

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAIARA VICENTINI

Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino,  
1981 (Diptera: Chironomidae) expostos ao hidrocarboneto benzo[a]pireno

CURITIBA

2014

MAIARA VICENTINI

Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981  
(DIPTERA: CHIRONOMIDAE) expostos ao hidrocarboneto benzo[a]pireno

Monografia apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da  
Silva

CURITIBA

2014

## **AGRADECIMENTOS**

À todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa conquista.

À Deus, por me dar forças e sabedoria para chegar onde cheguei.

À minha família, principalmente aos meus pais. Por serem compreensivos e me apoiarem em todos os momentos difíceis. Devo tudo que sou hoje a vocês.

Ao professor Mário Navarro, por ter me aceitado em seu laboratório, me inserido no mundo da pesquisa e por toda a orientação e compreensão nesses últimos anos.

À todo o pessoal do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, por tornarem o ambiente de trabalho um local de muito divertimento. Meus dias não seriam os mesmos sem vocês. Um agradecimento mais do que especial a Dé e ao Vini, por todo o apoio, amizade e compreensão em todos os momentos e por terem me ensinado boa parte do que sei hoje.

Ao pessoal do laboratório de Toxicologia Ambiental, principalmente a Letícia, e ao professor Maurício Moura, por toda ajuda nos ensaios enzimáticos e nas análises estatísticas.

À Universidade Federal do Paraná e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) por toda estrutura e financiamento concedidos.

E não menos importante, um muito obrigado a todo o pessoal da graduação, sejam eles professores ou colegas de turma, por todos os ensinamentos durante esses últimos anos. Em especial as minhas biozonáticas e biozonáticos, mesmo os que nos abandonaram e estão do outro lado do oceano, e a Regi, por toda a ajuda direta na monografia. Obrigada por todos os almoços divertidos no RU, por todas as gargalhadas durante as aulas, por todos os estudos desesperados na madrugada, por aguentarem meus surtos (que não foram poucos), por me apoiarem nos momentos mais difíceis e sempre se preocuparem comigo. Não teria conseguido chegar até aqui sem vocês.

Maiara

## RESUMO

Cada vez mais a atividade antrópica vem causando efeitos negativos no meio ambiente. Dentre os poluentes que podem ser encontrados, e que tem como principal fonte de produção esta atividade, está o benzo[a]pireno, um hidrocarboneto que tem potencial carcinogênico. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do benzo[a]pireno em larvas de *Chironomus sancticaroli*, através da quantificação das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterases alfa (EST- $\alpha$ ) e beta (EST- $\beta$ ), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), em diferentes períodos de exposição. Os organismos utilizados nos bioensaios de toxicidade foram retirados da colônia do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), mantida em sala de criação sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), fotoperíodo (12h claro/12h escuro) e umidade relativa do ar ( $80 \pm 10\%$ ). Foram estabelecidas para a espécie as concentrações letais, através de bioensaios de toxicidade aguda (96h), sem sedimento e com água desclorada, com concentrações inicialmente aleatórias para se encontrar a faixa gradual de mortalidade. A partir desses dados foram calculadas as concentrações letais (CL), sendo elas a CL<sub>2</sub>, CL<sub>10</sub>, CL<sub>30</sub>, CL<sub>40</sub>, CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub>, CL<sub>95</sub>, CL<sub>98</sub>. Foram selecionadas as concentrações CENO (Concentração de Efeito Não Observado), CL<sub>10</sub>, CL<sub>30</sub> e CL<sub>50</sub>, com valores de 0,47; 2,13; 3,41 e 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$  respectivamente, para a realização dos ensaios de toxicidade aguda, com tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96 h. Desses bioensaios foram retirados organismos para os ensaios enzimáticos da AChE, ESTs, SOD, CAT e quantificação das proteínas totais. Para a enzima AChE, os resultados foram expressos em mmol/mgptn/min, para as esterases em nmol/mgptn/min; para a SOD em U de SOD/mgptn e para a CAT em  $\mu\text{mol/mgptn/min}$ . Foram encontradas diferenças significativas para a AChE, nos tempos de 24 h na CENO; 48 h na CL<sub>10</sub> e CL<sub>50</sub>; e 72 h na CENO; CL<sub>10</sub> e CL<sub>30</sub>. Para a EST- $\alpha$ , nos tempos de 24 h na CENO; 48 h na CL<sub>10</sub>; CL<sub>30</sub> e CL<sub>50</sub>; e 72 h na CL<sub>30</sub>. Para EST- $\beta$ , nos tempos de 48 h na CL<sub>10</sub>; CL<sub>30</sub> e CL<sub>50</sub> e 72 h na CL<sub>10</sub>; CL<sub>30</sub> e CL<sub>50</sub>. Para a SOD nos tempos de 24 h na CL<sub>30</sub>; e 96 h na CL<sub>30</sub> e CL<sub>50</sub>. Para a CAT nos tempos de 48 h na CL<sub>50</sub> e 96 h para CL<sub>30</sub>. Para a AChE e as ESTs, ocorreram casos de redução e aumento; para a CAT somente redução e para a SOD, aumento. Com esses dados, demonstra-se que o benzo[a]pireno tem efeitos neurotóxicos e de estresse oxidativo para a espécie, mesmo em baixas concentrações e em curtos períodos de exposição. Dessa maneira, o composto pode causar comprometimento dos imaturos da espécie, alterando a dinâmica ecológica, uma vez que estes organismos têm importância trófica no meio aquático.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; Enzimas; Hidrocarboneto; Invertebrados.

## ABSTRACT

Increasingly anthropic activity is causing negative effects on the environment. Among the pollutants that can be found, and whose main source of production for this activity, there are benzo[a]pyrene, a hydrocarbon that has carcinogenic potential. The objective of this study was to evaluate the effects of benzo[a] pyrene in *Chironomus sancticaroli* larvae, by quantifying the enzymes acetylcholinesterase (AChE), alpha esterase (EST-  $\alpha$ ) and beta esterase ( $\beta$  - EST), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), at different exposure periods. The organisms used in bioassays of toxicity were from a colony of the Laboratory of Medical and Veterinary Entomology (LEMV) of the Federal University of Paraná (UFPR), kept with the creation room temperature ( $25\pm 2$  °C), photoperiod (12h dark/12h) and relative humidity ( $80\pm 10\%$ ) controlled. First, we determined the species lethal concentrations through bioassays for acute toxicity (96h) without sediment and with unchlorinated water, initially with random concentrations to meet the gradual range of mortality. From these data, the lethal concentrations (LC) were calculated, which were the LC<sub>2</sub>, LC<sub>10</sub>, LC<sub>30</sub>, LC<sub>40</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub>, LC<sub>95</sub> and LC<sub>98</sub>. The NOEC (No Observed Effect Concentration), LC<sub>10</sub>, LC<sub>30</sub> and LC<sub>50</sub> concentrations were selected, with values of 0.47; 2.13; 3.41 and 4.73  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  respectively, for the testing the acute toxicity with exposure times of 24, 48, 72 and 96 h. The organisms were sampled from these bioassays for enzyme assays for AChE, ESTs, SOD, CAT and quantification of total protein. For the enzyme AChE, the results were expressed in mmol/mgptn/min, to esterases in nmol/mgptn/min; for SOD in U of SOD/mgptn and CAT in  $\mu\text{mol}/\text{mgptn}/\text{min}$ . Significant differences for AChE were found in the times of 24 h in NOEC; 48 h in LC<sub>10</sub> and LC<sub>50</sub>; 72 h in NOEC; LC<sub>10</sub> and LC<sub>30</sub>. For the EST- $\alpha$ , in the times of 24 h in NOEC; 48 h in LC<sub>10</sub>; LC<sub>30</sub> and LC<sub>50</sub>; and 72 h in LC<sub>30</sub>. For EST- $\beta$ , in the times of 48 h in LC<sub>10</sub>; LC<sub>30</sub> and LC<sub>50</sub>, and to 72 h in LC<sub>10</sub>; LC<sub>30</sub> and LC<sub>50</sub>. For SOD, in times of 24 h in LC<sub>30</sub>; and 96 h in LC<sub>30</sub> and LC<sub>50</sub>. For CAT, in times of 48 h in LC<sub>50</sub> and 96 h in LC<sub>30</sub>. For AChE and ESTs, there were cases of decrease and increase; in CAT only decrease, and increase for SOD. With these data, we demonstrated that the benzo[a]pyrene have neurotoxic effects and oxidative stress for the animals, even at low concentrations and short exposure times. Thus, the compound can cause impairment of immature species, and the ecological dynamics can be affected, since these organisms have trophic importance in the aquatic environment.

Key-words: Ecotoxicology; Enzymes; Hydrocarbon; Invertebrates.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Estrutura do benzo[a]pireno.....	11
FIGURA 2: Estágios de vida de <i>Chironomus sancticaroli</i> . A: massa ovígera; B: larva; C: pupa; D: adulto macho e E: adulto fêmea.....	12
FIGURA 3: Aquários utilizados para a criação dos organismos, mantidos em sala de criação.....	16
FIGURA 4: Esquema de montagem das bandejas para criação dos organismos.....	17
FIGURA 5: Esquema representativo dos bioensaios de toxicidade aguda utilizados para a calibração.....	18
FIGURA 6: Placa do ensaio enzimático da acetilcolinesterase .....	20
FIGURA 7: Placa do ensaio enzimático da esterase-alfa.....	20
FIGURA 8: Placa do ensaio enzimático da esterase-beta .....	21
FIGURA 9: Placa do ensaio enzimático da superóxido dismutase.....	22
FIGURA 10: Placa do ensaio enzimático da catalase .....	23
FIGURA 11: Placa do ensaio da quantificação de proteína .....	24
FIGURA 12: Toxicidade aguda do benzo[a]pireno comparada com o controle, através da atividade enzimática da enzima acetilcolinesterase (AChE) de <i>Chironomus sancticaroli</i> . Os valores expressam média da atividade enzimática $\pm$ desvio-padrão. * indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando anova - unifatorial e os contrastes de tukey). Cada figura representa um tempo de exposição: a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h.....	31
FIGURA 13: Toxicidade aguda do benzo[a]pireno comparada com o controle, através da atividade enzimática da enzima esterase-alfa (EST- $\alpha$ ) de <i>Chironomus sancticaroli</i> . Os valores expressam média da atividade enzimática $\pm$ desvio-padrão. * indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando ANOVA - unifatorial e os contrastes de Tukey). Cada figura representa um tempo de exposição. a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h. ....	32
FIGURA 14: Toxicidade aguda do benzo[a]pireno comparada com o controle, através da atividade enzimática da enzima esterase-beta (EST- $\beta$ ) de <i>Chironomus sancticaroli</i> . Os valores expressam média da atividade enzimática $\pm$ intervalo de confiança. * indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando ANOVA - unifatorial e os contrastes de Tukey). Cada figura representa um tempo de exposição. a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h.....	33
FIGURA 15: Toxicidade aguda do benzo[a]pireno comparada com o controle, através da atividade enzimática da enzima catalase (CAT) de <i>Chironomus sancticaroli</i> . Os valores expressam média da atividade enzimática $\pm$ desvio-padrão. *	

indicam diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando ANOVA - unifatorial e os contrastes de Tukey). Cada figura representa um tempo de exposição. a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h.....34

FIGURA 16: Toxicidade aguda do benzo[a]pireno comparada com o controle, através da atividade enzimática da enzima superóxido dismutase (SOD) de *Chironomus sancticaroli*. Os valores expressam média da atividade enzimática  $\pm$  desvio-padrão. \* indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando ANOVA - unifatorial e os contrastes de Tukey). Cada figura representa um tempo de exposição. a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h.....35

## LISTA DE TABELAS

TABELA I: Faixa letal do composto benzo[a]pireno para a espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> expressa em $\mu\text{g.L}^{-1}$ .....	25
TABELA II: Mortalidade dos bioensaios de toxicidade aguda com exposição de 24 h .....	26
TABELA III: Mortalidade dos bioensaios de toxicidade aguda com exposição de 48 h .....	26
TABELA IV: Mortalidade dos bioensaios de toxicidade aguda com exposição de 72 h .....	26
TABELA V: Mortalidade dos bioensaios de toxicidade aguda com exposição de 96 h .....	27
TABELA VI: Médias das atividades enzimáticas da AChE expressas em mmol/mg ptn/min e seus intervalos de confiança (IC) de 95%, em diferentes tempos e concentrações. * representam aumento significativo e ** representam diminuição significativa .....	27
TABELA VII: Médias das atividades enzimáticas da EST- $\alpha$ expressas em nmol/mg ptn/min e seus intervalos de confiança (IC) de 95%, em diferentes tempos e concentrações. * representam aumento significativo e ** representam diminuição significativa .....	28
TABELA VIII: Médias das atividades enzimáticas da EST- $\beta$ expressas em nmol/mg ptn/min e seus intervalos de confiança (IC) de 95%, em diferentes tempos e concentrações. * representam aumento significativo e ** representam diminuição significativa .....	29
TABELA IX: Médias das atividades enzimáticas da CAT expressas em $\mu\text{mol/mg ptn/min}$ e seus intervalos de confiança (IC) de 95%, em diferentes tempos e concentrações. * representam aumento significativo e ** representam diminuição significativa .....	29
TABELA X: Médias das atividades enzimáticas da SOD expressas em U SOD/mg ptn e seus intervalos de confiança (IC) de 95%, em diferentes tempos e concentrações. * representam aumento significativo e ** representam diminuição significativa .....	30

## LISTA DE SIGLAS

**AChE** – Acetilcolinesterase

**ATC** – Iodeto de acetiltiocolina

**BaP** – Benzo[a]pireno

**CAT** – Catalase

**CENO** – Concentração de Efeito Não Observado

**CL<sub>10</sub>** – Concentração letal que mata 10% da população

**CL<sub>30</sub>** – Concentração letal que mata 30% da população

**CL<sub>50</sub>** – Concentração letal que mata 50% da população

**CONAMA** – Conselho Nacional do Meio Ambiente

**DTNB** – 5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato

**EDTA** – Sal dissódico EDTA dihidratado

**EROD** – Etoxiresorufina-O-deetilase

**EST- $\alpha$**  – Esterase alfa

**EST- $\beta$**  – Esterase beta

**GLM** – Modelo linear generalizado

**GPx** – Glutaciona peroxidase

**GSH** – Glutaciona reduzida

**HPAs** – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

**LEMV** – Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária

**LPO** – Peroxidação Lipídica

**PTN** – Proteína

**SOD** – Superóxido dismutase

**UFPR** – Universidade Federal do Paraná

**USEPA** – United States Environmental Protection Agency

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 OBJETIVOS .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 CRIAÇÃO DE <i>CHIRONOMUS SANCTICAROLI</i> .....	16
3.2 CALIBRAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES LETAIS .....	17
3.3 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA.....	18
3.4 ENSAIOS ENZIMÁTICOS .....	19
3.4.1 ACETILCOLINESTERASE .....	19
3.4.2 ESTERASE ALFA .....	19
3.4.3 ESTERASE BETA .....	21
3.4.4 SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	21
3.4.5 CATALASE.....	22
3.4.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS .....	23
3.5 ANÁLISES DOS DADOS .....	23
3.5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	23
3.5.2 PORCENTAGEM DE REDUÇÃO .....	24
4 RESULTADOS .....	25
4.1 CONCENTRAÇÕES LETAIS .....	25
4.2 MORTALIDADE DOS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA .....	25
4.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS .....	27
5 DISCUSSÃO .....	36
5.1 CONCENTRAÇÕES LETAIS .....	36
5.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS .....	37
5.2 CONCLUSÕES .....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

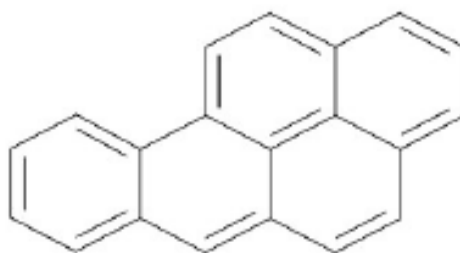
O ambiente vem sofrendo degradação por ações antropogênicas, seja por despejo de poluentes ou pela crescente urbanização. Toda essa poluição pode alcançar o meio aquático por diferentes maneiras, como através da chuva, de derrames acidentais, de processos agrícolas, ou carregados pelo ar até alcançarem e se depositarem em outros locais (Arias *et al.*, 2007).

Diversos são os tipos de contaminantes que podem atingir e provocar efeitos negativos no ambiente, como inseticidas, efluentes industriais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os HPAs são compostos orgânicos, que possuem dois ou mais anéis aromáticos fundidos. Esse tipo de composto tem como principal processo de emissão a atividade antropogênica, podendo alcançar os ecossistemas através de derramamento de petróleo, combustão incompleta de lixo e madeira ou queima de combustíveis fósseis (Magalhães *et al.*, 2007). São considerados carcinogênicos e mutagênicos o que torna a sua presença ainda mais danosa ao ambiente.

Dentre os HPAs que são considerados prioritários pela USEPA (United States Environmental Protection Agency) está o benzo[a]pireno (BaP), cuja estrutura química está representada na FIGURA 1. Este é um hidrocarboneto de alto peso molecular, com cinco anéis aromáticos e persistente no ambiente, tendo meia vida de 270 dias a 8 anos no solo (Guimarães, 2004). De acordo com a resolução 357 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), o valor máximo de benzo[a]pireno em águas de classe 1, que são aquelas águas destinadas ao abastecimento doméstico após simples tratamento, é de  $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Esse composto já foi testado para avaliar seu comportamento e efeitos em mamíferos (Neubert & Tapken 1988, Withey *et al.* 1993, Kang *et al.*, 2007, Gao *et al.*, 2011). Xia *et al.* (2011) testaram os efeitos de BaP em ratos, aplicando biomarcadores como SOD e AChE, que tiveram seus níveis ou atividades reduzidos, indicando neurotoxicidade. Outros estudos com outros organismos também tiveram propósito de avaliar os efeitos do benzo[a]pireno. Palanikumar *et al.* (2012) testaram os efeitos em peixes através de biomarcadores bioquímicos, encontrando inibição da AChE e aumento da CAT e da LPO (peroxidação lipídica), sendo que esta última

também indica estresse oxidativo. Rocha *et al.* (2012) e Silva *et al.* (2013) avaliaram os efeitos em diferentes espécies de camarões expostos ao BaP. No primeiro trabalho, os autores testaram enzimas como a EROD (Etoxiresorufina-O-deetilase), que participa de metabolismo de xenobióticos, e danos do DNA, encontrando aumento significativo nos dois biomarcadores. No segundo foram avaliados parâmetros como comportamento e biomarcadores bioquímicos, encontrando alteração na LPO, mas não na CAT. Já Akcha *et al.* (2000) avaliou diferentes biomarcadores aplicados em mexilhões, alimentados por quatro semanas com alimento contaminado com BaP, encontrando um aumento da CAT e inibição da AChE. Banni *et al.* (2010) utilizaram a mesma espécie de mexilhão, porém a contaminação foi hídrica e de forma aguda, utilizando alguns dos mesmos biomarcadores, como a AChE e a CAT, encontrando alterações dependendo do tempo de exposição (24, 48 ou 72h).



**Benzo[a]pireno**

FIGURA 1: Estrutura do benzo[a]pireno  
FONTE: Meire *et al.*, 2007.

Além da contaminação hídrica, hidrocarbonetos em geral, podem interagir com o sedimento, tornando esse compartimento também tóxico. Esse sedimento é de grande importância no ecossistema aquático já que está relacionado à produção primária (Kalinowski & Załęska-Radziwiłł, 2011) e é habitat de espécies bentônicas. Sendo assim, compostos como o BaP podem afetar também, por exemplo, organismos da família Chironomidae, como a espécie em estudo, *Chironomus sancticaroli*, que foi descrita por Strixino & Strixino, em 1981. Estes são insetos da ordem Diptera, cujo ciclo de vida é holometábolo, composto pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto (FIGURA 2). Os ovos ficam alocados em uma massa mucilaginosa com forma cilíndrica, no ambiente aquático e desses ovos eclodem

larvas de primeiro ínstar. Com o decorrer dos dias, essas larvas vão adquirindo coloração avermelhada devido a presença de hemoglobina na hemolinfa e passando pelos estágios de segundo, terceiro e quarto ínstar, até se tornarem pupas. Desse estágio emergem os adultos, único estágio aquático.

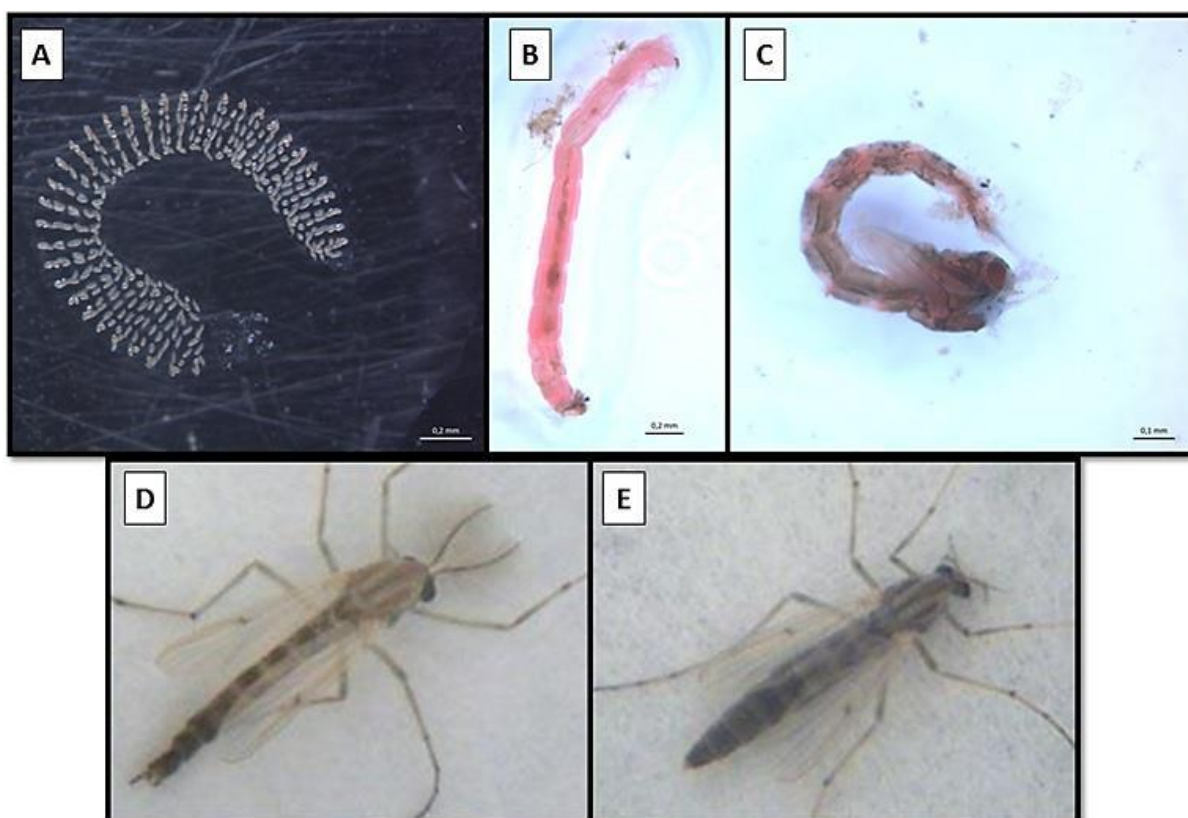


FIGURA 2: Estágios de vida de *Chironomus sancticaroli*. A: massa ovígera; B: larva; C: pupa; D: adulto macho e E: adulto fêmea.

*Chironomus sancticaroli* e outras espécies do gênero vêm sendo utilizadas em ensaios ecotoxicológicos para avaliação da qualidade ambiental por diversos autores e com diversos tipos de poluentes, tanto em condições laboratoriais, com produtos isolados ou misturas, quanto com amostras provenientes de campo (Paumen *et al.*, 2008; Printes *et al.*, 2011; Viveiros, 2012).

Nestes e em outros organismos podem ser aplicados diferentes biomarcadores, conceito muito utilizado atualmente, para avaliar os possíveis efeitos dos poluentes. Na ecotoxicologia, biomarcadores representam respostas, quantificáveis frente à degradação ambiental que podem ser bioquímicas,

histopatológicas ou genotóxicas. Como biomarcadores bioquímicos, temos, dentre outros, as enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST- $\alpha$ ), esterase beta (EST- $\beta$ ), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

A AChE é uma enzima encontrada no tecido nervoso, responsável pela propagação do impulso nervoso. Sua função é hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina em ácido acético e colina, regulando assim a transmissão desses impulsos. A sua inibição causa um acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas, causando uma hiper excitação no organismo, podendo levá-lo à morte (Braga & Valle, 2007). A AChE é considerada como biomarcador de neurotoxicidade, utilizada normalmente para avaliar o efeito de organofosforados e carbamatos. Porém, em um trabalho envolvendo um grupo de pessoas expostas ao BaP, que trabalham em fornos, Niu *et al.* (2009) encontraram alterações na AChE e nos níveis de acetilcolina, indicando a neurotoxicidade do BaP.

Já as enzimas EST- $\alpha$  e EST- $\beta$  fazem parte da Fase I do metabolismo. Enzimas dessa fase são responsáveis por se ligarem ao xenobiótico e o transformarem, através de reações de oxidação, redução e hidrólise (Oga *et al.*, 2008). As ESTs alfa e beta, mais especificamente, estão envolvidas com resistência metabólica de organofosforados (Hemingway & Ranson, 2000).

Em condições normais, há um balanço entre as espécies reativas de oxigênio produzidas pelo metabolismo e a ação dos sistemas antioxidantes. Quando há um desequilíbrio neste balanço, chamamos de estresse oxidativo (Sgarbi, 2007). Dentre os componentes desses sistemas estão a SOD e a CAT. A SOD é a enzima responsável pela catalisação da dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Já a CAT decompõe esse peróxido em oxigênio e água (Lopez-Martinez *et al.*, 2008), atuando quando o peróxido está presente em grande quantidade. Essas enzimas ajudam a manter baixos os níveis dessas espécies reativas de oxigênio, que podem interagir com biomoléculas e causar danos celulares, resultando na alteração da função de células, tecidos e órgãos (Oga *et al.*, 2008).

A persistência ambiental e o potencial carcinogênico do benzo[a]pireno fazem com que o estudo dos possíveis efeitos desse composto na biota aquática se torne relevante, tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente, uma vez que este pode se acumular ao longo da cadeia trófica. A utilização de biomarcadores

bioquímicos pode nos dar informações acerca da qualidade do ambiente em baixas concentrações de poluentes. Dessa maneira, pode-se evitar que o problema se agrave e que os efeitos da poluição só sejam detectados quando a dinâmica populacional do ecossistema já tiver sido afetada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar os efeitos do hidrocarboneto benzo[a]pireno em larvas da espécie *Chironomus sancticaroli*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar as concentrações letais (CL) do benzo[a]pireno para a espécie *Chironomus sancticaroli*;
- ✓ Expor larvas de *Chironomus sancticaroli* a diferentes concentrações de benzo[a]pireno, através de bioensaios de toxicidade aguda, por quatro durações distintas: 24, 48, 72 e 96 h;
- ✓ Avaliar os efeitos da exposição aguda, por durações distintas, de *Chironomus sancticaroli* ao benzo[a]pireno, através dos biomarcadores bioquímicos: acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST- $\alpha$ ), esterase beta (EST- $\beta$ ), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CRIAÇÃO DE *Chironomus sancticaroli*

Os organismos foram mantidos em sala de criação no Departamento de Zoologia (UFPR), com temperatura ( $25\pm 2$ ), fotoperíodo (12h claro/12h escuro) e umidade controlados. Foram mantidos quatro aquários de vidro (15 cm X 25 cm X 25 cm), contendo aproximadamente 2 cm de areia de rio como sedimento e dez litros de água desclorada (FIGURA 3). Cada aquário foi mantido sob aeração constante, com ração Dog Chow® triturada sendo acrescentada semanalmente, e foram cobertos com uma tela de tecido transparente, com espaço para a emergência dos adultos, permitindo a oviposição na água e a presença de todos os estágios de vida da espécie. Mensalmente, a água desses aquários foi trocada e a limpeza destes e da sala de criação foi realizada.



FIGURA 3: Aquários utilizados para a criação dos organismos, mantidos em sala de criação

Para a realização dos bioensaios de toxicidade aguda, massas ovígeras foram coletadas dessa colônia matriz e individualizadas em bandejas de plástico (FIGURA 4), contendo ração TetraMin® triturada e quatro litros de água desclorada, mantidas sob aeração constante. Quando as larvas atingiam o 3<sup>o</sup> instar, estas foram selecionadas para os bioensaios.



FIGURA 4: Esquema de montagem das bandejas para criação dos organismos

### 3.2 CALIBRAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES LETAIS

Para a calibração das concentrações letais do hidrocarboneto benzo[a]pireno foram realizados bioensaios com várias concentrações do composto, até ser obtida uma faixa de concentrações que causasse mortalidade de 0% a 99% dos organismos.

Os bioensaios foram realizados em copos de vidro de 300 ml, com 200 ml de solução-teste composta por água desclorada, álcool e benzo[a]pireno – 96% (da marca Sigma-Aldrich), sendo utilizadas nove concentrações do produto, além do controle com álcool absoluto, conforme esquema representado na FIGURA 5. Para cada concentração, foram feitas quatro réplicas, com dez larvas de 3º instar em cada, totalizando 40 larvas por concentração. Os bioensaios foram mantidos em câmara tipo BOD com temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro) controlados, com duração de 96 horas. Inicialmente foi utilizado sedimento nos bioensaios, porém alcançou-se a concentração de  $5760 \mu\text{g.L}^{-1}$  de benzo[a]pireno, e ainda não havia sido obtida a faixa de mortalidade, pois este composto pode ser facilmente adsorvido pelo sedimento e não ficar disponível para as larvas. Como foram encontradas dificuldades com a diluição do composto acima de  $5760 \mu\text{g.L}^{-1}$ , optou-se por utilizar apenas a água nos bioensaios, sem a presença do sedimento, afim de descobrir os efeitos do poluente.

Quando a faixa que provocou a mortalidade de 0% a 99% da população foi encontrada, este bioensaio sem sedimento foi repetido três vezes para a confirmação da faixa. Depois, esses dados foram analisados utilizando-se o programa Probit GW-Basic, para a determinação das concentrações letais.

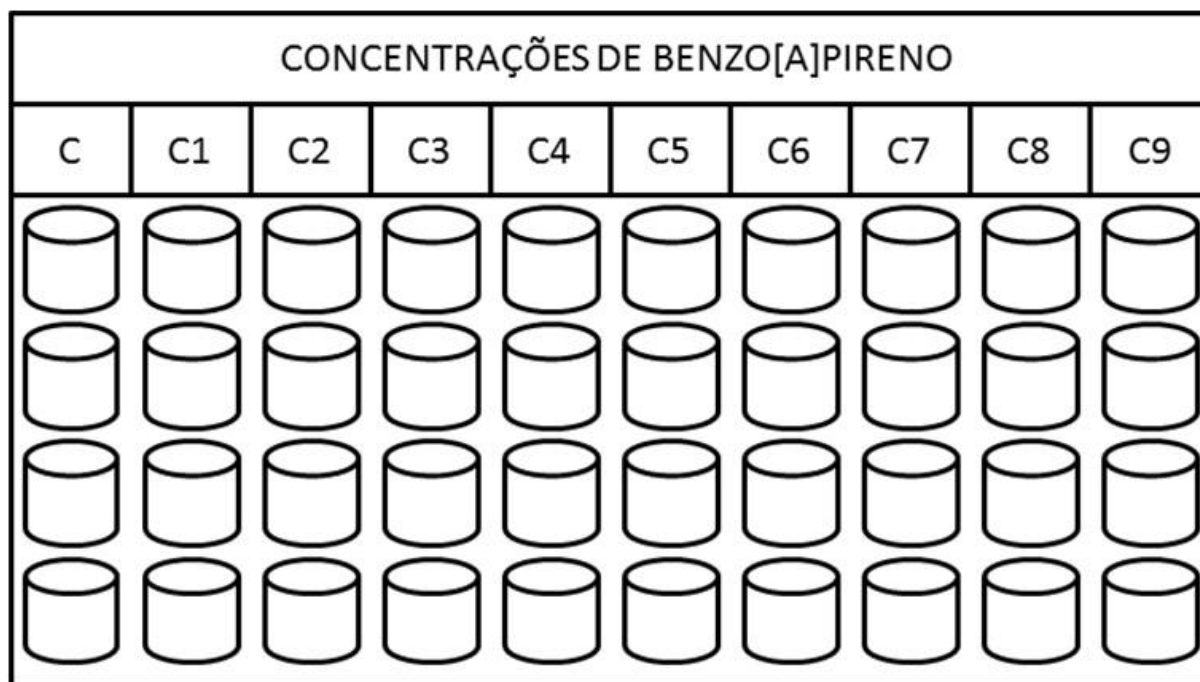


FIGURA 5: Esquema representativo dos bioensaios de toxicidade aguda utilizados para a calibração

### 3.3 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

Os bioensaios de toxicidade aguda foram realizados em copos de vidro, com capacidade para 300 ml, onde foram adicionadas 10 larvas de 3º ínstar e 200ml da solução teste, assim como nos bioensaios para a calibração, sem sedimento. Foram utilizadas as concentrações 0,47; 2,13; 3,41 e 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , representando a CENO, CL<sub>10</sub>, CL<sub>30</sub>, e CL<sub>50</sub>, previamente calibradas. Essas concentrações letais representam a porcentagem de mortalidade da população. Por exemplo, a CL<sub>50</sub>, de valor 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$  mata 50% da população dessa espécie. A concentração 0,47  $\mu\text{g.L}^{-1}$  é considerada a concentração de efeito não observado (CENO), e foi calculada pela divisão do valor da CL<sub>50</sub> por 10.

Foram realizados diversos bioensaios, com durações diferentes, sendo elas 24, 48, 72 e 96 h. Todos mantidos em câmaras do tipo BOD, com temperatura e fotoperíodo controlados, sem aeração e ração, de forma estática durante toda sua duração. Desses bioensaios, os organismos foram retirados e congelados em freezer -20°C e armazenados em freezer -80°C, para a posterior realização dos ensaios enzimáticos. Foram utilizados 20 organismos vivos de cada tratamento.

### 3.4 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Para serem preparadas para os ensaios enzimáticos, as larvas congeladas provenientes dos bioensaios foram descongeladas e individualizadas em tubos tipo eppendorf numerados, em que foram acrescentados 330 µl de água mili-q, para as amostras de AChE e ESTs e 150 µl para as amostras de SOD e CAT. Essas larvas foram homogeneizadas com auxílio de homogeneizador automático e centrifugadas a 12000xg por 1 minuto a 4°C em micro centrífuga refrigerada NT805 (Novatecnica). Os homogeneizados foram alíquotados de acordo com o volume utilizado em cada enzima e novamente armazenados em freezer -80°C.

#### 3.4.1 Acetilcolinesterase

Para a acetilcolinesterase foi utilizado o método de Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). O princípio deste ensaio é o desenvolvimento da coloração amarela em virtude da reação que ocorre entre o ATC e o DTNB na presença da enzima AChE. Neste experimento foram adicionados, em microplaca, 200 µl de DTNB (5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato) 0,75 mM e 50 µl de ATC (iodeto de acetilticolina) 10 mM em 25 µl de amostra, sendo pipetadas três réplicas de cada (FIGURA 6). Esse material foi incubado por 30 minutos em temperatura ambiente e depois foi realizada uma leitura em espectrofotômetro de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices), a cada 30 segundos, durante cinco minutos, no comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos em mmol/mgptn/min.

#### 3.4.2 Esterase alfa

Para a esterase-alfa foi utilizado o método de Valle *et al.*, (2006). Este método baseia-se no consumo do substrato alfa-naftil pela enzima esterase alfa, que o transforma em alfa-naftol. Neste experimento, alíquotas de 10 µl de amostra foram pipetadas em três réplicas da microplaca, seguidos pela adição de 200 µl de alfa-

naftil acetato/Na fosfato 0,3 mM. Esperou-se 15 minutos em temperatura ambiente, e então foram adicionados 50  $\mu$ l do corante Fast Blue a 0,3% e incubado por mais cinco minutos (FIGURA 7). A leitura foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices), com resultados expressos em nmol/mgptn/min.

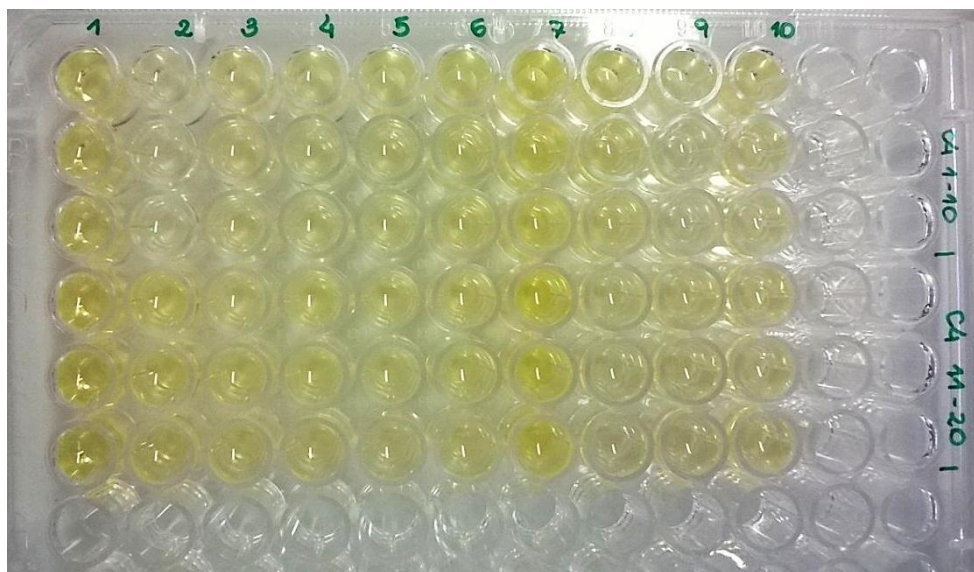


FIGURA 6: Placa do ensaio enzimático da acetilcolinesterase



FIGURA 7: Placa do ensaio enzimático da esterase-alfa

### 3.4.3 Esterase beta

Para a esterase-beta foi utilizado o método de Valle *et al.*, (2006). Este método baseia-se no consumo do substrato beta-naftil pela enzima esterase alfa, que o transforma em beta-naftol. Neste experimento, alíquotas de 10 µl de amostra foram pipetadas em três réplicas em microplaca, seguidos pela adição de 200 µl de beta-naftil acetato/Na fosfato 0,3 mM. Esperou-se 15 minutos em temperatura ambiente, e então foram adicionados 50 µl do corante Fast Blue a 0,3% e incubado por mais cinco minutos (FIGURA 8). A leitura foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices), com resultados expressos em nmol/mgptn/min.



FIGURA 8: Placa do ensaio enzimático da esterase-beta

### 3.4.4 Superóxido dismutase

Para a superóxido dismutase foram utilizadas duas alíquotas de 40 µl de amostra em tubo do tipo eppendorff. Em um deles foram adicionados 885 µl de tampão Tris 1M / EDTA 5 mM pH 8,0 e agitado no vortex. Depois foram adicionados 50 µl de pirogalol (ácido pirogálico) a 15 mM, agitado novamente no vortex e incubado por 30 minutos, no escuro. Depois, foram adicionados 25 µl de HCL 1N a 3% para parar a reação e agitado no vortex. Então, 300 µl de cada amostra foram

imediatamente adicionadas na microplaca, em triplicada (FIGURA 9), e lidas em espectrofotômetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices) a 440 nm.

As alíquotas restantes de cada amostra foram utilizadas para controle. O processo anterior foi repetido, porém as amostras não foram incubadas e sim lidas imediatamente a 440 nm. Para o branco, foram colocados todos os reagentes, exceto a amostra. No lugar dessa amostra foi adicionado água MiliQ. Os resultados foram expressos em U SOD/mgptn e o protocolo foi baseado em Gao *et al.* (1998).



FIGURA 9: Placa do ensaio enzimático da superóxido dismutase

#### 3.4.5 Catalase

Para a catalase, foram adicionados 5  $\mu$ l de cada amostra em quadruplicata em microplacas Greiner Bio One®. Foram então, adicionados 295  $\mu$ l de solução reação a 80mM (Tampão Tris 1M / EDTA 5mM pH 8,0; peróxido de hidrogênio 30% e água MilliQ) (FIGURA 10). Imediatamente as amostras foram lidas em espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices), a 240 nm, por cinco minutos, sendo uma leitura a cada 15 segundos. O método seguido foi o proposto por Aebi (1984) e os resultados foram expressos em  $\mu$ mol/mgptn/min.

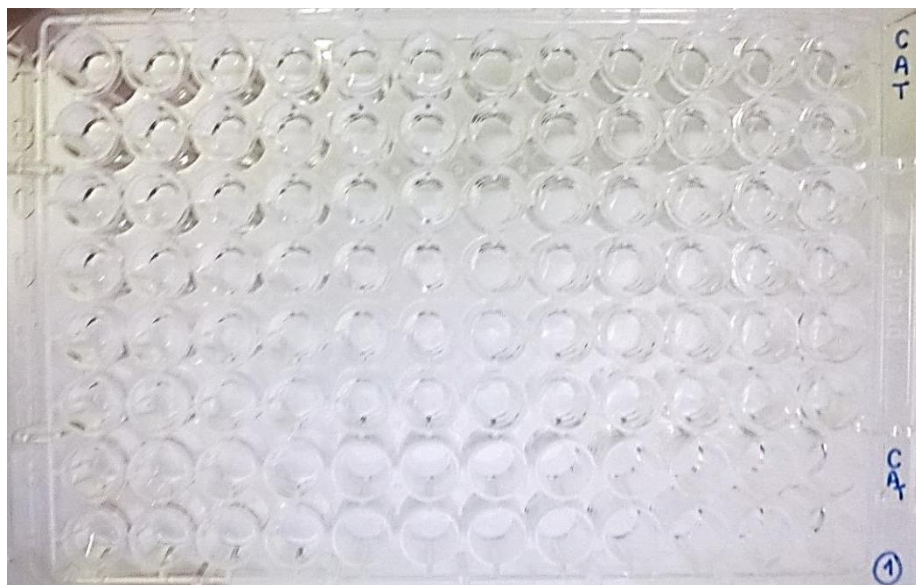


FIGURA 10: Placa do ensaio enzimático da catalase

#### 3.4.6 Quantificação de proteínas totais

Para fins de cálculo das demais atividades enzimáticas, foram quantificadas as proteínas totais de cada organismo. Esta quantificação foi mensurada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Foram pipetados 10  $\mu$ l de cada amostra em três réplicas da microplaca, seguidos pela adição de 250  $\mu$ l do reativo Bradford (Bio-Rad) diluído em tampão fosfato de potássio 100mM pH 7,5 na proporção de 1:5 (FIGURA 11). Logo após a adição do reativo foi realizada a leitura a 620 nm em espectrofotômetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices).

### 3.5 ANÁLISES DOS DADOS

#### 3.5.1 Análise estatística

As análises dos dados foram realizadas no ambiente R (R *Development Core Team* 2011). Um modelo linear generalizado (GLM) foi ajustado através de uma distribuição de erro da família Gamma, para AChE (24, 48 e 72 h), EST- $\alpha$  (24 e 48h), EST- $\beta$  (24 e 48h), CAT (24, 72 e 96h) e SOD (72 e 96h), e Gaussiana Inversa,

para AChE (96 h), EST- $\alpha$  (72 e 96h), EST- $\beta$  (72 e 96h), CAT (48h) e SOD (24 e 48h), utilizando as bibliotecas MASS (Vernables & Ripley, 2002) e effects (Fox, 2003). Foi realizada uma ANOVA unifatorial e foram utilizados contrastes de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) para as comparações *a posteriori* através da biblioteca multcomp (Hothorn *et al.*, 2008).

### 3.5.2 Porcentagem de redução

As porcentagens de redução das atividades enzimáticas foram calculadas a partir da seguinte fórmula hipotética:

$$X = 100\% - \frac{(C_x * 100)}{C}$$

Onde:

- X é a porcentagem de redução
- $C_x$  é o valor da média das atividades enzimáticas da concentração que se quer determinar a porcentagem de redução
- C é o valor da média das atividades enzimáticas do controle

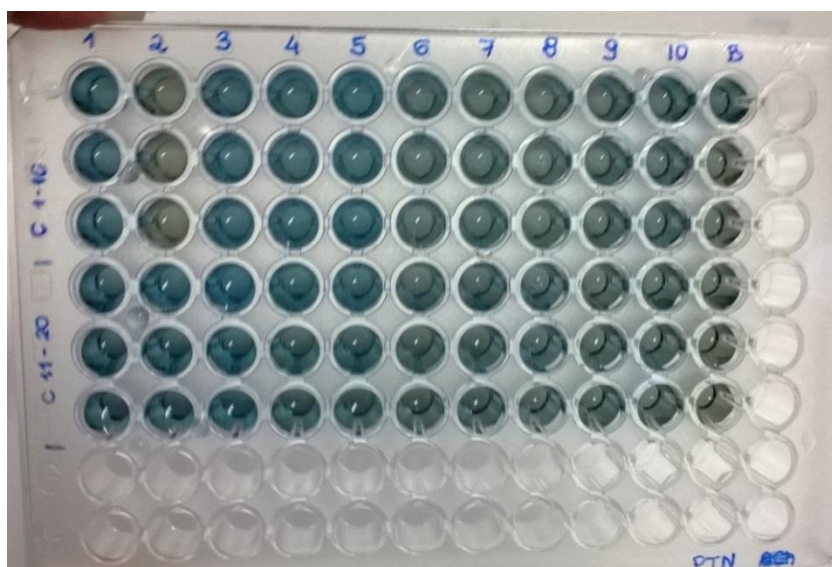


FIGURA 11: Placa do ensaio da quantificação de proteína

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CONCENTRAÇÕES LETAIS

Como resultado para as concentrações letais, obteve-se os valores da CL<sub>2</sub>, CL<sub>10</sub>, CL<sub>30</sub>, CL<sub>40</sub>, CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub>, CL<sub>95</sub>, CL<sub>98</sub> e da CENO, cujo valor atingiu 0,473 µg.L<sup>-1</sup>. Na TABELA I estão representadas as CL e seus respectivos valores em µg.L<sup>-1</sup>.

TABELA I: Faixa letal do composto benzo[a]pireno para a espécie *Chironomus sancticaroli* expressa em µg.L<sup>-1</sup>

Concentração Letal	µg.L <sup>-1</sup>
CENO	0,47
CL <sub>2</sub>	1,31
CL <sub>10</sub>	2,13
CL <sub>30</sub>	3,41
CL <sub>40</sub>	4,04
CL <sub>50</sub>	4,73
CL <sub>90</sub>	10,52
CL <sub>95</sub>	13,19
CL <sub>98</sub>	17,02

### 4.2 MORTALIDADE DOS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

Com base nas concentrações letais previamente calculadas, foram realizados diversos bioensaios de toxicidade aguda para a retirada de organismos para os ensaios enzimáticos. As tabelas II, III, IV e V a seguir representam a porcentagem de organismos vivos, mortos, predados e desaparecidos encontrados, para os períodos de exposição de 24, 48, 72 e 96 h, respectivamente. Foram considerados organismos mortos aqueles que não apresentavam nenhum movimento ou resposta ao estímulo do toque. Já predados eram os organismos que foram encontrados com apenas a parte superior do corpo. Desaparecidos foram os não encontrados.

TABELA II: Mortalidade dos bioensaios de toxicidade aguda com exposição de 24 h.

<b>Condição/ Concentração (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Vivos</b>	<b>Mortos</b>	<b>Predados</b>	<b>Desaparecidos</b>
<b>Controle</b>	99,1%	0%	0,9%	0%
<b>0,47</b>	100,0%	0%	0%	0%
<b>2,13</b>	92,4%	5,9%	0%	1,7%
<b>3,41</b>	65,2%	31,7%	0,6%	2,4%
<b>4,73</b>	50,7%	47,7%	1,0%	0,5%

TABELA III: Mortalidade dos bioensaios de toxicidade aguda com exposição de 48 h.

<b>Condição/ Concentração (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Vivos</b>	<b>Mortos</b>	<b>Predados</b>	<b>Desaparecidos</b>
<b>Controle</b>	94,0%	2,0%	2,0%	2,0%
<b>0,47</b>	84,0%	0%	10,0%	6,0%
<b>2,13</b>	86,0%	14,0%	0%	0%
<b>3,41</b>	41,1%	58,9%	0%	0%
<b>4,73</b>	23,1%	76,9%	0%	0%

TABELA IV: Mortalidade dos bioensaios de toxicidade aguda com exposição de 72 h.

<b>Condição/ Concentração (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Vivos</b>	<b>Mortos</b>	<b>Predados</b>	<b>Desaparecidos</b>
<b>Controle</b>	61,1%	6,8%	30,5%	1,7%
<b>0,47</b>	66,7%	6,7%	13,3%	13,3%
<b>2,13</b>	55,0%	41,3%	0%	3,8%
<b>3,41</b>	35,6%	60%	4,3%	0%
<b>4,73</b>	35,3%	59,5%	5,1%	0%

TABELA V: Mortalidade dos bioensaios de toxicidade aguda com exposição de 96 h.

<b>Condição/ Concentração (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Vivos</b>	<b>Mortos</b>	<b>Predados</b>	<b>Desaparecidos</b>
<b>Controle</b>	79,0%	1,0%	4,0%	16,0%
<b>0,47</b>	85,0%	0%	0%	15,0%
<b>2,13</b>	48,6%	41,4%	0%	10,0%
<b>3,41</b>	37,7%	62,3%	0%	0%
<b>4,73</b>	28,1%	71,9%	0%	0%

### 4.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Como resultados para a AChE foram obtidas as médias das atividades enzimáticas expressas em mmol/mg ptn/min, que estão representadas na TABELA VI e os gráficos representados na FIGURA 12. Houve uma redução significativa de 46% na atividade desta enzima para a concentração 0,47  $\mu\text{g.L}^{-1}$  no período de 24 h. Em 48 h, houve aumento significativo de aproximadamente 2x nas concentrações 2,13 e 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Em 72 h, houve reduções significativas de 30, 35 e 26% nas concentrações 0,47; 2,13 e 3,41  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente. Enquanto que em 96 h a atividade enzimática não foi alterada significativamente.

TABELA VI: Médias das atividades enzimáticas da AChE expressas em mmol/mg ptn/min e seus intervalos de confiança (IC) de 95%, em diferentes períodos de exposição e concentrações. \* representam aumento significativo e \*\* apresentam diminuição significativa.

<b>Tempo/ Concentração (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>24 h (IC)</b>	<b>48 h (IC)</b>	<b>72 h (IC)</b>	<b>96 h (IC)</b>
<b>Controle</b>	137,58 (105,25-169,90)	210,37 (150,12-270,62)	362,83 (298,04-427,63)	178,91 (143,17-214,65)
<b>0,47</b>	74,63 ** (47,61-101,64)	275,38 (235,11-315,65)	253,79 ** (196,21-311,37)	228,21 (180,36-276,06)
<b>2,13</b>	114,81 (89,83-139,79)	408,03 * (335,64-480,42)	236,36 ** (202,95-269,77)	136,45 (107,19-165,71)
<b>3,41</b>	122,73 (105,13-140,33)	228,89 (177,92-279,86)	267,44 ** (240,54-294,34)	170,65 (128,20-213,10)
<b>4,73</b>	124,30 (99,65-148,95)	465,56 * (400,00-531,04)	305,26 (274,03-336,49)	122,72 (101,45-143,99)

Como resultados para a EST- $\alpha$  foram obtidas as médias das atividades enzimáticas expressas em nmol/mgptn/min que estão representadas na TABELA VII, e os gráficos representados na FIGURA 13. Houve um aumento significativo de 1,5x na atividade desta esterase para a 0,47  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , em 24 h. Em 48 h, houve aumento significativo de 1,5; 1,4 e 3,2x nas concentrações 2,13; 3,41 e 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente. Em 72 h, houve uma redução significativa de 37% na 3,41  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . E em 96 h, não foram encontradas alterações significativas.

TABELA VII: Médias das atividades enzimáticas da EST- $\alpha$  expressas em nmol/mgptn/min e seus intervalos de confiança (IC) de 95%, em diferentes períodos de exposição e concentrações. \* representam aumento significativo e \*\* apresentam diminuição significativa.

<b>Tempo/ Concentração (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>24 h (IC)</b>	<b>48 h (IC)</b>	<b>72 h (IC)</b>	<b>96 h (IC)</b>
<b>Controle</b>	2,83 (0,91 - 1,08)	4,20 (3,42-4,98)	6,72 (5,72-7,72)	2,11 (1,66-2,56)
<b>0,47</b>	4,11 * (3,50 - 4,69)	3,19 (2,77-3,61)	6,86 (5,56-8,16)	2,64 (2,27-3,00)
<b>2,13</b>	3,18 (2,79 - 3,57)	6,50 * (5,44-7,72)	5,33 (4,68-5,98)	2,73 (2,20-3,26)
<b>3,41</b>	2,62 (2,18 - 3,05)	6,00 * (4,96-7,03)	4,23 ** (3,83-4,65)	2,47 (1,88-3,06)
<b>4,73</b>	2,64 (2,28 - 2,99)	13,41 * (11,38-15,44)	5,66 (5,30-6,02)	2,43 (2,03-2,82)

Como resultados para a EST- $\beta$  foram obtidas as médias das atividades enzimáticas expressas em nmol/mgptn/min que estão representadas na TABELA VIII, e os gráficos representados na FIGURA 14. Não houve alterações para as exposições de 24 e 96 h. Para 48 h, foram encontrados aumentos significativos de 1,8; 2,4 e 3,8x, para as concentrações 2,13; 3,41 e 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . E para 72 h, foram encontradas reduções significativas de 44, 55 e 29% para 2,13; 3,41 e 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

TABELA VIII: Médias das atividades enzimáticas da EST- $\beta$  expressas em nmol/mgptn/min e seus intervalos de confiança (IC) de 95%, em diferentes períodos de exposição e concentrações. . \* representam aumento significativo e \*\* apresentam diminuição significativa.

Tempo/ Concentração ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	24 h (IC)	48 h (IC)	72 h (IC)	96 h (IC)
<b>Controle</b>	3,28 (2,71-3,85)	3,09 (2,47-3,71)	6,14 (5,26-7,04)	2,08 (1,55-2,61)
<b>0,47</b>	3,75 (3,15-4,34)	3,85 (3,55-4,14)	5,43 (4,62-6,23)	1,86 (1,54-2,18)
<b>2,13</b>	3,54 (3,22-3,86)	5,44 * (4,72-6,16)	3,46 ** (3,02-3,90)	2,12 (1,77-2,49)
<b>3,41</b>	2,94 (2,57-3,31)	7,38 * (6,43-8,30)	2,78 ** (2,54-3,00)	2,53 (2,07-2,98)
<b>4,73</b>	2,82 (2,55-3,09)	11,69 * (9,66-13,72)	4,35 ** (4,03-4,67)	1,77 (1,49-2,04)

Como resultados para a CAT foram obtidos as médias das atividades enzimáticas expressas em  $\mu\text{mol/mgptn/min}$  que estão representadas na TABELA IX e os gráficos representados na FIGURA 15. Foram encontradas somente reduções significativas, de 56 e 25%, para a concentração 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em exposição de 48 h e para a concentração 3,41  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em exposição de 96 h, respectivamente.

TABELA IX: Médias das atividades enzimáticas da CAT expressas em  $\mu\text{mol/mgptn/min}$  e seus intervalos de confiança (IC) de 95%, em diferentes períodos de exposição e concentrações. . \* representam aumento significativo e \*\* apresentam diminuição significativa.

Tempo/ Concentração ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	24 h (IC)	48 h (IC)	72 h (IC)	96 h (IC)
<b>Controle</b>	158,75 (109,89- 207,61)	40,07 (24,69-55,45)	23,18 (19,11-27,25)	29,67 (26,14-33,22)
<b>0,47</b>	137,34 (101,31-173,39)	54,42 (32,45-76,39)	21,77 (16,91-26,63)	30,33 (26,48-34,18)
<b>2,13</b>	155,73 (129,48-181,98)	42,94 (25,29-60,58)	24,64 (19,86-29,42)	24,41 (21,32-27,50)
<b>3,41</b>	178,89 (153,93-203,85)	50,22 (29,87-70,57)	27,87 (22,02-33,72)	22,38 ** (18,11-26,63)
<b>4,73</b>	210,54 (195,49-225,59)	17,58 ** (12,55-22,61)	27,18 (24,73-29,63)	23,09 (19,51-26,69)

Como resultados para a SOD foram obtidas médias das atividades enzimáticas expressas em U SOD/mg ptn que estão representadas na TABELA X e

os gráficos representados na FIGURA 16. Diferentemente da CAT, foram encontrados somente aumentos significativos, de 1,4; 1,5 e 1,8x, para a 3,41  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em exposição de 24 h e para as concentrações 3,41 e 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , em exposição de 96 h, respectivamente.

TABELA X: Médias das atividades enzimáticas da SOD expressas em U SOD/mg ptn e seus intervalos de confiança (IC) de 95%, em diferentes períodos de exposição e concentrações. . \* representam aumento significativo e \*\* apresentam diminuição significativa.

<b>Tempo/ Concentração (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>24 h (IC)</b>	<b>48 h (IC)</b>	<b>72 h (IC)</b>	<b>96 h (IC)</b>
<b>Controle</b>	225,18 (202,52-247,84)	392,96 (310,10-475,82)	197,56 (166,23-228,89)	206,75 (168,37-245,13)
<b>0,47</b>	207,06 (178,32-235,80)	270,17 (247,43-292,91)	263,50 (212,01-314,99)	231,40 (209,14-253,67)
<b>2,13</b>	206,74 (142,14-271,34)	436,04 (274,76-597,32)	239,54 (167,763-311,32)	236,90 (174,84-298,93)
<b>3,41</b>	308,34 * (258,46-358,22)	363,92 (183,02-544,82)	235,27 (197,31-273,23)	320,89 * (250,58-391,20)
<b>4,73</b>	280,00 (236,52-323,48)	412,14 (223,79-600,49)	224,47 (194,36-254,58)	372,13 * (310,08-434,18)

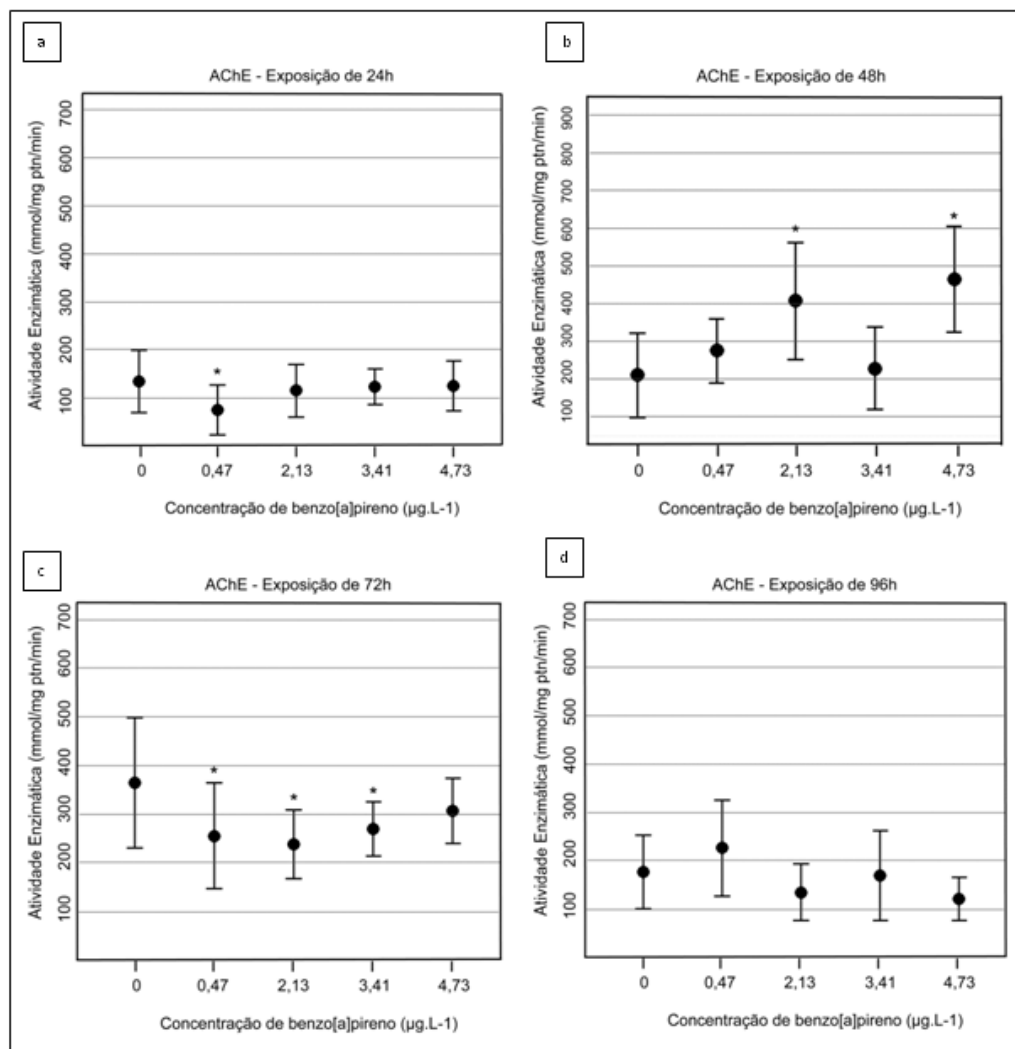


FIGURA 12: Toxicidade aguda do benzo[a]pireno comparada com o controle, através da atividade enzimática da enzima acetilcolinesterase (AChE) de *Chironomus sancticaroli*. Os valores expressam média da atividade enzimática  $\pm$  desvio-padrão. \* indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando anova - unifatorial e os contrastes de Tukey). Cada figura representa um tempo de exposição: a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h.

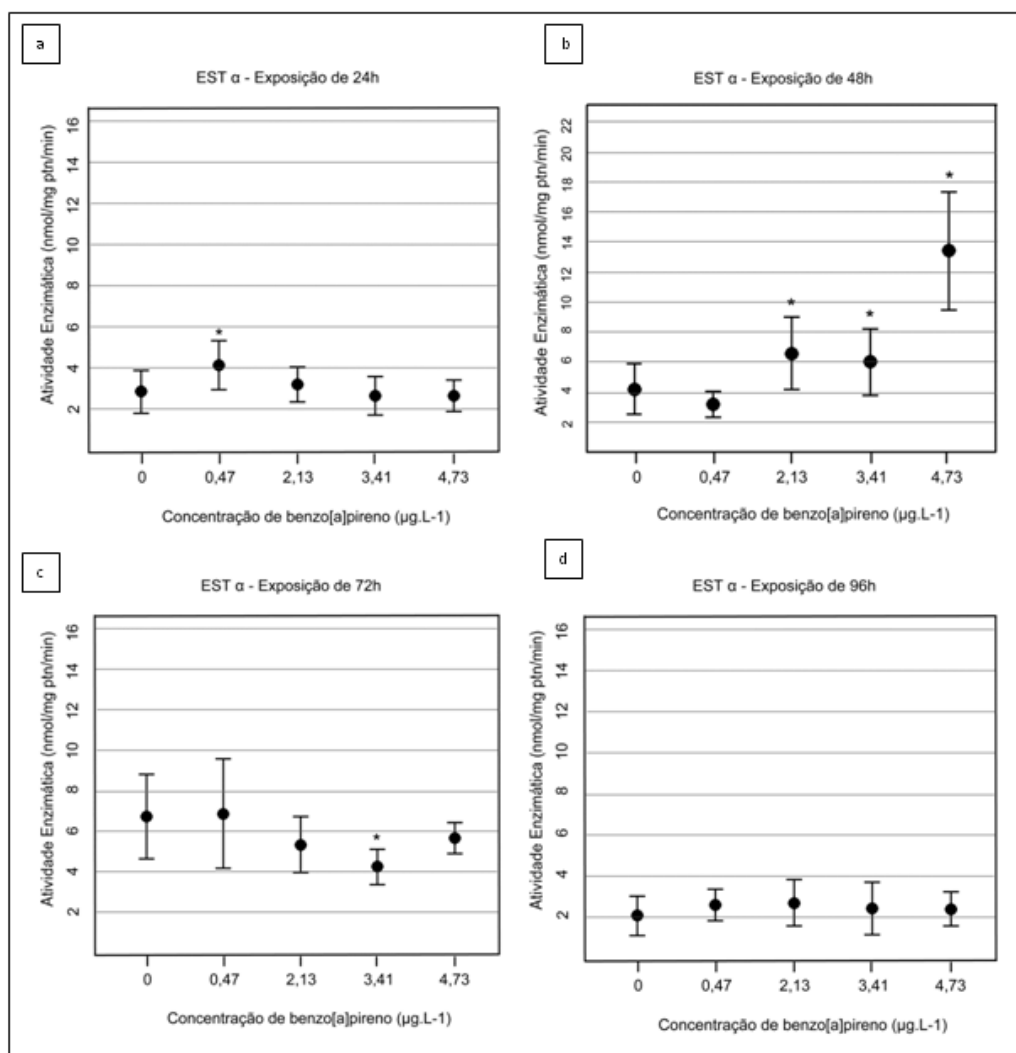


FIGURA 13: Toxicidade aguda do benzo[a]pireno comparada com o controle, através da atividade enzimática da enzima esterase-alfa (EST- $\alpha$ ) de *Chironomus sancticaroli*. Os valores expressam média da atividade enzimática  $\pm$  desvio-padrão. \* indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando ANOVA - unifatorial e os contrastes de Tukey). Cada figura representa um tempo de exposição. a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h.

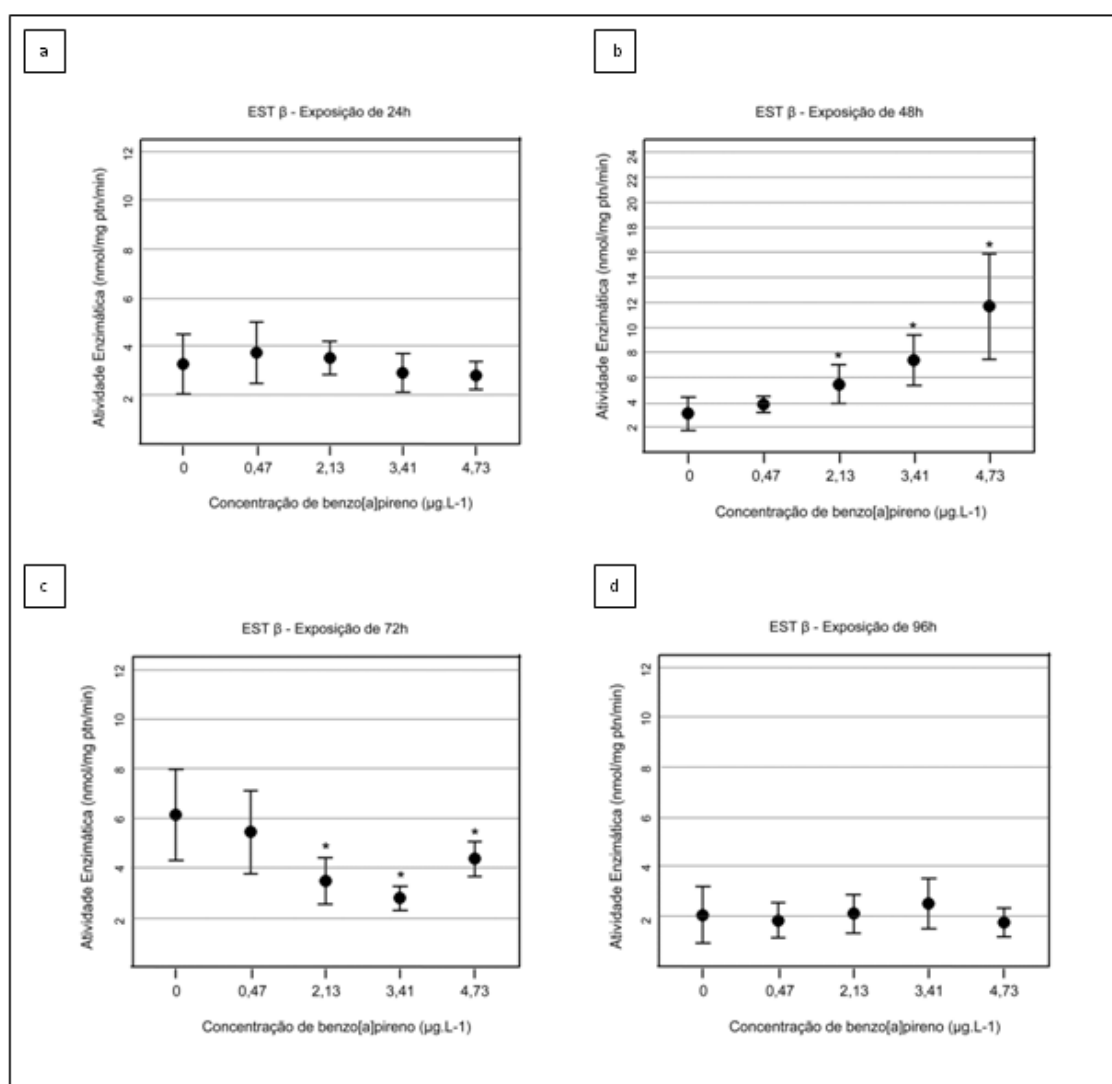


FIGURA 14: Toxicidade aguda do benzo[a]pireno comparada com o controle, através da atividade enzimática da enzima esterase-beta (EST-β) de *Chironomus sancticarioli*. Os valores expressam média da atividade enzimática ± desvio-padrão. \* indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando ANOVA - unifatorial e os contrastes de Tukey). Cada figura representa um tempo de exposição. a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h.

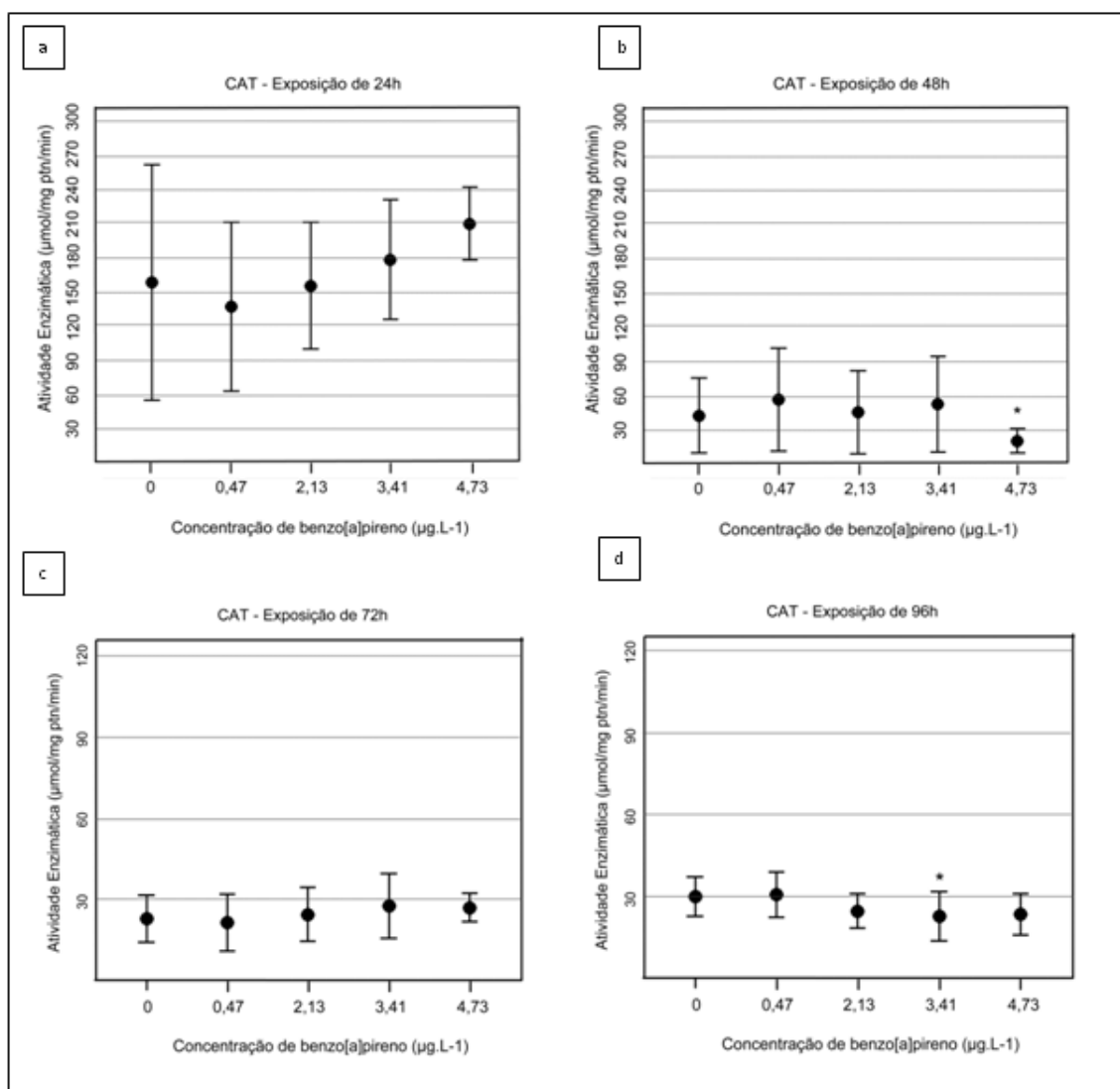


FIGURA 15: Toxicidade aguda do benzo[a]pireno comparada com o controle, através da atividade enzimática da enzima catalase (CAT) de *Chironomus sanctiparoli*. Os valores expressam média da média da atividade enzimática  $\pm$  desvio-padrão. \* indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando ANOVA - unifatorial e os contrastes de Tukey). Cada figura representa um tempo de exposição. a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h.

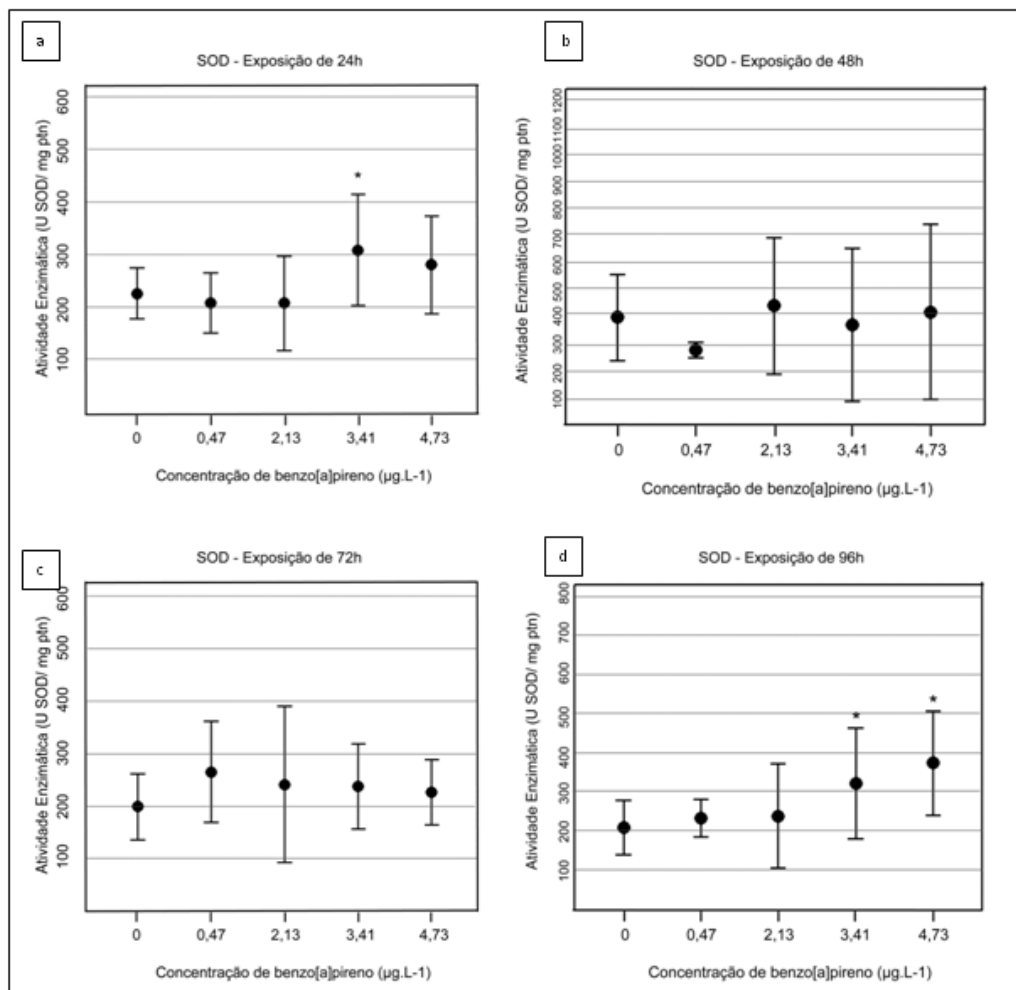


FIGURA 16: Toxicidade aguda do benzo[a]pireno comparada com o controle, através da atividade enzimática da enzima superóxido dismutase (SOD) de *Chironomus sancticaroli*. Os valores expressam média da atividade enzimática  $\pm$  desvio-padrão. \* indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando ANOVA - unifatorial e os contrastes de Tukey). Cada figura representa um tempo de exposição. a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 CONCENTRAÇÕES LETAIS

A ausência de sedimento refletiu na sensibilidade dos organismos, como no valor das concentrações letais. Para larvas de quironomídeos, o sedimento pode representar proteção, uma vez que os imaturos costumam confeccionar tubos, feitos com sedimento e seda, produzida por suas glândulas salivares (Fonseca & Rocha, 2004). Para moluscos, por exemplo, a concha é utilizada para estes fins. Nos experimentos com sedimento não foi observada a mortalidade esperada, em concentrações até mil vezes maiores do que a  $4,73 \mu\text{g.L}^{-1}$  sem sedimento. Isto pode ser explicado por questões de biodisponibilidade do composto, já que hidrocarbonetos em geral tem grande adsorção no sedimento. Principalmente os compostos com cinco ou mais anéis aromáticos e menor pressão de vapor, que é o caso do BaP (Brito, 2009). Logo espera-se que o BaP, devido às suas características físico-químicas, esteja mais retido no solo ou no sedimento do que na água (Frohner & Martins, 2008), o que não indica que esse composto deixa de ser um problema ambiental, já que condições do ambiente podem torná-lo biodisponível, como bioperturbação e processos físicos.

Os tubos construídos por imaturos de quironomídeos os permitem ficar mais protegidos contra predadores, além de limitar o contato direto com a água intersticial presente ali contendo o poluente (Schuler *et al.*, 2002). Dessa forma, podemos inferir que, na presença de sedimento, o BaP não ficou disponível e em contato o suficiente com as larvas de *Chironomus sancticaroli*. Ou seja, com a ausência do sedimento, o BaP pode tornar-se mais biodisponível para as larvas. Este composto, que tem baixa solubilidade em água, também pode se adsorver em partículas orgânicas possivelmente suspensas na água (Fatorelli & Corseuil, 2004), porém nos experimentos não foi adicionada ração, portanto, esperava-se que não houvesse tal matéria orgânica. Isso explica a diferença de mortalidade e faixa de concentrações letais entre bioensaios de toxicidade aguda com e sem sedimento.

## 5.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

A acetilcolinesterase é uma importante enzima relacionada ao sistema nervoso. Já é conhecido que carbamatos e organofosforados a inibem (Braga & Valle, 2007), e que o benzo[a]pireno tem potencial neurotóxico que pode alterar a atividade dessa enzima (Niu *et al.*, 2009).

Em *Chironomus*, diversos trabalhos já foram realizados, relatando a alteração em sua atividade em organismos expostos a xenobióticos (Callaghan *et al.*, 2001; Jin-Clarck *et al.*, 2002; Printes *et al.*, 2007). Neste trabalho, foram encontradas diferenças significativas na atividade da enzima AChE, em organismos expostos à diferentes concentrações e períodos de exposição. Em 24 h, houve uma redução de 46% na concentração 0,47  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Por ser considerada uma concentração de efeito não observado, e de valor muito baixo, não esperava-se encontrar alguma alteração na mesma. Até mesmo por não haver mortalidade neste tratamento. Esse resultado demonstra que mesmo com quantidades muito pequenas do poluente, o organismo pode ficar comprometido metabolicamente, mesmo estando vivo.

Em 72 h, houve uma redução nas concentrações 0,47; 2,13 e 3,41  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Esses últimos dados demonstram que há alteração em tempos de exposição maior, inclusive em concentrações maiores. Apesar de ter sido observada mortalidade na menor concentração, esta foi baixa, ressaltando o comprometimento metabólico de animais vivos. Alterações comportamentais podem ocorrer nessas larvas, já que a AChE está relacionada ao sistema nervoso, deixando-as mais suscetíveis a predação. Isto pode acarretar problemas ecológicos, uma vez que essas larvas servem de alimentos para outros organismos. Contudo, não foi observada diferença significativa em 96 h. Como a fotodegradação é um fator que tem influência na concentração do produto (Kot-Wasik *et al.*, 2004), e por consequência, em sua toxicidade, acredita-se que neste período mais prolongado a concentração de BaP a qual a larva estava exposta não foi suficiente para se observar algum efeito, nesta enzima, apesar da mortalidade encontrada.

As enzimas EST- $\alpha$  e EST- $\beta$  estão relacionadas ao metabolismo da fase I de xenobióticos. No período de 24 h, a EST-  $\alpha$  teve um aumento na concentração 0,47  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . No período de 48 h, ambas as esterases tiveram um aumento nas

concentrações 2,13; 3,41 e 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Em 72 h, a EST- $\alpha$  teve uma diminuição apenas na concentração 3,41  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , enquanto a EST- $\beta$  teve esse comportamento para as concentrações 2,13; 3,41 e 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Esses diferentes comportamentos podem ser reflexo da temperatura ótima para essas enzimas realizarem suas funções, visto que a EST- $\alpha$  possui maior atividade na temperatura de 30°C e a EST- $\beta$  em 25°C (Rebecchi, 2012) e o bioensaio de toxicidade aguda foi realizado em 25°C. Ambas as esterases apresentaram um padrão parecido de alteração, também não sendo alteradas em exposição de 96 h, podendo-se dizer que o composto poderia já estar mais degradado, ou que havia outras vias metabólicas sendo ativadas com o passar do tempo de exposição, como a SOD. Ainda assim, as alterações encontradas podem significar consideráveis efeitos no padrão de vida desses insetos, uma vez que as alterações indicam que o organismo pode estar alocando muita energia para se manter em um ambiente não favorável.

Pela literatura, esperava-se um efeito simultâneo entre a SOD e a CAT, isto é, que ambas aumentassem ou que ambas diminuíssem. Isto porque a catalase é inibida pelo radical superóxido, que está presente na ausência da SOD (Kono & Fridovich, 1982). Ou também porque grandes concentrações de peróxido de hidrogênio, que podem ser produzidos pela SOD ou por outras vias, podem induzir a atividade da CAT. No presente trabalho, encontrou-se um aumento na atividade da SOD para a concentração 0,47  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em exposição de 24 h e para as concentrações 3,41 e 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , em exposição de 96 h, o que indica a presença de radicais superóxidos em maiores quantidades, resultando em um quadro de estresse oxidativo. Dessa maneira, era esperado que a CAT também tivesse o mesmo comportamento, o que não ocorreu, uma vez que a CAT teve uma redução para a concentração 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em exposição de 48 h e para a concentração 3,41  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em exposição de 96 h.

Esse peróxido de hidrogênio, que pode ser produzido pela reação da SOD, não é degradado somente pela CAT. A GPx, não estudada neste trabalho, é outra enzima também participante deste sistema antioxidativo. Ela é responsável pela catalisação da redução de hidroperóxido pela glutathiona reduzida (GSH), formando glutathiona oxidada e água (Oga *et al.*, 2008). Jifa *et al.* (2006) testaram os efeitos da exposição do BaP em peixes *Lateolabrax japonicus*, encontrando aumento significativo, e correlacionado, para a SOD e a GPx, mas não encontrando alteração

na CAT. A GPx é considerada uma enzima protetora contra a peroxidação lipídica (LPO), o que pode indicar uma competição por substrato entre GPx e CAT, explicando as diferenças entre duas enzimas atuantes do mesmo sistema. No caso dos insetos, a principal enzima atuante neste sistema é a CAT, porém Felton & Summers (1995) afirmam que outra via de desintoxicação em insetos existe para substituir a GPx na degradação de peróxido de hidrogênio.

Além desses biomarcadores testados, outros também poderiam descrever e melhor ajudar no entendimento dos efeitos do BaP. Para se ter bons resultados e um melhor diagnóstico do efeito de poluentes, diversos biomarcadores devem ser analisados (Cajaraville *et al.*, 2000). O citocromo P450 é responsável pela transformação de hidrocarboneto no organismo, através de reações de monooxigenases (Brito, 2009). Dentro deste complexo está a isoforma CYP1A1, quantificada através da EROD, que atua transformando compostos orgânicos lipofílicos, como HPAs, em compostos hidrofílicos, facilitando sua excreção (Freire *et al.*, 2008) e se tornando um bom biomarcador para exposição a hidrocarbonetos. Como lipídeos são suscetíveis a espécies reativas de oxigênio (Kim *et al.* 2000), ou seja, são o resultado do estresse oxidativo, o biomarcador LPO também tem relevância, mas por questões de protocolo não foi possível testá-lo neste trabalho. Além disso, existem as BaP quinonas, que são compostos produzidos durante o metabolismo do BaP, provenientes da oxidação de um elétron no ciclo redox, e que também alteram a LPO, mostrando que também é algo que pode ser avaliado (Kim *et al.* 2000).

Para se ter um melhor panorama de efeitos deste composto, outros biomarcadores como genéticos e histopatológicos também podem ser utilizados. Porém, as alterações encontradas neste trabalho já demonstram os efeitos prejudiciais que o BaP tem para organismos da família Chironomidae. Alterações encontradas na AChE em curtos tempos de exposição, como 24h, e em baixas concentrações, como a CENO, indicam que o BaP tem efeitos neurotóxicos. Já alterações como nas ESTs em diferentes tempos e concentrações indicam efeitos metabólicos do BaP. E o aumento da SOD e a redução da CAT, mostram que o BaP tem efeitos no sistema antioxidante do organismo. Isso pode implicar em um débito metabólico da larva, tornando-a mais vulnerável até mesmo para outras condições adversas do ambiente. Como são importantes na teia trófica, como elos entre

produtores e consumidores secundários, o comprometimento metabólico e déficit energético nesses organismos podem causar alterações populacionais.

## 6 CONCLUSÕES

- A faixa letal do hidrocarboneto benzo[a]pireno para a espécie *Chironomus sancticaroli* varia de 1,31 a 10,52  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .
- O valor da  $CL_{50}$  do benzo[a]pireno na ausência de sedimento para *C. sancticaroli* é 4,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .
- Mortalidade de experimentos com benzo[a]pireno sem sedimento é maior que em experimentos contendo sedimento.
- As enzimas AChE, EST- $\alpha$ , EST- $\beta$ , SOD e CAT podem ser alteradas em presença de benzo[a]pireno, em curtos períodos de exposição, como em 24 ou 48 h, indicando que a contaminação aguda por benzo[a]pireno pode afetar a ecologia de ambientes aquáticos, uma vez que as larvas de *Chironomus sancticaroli* tem importância trófica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi, H. Catalase in vitro. 1984. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T. Narbonne, J. F. 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 49, n. 4, p 269-287.

Arias, A. R. L.; Buss, D. F.; Albuquerque, C.; Inácio, A. F.; Freire, M. M. Egler, M.; Mugnai, R.; Baptista, D. F. 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p 61-72.

Banni, M., Negri, A., Dagnino, A., Jebali, J., Ameer, S., Bousetta, H. 2010. Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73 (5), p. 842-848.

Bradford, M. 1976. 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.

Braga, I. A. & Valle, V. 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16, p.279-293.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação de corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras diretrizes. **Diário Oficial da União: República Federativa de Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 53, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.

Brito, C. F. 2009. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em sedimentos. Avaliação da represa do Parque Pedroso, Santo André, SP.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo.

Callaghan, A.; Hirthe, G.; Fisher, T. & Crane, M. 2001. Effects of short-term exposure to chlorpyrifos on biochemical, behavioural and life-history biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.50, p.19-24.

Cajaraville, M. P.; Bebianno, M. J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C.; Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311.

Ellmann, G. L.; Courtney, K. D.; Andreas, V. J. & Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95.

Fatorelli, L. & Corseuil, H. X. 2004. **Avaliação de risco ecológico para a estação intermediária de Guaratuba**. XIII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas. Cuiabá-MT.

Felton, G. W. & Summers, C. B. 1995. Antioxidant systems in insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 29, p. 187-197.

Fonseca, A. L.; Rocha, O. 2004. Laboratory cultures of native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera-Chironomidae). **Acta Limnologica Brasiliensis**, v.16, n. 2, p.153-161.

Fox, J., 2003. Effect displays in R for generalised linear models. **Journal of Statistical Software**, v.8,p.1-27.

Freire, M. M.; Santos, V. G.; Ginuino, I. S. F.; Arias, A. R. L. 2008. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n. 3, p. 347-354.

Froehner, S. & Martins, R. F. 2008. Avaliação do destino e bioacumulação de benzo[a]pireno através de simulação computacional. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1089-1093.

Gao, M., Li, Y., Sun, Y., Shah, W., Yang, S., Wang, Y., Long, J. 2011. Benzo[a]pyrene Exposure Increases Toxic Biomarkers and Morphological Disorders in Mouse Cervix. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, p. 398–406

Gao, R.; Yuan, Z.; Zhao, Z.; Gao, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, mar. 1998.

Guimarães, J. R. P. F. 2004. Toxicologia das emissões veiculares de diesel: um problema de saúde ocupacional e pública. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 6, p. 82-94.

Hemingway, J. & Ranson, H. 2000. Inseticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Reviews of Entomology**, v. 45, p. 371-391.

Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., 2008. Simultaneous inference in general parametric models. **Biometrical Journal**, v.50, p.346-363

Jifa, W.; Zhiming, Y.; Xiuxian, S.; You, W. 2006. Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 230–236

Jin-Clark, Y.; Lidy, M. J.; Zhu, K. Y. 2002. Effects of atrazine and cyanazine on chlorpyrifos toxicity in *Chironomus tentans* (Diptera:Chironomidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.21, n.3, p.598-603.

Kalinowski, R. & Załęska-Radziwiłł, M. 2011. Ecotoxicological assessment of freshwater sediments. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 20, n. 5, p. 1181-1191.

Kang, H. G., Jeong, S. H., Cho, M. H., Cho, J. H. 2007. Changes of biomarkers with oral exposure to benzo(a)pyrene, phenanthrene and pyrene in rats. **Journal of Veterinary Science**, v.8, n.4, p. 361-368.

Kim, H. S.; Kwack, S. J.; Lee, B. M. 2000. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo[a]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[a]pyrene. **Chemico-Biological Interactions**, v. 127, p. 139-150.

Kono, Y. & Fridovich, I. 1982. Superoxide radical inhibits catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 5751-5754.

Kot-Wasik, A.; Dabrowska, D.; Namieśnik, J. 2004. Photodegradation and biodegradation study of benzo(a)pyrene in different liquid media. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 168, p. 109–115

Lopez-Martinez, G.; Elnitsky, M. A.; Benoit, J. B.; Lee Jr., R. E. & Denlinger, D. L. 2008. High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica antarctica*, and developmentally linked expression of genes encoding superoxide dismutase, catalase and heat shock proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 796-804.

Magalhães, D.; Bruns, R. E.; Vasconcellos, P. C. 2007. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como traçadores de queima de cana-de-açúcar: uma abordagem estatística. **Química Nova**, v. 30, n.3, p 577-581.

Meire, R. O.; Azeredo, A.; Torres, J. P. M. 2007. Aspectos Ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n. 2, p 188-201.

Neubert, D. & Tapken, S. 1988. Transfer of benzo(a)pyrene into mouse embryos and fetuses. **Archives of Toxicology**, v. 62, p. 236–239.

Niu, Q.; Zhang, H.; Li, X.; Li, M. 2009. Benzo[a]pyrene-induced neurobehavioral function and neurotransmitter alterations in coke oven workers. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 67, p. 444-448.

Oga, S.; Camargo, M. M. A.; Batistuzzo, J. A. O. 2008. Fundamentos da toxicologia. Atheneu Editora, São Paulo, 3ª ed.

Palanikumar, L., Kumaraguru, A. K., Ramakritinan, C.M., Anand, M. 2012. Biochemical response of anthracene and benzo[a]pyrene in milkfish *Chanos chanos* **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, p. 187–197

Paumen, M. L.; Borgman, E.; Kraak, M. H. S.; van Gestel, C. A. M. Admiraal, W. 2008. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to polycyclic aromatic compound exposure. **Environmental Pollution**, v.152, p.225-232.

Printes, L. B.; Espíndola, E. L. G.; Fernandes, M. N. 2007. Biochemical biomarkers in individual larvae of *Chironomus Xanthus* (Rempel, 1939) (Diptera, Chironomidae). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.2, p.53–60.

Printes, L. B.; Fernandes, M. N. & Espíndola, E. L. G. 2011. Laboratory measurements of biomarkers and individual performances in *Chironomus xanthus* to evaluate pesticide contamination of sediments in a river of southeastern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.424-430.

R Development Core Team 2011. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <www.R-project.org>

Rebechi, D. 2012. **Efeitos ecotoxicológicos em *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) expostos ao organofosforado malathion**. Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Rocha, A. J. S., Gomes, V., Passos, M. J. A. C. R., Hasue, F. M., Santos, T. C. A., Bicego, M. C., Taniguchi, S., Ngan, P, V. 2012. EROD activity and genotoxicity in the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* exposed to benzo[a]pyrene (BaP) concentrations. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, p 995-1003.

Sgarbi, M. B. 2007. **Efeito *in vitro* dos ácidos fenilpirúvico, feniláctico e fenilacético sobre parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos jovens**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Shuler, L. J.; Heagler, M. G.; Lydy, M. J. 2002. Bioavailability of sediment associated benzo(a)pyrene within single-versus multiple-species systems. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, p. 199–204.

Silva de Assis, H. C .1998. **Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen**. Ph.D. Thesis, University of Berlin, Berlin, Germany.

Silva, C., Oliveira, C., Gravato, C., Almeida, J. R. 2013. Behaviour and biomarkers as tools to assess the acute toxicity of benzo(a)pyrene in the common prawn *Palaemon serratus*. **Marine Environmental Research**, v. 90, p. 39-46

Strixino, S. T. & Strixino, G. 1981. Nova espécie do gênero *Chironomus* Meigen do sul do Brasil (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.25, p.333-340.

Valle, D.; Montella, I. R.; Ribeiro, R. A.; Medeiros, P. F. V.; Martins-Jr, A. J. & Lima, J. B. P. 2006. **Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti***. Fundação Oswaldo Cruz and Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Rio de Janeiro and Distrito Federal. 129p.

Venables, W.N., Ripley, B.D., 2002. **Modern Applied Statistics with S**. 4<sup>th</sup> ed. Springer, New York. 45p.

Viveiros, W. 2012. ***Chironomus sancticarloi* – do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Withey, J.R.; Shedden, J.; Law, F.C. & Abedini, S. 1993. Distribution of benzo[a]pyrene in pregnant rats following inhalation exposure and a comparison with similar data obtained with pyrene. **Journal of Applied Toxicology**, v. 13, p. 193-202.

Xia, Y., Cheng, S., He, J., Liu, X., Tang, Y., Yuan, H., He, L., Lu, T., Tu, B., Wang., Y. 2011. Effects of subchronic exposure to benzo[a]pyrene (B[a]P) on learning and memory, and neurotransmitters in male Sprague–Dawley rat. **NeuroToxicology**, v. 32, p. 188–198.