

JOCIELI MASCHIO

**USO DE BIOMARCADORES QUÍMICOS E MORFOLÓGICOS NO ESTUDO  
DE BIODISPONIBILIDADE E EFEITO TÓXICO DE HIDROCARBONETOS EM  
*Astyanax* sp. E *Salvelinus alpinus*.**

Monografia apresentada ao  
Departamento de Biologia  
Celular, para obtenção do  
título de bacharel em Ciências  
Biológicas, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ciro  
Alberto Oliveira Ribeiro.

CURITIBA

2006

## AGRADECIMENTOS

*Foram muitos os que contribuíram para minha formação ao longo desses quatro anos de universidade. Agora no final do curso de Ciências Biológicas, este trabalho marca o fim de um estágio da minha vida acadêmica.*

*Agradeço em primeiro lugar a minha mãe Vera e ao meu pai Neuri, pois, graças aos seus esforços tive a oportunidade de estudar e de chegar até aqui. Ao meu irmãozinho querido, Paulo, que me apoiou em muitos momentos.*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Ciro Ribeiro pela acolhida e confiança ao longo desses anos de trabalho em conjunto.*

*Ao Prof. Marco Randj, grande amigo, que me acolheu no início de meus trabalhos no labtoxcel. Aprendi muito contigo!*

*Às minhas queridas amigas, formadoras do “Quarteto Fantástico”, que me agüentam há quatro anos: Elaine Lopes, Jenifer Nowatzki e Makeli Lusa. Vocês foram minha família durante todo esse tempo. Passamos mais tempo juntas do que com as nossas mães. “Amo vocês meus amores!”*

*Aos colegas-amigos de laboratório que me auxiliaram e muito na realização de todos os meus trabalhos no labtoxcel. Destacando Sr. Alberto Katsumiti, um cara que está sempre pronto pra prestar ajuda quando necessário, apesar dos atrasos! Daniele Dietrich, uma grande amiga nas horas críticas e cômicas. Patrícia França, florzinha querida, adoro você! Chico, apesar das ameaças e ataques que tenho sofrido, muito obrigada pelo companheirismo e auxílio técnico. À Dr<sup>a</sup>. Fabíola Valdez e ao Ms. César Silva pelo auxílio com o material de estudo desse trabalho. E aos demais colegas do laboratório: Grazy, Malú, Ana, João, Inês, Daniel, Maritana... e àquelas que não pertencem mais ao laboratório mas continuam em nossos corações: Paty-Lapa, Michelle, Elaine (novamente), etc..*

*À professora Helena do Departamento de Farmacologia pelo empréstimo de seu laboratório e de aparelhos para as análises. Ao Departamento de Bioquímica pelo empréstimo do espectrofluorímetro. À professora Helene pelo auxílio no tratamento dos dados.*

*À professora Lucélia e ao doutorando Francisco (Chico) por terem aceitado o convite para a banca deste trabalho.*

*E aos demais amigos que estiveram presentes de uma ou de outra forma, Diego, Reginaldo, Jú, Rô...*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS-----	vi
LISTA DE GRÁFICOS-----	vii
LISTA DE TABELAS-----	viii
LISTA DE SIGLAS-----	viii
RESUMO-----	ix
<b>1. INTRODUÇÃO-----</b>	<b>1</b>
1.1. O PETRÓLEO-----	1
1.2. ACIDENTES COM DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO-----	2
1.3. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA's)-----	3
1.4. BIOINDICADORES E BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL-----	5
1.5. ICTIOFAUNA COMO INDICADORES DE QUALIDADE AMBIENTAL-----	6
1.6. BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS -----	6
1.6.1. BRÂNQUIAS COMO ÓRGÃO ALVO E SUA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL---	7
1.6.2. FÍGADO COMO ÓRGÃO ALVO E SUA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL-----	8
1.7. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS – DETECÇÃO DE METABÓLITOS DE HPA's EM BILE-----	8
1.8. CARACTERIZAÇÃO DO ACIDENTE NA REFINARIA GETÚLIO VARGAS-PR----	9
<b>2. OBJETIVOS-----</b>	<b>10</b>
2.1. OBJETIVOS GERAIS-----	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	10
<b>3. METODOLOGIA-----</b>	<b>11</b>
3.1. BIODISPONIBILIDADE DE HPA'S-----	11
3.1.1. ÁREA DE ESTUDO-----	11
3.1.2. MODELO BIOLÓGICO-----	11
3.1.3. COLETAS-----	12
3.2. BIOMARCADOR QUÍMICO-----	12
3.2.1. “DESIGN” EXPERIMENTAL DA AVALIAÇÃO QUÍMICA EM BILE DE <i>Astyanax</i> sp.--	12
3.2.2. DETECÇÃO DE METABÓLITOS DE HPA'S EM BILE-----	14
3.2.3. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NA BILE-----	14
3.3. EFEITO DA FRAÇÃO SOLUVEL DO PETRÓLEO (FSA) EM <i>Salvelinus alpinus</i> -	15
3.3.1. MODELO BIOLÓGICO -----	15
3.4. BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS-----	15
3.4.1. “DESIGN” EXPERIMENTAL DOS EFEITOS AGUDOS DA FSA EM <i>S. alpinus</i> -----	15
3.4.2. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA EM FÍGADO E BRÂNQUIAS-----	16
<b>4. RESULTADOS-----</b>	<b>17</b>
4.1. HIDROCARBONETOS EM BILE-----	17
4.1.1. HIDROCARBONETOS TOTAIS E HPA'S NA BILE-----	17
4.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA-----	25

4.2.1. HISTOPATOLOGIA DAS BRÂNQUIAS-----	25
4.2.2. HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO-----	26
<b>5. DISCUSSÃO-----</b>	<b>35</b>
<b>6. CONCLUSÕES-----</b>	<b>44</b>
<b>7. REFERÊNCIAS-----</b>	<b>45</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - <i>Astyanax</i> sp.-----	11
FIGURA 02 – MAPA DE LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.-----	13
FIGURA 03 - <i>Salvelinus alpinus</i> -----	15
FIGURA 04 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM BRÂNQUIAS DE <i>Salvelinus alpinus</i> – GRUPO CONTROLE-----	30
FIGURA 05 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM BRÂNQUIAS DE <i>Salvelinus alpinus</i> – GRUPO EXPOSTO À FRAÇÃO SOLÚVEL DE PETRÓLEO (FSA).-----	31
FIGURA 06 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM FÍGADO DE <i>Salvelinus alpinus</i> – GRUPO CONTROLE-----	32
FIGURA 07 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM FÍGADO DE <i>Salvelinus alpinus</i> – GRUPO EXPOSTO A FSA – 96h.-----	33
FIGURA 08 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM FÍGADO DE <i>Salvelinus alpinus</i> – GRUPO EXPOSTO A FSA. SEGUIDO DE DEPURAÇÃO-----	34

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01 - AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE HPA's EM AMOSTRAS DE BILE DE <i>Astyanax</i> sp. EXPOSTOS À ÁGUA DO ARROIO SALDANHA.....	18
GRÁFICO 02 - MÉDIA ARITMÉTICA DOS VALORES DOS POOLS DE BILE DE CADA VARIÁVEL EXPERIMENTAL ENVOLVENDO A ÁGUA DO ARROIO SALDANHA.....	18
GRÁFICO 03 - AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE HPA's EM AMOSTRAS DE BILE DE <i>Astyanax</i> sp. EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO BARIGUI A MONTANTE DO ACIDENTE.....	19
GRÁFICO 04 - MÉDIA ARITMÉTICA DOS VALORES DOS POOLS DE BILE DE CADA VARIÁVEL EXPERIMENTAL ENVOLVENDO A ÁGUA DO RIO BARIGUI, A MONTANTE DO ACIDENTE.....	19
GRÁFICO 05 - AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE HPA's EM AMOSTRAS DE BILE DE <i>Astyanax</i> sp. EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO BARIGUI A JUSANTE DO ACIDENTE.....	20
GRÁFICO 06 - MÉDIA ARITMÉTICA DOS VALORES DOS POOLS DE BILE DE CADA VARIÁVEL EXPERIMENTAL ENVOLVENDO A ÁGUA DO RIO BARIGUI, A JUSANTE DO ACIDENTE.....	20
GRÁFICO 07 - AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE HPA's EM AMOSTRAS DE BILE DE <i>Astyanax</i> sp. UTILIZADOS COMO CONTROLE .....	21
GRÁFICO 08 - HICROCARBONETOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE BILE DE <i>Astyanax</i> sp. EXPOSTOS À ÁGUA DO ARROIO SALDANHA.....	22
GRÁFICO 09 - HICROCARBONETOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE BILE DE <i>Astyanax</i> sp. EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO BARIGUI À MONTANTE DO ACIDENTE.....	23
GRÁFICO 10 - HICROCARBONETOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE BILE DE <i>Astyanax</i> sp. EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO BARIGUI À JUSANTE DO ACIDENTE.....	23
GRÁFICO 11 - HICROCARBONETOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE BILE DE <i>Astyanax</i> sp. UTILIZADOS COMO CONTROLE.....	24
GRÁFICO 12 - HICROCARBONETOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE BILE DE <i>Astyanax</i> sp. EXPOSTOS A TODAS AS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS.....	24
GRÁFICO 13 - MÉDIA DOS VALORES DE HIDROCARBONETOS TOTAIS DAS AMOSTRAS DE BILE DE <i>Astyanax</i> sp. EXPOSTOS A TODAS AS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS.....	25
GRÁFICO 14 - OCORRÊNCIA DE ALTERAÇÕES TECIDUAIS NAS BRÂNQUIAS DE <i>Salvelinus alpinus</i> APÓS EXPOSIÇÃO A FSA, EXPRESSAS EM PORCENTAGEM.....	26
GRÁFICO 15 - OCORRÊNCIA DE ALTERAÇÕES TECIDUAIS NO FÍGADO DE <i>Salvelinus alpinus</i> APÓS EXPOSIÇÃO A FSA, EXPRESSAS EM PORCENTAGEM.....	28

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 01** - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OBSERVADAS NAS BRÂNQUIAS DE *Salvelinus alpinus*, CONTROLES E EXPOSTOS A FSA.-----27

**TABELA 02** - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OBSERVADAS NO FÍGADO DE *Salvelinus alpinus*, CONTROLES E EXPOSTOS A FSA.-----29

## LISTA DE SIGLAS

FSA – Fração Solúvel do Petróleo em Água.

FF – Fluorescência Fixa.

HPA – Hidrocarboneto Policíclico Aromático

UV – Radiação Ultravioleta.

H&E –Hematoxilina de Harris e Eosina.

## RESUMO

Os ambientes aquáticos são receptáculos de vários poluentes gerados pela atividade humana, sendo este um dos ecossistemas que mais sofre com os impactos causados pelo homem. Os freqüentes acidentes envolvendo derramamentos de petróleo contribuem ainda mais para a degradação do ambiente. A fração solúvel do petróleo em água (FSA) causa impactos aos organismos aquáticos, sendo considerado como um importante determinante de toxicidade do petróleo e de seus óleos derivados. Algumas moléculas de HPA's presentes na FSA possuem um potencial carcinogênico e mutagênico, trazendo sérios riscos à saúde dos organismos expostos. No presente trabalho foi avaliada, através de análises espectrofluorimétricas, a biodisponibilidade desses HPA's na bile da espécie *Astyanax* sp. exposta à água coletada do Arroio Saldanha, local onde ocorreu o acidente com derramamento de 4 milhões de litros de óleo em 2000, e do Rio Barigui à montante e à jusante do acidente. Também neste estudo, análises histopatológicas em microscopia de campo claro foram realizadas em fígado e em brânquias de *Salvelinus alpinus* expostos à FSA através de bioensaios para detecção dos efeitos agudos do petróleo. Verificou-se que os três pontos de coleta de água analisados na exposição de *Astyanax* sp. apresentaram concentrações de HPA's, indicando que existem outras fontes de contaminação além dos efluentes lançados no momento do acidente. À jusante do vazamento os valores foram mais elevados, indicando um somatório da poluição já existente no Rio Barigui aos contaminantes provindos do acidente no Arroio Saldanha. Na avaliação histopatológica de *Salvelinus alpinus* encontraram-se lesões tanto no grupo controle quanto no grupo exposto, indicando que o lote de indivíduos utilizados sofreu algum tipo de estresse anterior ao experimento, dificultando a atribuição da ocorrência das alterações morfológicas à presença de FSA na água dos bioensaios.

Palavras-Chave: Petróleo; Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos; Arroio Saldanha; Bioensaios. *Salvelinus alpinus*; *Astyanax* sp.

## 1. INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos tornaram-se receptáculos de vários poluentes gerados pela atividade humana, sendo este um dos ecossistemas que mais sofre com os impactos causados pelo homem. Diversas substâncias xenobióticas como metais pesados, pesticidas, despejos clandestinos de esgoto, de produtos industriais e produtos derivados do petróleo arrolam-se como responsáveis por este problema. Os xenobióticos são compostos químicos estranhos aos sistemas biológicos podendo vir a apresentar grau de toxicidade aos organismos expostos.

Embora haja um esforço para minimizar os impactos causados pelo petróleo, o aumento da atividade petrolífera, os processos vigentes no beneficiamento do petróleo e a ocorrência de acidentes cada vez mais frequentes nos últimos anos em rios, lagos e oceanos, têm preocupado a comunidade científica no sentido de desenvolver metodologias mais eficientes de diagnóstico dos efeitos sobre o ambiente natural e dos conseqüentes riscos para a saúde da população.

### 1.1. O PETRÓLEO

A palavra “petróleo” deriva da junção do radical grego *petra* que significa rocha, com o radical latino *oleum* de significado óleo (PEDROZO *et al.*, 2002).

O petróleo é um combustível fóssil resultante da transformação e decomposição de matéria orgânica de origem animal e vegetal, acumulada ao longo de milhões de anos no fundo de mares, lagos e pântanos. Ao sofrerem pressões ocasionadas pelos movimentos da crosta terrestre formaram a mistura oleosa conhecida como petróleo (PEDROZO *et al.*, 2002).

O uso comercial do petróleo iniciou no século XVIII com a indústria farmacêutica e na iluminação (PEDROZO *et al.*, 2002). A partir desse momento seu uso como fonte de energia foi sendo ampliado com a invenção e desenvolvimento de motores a gasolina e a diesel. Nos dias atuais, vários outros produtos são fabricados a partir do petróleo como plásticos, tintas, adesivos, corantes, solventes, etc..

O petróleo, assim como seus óleos derivados, são misturas complexas de hidrocarbonetos e compostos orgânicos contendo os elementos enxofre, nitrogênio e oxigênio, além de baixas concentrações de compostos orgânicos metálicos, principalmente, níquel e vanádio. Essa mistura é constituída por cerca de 75% de hidrocarbonetos de cadeias curtas e longas (NEFF, 1978), sendo que a solubilidade do óleo na água tende a diminuir com o aumento no tamanho da molécula do

hidrocarboneto. As moléculas aromáticas e não ramificadas são mais hidrossolúveis do que compostos alifáticos e ramificados (PEDROZO *et al.*, 2002).

## 1.2. ACIDENTES COM DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO

A liberação do petróleo e de seus produtos para o meio ambiente pode ocorrer através de acidentes durante a carga, descarga, transporte ou produção de subprodutos. A compreensão do comportamento dos diferentes componentes do petróleo na água, assim como no solo e no ar, é de fundamental importância na avaliação dos efeitos desses compostos à saúde da biota exposta (PEDROZO *et al.*, 2002). No Brasil, aconteceram alguns acidentes envolvendo derramamentos de petróleo nos últimos anos: Baía de Guanabara-RJ, 2000; Rio Iguaçu-PR, 2000; Plataforma de Campos-RJ, 2001 e Baía de Paranaguá-PR, 2004.

Após atingir o ambiente aquático, o petróleo passa por diferentes processos, como a evaporação, dissolução, oxidação, sedimentação, biodegradação e absorção pela biota (AKAISHI, 2003). Esses processos, em conjunto, determinam o destino destes produtos e os seus impactos sobre os ambientes naturais. No entanto, o processo de dissolução que ocorre logo após o contato com a água tem uma importância especial do ponto de vista toxicológico. Embora dependa da turbulência do corpo d'água, geralmente a quantidade de componentes do óleo dissolvidos na água é pequena. Porém, é essa fração solúvel em água (FSA) que causa os impactos aos organismos aquáticos, sendo considerado como um importante determinante de toxicidade do petróleo e de seus óleos derivados (SAEED & MUTAIRI, 1999). A dimensão do impacto gerado e a velocidade de cada um desses processos varia de acordo com as condições específicas de cada ambiente.

A velocidade com que o petróleo e seus derivados se espalham determina o seu efeito no ambiente. A dispersão da mancha gerada pelo derramamento pode ser influenciada por fatores como tensão superficial e viscosidade, por exemplo. Dessa forma, quanto maior a tensão superficial, menor a área de espalhamento. Em regiões de águas mais quentes, a temperatura elevada reduz a tensão superficial favorecendo o espalhamento da mancha de óleo. Quanto ao fator densidade, a maioria dos componentes do petróleo são menos densos que a água e, portanto, flutuam na superfície. Porém, com a evaporação das moléculas de baixa massa molecular, a densidade tende a aumentar e os compostos mais densos tendem a afundar e interagir com as rochas e o sedimento de fundo (USEPA, 1999).

A absorção da FSA pelos organismos aquáticos ocorre por um processo onde os xenobióticos atravessam a membrana das células e atingem a circulação. Os locais

de absorção mais intensa desses contaminantes são: trato gastrointestinal, vias respiratórias e epiderme (KLASSEN & WATKINS, 2001).

Segundo ANDERSON et al (1974) e MACKAY & SHIU (1976), as frações solúveis do petróleo são formadas por uma mistura complexa de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), fenóis e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre. Apesar desses compostos serem voláteis têm-se mostrado que organismos aquáticos como os peixes podem absorver rapidamente parte dessa fração solúvel, originando conseqüências adversas para a saúde da biota e, por sua vez, para o homem.

### 1.3. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA'S)

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA's) são compostos insaturados constituídos por átomos de carbono e hidrogênio, dispostos em diversas configurações moleculares e estruturais. A denominação aromática para tais moléculas tem por característica a presença de um ou mais anéis benzênicos em sua configuração. Cada anel benzênico é formado por grupos de seis moléculas de carbono-hidrogênio que estão dispostas em forma de um hexágono, unidas através de ligações duplas e simples de maneira alternada (PEDROZO *et al.*, 2002).

Os ambientes em que esses compostos orgânicos podem ser encontrados como contaminantes, incluem ar, água, solo, sedimento, fauna e flora (HURK *et al.*, 2006-a). A liberação de HPA's no ambiente tem sido reconhecida como um sério problema ambiental nas últimas décadas. Inúmeros biomarcadores têm sido desenvolvidos para medir a exposição e os potenciais efeitos tóxicos desses componentes na saúde da vida selvagem, principalmente, dos organismos aquáticos (HURK *et al.*, 2006-b), uma vez que se trata de substâncias lipofílicas e, portanto, possuem grande afinidade pelos tecidos animais.

Esses compostos podem ser provenientes de duas fontes distintas:

1) moléculas pirogênicas que são formadas durante a combustão incompleta e ineficiente da matéria orgânica.

2) moléculas de origem petrogênica que são componentes dos combustíveis fósseis, como o óleo e o carvão vegetal.

Os níveis de HPA's de origem petrogênica estão aumentando nos ambientes marinhos devido à exploração do óleo e seu transporte (HURK *et al.*, 2006-a). Essas moléculas por serem altamente hidrofóbicas são movidas rapidamente para os tecidos animais (MARSILI *et al.*, 1997), possuem também a tendência de associar-se com certa rapidez a partículas em suspensão na coluna d'água que são,

subseqüentemente, depositadas junto ao sedimento (INZUNZA, 2006). Sua solubilidade em meio aquoso é baixa e a excreção desses compostos por organismos contaminados ocorre através da urina e da bile. Alguns componentes necessitam ser metabolizados e se transformam em metabólitos solúveis em água (HURK *et al.*, 2006-a).

Algumas moléculas de HPA's têm mostrado grandes efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos nos organismos (HAUGLAND *et al.*, 2005; MARSILI *et al.*, 1997), outros apresentam efeito narcótico ou, ainda, quando combinados com radiação UV podem provocar um efeito fototóxico (HURK *et al.*, 2006-a). As principais moléculas de HPA's que possuem potencial tóxico são: Benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(b)fluoranteno, criseno e benzo(a)antraceno (MARSILI *et al.*, 1997).

Em invertebrados tem-se registrado que os HPA's são capazes de induzir danos celulares, presença de tumores, prejuízos na reprodução, redução das taxas de crescimento e desenvolvimento, e em casos de contaminação muito severa, a morte dos organismos (HSU & DENG, 1996). Além dos efeitos descritos, em peixes os HPA's, freqüentemente, estão associados às mutações, malformações, tumores e câncer (COLLIER *et al.* 1998), além de alterações fisiológicas e morfológicas nos rins e fígado, hiperplasia nas brânquias e erosão em nadadeiras (HSU & DENG, 1996).

Dados mostram que os hidrocarbonetos derivados do petróleo provocam danos estruturais nas lamelas respiratórias das brânquias (PRASAD, 1991), comprometendo as trocas gasosas do organismo com o meio e resultando em hipóxia, sendo essa a principal causa da morte acidental de peixes em massa. Além disso, foram identificadas lesões hiperplásicas em células mucosas e de cloreto nas brânquias de peixes expostos a HPA's (SPIES, *et al.*, 1996). No tecido hepático foram observadas necroses múltiplas e um variável número de macrófagos e linfócitos no fígado de organismos expostos em um derramamento de petróleo ocorrido no canal de Santa Bárbara (SPIES *et al.*, 1996).

Alguns dos compostos da fração solúvel do petróleo, como o benzo(a)pireno, são comprovadamente cancerígenos e, uma vez absorvido pelo organismo, atividades enzimas tratarão de metabolizar esse composto ou detoxificá-la. Todo esse processo pode levar, muitas vezes, à exaustão celular, tal como ao estresse oxidativo, comprometendo estruturas vitais das células, obtendo-se como resultado, em muitos casos, a morte celular por necrose. Outros efeitos prejudiciais à saúde dos organismos são: lesões cutâneas, deformidades no esqueleto e tumores (HAUGLAND *et al.*, 2005).

#### 1.4. BIOINDICADORES E BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

O uso de bioindicadores e biomarcadores na detecção de toxicidade em áreas impactadas e em bioensaios vem sendo amplamente utilizado nos últimos anos (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005). Bioindicadores são definidos como espécies capazes de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em altos níveis de organização biológica (ADAMS, 2002) apresentando características que favoreçam sua utilização na avaliação da saúde de um determinado ecossistema. Sendo assim, alguns fatores devem ser considerados na escolha da(s) espécie(s) indicadora(s) em estudos de biomonitoramento: (1) a espécie deve ser representativa da área de estudo; (2) deve possuir hábito, preferencialmente, sedentário constituindo, assim, populações não migratórias para que sua exposição aos contaminantes possa refletir as condições da região em estudo; (3) os organismos bioindicadores devem ser de fácil identificação e coleta em todas as estações do ano; (4) o tamanho do animal é um fator importante, pois deve possibilitar a obtenção de material biológico suficiente para garantir a realização das análises propostas no estudo e (5) o nível trófico da espécie a ser utilizada também deve ser avaliado, pois espécies que ocupam níveis tróficos superiores, geralmente, são mais representativas, uma vez que podem fornecer informações relacionadas aos processos de bioacumulação e biomagnificação.

Os biomarcadores são alterações biológicas a nível molecular, celular e fisiológico que expressam a exposição e o efeito tóxico causados pelos poluentes presentes no ambiente (WALKER *et al.*, 1996), apresentando grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (STEGEMAN *et al.*, 1992; BAINY, 1993). Essas respostas biológicas e ecológicas a um contaminante podem variar desde mudanças moleculares, onde a integridade genética e processos nucleares são envolvidos, até populacionais e de comunidades, onde as dinâmicas e estruturas de toda teia alimentar podem ser afetadas (ADAMS, 1990; SHUGART *et al.*, 1992).

A utilização de biomarcadores permite: (1) detectar precocemente a existência de contaminação por substâncias tóxicas biologicamente significativas, (2) identificar espécies ou populações em risco de contaminação, (3) avaliar a magnitude da contaminação e, o que é fundamental, (4) determinar o grau de severidade dos efeitos causados pelos contaminantes (STEGEMAN *et al.*, 1992).

### 1.5. ICTIOFAUNA COMO INDICADORES DE QUALIDADE AMBIENTAL

Muitos grupos de organismos têm sido sugeridos e usados como bioindicadores de alterações ambientais e ecológicas (KARR *et al.*, 1986). Entretanto, os peixes têm sido utilizados com sucesso como indicadores numa ampla variedade de habitat's aquáticos (WHITFIELD, 1996; SOTO-GALERA *et al.*, 1998), pois refletem o estado de saúde dos ecossistemas aquáticos em relação à presença de poluentes (CARAJAVILLE *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001).

Os peixes apresentam várias vantagens ao serem utilizados como bioindicadores, pois, estão presentes em praticamente todos os ecossistemas aquáticos, com exceção dos muito poluídos; existe informação disponível sobre o ciclo de vida e sobre as respostas ao ambiente para algumas espécies; são relativamente fáceis de se identificar; as comunidades de peixes geralmente incluem uma gama de espécies que representam diversos níveis tróficos; têm relativamente vida longa e por essa razão fornece um registro de longa duração do estresse ambiental; possuem muitas formas e guildas funcionais e deste modo cobrem todos os componentes do ecossistema aquático afetados pelas perturbações antropogênicas refletindo o estresse dentro de uma área bem como uma ampla avaliação da extensão dos seus efeitos.

### 1.6. BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

Técnicas morfológicas como a análise histopatológica em microscopia de luz e eletrônica, têm sido amplamente utilizadas em trabalhos de toxicologia, sendo reconhecidas como ferramentas de grande utilidade no estudo de efeitos agudos e crônicos de poluentes em teleósteos (AKAISHI *et al.*, 2004; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005). Essas técnicas permitem avaliar o efeito direto de alguns contaminantes em órgãos e tecidos alvos, da mesma forma que fornecem também dados importantes sobre o efeito da exposição a múltiplos contaminantes.

Através da histopatologia é possível revelar quais são os órgãos-alvo mais afetados e detectar a sensibilidade do organismo em relação aos níveis tóxicos dos contaminantes aos quais foram expostos (relação dose-resposta). Os efeitos na estrutura das células e tecidos constituem um importante parâmetro a ser considerado na avaliação do potencial tóxico de contaminantes sobre os organismos vivos.

As mudanças histológicas aparecem como uma resposta a estressores subletais e a histologia fornece um método rápido para detectar efeitos dos poluentes em vários tecidos e órgãos (BERNET *et al.*, 1999).

Em peixes, os órgãos alvo de maior importância frente à contaminação da água por substâncias xenobióticas são as brânquias e o fígado. Esses dois órgãos são vitais e representam a entrada do contaminante no organismo via hídrica e via trófica, respectivamente.

#### 1.6.1. AS BRÂNQUIAS COMO ÓRGÃO-ALVO E SUA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL

Os estudos com brânquias visam retratar a exposição hídrica aos contaminantes, uma vez que estas estruturas exibem uma ampla superfície que se encontra em contato direto e permanente com potenciais agentes tóxicos, representando um dos primeiros órgãos a serem afetados por xenobióticos que se encontram dissolvidos na água. Entretanto, esse órgão possui células produtoras de muco, o que garante uma proteção primária contra patógenos e substâncias tóxicas (BERNET *et al.*, 1999).

A presença de poluentes no ambiente aquático pode interferir na funcionalidade do tecido branquial causando alterações na via respiratória e no equilíbrio iônico dos peixes (VAN DEN HEUVEL *et al.*, 2000). As brânquias são responsáveis por variadas funções nos peixes, tais como, trocas gasosas, osmorregulação, excreção de produtos nitrogenados e balanço ácido-base. Portanto, se este órgão for comprometido, a saúde do organismo estará em risco (CENGIZ & UNLU, 2005).

O arco branquial contém as lamelas primárias, estas por sua vez, são ladeadas pelas lamelas secundárias ou respiratórias. A superfície da lamela branquial secundária é revestida por um epitélio celular simples e capilares separados por células pilares, que encontram-se paralelamente ao longo do eixo principal de sua superfície. Entre as lamelas primária e secundária encontra-se um espesso epitélio estratificado e nessa região ocorre a presença de células produtoras de muco e células de cloreto (CENGIZ & UNLU, 2005).

As células pilares são aquelas responsáveis pela estruturação e sustentação da lamela respiratória, os eritrócitos que transitam no interior das lamelas são nucleados, as células produtoras de muco são responsáveis pela proteção primária do órgão através da secreção de muco e as células de cloreto auxiliam no processo do equilíbrio ácido-base no organismo.

### 1.6.2. O FÍGADO COMO ÓRGÃO-ALVO E SUA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL

O fígado desempenha variadas funções no organismo como o metabolismo, estoque e distribuição de nutrientes para o sangue. Trata-se da maior glândula presente em vertebrados e produz substâncias exócrinas não enzimáticas, a bile. É atuante na biotransformação de compostos endógenos e exógenos, armazenamento de energia e síntese de proteínas (GUILLOUSO *et al.*, 1990).

Trata-se do principal órgão que pode metabolizar e em seguida excretar substâncias xenobióticas, sendo, portanto, um dos primeiros órgãos a entrar em contato com os contaminantes após exposição trófica (BERNET *et al.*, 1999), pois, além de ser uma glândula anexa do sistema digestivo, apresenta expressiva atuação na biotransformação de compostos tóxicos (CALOW, 1993).

O fígado de teleósteos, de maneira geral, é constituído por células do parênquima hepático que são tipos celulares que se apresentam de forma variável, desde a forma oval a polígonos irregulares. Encontram-se arrançadas de forma concêntrica ao redor dos capilares sanguíneos (sinusóides) formando cordões de hepatócitos. Seus núcleos são geralmente esféricos e contêm quantidades variáveis de heterocromatina, dispersa ou periférica ao núcleo e nucléolo. Sua alta taxa metabólica e biossintética pode ser verificada pela presença de um abundante retículo endoplasmático granular e grande quantidade de mitocôndrias (HEATH, 1995).

O órgão possui regiões especializadas de membrana, com 2 a 4 hepatócitos justapostos, que formam canalículos biliares que são canais intercelulares que recebem a bile por secreção celular. Toda essa estrutura é unida através de desmosomos. Vários canalículos biliares juntos formam o ducto biliar. Os ductos biliares convergem para um ducto hepático que deixa o fígado e se abre no duodeno ou alimenta a vesícula biliar, dependendo da espécie de peixe (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

### 1.7. BIOMARCADORES QUÍMICOS – DETECÇÃO DE METABÓLITOS DE HPA's NA BILE

Hidrocarbonetos aromáticos, incluindo seus metabólitos, possuem uma forte propriedade fluorescente o que possibilita medições quantitativas e análises qualitativas de vários compostos que podem ser obtidos através de simples avaliações de fluorescência de amostras de bile (AAS *et al.*, 2000; HURK *et al.*, 2006-a).

A bile é uma mistura de água, eletrólitos, sais biliares, bilirrubina (resultante da quebra de células sanguíneas), pigmentos biliares (biliverdina), substâncias xenobióticas detoxificadas, resíduos de hormônios esteróides e proteínas biliares. É secretada continuamente no fígado e é armazenada na vesícula biliar e, por meio de contrações, excreta essa mistura para o intestino delgado. Em animais, no período entre as refeições, a bile se acumula na vesícula biliar até que a próxima refeição seja realizada (HURK *et al.*, 2006-b). A secreção biliar é de extrema importância na digestão e absorção de lipídeos, pois estes são insolúveis em água e dificilmente hidrolisados, dificultando a ação das lipases no processo digestivo.

Os HPA's são metabolizados principalmente pelo fígado e os metabólitos produzidos podem ser secretados juntamente com a bile para a vesícula biliar, onde ficam armazenados até a bile ser lançada no trato intestinal (AAS *et al.*, 2000; RUDDOCK *et al.*, 2003).

#### 1.8. CARACTERIZAÇÃO DO ACIDENTE NA REFINARIA GETÚLIO VARGAS –PR.

O acidente ocorreu em 16 de julho de 2000, nas proximidades da refinaria Getulio Vargas, localizada na cidade de Araucária-PR, com o derramamento de 4,5 milhões de litros de óleo. O vazamento ocorreu numa região chamada Arroio Saldanha, caracterizada por grande quantidade de lama, atingindo o solo próximo à região e os rios Barigui e Iguaçu (KATSUMITI, 2006).

O óleo derramado apresentava baixa densidade sendo constituído por 71% de hidrocarbonetos saturados, 18% de compostos aromáticos e 0,8% de asfaltenos, onde os derivados do naftaleno, fenantreno e fluoreno foram os mais presentes. Aproximadamente 30% do óleo derramado atingiu os rios próximos, outros 30% evaporaram e o restante ficou retido no Arroio (MENICONI *et al.*, 2002).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

\*Avaliar a biodisponibilidade de hidrocarbonetos presentes nas águas do Rio Barigui e do afluente Arroio Saldanha através de biomarcadores químicos em *Astyanax* sp.

\* Detectar e quantificar através de biomarcadores morfológicos de contaminação ambiental os efeitos agudos decorrentes da exposição de *Salvelinus alpinus* à Fração Solúvel de Petróleo (FSA).

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

\*Detectar a presença de metabólitos de HPA's na bile de *Astyanax* sp. através de análises espectrofluorimétricas.

\*Analisar a existência de alterações histopatológicas em brânquias de *Salvelinus alpinus* expostos a Fração Solúvel de Petróleo (FSA) através de bioensaios.

\*Analisar a existência de alterações histopatológicas no tecido hepático de *Salvelinus alpinus* expostos a Fração Solúvel de Petróleo (FSA) através de bioensaios.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. BIODISPONIBILIDADE DE HPA's

##### 3.1.1. ÁREA DE ESTUDO

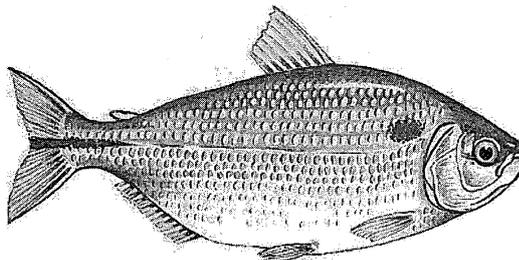
O Rio Barigui, nasce no encontro com o Arroio Antônio Rosa no município de Almirante Tamandaré e corta 18 bairros de Curitiba, percorrendo cerca de 60 km em ambiente urbano (FENIANOS, 2003). Esse rio destaca-se por ser um corpo d'água que recebe diversos tipos de poluentes provenientes da cidade industrial de Curitiba. Além disso, acidentes ambientais, como o derramamento de petróleo ocorrido no ano de 2000 contribuem para aumentar o nível de degradação deste importante recurso hídrico, o que vem ao longo das últimas décadas colocando em risco o ecossistema aquático e a saúde humana.

O Arroio Saldanha, local onde ocorreu o acidente com o derramamento de 4 milhões de litros de petróleo, localiza-se na cidade de Araucária – PR, região metropolitana de Curitiba. Sua extensão possui cerca de dois mil metros de planície inundável. A Montante e Jusante dessa área sofrem influência da área industrial adjacente, o que compromete ainda mais a qualidade de água dessa região (SILVA, 2006).

##### 3.1.2. MODELO BIOLÓGICO

Os animais que foram utilizados no presente estudo pertencem ao gênero *Astyanax* sp., família Characidae e sub família Tetragonopterinae, ordem Characiformes. Trata-se de um peixe de água doce, amplamente distribuído por todo território brasileiro. Apresenta indivíduos de pequeno porte, variando entre 5-15cm de comprimento, possui notável importância como espécie forrageira (AKAISHI *et al.*, 2004).

FIGURA 01 - *Astyanax* sp. UTILIZADOS NO EXPERIMENTO DE BIODISPONIBILIDADE DE HPA's.



Fonte: [www.portojofre.com.br/peixes.asp](http://www.portojofre.com.br/peixes.asp)

### 3.1.3. COLETAS

As amostras de água foram coletadas no mês de novembro de 2005, em dois pontos do Rio Barigui, sendo o primeiro próximo a Cocelpa (Al61) à montante e à jusante do córrego principal do Arroio Saldanha com o Rio Barigui. O terceiro ponto localiza-se no próprio Arroio Saldanha (FIGURA 1).

Em laboratório foram instalados os experimentos em aquários equipados com aeradores. A água teste sofreu diluições (50% e 100%) em água reconstituída (0,0065 g/L de  $\text{CaCl}_2$ ; 0,1335 g/L de  $\text{MgSO}_4$ ; 0,0004 g/L de KCl e 0,0105 g/L de  $\text{NaHCO}_3$ ; pH variando entre 7,2 e 7,3). O aquário denominado controle recebeu apenas água reconstituída. A água coletada nos três locais foi submetida à análise química de hidrocarbonetos totais, HPA's, metais e surfactantes num estudo realizado por SILVA *et al.* (2006).

Os indivíduos adultos de *Astyanax* sp. foram coletados no criadouro comercial Parque Costa, localizado em Curitiba – PR – Brasil. Os animais foram aclimatados em laboratório por um intervalo de tempo de 15 dias antes do experimento. A temperatura foi controlada, variando de  $22^\circ\text{C} + \text{ou} - 2$ , com fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro. Na fase de aclimação os animais foram alimentados com comida comercial (Alcon Guppy).

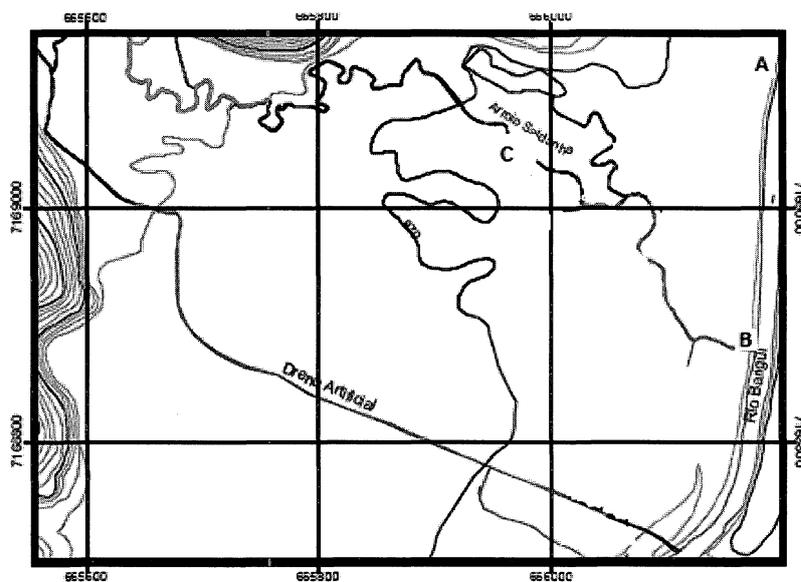
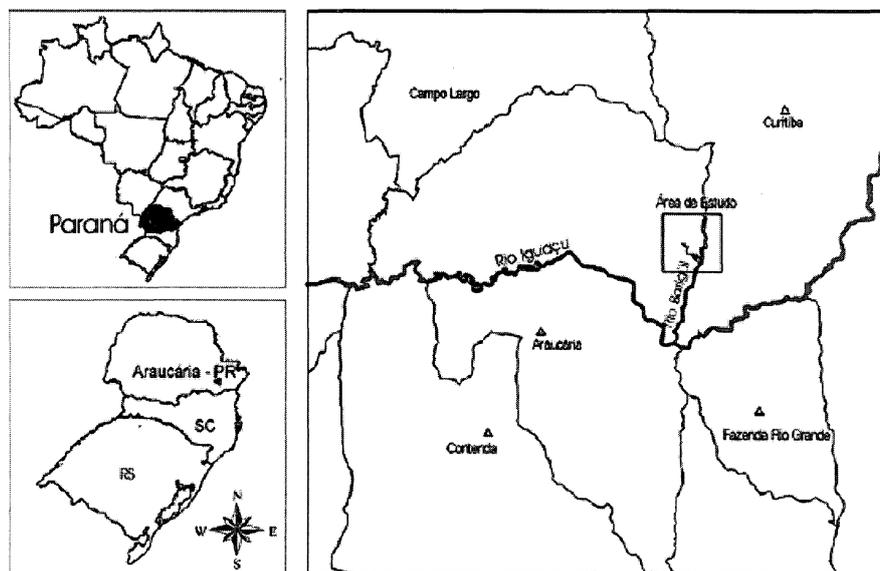
## 3.2. BIOMARCADOR QUÍMICO

### 3.2.1. "DESIGN" EXPERIMENTAL DA AVALIAÇÃO QUÍMICA EM BILE DE *Astyanax* sp.

Foram realizados bioensaios em aquários de 12 litros contendo as amostras de água coletadas do Rio Barigui e do seu afluente Arroio Saldanha. Ao todo, 140 indivíduos de *Astyanax* sp. foram analisados, separados em sete grupos de aquários com duplicata para cada diluição. Estes ficaram divididos em grupos de dez animais por aquário, totalizando 20 indivíduos para cada grupo testado ( controle, Arroio Saldanha 50% e 100%, montante 50% e 100% e jusante 50% e 100%). Os peixes ficaram expostos durante 96h nas mesmas condições da aclimação (1 semana), exceto pelo fato de que os animais no decorrer do experimento não foram alimentados.

Após decorridas 96h, os animais foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína a 2% e sacrificados por secção medular. As amostras de bile foram mantidas em frascos de vidro âmbar a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e os HPA's presentes nesta fração foram analisados.

FIGURA 02 – MAPA DE LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.



A) Cocelpa – montante (666.169 – 7.169.169). B) Ponto de encontro entre o afluente e o Rio Barigui – jusante (666.171 – 7.168.861). C) Afluente Arroyo Saldanha, ponto mais afetado durante o acidente com derramamento de 4 milhões de litros óleo, no ano de 2000 (665.939 – 7.169.061).

### 3.2.2. DETECÇÃO DE HPA'S NA BILE

As amostras de bile coletadas foram analisadas para quantificação e qualificação de hidrocarbonetos de acordo com o método de comprimento de onda fluorescente ou Fluorescência Fixa (FF). As amostras foram congeladas e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  em vidro âmbar para evitar a degradação das moléculas. Foi montada uma curva de padronização para hidrocarbonetos padrões de 2, 3, 4, 5 e 6 anéis (naftaleno, fenantreno, pireno, benzo[a]pireno e benzo[ghi]perileno, respectivamente), nas concentrações de 0,078ng/ml, 0,156ng/ml, 0,312ng/ml, 0,6ng/ml, 0,625ng/ml, 1,25ng/ml, 2,5ng/ml e 5ng/ml, em metanol 48%, e outra curva de padronização da diluição da amostra de bile em metanol 48%, visando eliminar os efeitos de filtro interno causados por outros compostos presentes na bile que também possuem propriedades fluorescentes, nas seguintes proporções de bile para etanol 48%: 1:1000; 1:1200; 1:1400; 1:1600; 1:1800 e 1:2000.

### 3.2.3. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NA BILE

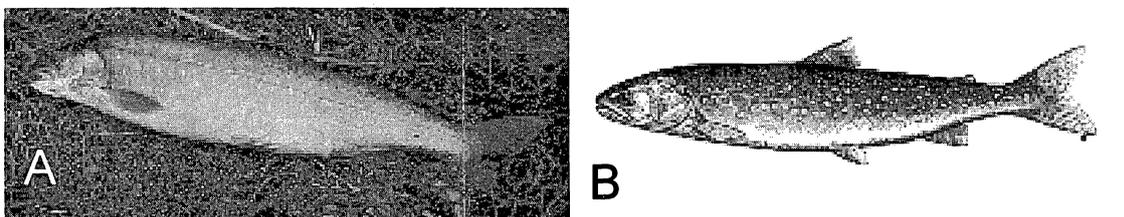
A quantificação da concentração das proteínas da bile foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Foram realizados três brancos: o primeiro consistia somente de água, o segundo de água + amostra de bile e o terceiro de água + reativo de Bradford. Utilizamos uma curva padrão nas concentrações de 0, 125, 250, 500 e 1000 ug/ml de albumina de soro bovina (BSA). As amostras foram diluídas 5 vezes e lidas a 620 nm .

### 3.3. EFEITO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DE PETRÓLEO (FSA) EM *Salvelinus alpinus*

#### 3.3.1. MODELO BIOLÓGICO

Os animais que foram utilizados nesse estudo pertencem a espécie *Salvelinus alpinus*, família Salmonidae, subfamília Salmoninae, Ordem Salmoniformes (salmões), classe dos Actinopterygii. Trata-se de uma espécie de hábito não migratório, existindo populações residentes em lagos e rios. Vive em ambiente bentopelágico numa profundidade de 30-70m. Pode chegar a 107cm de comprimento e até 15kg de massa. Sua alimentação consiste em crustáceos planctônicos, anfípodas, moluscos, insetos e outros peixes. Mostra-se como uma espécie extremamente sensível à poluição aquática ([www.fishbase.com](http://www.fishbase.com)).

FIGURA 03 - *Salvelinus alpinus* UTILIZADOS NOS BIOENSAIOS DE EXPOSIÇÃO AGUDA À FSA.



Fonte: [www.fishbase.com](http://www.fishbase.com)

### 3.4. BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

#### 3.4.1. “DESIGN” EXPERIMENTAL DO ESTUDO DOS EFEITOS AGUDOS DA FSA EM *S. alpinus*.

Foram realizados bioensaios utilizando-se 56 indivíduos da espécie *Salvelinus alpinus* (truta) distribuídos em seis aquários. Cada aquário continha aproximadamente 9 espécimes, três aquários foram utilizados como controle e três foram contaminados com petróleo. O tempo de exposição foi de sete dias em fluxo contínuo a 300ml de petróleo (óleo cru) em recipientes que permitiam o contato do óleo com a água, mas impediam o contato direto dos peixes com o contaminante.

Após 96h de exposição o petróleo foi removido dos aquários e os animais permaneceram em período de depuração durante 10 dias. Amostras de fígado e brânquias foram coletadas após 96h e no 10º dia de exposição para avaliação histopatológica em microscopia de campo claro. Toda parte experimental deste

trabalho ocorreu nas dependências do laboratório Toxicologia Marinha, ministrado pelo prof.º Dr. Emilien Pelletier, da Université du Québec à Rimouski no Canadá.

### 3.4.2. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE FÍGADO E BRÂNQUIAS

O segundo arco branquial direito de cada espécime foi coletado para análise histopatológica em microscopia de campo claro. A amostra do fígado foi obtida após secção ventral. O arco branquial e a amostra do fígado foram fixados em ALFAC durante 16 horas. Em seguida as peças foram desidratadas em série crescente de álcoois, 90% e 95% por 1 hora e em álcool 100% por 30 minutos, duas vezes.

O material foi diafanizado utilizando-se 3 banhos de 5 minutos em xilol. A impregnação realizada em paraplast plus a 56°C por 2 horas e após incluídas. Para a microtomia os blocos foram mantidos em freezer por 15 minutos, a fim de facilitar a obtenção de bons cortes ao micrótomo (LEICA RM 2145). A espessura dos cortes foi de 5 µm, os quais foram fixados em lâminas com albumina e distendidos sobre uma chapa quente. Os cortes receberam a coloração de Hematoxilina de Harris e Eosina 1%. Para o processo de coloração as lâminas foram diafanizadas em xilol, em seguida hidratadas em série decrescente de álcoois e então coradas.

Após a coloração as lâminas passaram por um processo de desidratação, para posterior montagem em lâminas permanente, em série crescente de álcoois e banhadas em xilol para finalmente serem montadas com resina (poly mount) e lamínula. Toda análise dessas lâminas foi realizada em microscópio de luz LEICA DME. As imagens foram obtidas em Fotomicroscópio Zeiss Axiophot.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. HIDROCARBONETOS EM BILE

#### 4.1.1. HIDROCARBONETOS TOTAIS E HPA'S NA BILE

Seis tipos de compostos mensurados foram identificados na bile de peixes da espécie *Astyanax* sp. expostos a água coletada em áreas próximas ao acidente ocorrido no ano de 2000, na cidade de Araucária – PR, com vazamento de quatro milhões de litros de óleo no local. Os compostos encontrados correspondem ao naftaleno que contem 2 anéis em sua estrutura; compostos contendo 3 anéis, havendo cinco possibilidades de moléculas distintas incluindo o fenantreno; composições com 4 anéis apresentando quatro possíveis moléculas, dentre elas o pireno e o criseno; 5 anéis, existindo quatro prováveis moléculas, como exemplo o benzo(a)pireno; e compostos possuindo 6 anéis, com duas possíveis composições moleculares, sendo uma delas o benzo(ghi)perileno. A diluição escolhida para a leitura das amostras de bile foi 1:1600, ou seja, uma parte de bile para 1600 partes de solvente (metanol 48%).

A quantificação dos hidrocarbonetos totais e individuais contido em cada *pool* de amostras de bile foi calculada e está representada nos GRÁFICOS 01, 02, 03, 04, 05, 06 e 07.

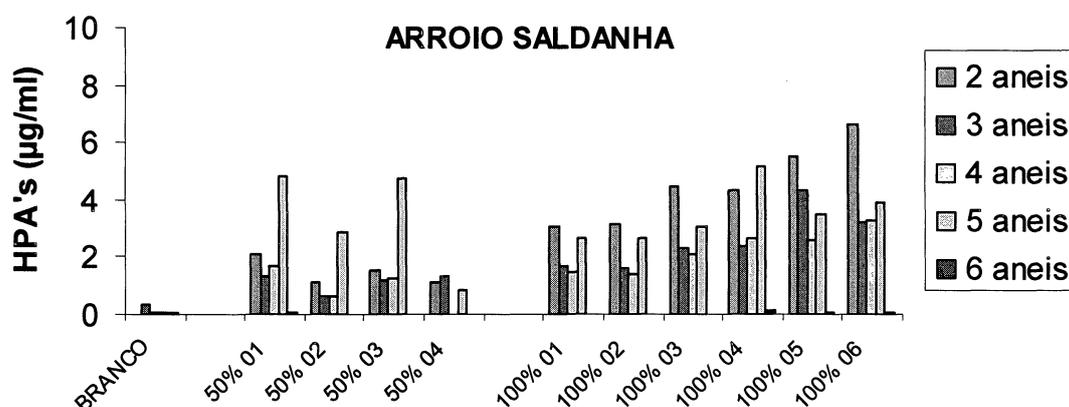
Nas amostras de bile coletadas dos peixes que receberam água do Arroio Saldanha-50% durante experimento, houve um predomínio de compostos contendo cinco anéis, seguido dos compostos de quatro e dois anéis, respectivamente. Porém no aquário onde a água coletada no Arroio não foi diluída, o predomínio foi de moléculas de HPA's de dois anéis, seguido pelos compostos com cinco estruturas benzênicas em sua fórmula estrutural (GRÁFICO 01 e 02).

Na quantificação dos HPA's das amostras de bile coletadas do experimento com água do Rio Barigui à montante do vazamento, verificou-se a predominância de moléculas contendo cinco anéis, tanto nas amostras que receberam água diluída a 50% quanto àquelas não diluídas. Compostos contendo seis anéis benzênicos foram detectados em baixíssimas quantidades. Enquanto os compostos de dois, três e quatro anéis oscilaram num valor intermediário (GRÁFICOS 03 e 04).

No Rio Barigui, à jusante do vazamento, foi observado um maior índice de compostos aromáticos com cinco e dois anéis, respectivamente, ou seja, moléculas do grupo dos benzo-pirenos e naftaleno (GRÁFICOS 05 e 06).

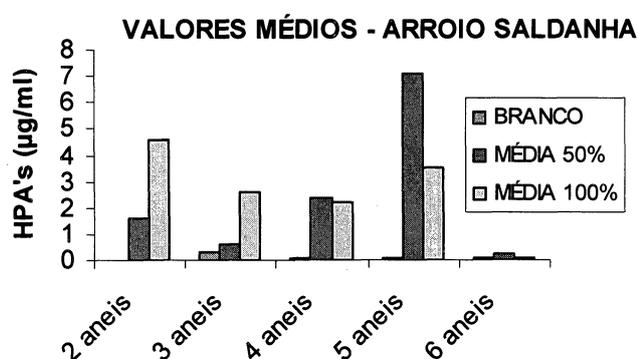
Em nosso grupo controle identificamos uma pequena quantidade de fluorescência, principalmente, na faixa do comprimento de onda para detecção de compostos com cinco anéis (GRÁFICO 07).

GRÁFICO 01: AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE HPA's EM AMOSTRAS DE BILE DE *Astyanax* sp. EXPOSTOS À ÁGUA DO ARROIO SALDANHA.

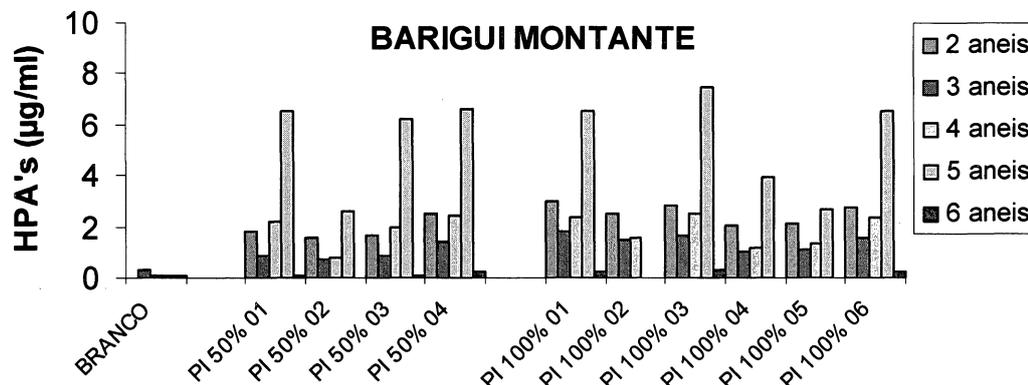


As barras verticais representam a quantidade em  $\mu\text{g/ml}$  dos compostos aromáticos de 2, 3, 4, 5 e 6 anéis em cada uma das variáveis experimentais estabelecidas. O branco consiste apenas do solvente metanol; 50% indica a diluição da água obtida do Arroio na proporção 1:1; 100% indica que não houve diluição da amostra de água na realização do experimento. Os valores 01-06 representam os *pools* de amostras de bile retiradas dos indivíduos expostos.

GRÁFICO 02: MÉDIA ARITMÉTICA DOS VALORES DOS *POOLS* DE BILE DE CADA VARIÁVEL EXPERIMENTAL ENVOLVENDO A ÁGUA DO ARROIO SALDANHA.



**GRÁFICO 03: AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE HPA's EM AMOSTRAS DE BILE DE *Astyanax* sp. EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO BARIGUI A MONTANTE DO ACIDENTE.**



As barras verticais representam a quantidade em  $\mu\text{g/ml}$  dos compostos aromáticos de 2, 3, 4, 5 e 6 anéis em cada uma das variáveis experimentais estabelecidas. O branco consiste apenas do solvente metanol; PI 50% indica a diluição da água obtida do Rio Barigui, a montante do vazamento, na proporção 1:1; PI 100% indica que não houve diluição da amostra de água na realização do experimento. Os valores 01-06 representam os *pools* de amostras de bile retiradas dos indivíduos expostos.

**GRÁFICO 04: MÉDIA ARITMÉTICA DOS VALORES DOS *POOLS* DE BILE DE CADA VARIÁVEL EXPERIMENTAL ENVOLVENDO A ÁGUA DO RIO BARIGUI, A MONTANTE DO ACIDENTE.**

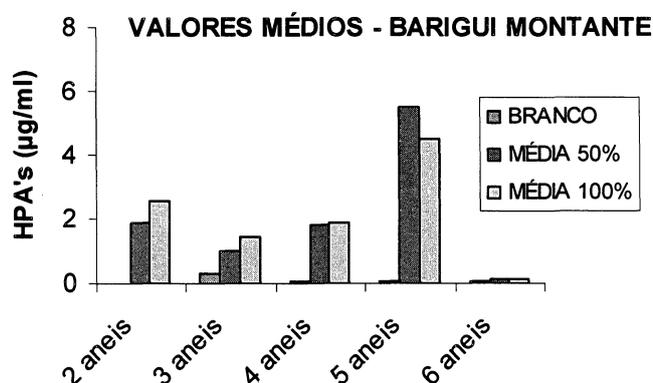
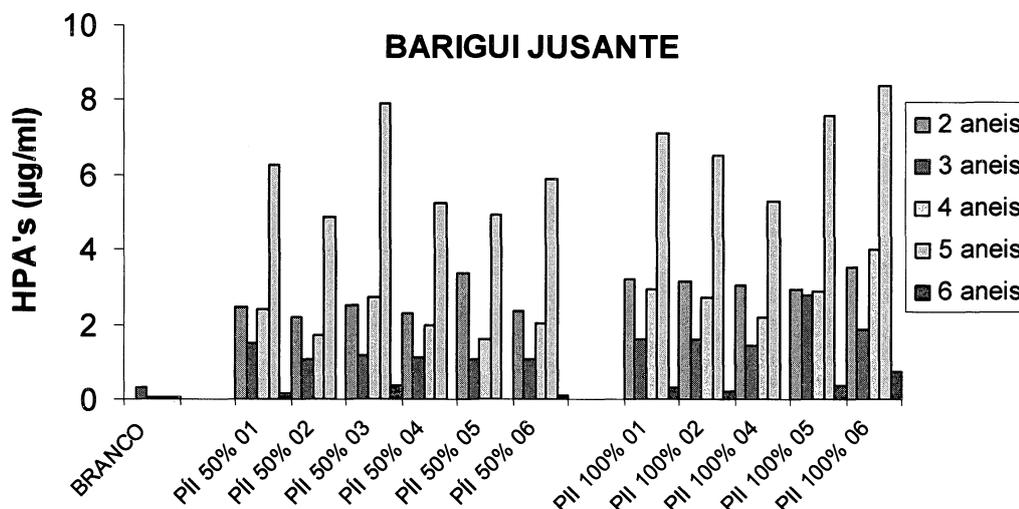


GRÁFICO 05: AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE HPA's EM AMOSTRAS DE BILE DE *Astyanax* sp. EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO BARIGUI A JUSANTE DO ACIDENTE.



As barras verticais representam a quantidade em µg/ml dos compostos aromáticos de 2, 3, 4, 5 e 6 anéis em cada uma das variáveis experimentais estabelecidas. O branco consiste apenas do solvente metanol; PII 50% indica a diluição da água obtida do Rio Barigui, a jusante do vazamento, na proporção 1:1; PII 100% indica que não houve diluição da amostra de água na realização do experimento. Os valores 01-06 representam os *pools* de amostras de bile retiradas dos indivíduos expostos.

GRÁFICO 06: MÉDIA ARITMÉTICA DOS VALORES DOS *POOLS* DE BILE DE CADA VARIÁVEL EXPERIMENTAL ENVOLVENDO A ÁGUA DO RIO BARIGUI, A JUSANTE DO ACIDENTE.

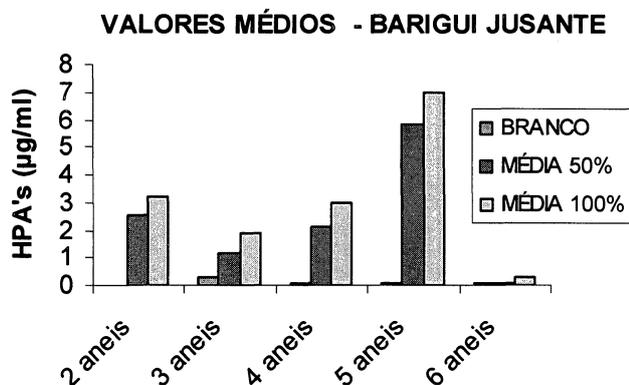
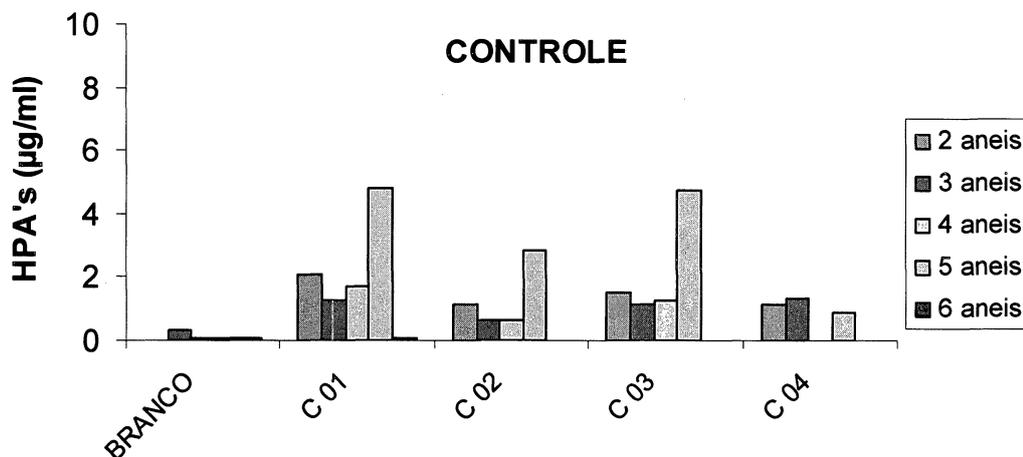


GRÁFICO 07: AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE HPA's EM AMOSTRAS DE BILE DE *Astyanax* sp. UTILIZADOS COMO CONTROLE.



As barras verticais representam a quantidade em µg/ml dos compostos aromáticos de 2, 3, 4, 5 e 6 anéis em cada uma das variáveis experimentais estabelecidas. O branco consiste apenas do solvente metanol; A letra C indica o grupo controle e os valores 01-04 representam os *pools* de amostras de bile retiradas dos indivíduos expostos.

Foi realizada a dosagem de proteínas nas amostras de bile dos indivíduos estudados, de acordo com o protocolo de BRADFORD (1976). A razão entre a quantidade de HPA's presentes na bile expressos em µg/ml e a dosagem de proteína na bile também em µg/ml está representada nos GRÁFICOS 08, 09, 10 e 11. Os GRÁFICOS 12 e 13 representam os hidrocarbonetos totais encontrados para cada variável do experimento.

No experimento realizado contendo a água do Arroio Saldanha os valores da razão entre concentração de HPA's e concentração de proteínas da bile oscilou de 0,0004 à 0,0008 (unidade adimensional) tanto na proporção 50% quanto na 100% (GRÁFICO 08).

Os valores a montante do vazamento, ponto localizado no Rio Barigui, mostraram grande amplitude de variação entre as amostras, sendo que algumas amostras apresentaram valores relativamente baixos enquanto outras, valores mais elevados (GRÁFICO 09).

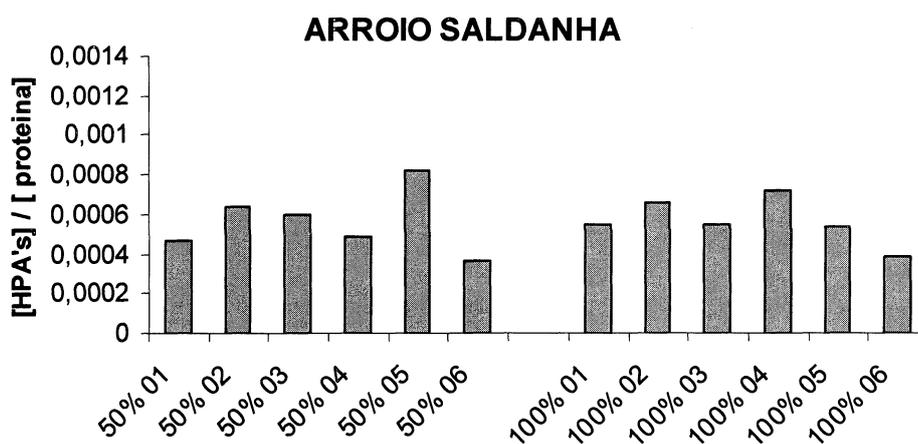
No GRÁFICO 10, verifica-se uma variação menor nos valores da razão à jusante do Rio Barigui do que nos outros pontos analisados. Esses valores correspondem a faixa de 0,0006 a 0,0012, ou seja, a maior proporção encontrada.

Os valores relacionados ao controle (GRÁFICO 11) apresentaram também certo índice de fluorescência, conseqüentemente, uma razão correlacionada à

dosagem de proteínas da bile. Estes valores são bastante inferiores quando é realizada uma correspondência aos valores encontrados nos outros três experimentos em que a água foi retirada de campo. Suas proporções variaram entre 0,0002 e 0,0005.

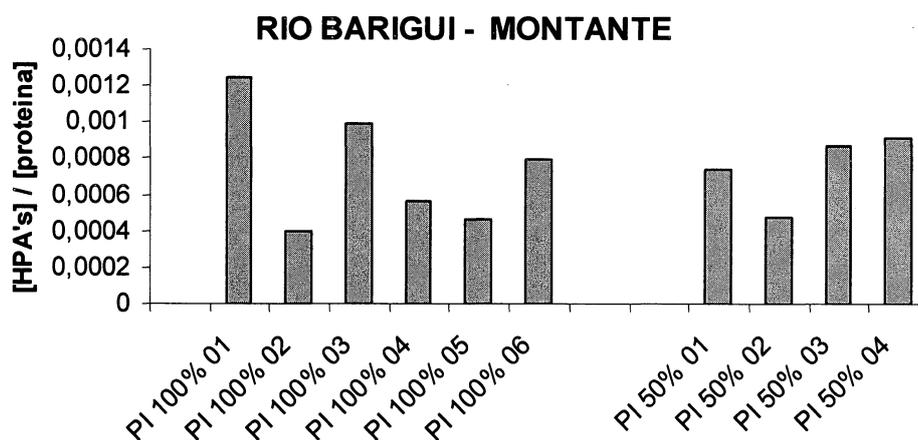
O GRÁFICO 12 apresenta uma comparação entre todas as variáveis experimentais analisadas, mostrando cada grupo com cada uma de suas amostras testadas. No GRÁFICO 13, temos as médias dos valores de todas as amostras pertencentes à um mesmo grupo. Nesse GRÁFICO podemos observar que o bioensaio que utilizou água do Rio Barigui à jusante do vazamento de óleo foi o que apresentou valores maiores de razão entre a quantidade de HPA's e de proteínas presentes na bile, principalmente, quando não diluída em água reconstituída. A média dos demais bioensaios variou entre 0,0006 e 0,0008 e o controle mostrou um valor médio de 0,0004.

GRÁFICO 08: HICROCARBONETOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE BILE DE *Astyanax* sp. EXPOSTOS À ÁGUA DO ARROIO SALDANHA.



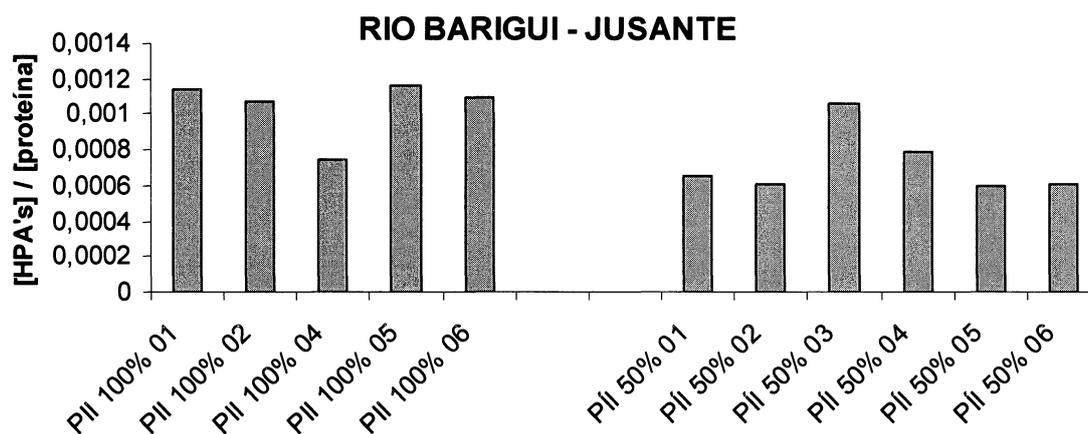
As barras verticais representam a razão entre a concentração de HPA's pela concentração de proteína presente na bile dos animais experimentais. O valor 50% indica a diluição da água obtida do Arroio Saldanha, na proporção 1:1; 100% indica que não houve diluição da amostra de água na realização do experimento. Os valores 01-06 representam os *pools* de amostras de bile retiradas dos indivíduos expostos.

GRÁFICO 09: HICROCARBONETOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE BILE DE *Astyanax* sp. EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO BARIGUI À MONTANTE DO ACIDENTE.



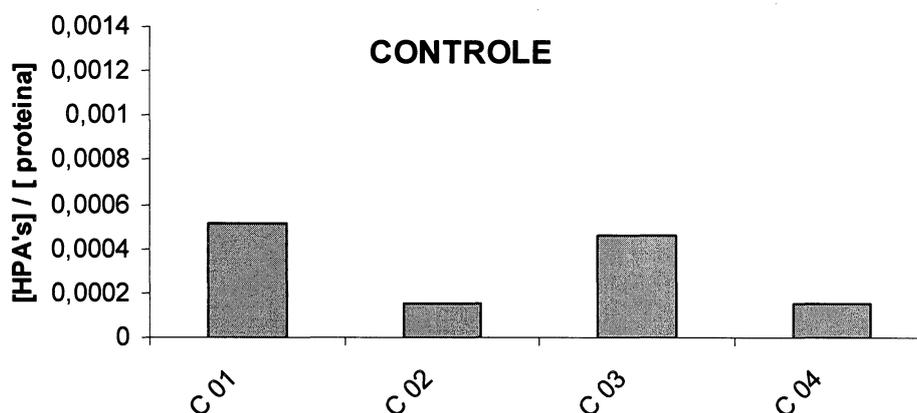
As barras verticais representam a razão entre a concentração de HPA's pela concentração de proteína presente na bile dos animais experimentais. O valor PI 50% indica a diluição da água obtida do Rio Barigui, a montante do vazamento, na proporção 1:1; PI 100% indica que não houve diluição da amostra de água na realização do experimento. Os valores 01-06 representam os *pools* de amostras de bile retiradas dos indivíduos expostos.

GRÁFICO 10: HICROCARBONETOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE BILE DE *Astyanax* sp. EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO BARIGUI À JUSANTE DO ACIDENTE.



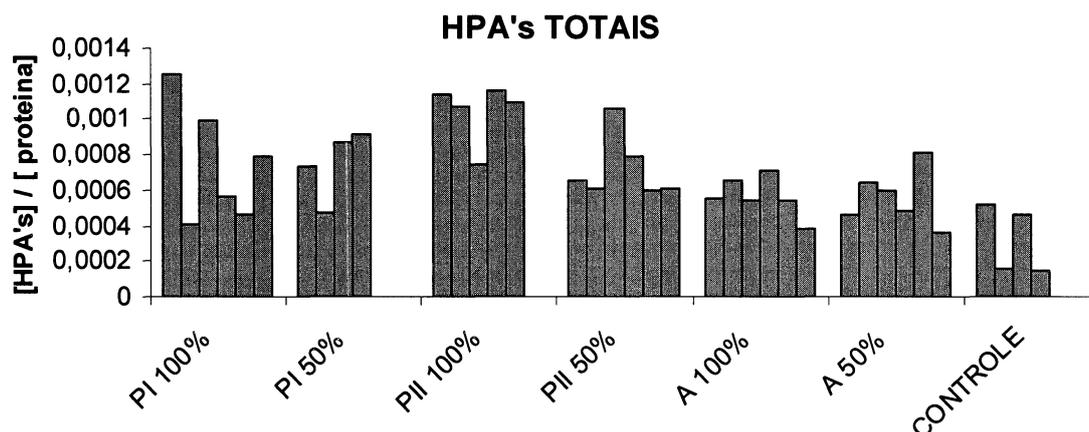
As barras verticais representam a razão entre a concentração de HPA's pela concentração de proteína presente na bile dos animais experimentais. O valor PII 50% indica a diluição da água obtida do Rio Barigui, a jusante do vazamento, na proporção 1:1; PII 100% indica que não houve diluição da amostra de água na realização do experimento. Os valores 01-06 representam os *pools* de amostras de bile retiradas dos indivíduos expostos.

GRÁFICO 11: HICROCARBONETOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE BILE DE *Astyanax* sp. UTILIZADOS COMO CONTROLE.



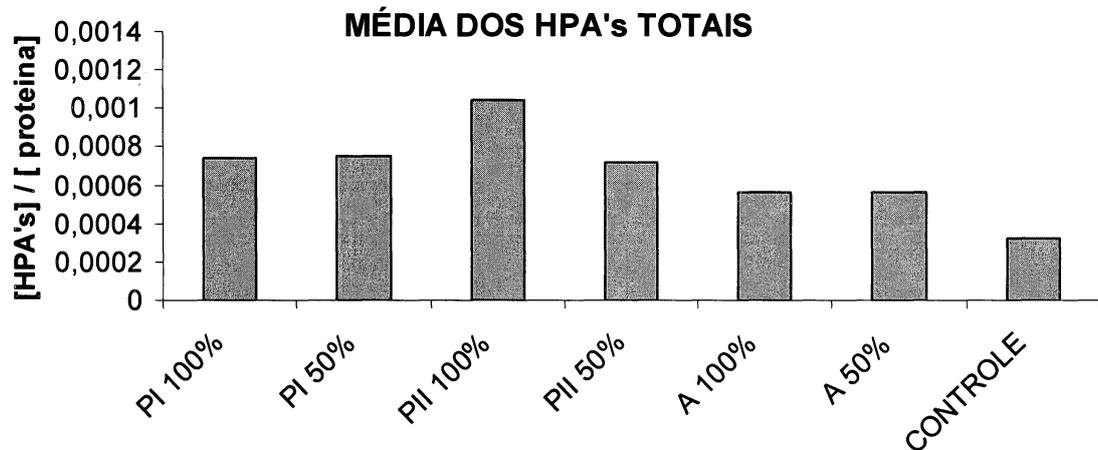
As barras verticais representam a razão entre a concentração de HPA's pela concentração de proteína presente na bile dos animais experimentais. A letra C indica o grupo controle e os valores 01-04 os pools de amostras de bile retiradas dos indivíduos expostos.

GRÁFICO 12: HICROCARBONETOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE BILE DE *Astyanax* sp. EXPOSTOS A TODAS AS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS.



O eixo vertical representa a razão entre a concentração de HPA's pela concentração de proteína presente na bile dos animais experimentais. O valor 50% indica a diluição da água obtida do Arroio Saldanha (A); do Rio Barigui a montante do acidente (PI) ou a jusante (PII), na proporção 1:1; 100% indica que não houve diluição da amostra de água na realização do experimento. Cada grupo de barras verticais corresponde a uma das variáveis testadas neste estudo.

GRÁFICO 13: MÉDIA DOS VALORES DE HIDROCARBONETOS TOTAIS DAS AMOSTRAS DE BILE DE *Astyanax* sp. EXPOSTOS A TODAS AS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS.



O eixo vertical representa a razão entre a concentração de HPA's pela concentração de proteína presente na bile dos animais experimentais. O valor 50% indica a diluição da água obtida do Arroio Saldanha (A); do Rio Barigui a montante do acidente (PI) ou a jusante (PII), na proporção 1:1; 100% indica que não houve diluição da amostra de água na realização do experimento. Cada grupo de barras verticais corresponde a uma das variáveis testadas neste estudo.

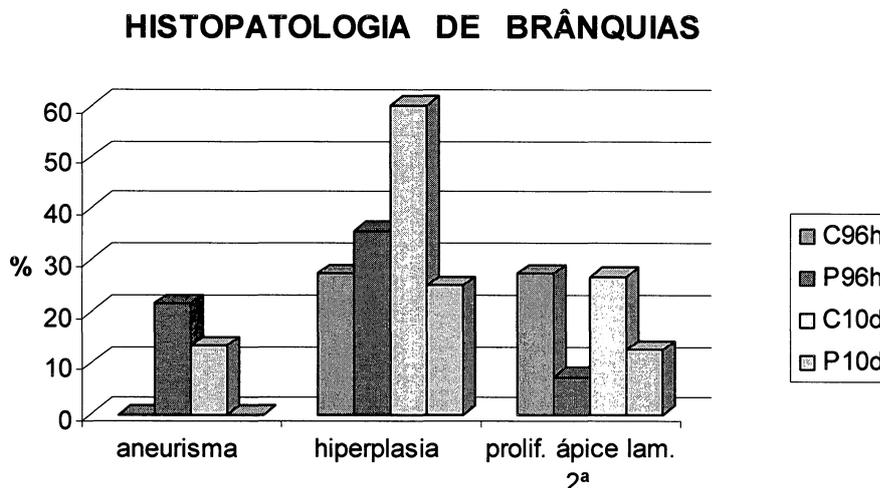
## 4. 2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

### 4. 2.1. HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS

As brânquias de *Salvelinus alpinus* expostos à Fração Solúvel do Petróleo (FSA) apresentaram alterações circulatórias do tipo aneurisma, alterações progressivas do tipo hiperplasia associada ou não a fusão das lamelas respiratórias e proliferação celular no ápice da lamela secundária.

Hiperplasia esteve presente tanto nos indivíduos expostos a FSA quanto nos indivíduos controle. Aneurismas apareceram em apenas 5 dos 56 animais analisados, porém, estiveram presentes em ambos os grupos (controle e exposto). As taxas de ocorrência das alterações estão representadas em porcentagem no GRÁFICO 14. A tabela 01 resume as alterações encontradas no tecido branquial de *Salvelinus alpinus* expostos à FSA.

GRÁFICO 14: OCORRÊNCIA DE ALTERAÇÕES TECIDUAIS NAS BRÂNQUIAS DE *Salvelinus alpinus* APÓS EXPOSIÇÃO A FSA, EXPRESSAS EM PORCENTAGEM.



As barras verticais representam a porcentagem de ocorrência de cada alteração em cada um dos grupos experimentais. As letras C e P correspondem aos grupos controle e exposto aos contaminantes, respectivamente. A sigla 96h indica o tempo de exposição ao agente xenobiótico e 10d é correspondente aos dez dias de depuração pós-exposição.

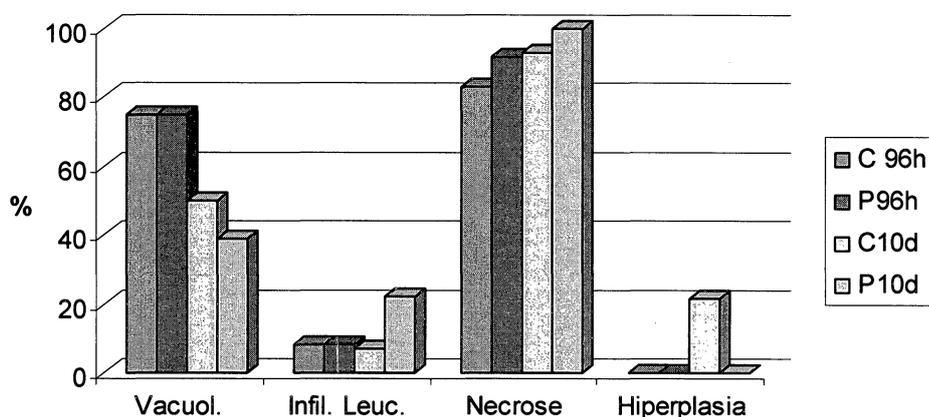
#### 4.2.2. HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO

O fígado dos animais expostos à fração solúvel do petróleo apresentou tecido bastante danificado em decorrência de necroses e vacuolizações das células hepáticas. A lesão necrose esteve presente na grande maioria dos peixes analisados, ultrapassando 80% do total de indivíduos presentes em cada grupo. Vacuolização foi a segunda alteração mais freqüente, estando presente em grande quantidade inclusive no grupo controle.

Casos de infiltração leucocitária estiveram associados na maioria das vezes à presença de focos necróticos. Três casos de hiperplasia foram registrados no experimento, todos no grupo controle. As taxas de ocorrência das alterações estão representadas em porcentagem no GRÁFICO 15. A tabela 02 resume as alterações encontradas no tecido hepático de *Salvelinus alpinus* expostos à FSA.

GRÁFICO 15: OCORRÊNCIA DE ALTERAÇÕES TECIDUAIS NO FÍGADO DE *Salvelinus alpinus* APÓS EXPOSIÇÃO A FSA, EXPRESSAS EM PORCENTAGEM.

### HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO

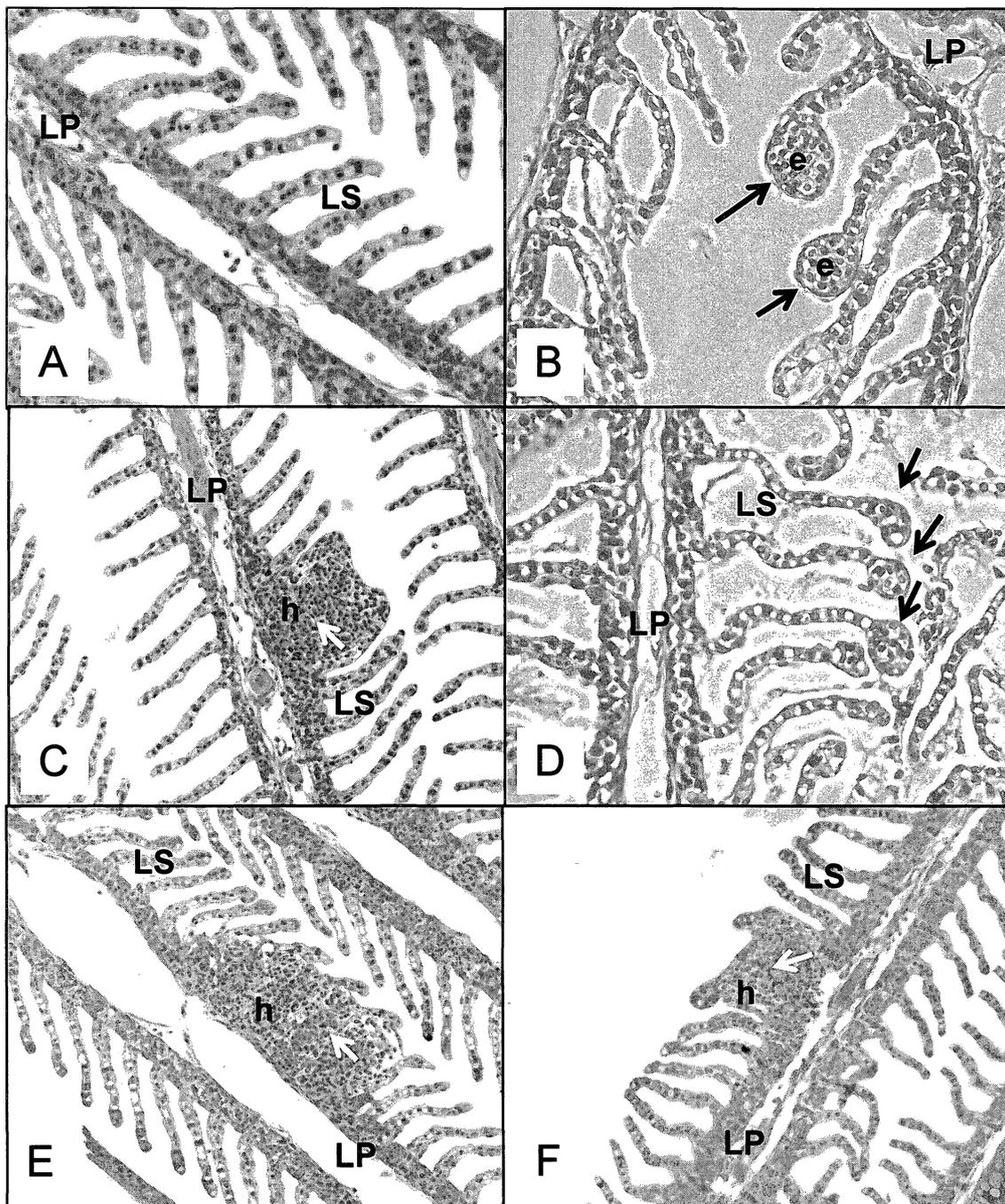


As barras verticais representam a porcentagem de ocorrência de cada alteração em cada um dos grupos experimentais. As letras C e P correspondem aos grupos controle e exposto ao contaminante, respectivamente. A sigla 96h indica o tempo de exposição ao agente xenobiótico e 10d é correspondente aos dez dias de depuração pós-exposição.

As alterações morfológicas encontradas no tecido branquial estão exemplificadas nas imagens contidas nas FIGURAS 04 e 05. Na FIGURA 04 observam-se os cortes histológicos realizados em brânquias dos indivíduos controle. Nesses animais verificaram-se alterações como hiperplasias (FIGURA 04 C, E e F) e aneurismas (FIGURA 04 B e D). Na FIGURA 05 observam-se quadros de hiperplasia bastante severa, havendo a fusão das lamelas respiratórias (FIGURA 05 A, C e F).

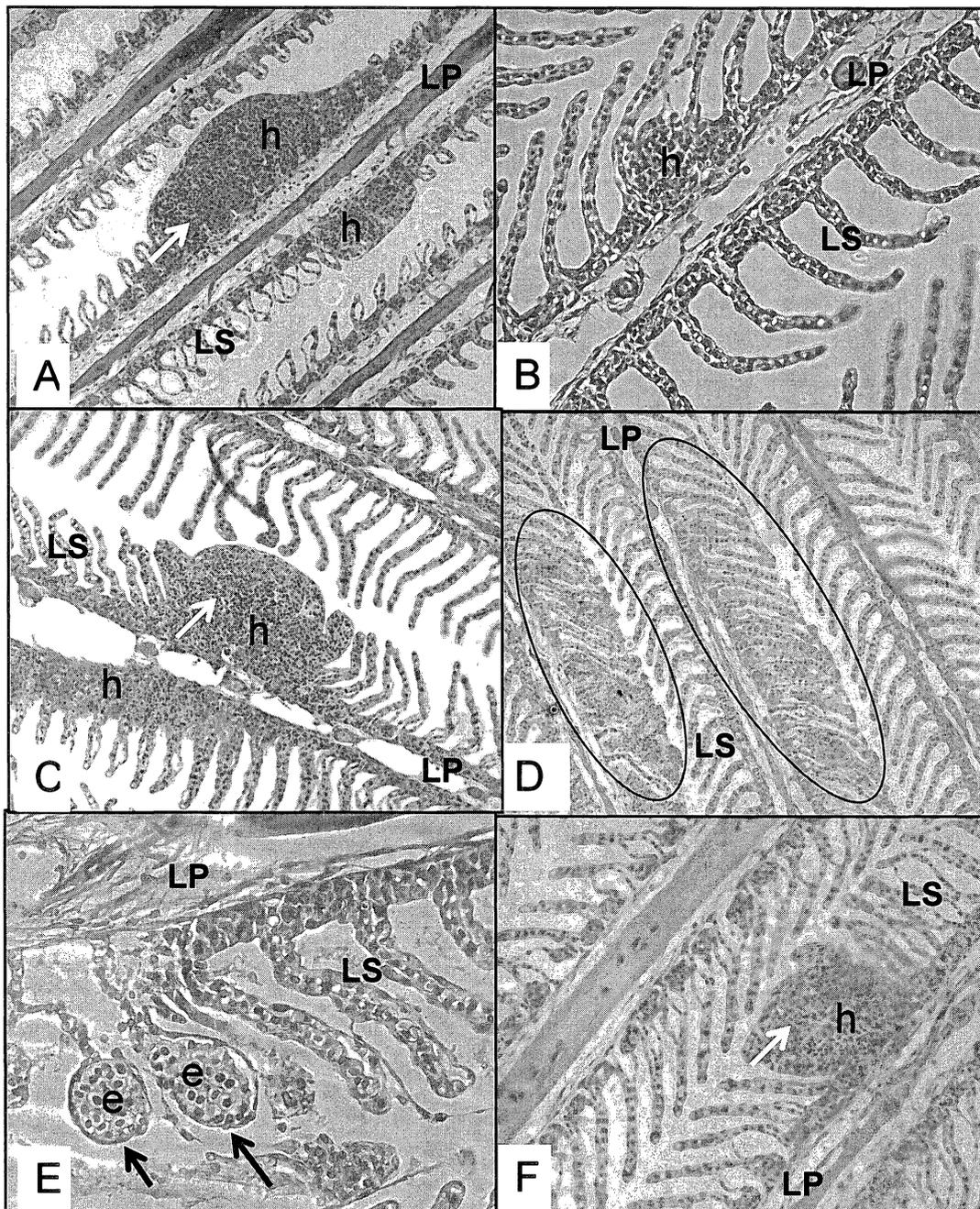
Alterações no tecido hepático estão exemplificadas nas FIGURAS 06, 07 e 08. Na FIGURA 06 são apresentados cortes histológicos dos indivíduos controle e observa-se necroses (B e E), vacúolos (C e F) e um quadro de hiperplasia (D). Infiltração leucocitária e necroses são evidenciadas na FIGURA 07 que representa os indivíduos expostos durante 96h ao contaminante. Nos indivíduos expostos e colocados em período de depuração por 10 dias verifica-se a presença de necroses, vacúolos e células de defesa no tecido (FIGURA 08).

FIGURA 04: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM BRANQUIAS DE *Salvelinus alpinus* – GRUPO CONTROLE.



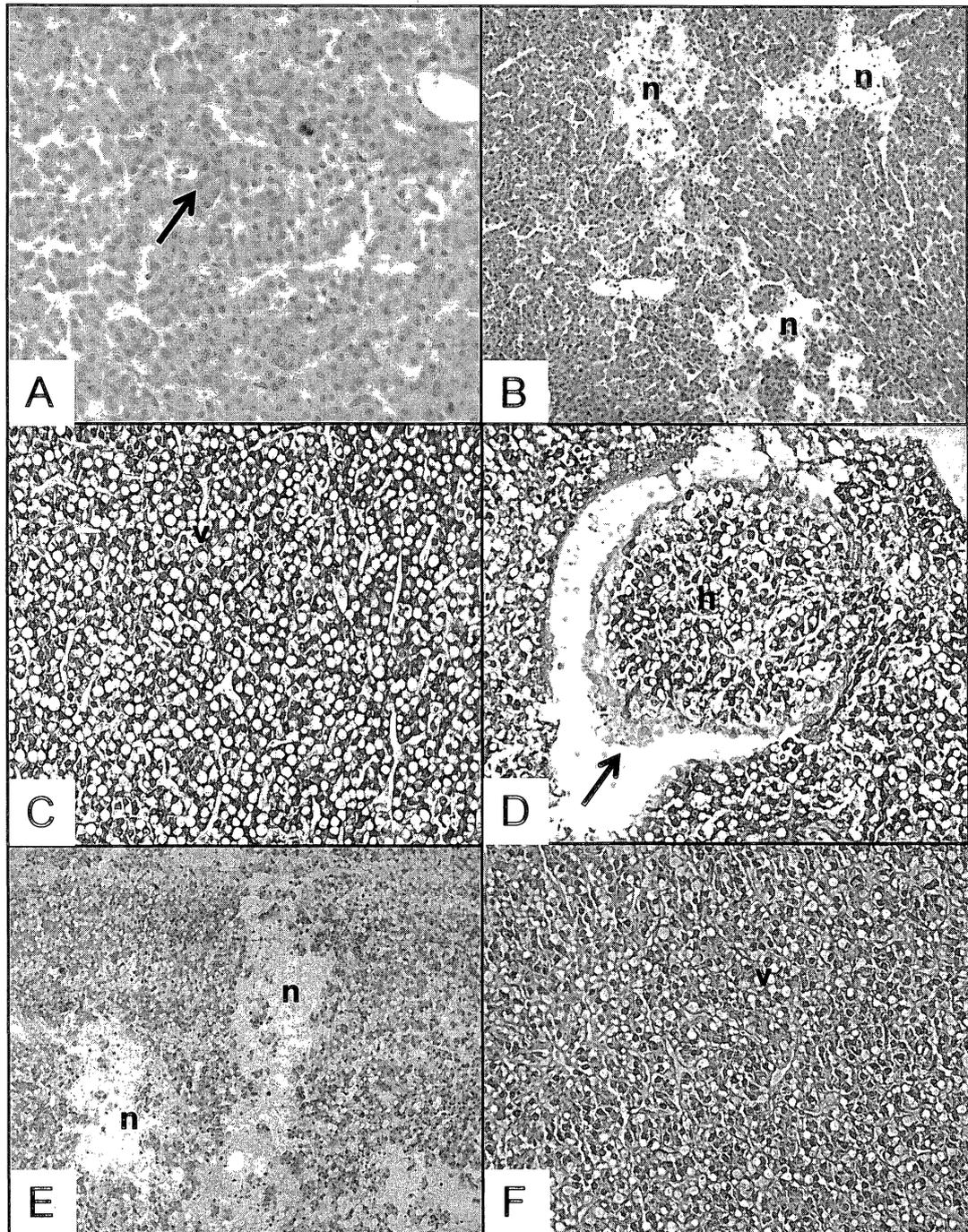
Cortes histológicos do tecido branquial de *Salvelinus alpinus* corados com H&E– indivíduos controle - sacrificados no 10º dia de recuperação do experimento. LP = lamela primária; LS = lamela secundária; h = hiperplasia; e = eritrócitos. "A" estrutura padrão da brânquia apresentando lamelas primárias (LP) e lamelas secundárias (LS) bem definidas, aumento 200x. "B" e "D" apresentam ocorrência de aneurismas no ápice das lamelas secundárias (setas escuras), aumento 200x. "C", "E" e "F" apresentam quadros de hiperplasia na região das lamelas secundárias (h), com fusão dessas lamelas no local (seta branca), aumento 100x.

FIGURA 05: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM BRANQUIAS DE *Salvelinus alpinus* – GRUPO EXPOSTO À FRAÇÃO SOLÚVEL DE PETRÓLEO (FSA).



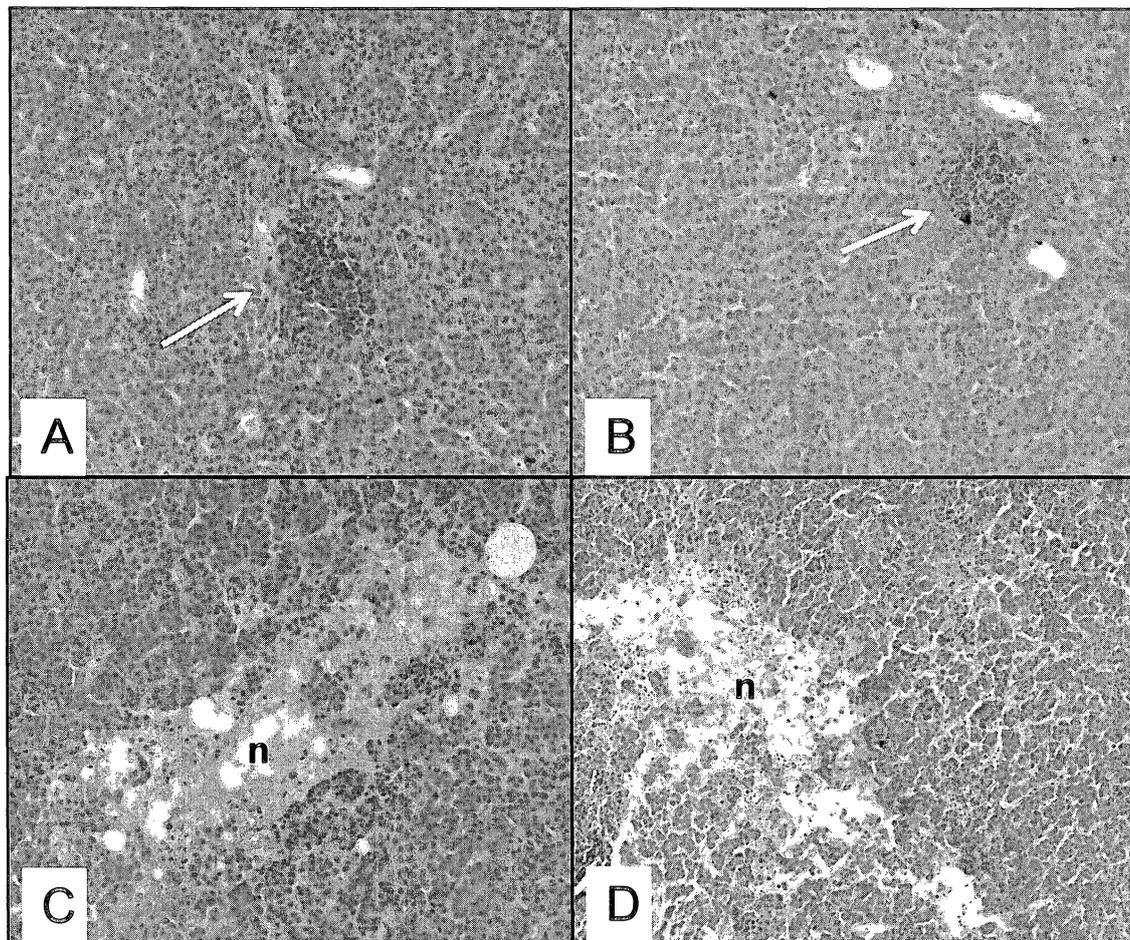
Cortes histológicos do tecido branquial de *Salvelinus alpinus* sacrificados no 10º dia de recuperação, após exposição ao contaminante FSA (imagens “A”, “B”, “C” e “D”). E de indivíduos sacrificados com 96h de exposição a FSA (imagens “E” e “F”). LP = lamela primária; LS = lamela secundária; h = hiperplasia; e = eritrócitos. “A”, “C” e “F” apresentam quadros de hiperplasia na região das lamelas secundárias (h), com fusão dessas lamelas no local (seta branca), imagens com aumento 100x. “B” apresenta quadro de hiperplasia moderada (h), aumento 200x. Em “D” o círculo indica fusão das lamelas respiratórias, aumento de 100x. Em “E” ocorrência de aneurismas no ápice das lamelas secundárias (setas escuras), aumento 200x. Coloração H&E.

FIGURA 06: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM FÍGADO DE *Salvelinus alpinus* - GRUPO CONTROLE.



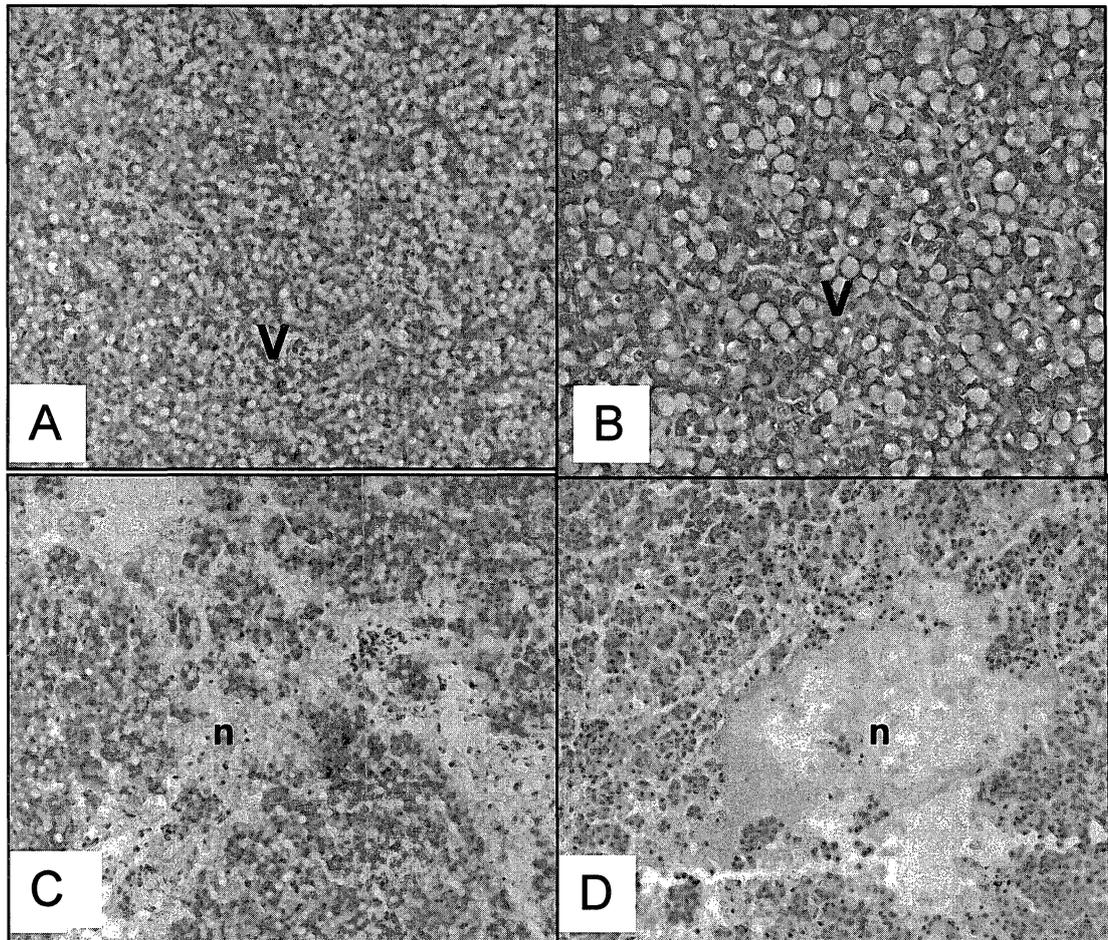
Cortes histológicos do tecido hepático de *Salvelinus alpinus* – indivíduos controle - sacrificados 96h e no 10º dia de recuperação do experimento. "A" apresenta a estrutura padrão, sem nenhuma alteração, do tecido hepático. A seta indica o hepatócito, aumento 100x. Em "B" e "E" é evidenciado a presença de focos de necrose (n), aumento 200x. "D" a seta indica presença de hiperplasia (h), aumento 100x. Em "C" e "F" há vacuolização celular (v), aumento 200x. "A", "B", "C" e "D" controles do 10º dia de depuração e "E" e "F" controles de 96h de exposição. Coloração H&E.

FIGURA 07: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM FÍGADO DE *Salvelinus alpinus* - GRUPO EXPOSTO A FSA – 96h.



Cortes histológicos do tecido hepático de *Salvelinus alpinus* sacrificados após 96h de exposição ao contaminante FSA. "A" e "B" apresentam infiltração leucocitária no tecido, aumento 100x. "C" e "D" apresentam focos de necrose (n), aumento 100x. Coloração H&E.

FIGURA 08: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM FÍGADO DE *Salvelinus alpinus* - GRUPO EXPOSTOS A FSA. SEGUIDO DE DEPURAÇÃO.



Cortes histológicos do tecido hepático de *Salvelinus alpinus* sacrificados no 10º dia de recuperação, após exposição ao contaminante FSA. "A" e "B" apresentam tecido bastante vacuolizado, (v) = vacúolos, aumento de 100x e 200x, respectivamente. Em "C" e "D" evidências de focos de necrose (n) no fígado desses animais, aumento 100x. Coloração H&E.

## 5. DISCUSSÃO

Em áreas poluídas a exposição de peixes aos xenobióticos promove interações entre esses componentes químicos e os sistemas biológicos, podendo apresentar como consequência distúrbios bioquímicos e morfológicos (GUL *et al.*, 2004). Análises de impacto de poluentes em peixes a nível celular e bioquímico tem se mostrado uma alternativa para esses estudos.

No trabalho de SILVA (2006) foi realizada uma avaliação dos efeitos da água do Rio Barigui e do afluente Arroio Saldanha na espécie *Astyanax* sp. Os indivíduos utilizados nos estudos do autor são os mesmos utilizados para a quantificação de HPA's na bile do presente trabalho.

A água utilizada nos bioensaios passou por uma análise química, avaliando-se a presença de HPA's e hidrocarbonetos totais, metais pesados e surfactantes, essa análise foi realizada nas dependências do Instituto Ambiental do Paraná (IAP). Como resultados foram encontrados na água do Arroio Saldanha, HPA's como o fluoreno e o criseno, compostos estes provenientes de fonte de petróleo. Ocorreu ainda a presença de substâncias surfactantes e de metais potencialmente tóxicos, por exemplo, o mercúrio (Hg). O metal pesado Hg era um dos metais existentes no óleo cru derramado no acidente. Este não foi encontrado à montante da área de estudo, o que indica que tal contaminante é proveniente do desastre ocorrido. O composto benzo(k)fluoranteno foi encontrado a montante do Rio Barigui e o benzo(b)fluoranteno a jusante (SILVA, 2006).

Por meios de análises fluorimétricas foi detectada a presença dos seis tipos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na bile da espécie *Astyanax* sp. exposta a água proveniente dos locais próximos ao acidente da refinaria Getúlio Vargas – PR. Verificou-se que os valores de fluorescência convertidos a ug/ml (microgramas do HPA por mililitro de amostra de bile) apresentaram taxas mais elevadas na faixa do comprimento de onda que detecta compostos que possuem 5 anéis aromáticos, ou seja, na região dos comprimentos de onda de excitação e emissão 364/406nm. Essa composição corresponde ao grupo dos benzo-pirenos. Pertencente a esse grupo está o benzo(a)pireno, substância comprovadamente carcinogênica. Como anteriormente citado, na análise química da água dos dois pontos do Rio Barigui foram encontradas as substâncias benzo(k)fluoranteno e benzo(b)fluoranteno, estas que pertencem ao grupo de moléculas benzênicas que contém 5 anéis em sua composição e que provavelmente foram os compostos detectados pela análise de fluorescência. Tais substâncias possuem um forte potencial carcinogênico. Os compostos com 6 anéis foram detectados em baixíssimas quantidades e em apenas algumas das amostras

estudadas. Moléculas contendo 2, 3 e 4 anéis foram detectadas tanto no ensaio com a água do Arroio Saldanha quanto nos ensaios com a água do Rio Barigui (montante e jusante).

Ao compararmos as médias dos HPA's totais observamos que as maiores taxas de concentração desses compostos benzênicos foram encontradas no Rio Barigui, à jusante do local do vazamento. Os valores foram expressos em ug de HPA/mg de proteína presente na bile. À montante, taxas menores também foram encontradas, nos indicando que apesar do acidente não ter atingido essa região, tal área deve estar sofrendo com o impacto antrópico, uma vez que se trata de um rio que corta a cidade de Curitiba e sofre os impactos da atividade humana e industrial adjacente, como postos de gasolina e oficinas de veículos automotivos.

Os maiores valores à jusante do Rio Barigui indicam que toda a carga de poluentes já existente no Rio Barigui foi somada aos contaminantes provindos do acidente, carregados pelo afluente Arroio Saldanha desde o local do desastre até o leito do Rio Barigui. O ponto de coleta à jusante é um local que condensa as duas fontes de contaminação.

Quando comparados ao controle, a média dos HPA's totais mostra-se significativa, evidenciando que nos pontos de coleta da água para a realização dos ensaios há indícios de contaminação por HPA's.

No trabalho de FRANÇA (2005), foram detectados através de análises fluorimétricas, a presença de importantes HPA's na bile dos espécimes de *Atherinella brasiliensis* como: naftaleno, fenantreno, pireno e benzo(a)pireno, substâncias essas que são derivados de petróleo e que, provavelmente, encontravam-se no local devido ao acidente do petroleiro Vicuña ocorrido em 2004.

A contaminação de ecossistemas aquáticos com petróleo cru ou seus derivados pode alterar significativamente a dinâmica do local, uma vez que xenobióticos presentes na água tornam-se disponíveis para os peixes e outros organismos aquáticos. A solubilidade dos hidrocarbonetos de petróleo na água depende da polaridade de suas moléculas, sendo que os hidrocarbonetos aromáticos são mais solúveis em água em relação aos hidrocarbonetos parafínicos com o mesmo número de átomos de carbono (PEDROZO *et al.*, 2002).

O criseno, um dos compostos encontrados na análise química da água do Arroio Saldanha, é um composto policíclico aromático que contém quatro anéis benzênicos condensados em sua estrutura química. Trata-se de uma substância tóxica, assim como a maioria dos compostos que contém de 4 a 5 anéis em sua composição, altamente lipofílica, ou seja, possui grande afinidade por membranas biológicas. Este composto é um dos constituintes da complexa mistura de HPA's

existente no óleo cru e apresenta propriedades carcinogênicas, assim como, alguns de seus homólogos metilados. É rapidamente adsorvido à matéria orgânica e inorgânica, depositando-se na grande maioria das vezes no sedimento de fundo do ambiente aquático, porém pode estar presente também na coluna d'água. Sua incorporação em organismos aquáticos, como os peixes, ocorre principalmente através do tecido branquial (JONSSON *et al.*, 2004).

Os HPA's, de forma geral, depois de absorvidos são eficientemente metabolizados nos vertebrados por enzimas, as quais aumentam a solubilidade desses compostos à água permitindo sua excreção. Isso explica porque os HPA's não se acumulam em muitos organismos, e porque as concentrações de HPA's nos tecidos são pobres indicadores das concentrações ambientais e de exposição (HURK *et al.*, 2006). Após metabolizados, esses compostos encontram-se concentrados e são excretados via bile. A vesícula biliar é a maior rota de excreção de HPA's em peixes. Como resultado, a análise dos metabólitos na bile de peixes constitui um método bastante sensível para avaliação de exposição aos HPA's (AAS *et al.*, 1998; JONSSON *et al.*, 2004).

Análises de metabólitos na bile de *Cyprinodum variegatus* expostos ao criseno, *Pleuronectes platessa* exposto a óleo cru e *Platichthys flesus* expostos ao sedimento contaminado por HPA's apresentaram sinais de fluorescência desses compostos e de seus metabólitos nas amostras de bile analisadas (JONSSON *et al.*, 2004).

CAMUS *et al.* (1998), detectou metabólitos de HPA's em *Scophthalmus maximus* expostos durante três semanas ao óleo cru. Foi detectada a presença de tais metabólitos após 24h de exposição, com aumento significativo até quatro dias de exposição (CAMUS *et al.* 1998). A detecção de metabólitos de HPA's em bile através da fluorescência fixa (FF) é um método sensível e semi-quantitativo para determinar uma possível exposição a esses agentes contaminantes (AAS *et al.*, 1998). Esse método de avaliação pode servir como um biomarcador complementar em estudos de exposição crônica de concentrações subletais ao óleo cru (CAMUS *et al.*, 1998).

No estudo de ARIESE *et al.* (1993), foram encontrados metabólitos de HPA's, principalmente, pireno nas amostras de bile analisadas através da fluorescência desses compostos em *Ameiurus nebulosus* contaminados por benzo(a)pireno. HURK *et al.* (2006-b) verificou que a injeção de benzo(a)pireno em *Ictalurus punctatus* causou um notável aumento na fluorescência da bile.

Os HPA's podem ser absorvidos pelo organismo por meio da ingestão, difusão pela superfície ou por troca gasosa. Depois de adsorvidas pelo peixe, as moléculas

desses compostos são biotransformadas em metabólitos polares que serão excretados com maior eficiência (HAUGLAND et al., 2005).

A Fluorescência Fixa (FF) é um método utilizado para estimar concentrações de metabólitos de HPA's em amostras de bile diluída. Trata-se de um método rápido, bastante simples e com baixo custo de análise, o que permite fazer uma avaliação com um grande número de amostras (AAS et al., 1998). Em seu estudo INZUNZA et al. (2006), expôs espécimes de *Oncorhynchus mykiss* ao sedimento retirado do Rio Biobio - Chile, que tem se mostrado receptor de efluentes urbanos e industriais, e verificou a presença de metabólitos de HPA's na bile em relação ao seu controle. Seu trabalho mostrou uma relação direta entre a fluorescência na bile e a concentração de HPA's encontrada no sedimento. FF mostrou-se um bom biomarcador para esse tipo de contaminação e pode ser usado como complemento para as análises biológicas e químicas em programas de biomonitoramento (INZUNZA et al., 2006).

Pouco se sabe sobre os mecanismos de regulação da excreção de proteínas na bile. Em mamíferos, aproximadamente 80% da proteína presente na bile é derivada do soro. Existe a possibilidade de que altos níveis de estresse químico e danos celulares no fígado e nos ductos biliares proporcionem um aumento nos níveis de proteína na bile, porém ainda são especulações (HURK et al., 2006-b). HURK et al. (2006-b) recomenda a normalização da fluorescência biliar de acordo com os níveis de proteínas existentes na bile. No trabalho de PADRÓS et al. (2003), foram detectados metabólitos de benzo(a)pireno na bile de *Salvelinus alpinus*, através do método de fluorescência fixa (FF) e expressando o resultado em micrograma do contaminante pelo quantidade de proteína presente na bile em miligramas (ug/mg). A presença dos metabólitos do benzo(a)pireno foi detectada na bile 8 dias após a injeção do contaminante. O benzo(a)pireno é rapidamente metabolizado pelo fígado de peixes e por esse motivo sua presença em outros tecidos apresenta níveis muito baixos ou, às vezes, não detectável PADRÓS et al. (2003).

Alguns autores recomendam a normalização da bile por volume de amostra, porém o volume de bile presente na vesícula biliar em peixes é dependente de seu "status" nutricional. A bile é produzida de forma contínua pelo fígado e fica estocada na vesícula biliar sendo que nos momentos de refeições os sais biliares são lançados para o intestino para haver a solubilização dos lipídios da dieta (HURK et al., 2006-a). Neste experimento, no entanto, o estado nutricional foi um dos parâmetros controlados, uma vez que os animais não foram alimentados nas 96h de experimentação. A padronização do sinal de fluorescência pela quantidade de proteína existente diminui o erro nos dados analisados, pois, essa medida servirá como

controle para a diferença de densidade da bile, existente entre os diferentes grupos (AAS *et al.* 1998).

Nos espécimes de *Astyanax* sp., estudados por SILVA (2006), expostos à água coletada no Arroio Saldanha e no Rio Barigui, foram realizadas análises histopatológicas em dois órgãos-alvo: fígado e brânquias. No tecido branquial foram encontradas lesões do tipo aneurisma, fusão das lamelas secundárias, hipertrofia e necrose. Nas avaliações do tecido hepático observou-se a presença de centros de melanomacrófagos, melanomacrófagos livres, infiltração leucocitária e necrose. Tais alterações em ambos os tecidos analisados ocorreram tanto no Arroio Saldanha, assim como a montante e à jusante do Rio Barigui. Esse dado nos indica que os três pontos de coleta encontram-se impactados por algum tipo de substância xenobiótica e, isso se deve, provavelmente, a grande atividade industrial de diversos segmentos naquela região, o que compromete ainda mais a qualidade da água (SILVA, 2006).

Em peixes, as brânquias, assim como a pele, são os primeiros órgãos a serem atingidos em casos de poluição aquática, pois, exibem uma ampla superfície que se encontra em contato direto e permanente com potenciais agentes tóxicos, sendo o principal órgão atingido por contaminação hídrica. Entretanto, ambos os órgãos possuem células produtoras de muco, o que garante uma proteção primária contra patógenos e substâncias tóxicas (BERNET *et al.*, 1999). A presença de poluentes no ambiente aquático pode interferir na funcionalidade do tecido branquial causando alterações na via respiratória e no equilíbrio iônico dos peixes (VAN DEN HEUVEL *et al.*, 2000). As brânquias são responsáveis por variadas funções nos peixes, tais como, trocas gasosas, osmorregulação, excreção de produtos nitrogenados e balanço ácido-base, portanto, se este órgão for comprometido, a saúde do organismo estará em risco (CENGIZ & UNLU, 2005).

No presente estudo foram encontrados lesões do tipo aneurisma e focos hiperplásicos no tecido branquial da espécie *Salvelinus alpinus*, exposta à fração solúvel de petróleo (FSA). Para BERNET *et al.*, (1999), aneurismas são distúrbios circulatórios caracterizados por dilatações encontradas nos vasos sanguíneos arteriais. Esse tipo de lesão recebe fator de importância de grau 1, ou seja, a lesão é facilmente reversível quando a exposição do animal aos xenobióticos é interrompida, indicando um efeito agudo do contaminante. A relevância do fator de importância da alteração é dependente da importância patológica da lesão, ou seja, de que maneira essa alteração poderá afetar a funcionalidade do órgão e a habilidade de sobrevivência do indivíduo (BERNET *et al.*, 1999).

Em seu trabalho, VAN DEN HEUVEL *et al.* (2000), encontrou um grande número de aneurismas em brânquias de *Perca flavescens* expostos a óleo, de uma mistura caracterizada por alta salinidade, presença de ácidos naftênicos (ácidos carboxílicos) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's). A freqüência dessa lesão mostrou-se intimamente ligada ao gradiente de exposição ao contaminante. A presença de aneurismas no tecido branquial pode estar relacionada à morte das células pilares que são responsáveis pela sustentação da lamela. Na ausência dessas células, a integridade estrutural da lamela é rompida, dando passagem a uma grande quantidade de células sanguíneas que empurram o epitélio lamelar, dilatando-o (VAN DEN HEUVEL *et al.*, 2000; CENGIZ & UNLU, 2005).

A ocorrência de aneurismas em brânquias pode estar associada a exposição à determinados contaminantes, incluindo o petróleo (SPIES *et al.*, 1996). Isso pode estar relacionado com a enzima responsável pelo metabolismo dos HPA's, P4501A, que já foi localizada nas células pilares branquiais, portanto, ela pode nos indicar que as células pilares são particularmente sensíveis aos HPA's presentes no óleo em mistura com a água (VAN DEN HEUVEL *et al.*, 2000). Porém, no presente trabalho foram encontrados aneurismas também nos indivíduos controle, o que não proporciona a garantia de que a alteração encontrada foi decorrente da exposição a FSA.

*Salvelinus alpinus* contaminados com metil-mercúrio e mercúrio inorgânico apresentaram descolamento de epitélio, vacuolização das células epiteliais, edemas, assim como a desintegração do sistema de células pilares, induzindo a uma expansão do vaso, resultando no acúmulo de células sanguíneas dando origem aos aneurismas (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002). Observa-se, portanto, que a nossa espécie em estudo é sensível a diferentes contaminantes, podendo apresentar o mesmo tipo de lesão em resposta a diferentes agentes estressores.

Brânquias de peixes da espécie *Atherinella brasiliensis* coletados na Baía de Paranaguá-PR, após o acidente ocorrido com o petroleiro Vicuña, apresentaram um forte índice de aneurismas, presença de hiperplasia e ectoparasitos (MASCHIO, 2006). Esse acidente provocou o derramamento de milhões de litros de metanol, óleo tipo "bunker" e óleo diesel no local.

Hiperplasia, segundo BERNET *et al.* (1999), é uma lesão do tipo progressiva, pois, proporciona um acréscimo na atividade das células e/ou tecidos. Essa é uma alteração onde o tecido ou órgão sofre um aumento de tamanho ocasionado pelo aumento na quantidade de células, não havendo alteração de volume. Essa lesão recebe fator de importância de grau 2, ou seja, trata-se de uma patologia moderada, em que a alteração é reversível em muitos casos, se o agente tóxico for neutralizado.

Foram encontrados focos hiperplásicos tanto nos indivíduos controle como nos indivíduos expostos ao contaminante. A lesão esteve presente nos dois grupos experimentais (expostos por 96h e após 10 dias de recuperação). O fato das alterações terem aparecido em ambos os grupos, pode estar correlacionada a presença de algum outro agente estressor além da presença do petróleo.

Focos hiperplásicos foram registrados em brânquias de *Perca flavescens* que estiveram em contato com água contaminada com derivados de petróleo como ácidos naftênicos e HPA's. Essa espécie apresentou proliferação das células epiteliais na base das lamelas secundárias, assim como das células produtoras de muco e células de cloreto, essas últimas responsáveis pelo transporte ativo de íons na superfície do órgão (NERO *et al.*, 2006; VAN DEN HEUVEL *et al.*, 2000). Além disso, focos necróticos e fusão das lamelas secundárias também foram evidenciados (NERO *et al.*, 2006). Exemplares de *Carassius auratus* expostos ao mesmo tipo de contaminantes apresentaram necrose, alterações inflamatórias (edema) e desorganização nos filamentos do arco branquial (NERO *et al.*, 2006). A hiperplasia no tecido hepático é uma resposta adaptativa lenta, dependente do nível de contaminação da água (GUL *et al.*, 2004).

NERO *et al.* (2005), ao estudar os efeitos dos ácidos naftênicos (derivados de petróleo) em brânquias de *Perca flavescens* observou que este contaminante provoca proliferação das células de cloreto, epiteliais e mucosas causando quadros severos de hiperplasia. Lesões do tipo proliferativas foram encontradas com maior frequência em seu estudo. Ao contaminar os organismos com os derivados de petróleo verificaram-se as mesmas alterações, porém, com aumento na proliferação das células de muco. Esse fator pode implicar numa redução nas taxa de entrada do xenobiótico no organismo, uma vez que o muco contém elevados níveis de açúcares e proteínas que agem no potencial elétrico da membrana da célula. É possível que essa resposta proliferativa possa reduzir a permeabilidade dos ácidos naftênicos no tecido branquial (NERO *et al.*, 2005).

A presença de hiperplasias pode ser considerada como um mecanismo de defesa do animal, uma vez que este diminui a superfície respiratória, mas, ao mesmo tempo, aumenta a distância entre o agente tóxico externo e a corrente sanguínea, dificultando sua difusão pelo organismo (CENGIZ & UNLU, 2005), porém, se ocorrer em grandes proporções, promoverá grande dificuldade na realização das trocas gasosas, podendo gerar condições de hipóxia (NERO *et al.*, 2006). Muitos HPA's são tóxicos e a exposição a este grupo de compostos tem sido identificada como um fator de risco favorecendo o desenvolvimento de lesões hepáticas em peixes.

O fígado é um dos órgãos responsável pelo metabolismo e pela excreção de xenobióticos (BERNET *et al.*, 1999). No presente estudo, o tecido hepático da espécie *Salvelinus alpinus* evidenciou a presença de necrose e a ocorrência de infiltração leucocitária, além da presença de vacuolização do tecido em vários dos indivíduos analisados.

Para BERNET *et al.* (1999), necrose é uma alteração regressiva, de fator de importância 3, ou seja, uma lesão irreversível que pode danificar total ou parcialmente a função do órgão atingido. A necrose é uma consequência de um conjunto de distúrbios causados por substâncias tóxicas como inibição enzimática, alteração na membrana celular, distúrbios na síntese de proteínas e no metabolismo de carboidratos. A ocorrência de necrose no fígado sugere a presença de xenobióticos, provavelmente, decorrente do papel na biotransformação desempenhada por esse órgão. As alterações encontradas no fígado podem comprometer o funcionamento desse órgão e, conseqüentemente, prejudicar a saúde dos indivíduos (SILVA, 2006).

A exposição a contaminantes parece diminuir a resistência imunológica dos indivíduos tornando-os mais susceptíveis aos agentes estressores (VAN DEN HEUVEL *et al.*, 2000). Nesse trabalho foram encontrados focos necróticos e ocorrência de infiltração leucocitária, assim como foi encontrado por SPIES *et al.* (1996), ao analisar o tecido hepático de peixes provindos de áreas contaminadas por petróleo. NERO *et al.* (2006) avaliou, através da histopatologia, o fígado da espécie *Perca flavescens* exposto a ácidos naftênicos, metais e HPA's oriundos da extração de betume e verificou inflamações severas no órgão analisado. A ocorrência de infiltração leucocitária e/ou inflamações podem ser ferramentas importantes na avaliação da qualidade dos recursos hídricos, por exemplo, em casos de acidentes com derramamentos de petróleo e derivados (SILVA, 2006). A infiltração de células de defesa no tecido atingido é uma resposta do organismo à presença de contaminantes. Geralmente, são encontradas próximas a outras lesões como, por exemplo, focos de necrose. Essas células atravessam as paredes dos vasos sanguíneos e infiltram ao redor do tecido afetado. Recebe grau de importância de número 2, caracterizando um distúrbio moderado e reversível em muitos casos (BERNET *et al.*, 1999).

No estudo realizado por FRANÇA (2005), utilizando o fígado como órgão alvo para análises histopatológicas, foram encontradas diversas alterações morfológicas hepáticas em peixes da espécie *Atherinella brasiliensis*, provenientes da Baía de Paranaguá-PR coletados após o acidente com o navio *Vicuña* em 2004. Centros de melano-macrófagos, infiltração leucocitária e eritrocitária, incidência de necroses, ocorrência de neoplasias e hiperplasias, presença de endoparasitos e vacuolização foram verificadas nesse material de estudo. No presente trabalho também foram

encontrados indivíduos apresentando hiperplasia no tecido hepático. Trata-se de uma lesão progressiva, de importância 2, caracterizando-se por apresentar um aumento no número de células existentes, não havendo alteração no tamanho destas (BERNET *et al.*, 1999).

O fígado completamente vacuolizado pode indicar saturação de compostos lipossolúveis presentes na água e o órgão passa a acumular essas substâncias em vacúolos citoplasmáticos na tentativa de reduzir a concentração desses xenobióticos na circulação e em outros tecidos (FRANÇA, 2005). Células do hepatopâncreas respondem ao estímulo tóxico havendo a formação de vacúolos. Desse modo, a vacuolização identificada nesse estudo pode indicar uma resposta do organismo à exposição aos compostos químicos presentes na Fração Solúvel do Petróleo, evidenciando que esses contaminantes estão trazendo danos a nível celular nesses indivíduos.

## 6. CONCLUSÕES

- Na avaliação química de HPA's na bile de *Astyanax* sp. os três pontos de coleta de água analisados apresentaram concentrações de HPA's nos locais, indicando que tais ambientes estão impactados também por outras fontes poluentes além da carga derramada durante o acidente no Arroio Saldanha.
- O ponto localizado a jusante do acidente apresentou maiores concentrações desses compostos, podendo indicar que houve um somatório das cargas poluentes já existentes no Rio Barigui com a carga provinda do acidente em seu afluente Arroio Saldanha.
- Com os estudos de bioensaios com *Astyanax* sp. verificou-se que o acúmulo de óleo ainda remanescente do acidente em 2000 no Arroio Saldanha ainda contribui com a poluição do Rio Barigui por estes contaminantes.
- Na avaliação histopatológica de fígado e brânquias de *Salvelinus alpinus* expostos a FSA encontramos lesões em iguais proporções tanto no grupo exposto quanto no controle, nos indicando que os indivíduos utilizados para o ensaio sofreram com algum outro tipo de agente estressor antes do experimento, não podendo atribuir a presença das alterações morfológicas à presença de FSA na água dos bioensaios.

## 7. REFERÊNCIAS

AAS, E.; BEYER, J.; GOKSOYR, A. **PAH in fish bile detect by fixed wavelength fluorescence.** Marine Environmental Research. V.46, n°1-5, p.225-228. 1998.

AAS, E.; BEYER, J.; GOKSOYR, A. **Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation.** Biomarkers, v.5, n°1, p.9-23. 2000.

ADAMS, S.M. **Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish.** Am. Fish Soc. Symp., 8:1-8. 1990.

ADAMS, M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem stress.** American Fisheries Society Bethesda, Maryland. 2002.

ANDERSON, J.W.; NEFF, H. M **Characteristics of dispersion and water-soluble extracts of crude and refined oil and their toxicity to estuarine crustaceans and fish.** Marine Biology v 27, p. 75-78, 1974.

AKAISHI, F. M. **Aplicação de biomarcadores de contaminação ambiental em estudos de laboratório e monitoramento em campo.** Tese (mestrado em morfologia na área de Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

AKAISHI, F. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; JAKOBI, S. C. G.; STJEAN, S.; COUTERNAY, S. C.; LIMA, E.; WAGNER, A. L. R.; SCOFIELD, A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. **Morphological and neurotoxic findings in tropical freshwater fish (*Astyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil.** New York: Archives Environmental Contamination and Toxicology. V.46, p.244-253. 2004.

ARIESE, F.; KOK, S.J.; VERKAIK, M.; GOOIJER, C.; VELTHORST, N.H.; HOFSTRAAT, J.W. **Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure.** Aquatic toxicology. V.26, p.273-286. 1993.

BAINY, A. C. D. **How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments.** *Ciência e Cultura* 45, 10-11. 1993.

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

BRADFORD, 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.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, S. & VIARENGO, A. **The use of biomarkers to asses the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach.** *The Science of Total Environment*. v. 247, p. 295-311. 2000.

CALOW, P. **Handbook of ecotoxicolgy.** London: Oxford, v. 1. 478p. 1993.

CAMUS, L.; AAS, E.; BORSETH, J.F. **Ethoxyresorufin-O-deethylase activity and fixed wavelength fluorescence detection of PAH's metabolites in bile in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) Exposed to a Dispersed Topped Crude Oil in a Continuous Flow System.** *Marine Environmental Research*. V.46, n°1-5, p.29-32. 1998.

CENGIZ, E. I.; UNLU, E. **Sublethal effects of commercial deltametrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2005 (*in press*).

COLLIER, T. K.; JOHNSON, L. L.; STEHR, C. M.; MYERS, M. S. & STEIN, J. E. **A comprehensive assessment of the impacts of contaminants on fish from an urban waterway.** *Marine Environmental Research*. v. 46, p. 243-247. 1998.

FENIANOS, E. **Almanaque kur-yt-yba.** Ed. Univer cidade. Curitiba, 160p. 2003.

FRANÇA, P. P. **Uso de biomarcadores na avaliação do impacto do acidente do navio Vicuña/ 2004 na Baía de Paranaguá – Pr: Análises preliminares.** Monografia

apresentada ao Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2005.

GUILLOUSO, A.; MOREL, F.; RATANASAVANH, D.; CHESNE, C.; GUGUEN-GUILLOUSO, C. **Long-term culture of functional hepatocytes**. Toxic in vitro. n°4, v.4/5, p.415-427. 1990.

GUL, S.; BELGE-KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; SAHAN, A.; DORAN, F. **Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey**. Environment International. V.30, p.605-609. 2004.

HAUGLAND, C.; UGLAND, K. I.; BORSETH, J. F.; AAS, E. **Polycyclic aromatic hydrocarbons in capelin (*Mallotus villosus*) in the Barents Sea by use of fixed wavelength fluorescence measurements of bile samples**. Baseline / Marine Pollution Bulletin. V.50, p.95-104. 2005.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. 2ªed. Boca Raton: CRC, 1995.

HSU, T. & DENG, F. **Studies on the susceptibility of various organs of zebrafish (*Brachydanio rerio*) to benzo(a)pyrene-induced DNA adduct formation**. Chemosphere. v. 33, n. 10, p. 1975-1980. 1996.

HURK, P. (a) **Bile fluorescence, heme oxygenase induction, and increased biliverdin excretion by mixtures of environmental toxicants**. Aquatic Toxicology, v.77, p.202-209. 2006.

HURK, P. (b) **Heme oxygenase induction and biliverdin excretion: Implications for the bile fluorescence biomarker**. Marine Environmental Research, Short Communication. V.62, p. S16-S19. 2006.

INZUNZA, B.; ORREGO, R.; PEÑALOSA, M.; GAVILÁN, J.; BARRA, R. **Analysis of CYP4501A1, PAH's metabolites in bile, and genotoxic damage in *Oncorhynchus mykiss* exposed to Biobío River sediments, Central Chile**. Ecotoxicology and Environmental Safety. V.65, p.242-251. 2006.

JONSSON, G.; SUNDT, R.C.; AAS, E.; BEYER, J. **An evaluation of two fluorescence screening methods for the determination of chrysene metabolites in fish bile.** Chemosphere. V.56, p.81-90. 2004.

KARR, J. R., FAUSCH, K. D., ANGERMIER, P. L., YANT, P.R. & SCHLOSSER, I. J., **Assessing biological integrity in running waters, a method and its rationale.** III. Nat. Hist. Surv. Spec. Public. 5., Urbana, IL., USA, 28p. 1986.

KLASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Toxicologia: A ciencia básica dos tóxicos de Casareth & Doull's.** CASTRO, M.; COUTO, F. S.; MIL-HOMENS, R.; RICO, T. M. T.; MARTINS, F. [Trad.]. 5ª ed. Portugal: Mc Graw-hil de Portugal, 2001.

KATSUMITI, A. K. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do impacto do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce.** Dissertação de mestrado na área de Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MACKAY, D., SHIU, W.Y. Aqueous solubility of weathered northern crude oil. **Bulletin Environment Contamination Toxicology**, v 15, p. 01-109, 1976.

MARSILI, L.; FOSSI, M. C.; CASINI, S.; SAVELLI, C.; JIMENEZ, B.; JUNIN, M.; CASTELLO, H. **Fingerprint of polycyclic aromatic hydrocarbons in two populations of southern sea lions (*Otaria flavescens*).** Chemosphere, v.34, n°4, p.759-770. 1997.

MASCHIO, J. **Análise histopatológica de brânquias de *Atherinella brasiliensis* da Baía de Paranaguá-PR após o acidente ocorrido com o navio chileno Vicuña em 2004 e análise enzimática da  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALAd) em quatro tecidos distintos de *Hoplias malabaricus*.** Relatório referente ao Programa de Iniciação Científica PIBIC-CNPQ, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MENICONI, M.F.G.; GABARDO, I.T.; CARNEIRO, M.E.R.; BARBANTI, S.M.; SILVA, C.G.; MASSONE, C.G. **Brazilian oil spills chemical characterization – case studies.** Environmental Forensics. V.3, p.303-321. 2002.

NEFF, H. M. **Polycyclic aromatic hidrocarbons in the aquatic environment sources, fates and biological effects.** Applied Science Publisher Ltd. Essex UK, 1978.

NERO, V.; FARWELL, A.; LEE, L. E. J.; VAN MEER, T.; MACKINNON, M. D.; DIXON, D. G. **The effects of salinity on naphthenic acid toxicity to yellow perch: Gill and liver histopathology.** Ecotoxicology and Environment Safety, 2005 (in press).

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

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; BELGER, L.; PELLETIER, É.; ROULEAU, C. **Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*).** Environmental Research. V.90, p.217-225, 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. **Bioacumulation and the effects of organoclorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the carmague Nature Reserve, France.** Aquatic Toxicology. V.74, p.53-69. 2005.

PADRÓS, J.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. **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, p.45-55. 2003.

PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SCHNEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. **Ecotoxicologia e avaliação do risco do petróleo.** Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 2002.

PRASAD, M. S. **SEM study on the effects of crude oil on the gills and airbreathing organs of climbing perch *Anabas testudineus*.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. v.47, p. 882-889. 1991.

RUDDOCK, P. J.; BIRD, D. J.; McEVOY, J.; PETERS, L. D. **Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries.** The Science of the Total Environment. V.301, p.105-117. 2003.

SAEED, T. & MUTAIRI, M. A. **Chemical Composition of the Water Soluble Fraction of Leaded Gasolines in SeaWater.** Environment International, 25, 117-129. 1999.

SHUGART, L. R.; McCARTHY, J. F. & HALBROOK, R. S. **Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview.** Risk. Anal. v. 12, p. 353-360. 1992.

SILVA, C. A. R.; RAINBOW, P. S.; SMITH, B. D. & SANTOSZ, L. **Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source.** Water Research. v. 35 n. 17 pp. 4072-4078. 2001.

SILVA, C.A. **Avaliação dos efeitos da água do Rio Barigui e do Afluente Arroio Saldanha em *Astyanax* sp.** Dissertação de mestrado da área de Farmacologia, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SOTO-GALERA, E., DIAZ-PARDO, E., LOPEZ-LOPEZ, E. & LYONS, J. **Fish as indicators of environmental quality in the Rio Lerma Basin, Mexico.** Aquatic Ecosystem Health and Management 1: 267 – 276. 1998.

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

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M. & VAN HELD, P.A.. 1992. **Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect.** In: **Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress.** Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.P. & Bergman, H.L. Eds. Lewis Publishers. p.235-335.

TAKASHIMA, F. & HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features.** 2ªed., New York. 1995.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. United States Office of Emergency. Environmental Protection and Remedial. Oil Program Center. **Understanding oil spills and oil spill response in freshwater environments.** Washington, 1999.

VAN DEN HEUVEL, M. R.; POWER, M.; RICHARDS, J.; MACKINNON, M.; DIXON, D. G. **Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated waters.** Ecological and Environment Safety, v.46. p. 334-341, 2000.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M. & PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology.** Taylor & Francis. Londres. p.321. 1996.

WHITFIELD, A. K. **Fishes and the environmental status of South African estuaries.** Fisheries Management and Ecology 3: p.45-57. 1996.

[www.fishbase.com](http://www.fishbase.com) disponível em 01/12/2006.