. 1, p. 45-55, 2003.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 345-356, 1995.

PARSONS, E. C. M. Trace element concentrations in whole fish from North Lantau waters , Hong Kong. **Journal of Marine Science**, v. 56, p. 791-794, 1999.

PATCHINEELAM, S. M.; SANDERS, C. J.; SMOAK, J. M. et al. A Historical Evaluation of Anthropogenic Impact in Coastal Ecosystems by Geochemical Signatures. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 22, n. 1, p. 120-125, 2011.

PATERSON, A. Do Shallow-water Habitats Function as Refugia for Juvenile Fishes? **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 51, n. 3, p. 359-364, 2000.

PAYNE, J. F.; FRANCEY, L.; RAHIMTULA, A.; PORTER, E. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 86: 233-245, 1987.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L. L. Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, p. 225-231, 1996.

PEAKALL, D. B. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. **Ecotoxicology**, v. 3, n. 3, p. 157-160, 1994.

PELLACANI, C.; BUSCHINI, A.; FURLINI, M.; POLI, P.; ROSSI, C. A battery of in vivo and in vitro tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 1, p. 1-10, 2006.

PESSANHA, A. L. M.; ARAÚJO, F. G. Recrutamento do peixe-rei, *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard) (Atheriniformes, Atherinopsidae), na margem continental da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 4, p. 1265-1274, 2001.

PIETZSCH, R.; PATCHINEELAM, S. R.; TORRES, J. P. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments from a subtropical estuary in Brazil. **Marine Chemistry**, v. 118, n. 1-2, p. 56-66, 2010. Elsevier B.V.

POLARD, T.; JEAN, S.; MERLINA, G. et al. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 144-9, 2011.

PROVOST, G. S.; KRETZ, P. L.; HAMNER, R. T. et al. Transgenic systems for in vivo mutation analysis. **Mutation Research**, v. 288, n. 1, p. 133-49, 1993.

RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; ASSIS, H. C. DA S. DE; et al. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, n. 2, p. 147-56, 2005.

RAMSDORF, W. A. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Canguiri - UFPR)**, 2007. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RAMSDORF, W. A.; GUIMARÃES, F. D. S. F.; FERRARO, M. V. M.; GABARDO, J.; TRINDADE, E. S.; CESTARI, M. M. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, n. 1, p. 78-81, 2009.

REIS, E. G. A pesca artesanal de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) no estuário da Lagoa dos Patos (RS), Brasil. **Periodico do Departamento de Oceanografia**, v. 5, p. 8-21, 1986.

- RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas- RS. Editora da ULBRA. 356 p., 2003.
- ROCCO, L.; FRENZILLI, G.; FUSCO, D.; PELUSO, C.; STINGO, V. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 7, p. 1530-6, 2010.
- RODRIGUES, S. K.; ABESSA, D. M. S.; MACHADO, E. C. Geochemical na Ecotoxicological Assessment for Estuarine Surface Sediments from Southern Brazil. **Marine Environmental Research**, *In press*. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.02.005.
- ROESIJADI, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 22, p.81-114, 1992.
- ROESIJADI, G.; ROBINSON, W. E. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. In: MALINS, D. C.; OSTRANDER, G. K. (Eds.) **Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. Lewis Publishers, CRC press, pp. 387-420, 1994.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v. 722, n. 1-2, p. 225-54, 1999.
- SANDERS, C. J.; SANTOS, I. R.; SILVA-FILHO, E. V; PATCHINEELAM, S. R. Mercury flux to estuarine sediments, derived from Pb-210 and Cs-137 geochronologies (Guaratuba Bay, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 9, p. 1085-9, 2006.
- SANDERS, C. J.; SANTOS, I. R.; SILVA-FILHO, E. V; PATCHINEELAM, S. R. Contrasting mercury and manganese deposition in a mangrove-dominated estuary (Guaratuba Bay, Brazil). **Geo-Marine Letters**, v. 28, n. 4, p. 239-244, 2008.
- SANTOS, D. M.; ARAÚJO, I. P.; MACHADO, E. DA C. et al. Organotin compounds in the Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil: evaluation of biological effects, surface sediment, and suspended particulate matter. **Marine pollution bulletin**, v. 58, n. 12, p. 1926-31, 2009.
- SASAKI, Y. F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E. et al. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 393, n. 1-2, p. 133-9, 1997.
- SASEKUMAR, A.; CHONG, V. C.; LEH, M. U.; D'CRUZ, R. Mangroves as a habitat for fish and prawns. **Hydrobiologia**, v. 247, n. 1-3, p. 195-207, 1992.
- SAYED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in

freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 2, p. 295-301, 2003.

SCHEWE, T.; RAPOPORT, S. M.; KÜHN, H. Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 58, p. 191-272, 1986.

SCHLENK, D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, p. 48-53, 1999.

SCHLENK, D. Biotransformation in Fishes. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. **The toxicology of fishes**. USA: CRC press, p.153-234, 2008

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SCHWAIGER, J. et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SCHWAIGER, J. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 8, p. 231 – 240, 2001.

SEARLE, J.; KERR, J. F.; BISHOP, C. J. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. **Pathology Annual**, v. 17 Pt 2, p. 229-59, 1982.

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental, 167-178. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcançe, 2003.

SILVA, C. A. DA; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; KATSUMITI, A. et al. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 2, p. 400-9, 2009.

SILVA DE ASSIS, H. C. **O uso de biomarcadores para avaliação de poluição aquática**. Tese de doutorado, Universidade Técnica de Berlim, Alemanha, 1998.

SINGH, N. P. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. **Experimental Cell Research**, v. 256, n. 1, p. 328-37, 2000.

SINGH, N. P. Apoptosis Assessment by the DNA Diffusion Assay. **Methods in Molecular Medicine**, v. 111, p. 55-67, 2005.

- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184-91, 1988.
- SINGH, N. P.; STEPHENS, R. E. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 383, n. 2, p. 167-75, 1997.
- SIROKÁ, Z.; DRASTICHOVÁ, J. Biochemical markers of aquatic environment contamination: Cytochrome P450 in fish. A review. **Acta Vet Brno**, v. 73, p. 123-132, 2004.
- SOLOMONS, W. & FORSTNER, U. **Metals in the Hydrocycle**. Berlin: Springer – Verlag, 349p., 1984.
- SOUZA-BASTOS, L. R.; FREIRE, C. A. Osmoregulation of the resident estuarine fish *Atherinella brasiliensis* was still affected by an oil spill (Vicuña tanker, Paranaguá Bay, Brazil), 7 months after the accident. **Science of The Total Environment**, v. 409, n. 7, p. 1229-34, 2011.
- SÁ, F.; MACHADO, E. DA C.; ANGULO, R. J.; VEIGA, F. A.; BRANDINI, N. Arsenic and Heavy metals in Sediments near Paranaguá Port , Southern Brazil. **Journal of Coastal Research**, v. Special Is, n. 39, p. 1066-1068, 2006.
- STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DIGIULIO, R. T.; FORLIN, L.; FOWLER, B. M.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of contamination exposure and effect, In HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. (Eds.), **Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 235, 1992.
- STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: MALINS, D. C.; OSTRANDER, G. K. (Eds.), **Aquatic toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. Lewis Publishers, CRC press, Boca Raton, pp. 87, 1994.
- STENESH, J. **Biochemistry**, Plenum Press, New York, 1998.
- STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H. C.; HANSEN, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**, v. 47, p. 1-10, 1999.
- THAYER, G. W.; COLBY, D. R.; HETTLER, W. F. Utilization of the red mangrove prop root habitat by fishes in south Florida. **Marine Ecology Progress Series**, v. 35, p. 25-38, 1987.

- TODESCHINI, M. L. **Dinâmica espacial e temporal das características físicas e químicas do Rio Cubatão e ordenação espacial da bacia hidrográfica**. Dissertação de Mestrado em Geologia Ambiental. Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná. 80p, 2004.
- TORTELLI, V.; COLARES, E. P.; ROBALDO, R. B. et al. Importance of cholinesterase kinetic parameters in environmental monitoring using estuarine fish. **Chemosphere**, v. 65, n. 4, p. 560-6, 2006.
- VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178-89, 2006.
- VAZZOLER, A. E. A. M.; SOARES, L. S. H.; CUNNINGHAM, P. T. M. Ictiofauna da Costa Brasileira in LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. Ed. USP. 534pp. 1999.
- VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic mollusks. **Marine Environment Research**, v. 44, p. 69–84, 1997.
- VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CERATTO, N.; PANFOLI, I. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. **Cell Molecular Biology**, v. 46, p. 407-417, 2000.
- VILLELA, I.V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H.C.; SILVEIRA, J.D. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.
- WAKABARA, Y.; FLYNN, M. N.; TARARAM, A. S. Ingestion and selection of suprabenthic crustaceans by small-sized fishes in a lower saltmarsh system. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 44, n. 2, p. 89-103, 1996.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Introdução de Agentes Químicos no Ambiente. **Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações**. Rima ed., 2006. São Carlos.
- ZANETTE, J.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 143, n. 2, p. 187-95, 2006.