

FABÍOLA XOCHILT VALDEZ DOMINGOS

**BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL
EM PEIXES E OSTRAS DE TRÊS ESTUÁRIOS BRASILEIROS
E CINÉTICA DE DERIVADOS SOLÚVEIS DO PETRÓLEO
EM PEIXES**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas com Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ciro A. Oliveira Ribeiro

Co-orientora: Prof^a. Dra. Helena C. Silva de Assis

Colaboração: Dr. Émilien Pelletier
Dr. Claude Rouleau

CURITIBA
2006

PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

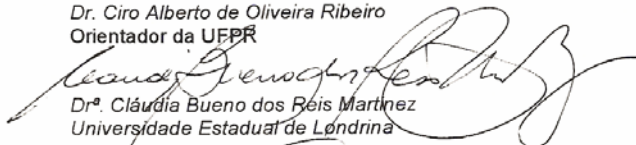
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

Ata da Sessão Pública, de exame de tese para obtenção do grau de doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

Ao(s) vinte e nove dias do mês de setembro de dois mil e seis, às 13:30 horas, nas dependências do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se à banca examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos professores: Dr^a. Cláudia Bueno dos Reis Martinez (Universidade Estadual de Londrina), Dr^a. Carolina Arruda de Oliveira Freire (Universidade Federal do Paraná), Dr^a. Flávia Sant'Ana Rios (Universidade Federal do Paraná), Dr. Jose Maria Monserrat (Fundação Universidade Federal do Paraná) e Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro (orientador e presidente da banca examinadora da UFPR), com a finalidade de julgar a tese do(a) candidato(a) **Fabiola Xochilt Valdez Domingos**, intitulada: "**Biomarcadores de contaminação ambiental em Regiões estuarinas Brasileiras e cinética de derivados de petróleo em peixe**", para obtenção do grau de doutora em Biologia Celular e Molecular. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa estabelecido pela coordenação do curso, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feitos pelo(a) orientador(a) Dr(a). Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro. Após haver analisado o referido trabalho e argüido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela "APROVAÇÃO" do(a) acadêmico(a), habilitando-o ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, na área de concentração em **BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**. Curitiba, 29 de setembro de 2006, desde que apresente a versão definitiva da tese conforme regimento interno do programa



Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Orientador da UFPR



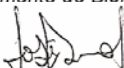
Dr^a. Cláudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina



Dr^a. Carolina Arruda de Oliveira Freire
Departamento de Fisiologia - UFPR



Dr^a. Flávia Sant'Ana Rios
Departamento de Biologia Celular - UFPR



Dr. José Maria Monserrat
Fundação da Universidade Federal do Rio Grande

Esta tese é dedicada à meus pais Ailton (*in memoriam*) e Maria Luisa e à minha
filha Bianca por todo seu auxílio, incentivo e
dedicação incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro a quem considero meu “Pai Científico”, pelos 9 anos de orientação, confiança e apoio nos momentos difíceis.

A minha Co-Orientadora Prof. Dr. Helena Cristina da Silva de Assis por sua orientação, paciência e confiança.

Aos meus Orientadores na Université do Québec a Rimouski Prof. Dr. Emilien Pelletier (Institut des Sciences de la Mer de Rimouski - ISMER, Université du Québec à Rimouski) e Dr. Claude Rouleau (IML – Institut Maurice Lamontagne), pela acolhida pessoal e profissional e por sua contribuição significativa na minha formação durante os 7 meses em que estive no Canadá.

A meus pais Ailton (*in memoriam*) e Maria Luisa, sem seus ensinamentos, incentivo e auxílio eu não estaria concluído esta tese.

A minha filha Bianca, por ter me privado de sua companhia em diversos momentos de minha formação, por paciência, motivação e esperança.

A minha família pelo incentivo, entusiasmo, e confiança.

A meus amigos, pessoas maravilhosas, com quem compartilho vitórias e tropeços.

A Manuela da Silva Dreyer, Nara Bobko, Patícia de Souza Diogo, Michele da Cunha Torres, pelo auxílio na preparação das amostras.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Celular em especial a Francisco Filipak Neto pelo auxílio imediato nas mais diversas tarefas, especialmente àquelas relacionadas a informática.

A Gislaine Canuel, Stephane, Coraline, Isabelle Desbiens pelo auxílio na preparação dos experimentos, coleta de amostras e manuseio de equipamentos.

A Irene Sloss, Gustavo, Antônio Curtosi, Emilie Doussantouse e Stephane pela calorosa acolhida no Canadá e auxílio nos mais diversos momentos.

Ao Centro de Estudos do Mar – CEM, professores Henry Louis Spach, Paulo Lana e suas equipes pela disponibilidade e auxílio logístico nas coletas realizadas em Paranaguá.

A todos os pesquisadores e suas respectivas equipes pelo auxílio nas coletas e no processamento inicial das amostras nas universidades: UFPE, UFRPE e UFES.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR.

A Marlene Camargo, por sua atenção e eficiência.

Aos professores desta academia especialmente Cloris Faraco, Célia Franco, Marco Randi, Luís Fernando Favaro, Sílvio Sanches Veiga, Stênio que tanto contribuíram para a minha formação.

A finalmente a UFPR, instituição na qual passei grande parte dos últimos 11 anos de minha vida.

Ao PROJETO RECOS – INSTITUTO DO MILÊNIO – Ministério da Ciência e Tecnologia pelo financiamento do projeto (www.mileniodomar.org.br).

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) – UFPR, especialmente a Regina, Rosângela, Sérgio e Matilde.

A CAPES pela bolsa de doutorado no país e pela bolsa sanduíche no exterior.

O que seria da ciência sem a curiosidade?

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. CONTAMINAÇÃO EM AMBIENTES AQUÁTICOS	1
1.1. METAIS PESADOS	2
1.2. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	3
1.3. PESTICIDAS ORGANOCLORADOS	5
1.4. PESTICIDAS ORGANOFOFORADOS E CARBAMATOS.....	7
1.5. ORGANOESTANHOS: TRIBUTIL-ESTANHO (TBT) E DIBUTIL-ESTANHO (DBT)	7
2. PEIXES E MOLUSCOS COMO BIOINDICADORES DE QUALIDADE AMBIENTAL.....	10
3. BIOMONITORAMENTO.....	12
4. BIOMARCADORES	14
5. CINÉTICA DE CONTAMINANTES EM ORGANISMOS AQUÁTICOS COMO FERRAMENTA PRÉVIA A ESTUDOS DE BIOMONITORAMENTO.....	16
CAPÍTULO I: BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM PEIXES NOS ESTUÁRIOS BRASILEIROS DE PARANAGUÁ (PR), PIRAQUÊ-AÇÚ (ES) E ITAMARACÁ (PE).....	18
I. 1. INTRODUÇÃO.....	19
I.2. MATERIAIS E MÉTODOS	21
I.2.1. ESPÉCIES BIOINDICADORAS	21
I.2.2. ÁREAS DE ESTUDO E ESTRATÉGIA AMOSTRAL.....	21
<i>I.2.2.1. Itamaracá - Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz - PE.....</i>	<i>23</i>
<i>I.2.2.2. Piraquê - Sistema Estuarino dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim - ES</i>	<i>24</i>
<i>I.2.2.3. Paraná - Complexo Estuarino Baía de Paranaguá.....</i>	<i>25</i>
I.2.3. PROCEDIMENTOS INICIAIS	26
I.2.4. BIOMARCADORES SOMÁTICOS	26
I.2.5. BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS.....	27
<i>I.2.5.1. Avaliação Histopatológica.....</i>	<i>27</i>
<i>I.2.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão</i>	<i>28</i>
<i>I.2.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura.....</i>	<i>28</i>
I.2.6. BIOMARCADOR BIOQUÍMICO - AVALIAÇÃO DA COLINESTERASE	28
I.2.7. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	29
I.3. RESULTADOS	30
I.3.1. INDICES SOMÁTICOS.....	30
I.3.2. HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS	32
I.3.3. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO	32
I.3.4. ATIVIDADE DA COLINESTERASE	37
I.4. DISCUSSÃO	38
CAPÍTULO II: BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM OSTRAS NOS ESTUÁRIOS BRASILEIROS DE PARANAGUÁ (PR), PIRAQUÊ-AÇÚ (ES) E ITAMARACÁ (PE).....	45
II. 1. INTRODUÇÃO.....	46
II.2. MATERIAIS E MÉTODOS	48
II.2.1. ESPÉCIE BIOINDICADORA.....	48
II.2.2. ÁREAS DE ESTUDO E ESTRATÉGIA AMOSTRAL	48
<i>II.2.2.1. Itamaracá - Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz - PE.....</i>	<i>50</i>
<i>II.2.2.2. Piraquê - Sistema Estuarino dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim - ES</i>	<i>51</i>
<i>II.2.2.3. Paraná - Complexo Estuarino Baía de Paranaguá.....</i>	<i>52</i>
II.2.3. PROCEDIMENTOS INICIAIS.....	53
II.2.4. BIOMARCADOR SOMÁTICO	54
II.2.5. BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS	54

<i>II.2.5.1. Avaliação Histopatológica</i>	54
<i>II.2.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão</i>	55
<i>II.2.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	55
II.2.6. BIOMARCADOR BIOQUÍMICO - AVALIAÇÃO DA COLINESTERASE.....	55
II.2.7. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	56
II. 3. RESULTADOS	57
II.3.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA.....	57
II.3.2. ÍNDICE SOMÁTICO	57
II.3.3. HISTOPATOLOGIA.....	59
<i>II.3.3.1. Lesões Detectadas</i>	59
<i>II.3.3.2. Ocorrência de Lesões</i>	63
II.3.4. ATIVIDADE DA COLINESTERASE	65
II. 4. DISCUSSÃO	66
CAPÍTULO III: CINÉTICA DE DERIVADOS DE PETRÓLEO EM <i>Fundulus heteroclitus</i> E <i>Salvelinus alpinus</i> APÓS EXPOSIÇÃO HÍDRICA	73
III.1. INTRODUÇÃO	74
III.2. MATERIAIS E MÉTODOS	75
III.2.1. ESPÉCIES BIOINDICADORAS.....	75
III.2.1. EXPERIMENTO COM RADIOISÓTOPOS.....	76
<i>III.2.1.2. Autoradiografia (WBARG – “Whole-body Autoradiography”)</i>	77
III.2.2. SIMULAÇÃO DE DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO.....	77
<i>III.2.2.1. Análise de HPAs na água</i>	79
<i>III.2.2.2. Análise de HPAs na bile</i>	80
III.3. RESULTADOS	81
III.3.1. Experimento com radioisótopos.....	81
<i>III.3.1.1. Análise Qualitativa</i>	81
<i>III.3.1.2. Análise Quantitativa</i>	83
<i>III.3.2. SIMULAÇÃO DE DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO</i>	84
<i>III.3.2.1. Análise de HPAs na água</i>	85
<i>III.3.2.2. Análise de HPAs na bile</i>	86
III.4. DISCUSSÃO	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Localização geográfica dos pontos referência (R) e contaminado (C) nas três regiões estuarinas avaliadas na costa brasileira.....	23
Figura 2. Índice hepatossomático (IHS), e fator de condição (FC) de peixes coletados em três estuários brasileiros.....	31
Figura 3. Histopatologia de brânquias de peixes das áreas estuarinas avaliadas.....	34
Figura 4. Índice histopatológico de lesões branquiais de indivíduos coletados nas áreas estuarinas estudadas.....	34
Figura 5. Histopatologia de fígado em indivíduos coletados nas áreas estuarinas avaliadas.....	35
Figura 6. Índice histopatológico de lesões hepáticas de indivíduos coletados nas áreas estuarinas estudadas.....	37
Figura 7. Ocorrência de centros de melanomacrófagos (CMM) e melanomacrófagos livres (MM) no fígado de indivíduos coletados nas áreas estuarinas estudadas.....	37
Figura 8. Atividade da colinesterase no músculo de indivíduos coletados nas áreas estuarinas estudadas.....	36

CAPÍTULO II

Figura 1. Localização geográfica dos pontos referência (R) e contaminados (C1 e C2) nas três regiões estuarinas avaliadas na costa brasileira.....	48
Figura 2. Índice de condição (IC) de <i>Crassostrea rhizophora</i> coletada no inverno e verão em três estuários brasileiros.....	57
Figura 3. Lesões histopatológicas observadas nas brânquias de <i>Crassostrea rhizophora</i>	57
Figura 4. Organização ultraestrutural e lesões detectadas nos filamentos branquiais de <i>Crassostrea rhizophora</i>	59
Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura das brânquias de <i>Crassostrea rhizophora</i>	60
Figura 6. Ocorrência comparativa de lesões histopatológicas nas brânquias de <i>Crassostrea rhizophora</i> entre três regiões estuarinas da costa brasileira.....	62

CAPÍTULO III

Figura 1. Recipiente de contenção de petróleo.....	48
Figura 2. Autorradiogramas de <i>Fundulus heteroclitus</i> após exposição de 24h.	79
Figura 3. Índice de concentração (IC) de Naftaleno, Naftol e Fenantreno em <i>Fundulus heteroclitus</i> durante 21 dias de experimento.....	81
Figura 4. Eliminação de Naftaleno, Naftol e Fenantreno durante o período de depuração em <i>Fundulus heteroclitus</i> durante 21 dias de experimento.....	81
Figura 5. Presença de HPAs na água durante o experimento de simulação de derramamento de petróleo em <i>Salvelinus alpinus</i>	82
Figura 6. Cromatogramas de bile obtidos por HPLC-FL.	83

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Exemplos de fatores de importância utilizados no cálculo do índice de lesões segundo Bernet et al. (1999).....	27
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água nos três estuários avaliados.....	30
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água nos três estuários avaliados.	30

CAPÍTULO II

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água nos três estuários avaliados.	56
Tabela 2. Alterações histopatológicas relacionadas a exposição à contaminantes observadas por alguns autores nas brânquias de bivalves.....	66

CAPÍTULO III

Tabela 1. Características dos contaminantes testados.....	74
Tabela 2. Estimativa da concentração de HPAs metilados em amostras provenientes da simulação de derramamento de petróleo.....	83
Tabela 3. Características dos metabólitos naftol, fenantrol e pireno.....	83

RESUMO

Ambientes aquáticos, particularmente regiões estuarinas, constituem o destino final de diversos tipos de contaminantes. Este estudo apresenta duas abordagens diferentes: a avaliação comparativa de biomarcadores em três regiões estuarinas brasileiras e avaliação da cinética de derivados do petróleo através de bioensaios. Para o biomonitoramento dos estuários de Paranaguá (PR), Piraquê (ES) e Itamaracá (PE) foram utilizados três organismos bioindicadores: peixes (*Cathorops spixii* e *Lutjanus synagris*) e ostras (*Crassostrea rizophorae*). Biomarcadores somáticos, histopatológicos (brânquias e fígado) e bioquímico (atividade da acetilcolinesterase) foram avaliados em ambas as espécies. Diferenças nos índices somáticos e atividade da colinesterase, bem como a ocorrência de lesões histopatológicas foram detectadas nos peixes. As ostras apresentaram índices de condição e atividade da colinesterase similar entre as áreas avaliadas, além disso, lesões histopatológicas foram observadas nestes organismos. Em todas as áreas amostradas os peixes apresentaram diferenças no fator de condição, nas lesões histopatológicas hepáticas e branquiais, bem como na atividade da colinesterase nos diferentes pontos de coleta. A avaliação cinética e toxicológica de derivados de petróleo foi realizada através de dois experimentos (1) exposição a derivados de petróleo (naftaleno, naftol e fenantreno) marcados com ^{14}C e (2) simulação de derramamento de petróleo. Através do experimento (1) foi possível observar a cinética dos compostos avaliados na espécie de peixe *Fundulus heteroclitus*. Os principais órgãos alvo destes compostos foram vesícula biliar, intestino e fígado. Através da simulação de derramamento de petróleo foi possível detectar a presença de derivados de HPAs na água através de espectrofotometria e de HPLC-FL, porém estes compostos não foram detectados na bile de *Salvelinus alpinus* através da análise ao HPLC-FL. Os resultados obtidos nos estuários brasileiros revelam que todas as áreas avaliadas estão impactadas, bem como a importância da abordagem de múltiplos biomarcadores em estudos de biomonitoramento. Os estudos relativos à cinética contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos de dispersão, biocumulação e distribuição de HPAs leves em peixes.

Palavras-chave: atividade da acetilcolinesterase, biomarcadores, biomonitoramento, cinética de derivados de petróleo, fenantreno, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, histopatologia, naftaleno, naftol.

ABSTRACT

Aquatic environments, particularly estuarine regions, receive a expressive load of contaminants. This study presents two different approaches: a comparative biomarker evaluation in three Brazilian estuarine areas and a kinetic evaluation of petroleum derivatives through bioassays. The biomonitoring of Paranaguá (PR), Piraquê (ES) and Itamaracá (PE) estuaries were carried out on three bioindicator species: fishes (*Cathorops spxii* and *Lutjanus synagris*) and oysters (*Crassostrea rizophorae*). Somatic, histopathologic (gills and liver) and biochemical biomarkers (cholinesterase activity) were evaluated on these species. Differences on somatic indexes and cholinesterase activity as well as the occurrence of histopathologic lesions were detected on fishes. Oysters presented somatic indexes and cholinesterase activity values similar between evaluated areas, besides that, histopathologic lesions were observed on these organisms. Fishes presented differences on condition factor, histopathologic lesions on liver and gills, as well on cholinesterase activity. In order to evaluate the kinetic parameters of petroleum derivatives two experiments were done: (1) a waterborne exposition to selected petroleum derivatives (naphthalene, naphtol and phenantrene) radiolabeled with ^{14}C and (2) a simulation of an oil spill. The results of the first experiment showed that the main target organs for naphthalene, naphtol and phenantrene in *Fundulus heteroclitus*, were gall bladder, intestine and liver. The presence of petroleum derivatives was detected on the aquaria water through spectrophotometry and HPLC-FL after the oil spill simulation. However these compounds were not detected on the bile of evaluated animals analysed through HPLC-FL. The results obtained on the Brazilian estuaries suggest that all evaluated areas are impacted, as well the relevance of a multibiomarker approach on biomonitoring studies. The kinetic results contribute to a better understanding of dispersion, bioaccumulation and distribution of light PAHs on fishes.

Key-words: acetilcholinesterase activity, biomarkers, biomonitoring, histopathology, kinetic of petroleum derivatives, naphthalene, naphtol, phenentrene, polycyclic aromatic hidrocarbons.

INTRODUÇÃO GERAL

1. CONTAMINAÇÃO EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Os ecossistemas aquáticos são considerados receptores finais de contaminantes liberados no ambiente, estando susceptíveis a ação de contaminantes aéreos, que chegam aos corpos d'água por deposição atmosférica e contaminantes terrestres que atingem os ambientes aquáticos através do escoamento destes pelas chuvas.

Os estuários são ambientes aquáticos de transição entre ecossistemas dulcícolas e marinhos. São regiões parcialmente fechadas nas quais a água do mar é bastante diluída pelo aporte de água doce do continente (Thurman e Trujillo, 1999). As regiões estuarinas são extremamente importantes do ponto de vista biológico, pois apresentam alta riqueza de espécies e podem ser consideradas como "berçário" para diversas espécies marinhas, tanto pela proteção quanto pela grande disponibilidade de nutrientes (Thurman e Trujillo, 1999).

Situados em regiões costeiras, os estuários freqüentemente encontram-se localizados em áreas de grande atividade antropogênica, sendo, portanto susceptíveis aos impactos decorrentes destas atividades. As principais fontes de impacto ambiental em estuários seriam o escoamento de esgoto proveniente de áreas urbanas, a liberação de diversos produtos químicos (orgânicos e inorgânicos) pela atividade industrial, a agricultura e o fluxo de embarcações, atividade a partir da qual podem ocorrer vazamentos acidentais de petróleo e derivados, combustíveis e outros produtos transportados por via marítima (Kennish, 1991).

Através das diversas fontes acima citadas, os poluentes mais comumente encontrados em estuários são: metais pesados (em especial os compostos

organoestanhos); hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs); pesticidas como bifenilas policloradas(PCBs), organoclorados (OC) e organofosforados; dioxinas e furanos; detergentes e outros componentes do esgoto urbano e da ocupação humana.

1.1. METAIS PESADOS

Os metais pesados correspondem a um grupo de elementos químicos que apresenta massa atômica variando entre 63,54 a 200,59 (Viarengo, 1989). A maioria dos metais pesados apresenta potencial tóxico comprovado, ou seja, são capazes de induzir efeitos deletérios aos organismos vivos expostos (Dallinger e Raimbow, 1993). Alguns metais pesados como ferro, cobre, zinco e cobalto, são considerados elementos essenciais aos processos biológicos, mas podem ser tóxicos quando em concentrações mais elevadas (Kennish, 1991; Heath, 1995).

A atividade industrial de mineração, processamento de metais e geração de despejos industriais e domésticos vem contribuindo para o aumento da concentração de diversos metais pesados nos ambientes naturais (Abel, 1989). Os organismos vivos podem bioacumular metais pesados, incorporando-os na cadeia trófica e atingindo grande parte dos diferentes estratos que constituem os ecossistemas aquáticos (Viarengo, 1989).

Experimentos agudos com peixes através de estudos de laboratório mostraram que o mercúrio é capaz de induzir alterações branquiais como a fusão de lamelas secundárias nas espécies *Trichomycterus zonatus* e *Salvelinus alpinus* (Oliveira Ribeiro et al., 1996; Oliveira Ribeiro et al., 2000). No entanto

existem relatos de que outros metais pesados, como o chumbo, também podem afetar a estrutura das brânquias em peixes (Alves Costa, 2001).

Alterações hepáticas em peixes expostos a metais também foram relatadas em nosso grupo de pesquisa. Áreas de necrose, danos nucleares e morte celular foram relatados por Rabitto et al (2005) em *Hoplias malabaricus* após exposição crônica a chumbo inorgânico. Oliveira Ribeiro et al. (2002) observaram desorganização citoplasmática e áreas de necrose após exposição trófica ao metil-mercúrio.

1.2. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), são compostos orgânicos que apresentam dois ou mais anéis carbônicos fundidos. Alguns HPAs como o benzo[a]pireno, são formados através da combustão incompleta de compostos orgânicos e subsequente recombinação com outras partículas orgânicas, constituindo portanto uma fonte importante destes compostos (Harvey,1991).

HPAs podem ser introduzidos naturalmente no ambiente através de queimadas de florestas, pastagens e atividades vulcânicas. Como fontes antropogênicas de HPAs é possível destacar: descargas e derramamentos de petróleo, geração de energia elétrica, esgotos urbanos e industriais, incineração de lixo e madeira, aquecimento de casas além da produção de carvão e asfalto (Albers, 1995).

A presença de HPAs em ambientes aquáticos contaminados pode ser detectada tanto nos componentes bióticos quanto nos componentes abióticos

do ecossistema. Mamíferos, aves, peixes e vários macroinvertebrados são capazes de metabolizar os hidrocarbonetos ingeridos, porém, organismos que vivem muito próximos à fonte de contaminação ou que não possuem sistemas de detoxificação bem desenvolvidos, como os bivalves, tendem a bioacumular estes compostos mais intensamente (Albers, 1995).

Em invertebrados tem-se registrado que os HPAs são capazes de causar a indução de 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 e Deng, 1996 e Ueno et al, 1995). Além dos efeitos descritos, em peixes os HPAs freqüentemente estão associados a mutações, malformações, tumores e câncer (Collier et al. 1998), e ainda a alterações fisiológicas e morfológicas nos rins e fígado, hiperplasia nas brânquias e erosão em nadadeiras observadas por Hsu e Deng (1996).

Dados mostram que os hidrocarbonetos derivados do petróleo provocam danos estruturais nas lamelas respiratórias das brânquias (DiMichele e Taylor, 1978; Engelhardt et al., 1981; Poirier et al., 1989; Correa e Garcia, 1990; Prasad, 1991, Nero et al., 2006), comprometendo as trocas gasosas do organismo com o meio e resultando em hipóxia, sendo esta a principal causa de morte em massa de peixes. Além disso, Spiers et al. (1996) identificaram lesões hiperplásicas em células mucosas e de cloreto nas brânquias de peixes expostos a HPAs.

Hidrocarbonetos podem se acumular em ovos de peixes e são transferidos para as larvas após a eclosão dos ovos (Goksoyr et al., 1991). Spiers et al. (1996) observaram necroses múltiplas e um variável número de macrófagos e linfócitos no fígado de organismos expostos em um derramamento de petróleo

no canal de Santa Bárbara. Segundo estudos de diversos autores os hidrocarbonetos provenientes do petróleo elevam as concentrações de cortisol no plasma (Di Michele e Taylor, 1978; Levitan e Taylor, 1979; Engelhardt et al., 1981; Leloup-Hatey e Hardy, 1985). O aumento na concentração deste hormônio deprime a função da tireóide (Redding et al., 1986; Brown et al., 1991), podendo apresentar como consequência alterações no comportamento reprodutivo e alimentar dos organismos expostos.

Estudos recentes realizados em nosso laboratório mostraram que a fração solúvel do petróleo é capaz de causar inibição na atividade da acetilcolinesterase (AChE) em *Astyanax sp* após exposição aguda, bem como várias das lesões mencionadas acima (Akaishi et al., 2004).

1.3. PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

Após a Segunda Guerra Mundial, ocorreu um súbito aumento no uso dos inseticidas. Logo após o seu uso começou-se a observar que tais compostos eram encontrados com freqüência no ambiente natural, principalmente em organismos que não constituíam seu alvo inicial. Sua toxicidade, persistência e características lipofílicas, causavam o acúmulo de resíduos em tecidos, mortalidade, efeitos na reprodução e declínio de populações selvagens. Estudos sobre os efeitos de pesticidas em peixes tiveram início logo após a introdução do DDT (dimetil-difenil-tricloroetano) em 1943 (Blus, 1995).

Além da vasta utilização na agricultura, como pesticidas, outros organoclorados (PCBs - bifenilas policloradas, DDT, dioxinas e furanos), principalmente os PCBs têm sido extensivamente utilizados nas indústrias

eletrônicas, manufatura de adesivos, aditivos de óleo hidráulico, tintas, extintores, plásticos e em copiadoras de papel (Tam e Yao, 2002).

Assim como os HPAs, vários dos compostos organoclorados pertencem a classe dos poluentes orgânicos persistentes (POPs), os quais são compostos que apresentam resistência à degradação e, portanto, encontram-se por períodos de tempo prolongados no ambiente (Ali e Sreekrishnan, 2001; Fillman et al., 2002). Os POPs podem ser transportados por longas distâncias, pois tem sido detectados em amostras biológicas coletadas em locais distantes das fontes de contaminação (Simonich e Hites, 1995 *apud* Vives e Grimalt, 2002) e podem participar de diversos ciclos biogeoquímicos sem sofrerem degradação (Vives e Grimalt, 2002).

Por sua toxicidade e persistência no ambiente, os POPs tem sido o alvo principal de atuação dos órgãos de proteção ambiental no Canadá (Canadian Environmental Protection) e Estados Unidos (United States Protection Agency - EPA) (Ali e Sreekrishnan, 2001). Os POPs, por serem de difícil degradação, tendem a se concentrar no ambiente e serem bioacumulados pelos organismos vivos afetando a saúde dos ecossistemas e da mesma forma colocando em risco a saúde humana (Fillman et al., 2002). Os compostos organoclorados persistem por longos períodos no ambiente, com isso atuam cronicamente sobre os organismos vivos sendo capazes de induzir alterações genéticas nos organismos expostos, podendo levar a alterações congênitas e neoplasias diversas (Ali e Sreekrishnan, 2001). Sendo assim, estes compostos estão associados a graves efeitos ambientais, atuando sobre uma ampla variedade de espécies e atingindo todos os níveis tróficos (Blus, 1995). A exposição a organoclorados tem sido associada ao

declínio de populações de animais marinhos (Tanabe et al., 1994 *apud* Fillman et al., 2002).

1.4. PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS E CARBAMATOS

Os organofosforados e carbamatos são pesticidas que tem sido utilizados no controle de insetos e outros invertebrados (Hill, 1995). Esta classe de pesticidas é rapidamente metabolizada ou excretada pela maioria dos organismos vivos, não havendo bioconcentração nas cadeias tróficas. Portanto, os organofosforados e carbamatos apresentam um tempo relativamente curto de permanência no ambiente. Esses fatores, associados à sua eficiência tem favorecido a substituição dos organoclorados pelos organofosforados e carbamatos.

Os organismos podem ser afetados pelos organofosforados e carbamatos através do contato direto, que pode ocorrer na aplicação do pesticida, na ingestão de água, solo, presas ou alimentos contaminados. Vários estudos mostram que organismos aquáticos expostos à organofosforados e carbamatos afetam a atividade das colinesterases (De la Torre et al., 2002; Rofriguez-Fuentes e Gold-Bouchot, 2000; Tortelli et al., 2006).

1.5. ORGANOESTANHOS: TRIBUTIL-ESTANHO (TBT) E DIBUTIL-ESTANHO (DBT)

O TBT (tributil-estanho) é um composto organometálico que tem sido amplamente utilizado como biocida em tintas de embarcações desde a década de 70, e talvez seja o agente químico mais tóxico que tem sido introduzido deliberadamente nos ecossistemas aquáticos (Pelletier, 1995). Além

disso, este composto é utilizado também na indústria de PVC como estabilizador, na proteção de madeira contra fungos e bactérias, como agente desinfetante e como pesticida na agricultura. Apesar de regulamentado o uso do TBT em vários países, a contaminação ainda persiste em níveis tóxicos crônicos, havendo registros da presença deste composto nos organismos aquáticos e sedimento (Fent e Hunn, 1995).

Em vários animais (como mamíferos, peixes e invertebrados) foi demonstrado que o TBT é metabolizado em produtos intermediários hidroxilados como o dibutil-estanho (DBT) e monobutil-estanho (MBT) (Fent, 1996). Experimentos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que xenobiontes como o TBT podem inibir o sistema enzimático citocromo P450 em peixes, através da inativação de algumas enzimas deste complexo, alterando-as e inibindo o seu funcionamento (Fent e Stegman, 1993; Fent e Buchelil, 1994). Desta forma, o TBT pode alterar tanto o seu próprio metabolismo quanto o de outros poluentes que são biotransformados pelo sistema P450. Além disso pode interferir em outras vias metabólicas do organismo como a biosíntese de hormônios, processo do qual este complexo multienzimático participa (Pádroš et al., 2000).

Segundo Fent e Meier (1992), a presença de TBT na água leva a um alto índice de mortalidade de larvas de *Phoxinus phoxinus*, além de deformação no eixo do corpo, paralisia e presença de olhos opacos. Também foi observado nesta mesma espécie degeneração na pele, músculo esquelético, rim e epitélio da córnea, com algumas células apresentando vacuolização do citoplasma e picnose. Dados recentes e ainda não publicados pelo nosso grupo, mostram que o TBT quando dissolvido na água, leva à mortalidade de 100% da população de

alevinos de *Phaloceros caudimaculatus*, em concentrações consideradas subletais para outros organismos de clima nórdico. Estes resultados mostram que alevinos de *Phaloceros caudimaculatus* são mais sensíveis do que peixes de clima temperado. A sensibilidade e suscetibilidade mais acentuada em organismos tropicais do que nórdicos foi demonstrada no estudo realizado por Oliveira Ribeiro et al. 2000, neste trabalho a espécie brasileira *Trichomycterus zonatus* foi capaz de acumular maiores concentrações de Hg do que espécie nórdica *Salvelinus alpinus* em condições experimentais similares. Estes resultados reforçam ainda mais o argumento de que a legislação referente a níveis máximos permissíveis da presença de contaminantes na água deveria ser estabelecida a partir de resultados obtidos com espécies nativas, dados esses que ainda são escassos na literatura.

Trabalhos desenvolvidos no nosso laboratório demonstraram ainda que exemplares de *Salvelinus alpinus* submetidos a injeções intraperitoneais de 0,3 mg TBT/kg apresentaram necroses hepáticas e alterações na organização da cromatina em hepatócitos (Valdez Domingos, 1999). A presença de necroses associada à exposição ao TBT também foi relatada por outros autores (Holm et al., 1991; Schwaiger et al., 1992; Ueno et al., 1994 e Ueno et al., 1995 e Oliveira Ribeiro et al, 2002), evidenciando este tipo de alteração como um importante elemento na identificação do potencial tóxico do TBT em fígado de peixes. O fígado é um importante órgão-alvo para o TBT e seus derivados, onde a ação deletéria deste composto pode comprometer as condições de vida do organismo tanto pela importância do órgão, quanto pela gravidade das alterações diagnosticadas.

Dada sua toxicidade faz-se necessária a quantificação e discussão dos níveis de TBT e DBT na costa brasileira, bem como estudos para diagnosticar de forma mais ampla seus reais efeitos sobre os organismos aquáticos tropicais brasileiros. A utilização de espécies nativas nestes estudos, mesmo quando realizados em condições de laboratório, constituem dados importantes auxiliando na escolha de espécies bioindicadoras em estudos de biomonitoramento e diagnóstico de áreas impactadas por estes contaminantes.

Diante das múltiplas fontes de impacto antropogênico sobre as regiões costeiras, principalmente nas áreas estuarinas, faz-se necessário o desenvolvimento e a padronização de metodologias e de biomarcadores que possam contribuir para a avaliação e diagnóstico dos impactos a que estão sujeitas estas regiões no Brasil.

2. PEIXES E MOLUSCOS COMO BIOINDICADORES DE QUALIDADE AMBIENTAL

Bioindicadores são espécies de organismos vivos cujas características favorecem sua utilização na avaliação da saúde de um determinado ecossistema. Alguns fatores devem ser considerados na escolha de espécies bioindicadoras em estudos de biomonitoramento: (1) a espécie deve ser representativa da área de estudo; (2) deve possuir hábito preferencialmente sedentário ou de baixa mobilidade, constituindo assim populações fixas a fim de que sua exposição aos contaminantes possa refletir as condições da região em estudo (Radtke, 1979); (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 (Stewart e Malley, 1997); 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 fenômenos de bioacumulação e biomagnificação (Oliveira Ribeiro et al., 1999; Vives e Grimalt ,2002).

A utilização de espécies de vertebrados e de invertebrados em um mesmo estudo de biomonitoramento ambiental gera resultados que possibilitam uma análise mais ampla das condições de impacto do ambiente, visto que existem diferenças na fisiologia e complexidade de respostas que estes organismos podem apresentar. Desta forma o uso de um número variado de biomarcadores como avaliações somáticas, moleculares, bioquímicas, genéticas, imunológicas e morfológicas torna o estudo mais representativo. No entanto, dependendo do biomarcador selecionado, os protocolos para estes parâmetros diferem, podendo ser específicos para grandes grupos taxonômicos ou mesmo para famílias, gêneros e espécies, fazendo-se necessária uma padronização prévia dos protocolos antes do início das amostragens definitivas.

Peixes e moluscos apresentam várias das características acima citadas e têm sido considerados excelentes bioindicadores. Estes organismos vêm sendo amplamente utilizados em estudos de toxicologia e monitoramento ambiental, na avaliação da saúde dos ecossistemas aquáticos tanto com relação à presença quanto aos efeitos de poluentes (Carjaville et al., 2000; Silva et al., 2001; Nasci et al., 2002; Svärth, 2003; Amado et al., 2003 e 2006; Joyeux et al., 2004; Medeiros et

al., 2005; Oliveira Ribeiro et al., 2005; Binelli et al., 2006; Rabitto et al., 2005; Nigro et al., 2006; Teles et al., 2006; Zanette et al., 2006).

3. BIOMONITORAMENTO

Através de programas de monitoramento é possível identificar e acompanhar impactos antropogênicos em determinadas áreas ao longo do tempo (Lange, 1996). Inicialmente os estudos de monitoramento enfocavam a detecção de contaminantes no compartimento abiótico de ambientes aquáticos (coluna d'água e sedimento) (Van der Oost et al., 1996; Rainbow et al., 1995; Silva et al., 2001), posteriormente começou-se a avaliar a presença de xenobiontes nos componentes bióticos desses contaminantes (Kehrig et al., 1998; Schmitt et al., 1999; Watanabe et al., 1999). Alguns autores como Meyer et al. (1998), Silva et al. (2001), Joyeux et al. (2004), Pereira e Kuch (2005) e Silva et al. (2006) relatam a presença de contaminantes em águas costeiras brasileiras.

Estudos de biomonitoramento direcionados a detecção e avaliação de efeitos em organismos vivos são bem mais recentes (Doran et al., 2001; Barreiro et al., 2002; Nasci et al., 2002; Monteiro et al., 2005; Munteanu e Munteanu, 2006) e vêm sendo bastante utilizados em ambientes estuarinos e marinhos na Europa e América do Norte (Nasci et al., 2002; Petrovic et al., 2004; Munteanu and Munteanu, 2006; Nigro et al., 2006). Na costa brasileira ainda são escassos os dados relativos à biomonitoramento, estes estudos foram recentemente iniciados e vêm sendo realizados mais intensamente nos últimos anos (Ventura et al., 2002; Lemos et al., 2005; Martins et al., 2005; Amado et al., 2006; Camargo and Martinez, 2006; Zanette et al., 2006), como o projeto RECOS financiado pelo

Ministério da Ciência e Tecnologia através do Instituto do Milênio, do qual faz parte o presente trabalho.

O Projeto Instituto do Milênio - RECOS - Uso e Apropriação dos Recursos Costeiros, é um projeto amplo, aprovado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (Dez/2001), e financiado pelo Banco Mundial, no qual estão envolvidas diversas instituições brasileiras: FURG, CECO (UFRGS); UNISUL, CLIMERH/EPAGRI (SC), UFSC, UFPR, IAG (USP), UFFL, UFES, UFRPE, UFPE, UFMA, UFPA e Museu Goeldi.

Quatro grandes áreas temáticas constituíram o Projeto Instituto do Milênio: (1) Modelo Gerencial da Pesca, (2) Maricultura Sustentável, (3) Monitoramento, Modelagem, Erosão e Ocupação Costeira e (4) Qualidade Ambiental e Biodiversidade. Na área temática Qualidade Ambiental e Biodiversidade do Projeto Instituto do Milênio está inserido o programa Qualidade Ambiental – Biomarcadores, que realizou estudos em 5 regiões da costa brasileira nos estados do Pará (PA), Pernambuco (PE), Espírito Santo (ES), Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS).

O presente trabalho está inserido no programa acima citado, que objetivou avaliar e comparar cinco diferentes regiões da costa brasileira impactadas por atividades antropogênicas, através da utilização de diferentes classes de biomarcadores, bem como estabelecer e padronizar metodologias que possam ser efetivamente aplicadas em estudos de biomonitoramento em regiões costeiras do Brasil.

4. BIOMARCADORES

Biomarcadores são respostas bioquímicas, fisiológicas ou parâmetros morfológicos alterados, causados pela exposição de um organismo a um determinado xenobionte (Melancon, 1995). Os biomarcadores também podem ser definidos como alterações biológicas em nível molecular, celular e fisiológico, as quais expressam a exposição e os efeitos tóxicos causados pelos poluentes (Walker et al., 1996).

Alguns critérios devem ser avaliados na definição de biomarcadores a serem utilizados em um estudo: especificidade, o biomarcador deve demonstrar o efeito específico de um determinado contaminante no funcionamento de um determinado órgão alvo e/ou de estrutura vital; fácil reprodutibilidade (metodologia e logística acessível) e ainda, clareza na interpretação dos resultados, de forma que seja possível diferenciar resultados devidos à exposição aos contaminantes de oscilações fisiológicas normais (Stegeman et al., 1992; Bainy, 1993).

A utilização de biomarcadores em estudos de toxicologia apresenta várias vantagens, pois 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 (4) determinar o grau de severidade dos efeitos causados pelos contaminantes (Stegeman et al., 1992).

Segundo Oost et al. (2003), biomarcadores podem ser classificados como: (1) Biomarcadores de efeito, constituem parâmetros mensuráveis em compartimentos celulares que permitem inferir efeitos prejudiciais ou adversos

aos organismos; como a indução das enzimas CYP1A1 e CYP1A2 do citocromo P450 na presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. (2) Biomarcadores de exposição, através dos quais é possível detectar e/ou quantificar a presença do xenobionte, seus metabólitos ou sua associação a componentes celulares ou moleculares do organismo; como a detecção de metabólitos na bile em animais expostos a HPAs. Há ainda biomarcadores inespecíficos, que respondem a vários contaminantes e podem ser utilizados como indicadores gerais de exposição. Os biomarcadores inespecíficos, como avaliação de lesões histopatológicas e índices somáticos, auxiliam na detecção da presença e efeito de xenobiontes em ambientes aquáticos, sendo altamente recomendada sua utilização em estudos de biomonitoramento ambiental e diagnóstico de áreas impactadas. Neste estudo os biomarcadores serão classificados, segundo Adams et al (1989), de acordo com nível de organização biológica em biomarcadores somáticos, bioquímicos e morfológicos.

A avaliação de contaminação de ambientes aquáticos através de biomarcadores tem sido bastante utilizada em estudos de biomonitoramento, porém a maioria dos estudos tem avaliado apenas um único nível de organização biológica (Sturm et al., 1999; Coughlan et al., 2002; Lionetto et al., 2003; Galloway et al., 2004; Binelli et al., 2006; Zanette et al., 2006). A utilização de biomarcadores pertencentes a dois ou mais níveis de organização biológica como realizado por Noaksson et al., 2005; Amado et al. 2006, Camargo e Martinez (2006) e no presente estudo, possibilita a obtenção de diferentes tipos de respostas que podem ser comparadas e confrontadas. Este tipo de abordagem proporciona um diagnóstico mais preciso e confiável da situação da

área estudada e representa a tendência atual em estudos de biomonitoramento.

5. CINÉTICA DE CONTAMINANTES EM ORGANISMOS AQUÁTICOS COMO FERRAMENTA PRÉVIA A ESTUDOS DE BIOMONITORAMENTO

Organismos aquáticos são capazes de absorver, e bioacumular contaminantes presentes na água ou alimento (Akaishi et al. 2004).

Através da cinética de contaminantes é possível compreender as vias de absorção e distribuição de contaminantes em organismos aquáticos (Arukwe et al., 1999; Rouleau et al., 1999; Inza et al., 2001; Fowler et al., 2004; Bianchini et al., 2005; Edginton and Rouleau, 2005; Wood et al., 2002). Este tipo de estudo fornece subsídios aos estudos de biomonitoramento, pois identifica de forma mais precisa tecidos e órgãos alvos.

A autoradiografia (WBARG - whole-body autoradiography) é uma metodologia que vem sendo muito utilizada em estudos de cinética, pois permite quantificar e qualificar a presença e distribuição de contaminantes através de organismos expostos a xenobiontes radioativamente marcados. A cinética de alguns contaminantes como zinco, cádmio (Inza et al., 2001; Rouleau et al., 1998 e 2001; Fowler et al., 2004), mercúrio (Rouleau et al., 1998 e 1999), mercúrio inorgânico e metilmercúrio (Oliveira Ribeiro et al., 1999), prata (Wood et al., 2002; Fowler et al., 2004; Bianchini et al., 2005), nonilfenol (Arukwe et al., 1999), tributil-estanho (Rouleau et al., 1999 e 2003) e bifenilas policloradas (PCBs) (Fowler et al., 2004) em peixes já foram avaliadas através de WBARG. No entanto há uma

grande quantidade de contaminantes que ainda não tiveram seus potenciais de absorção, bioacumulação e eliminação elucidados.

Esta tese foi estruturada em 3 capítulos, os capítulos I e II trazem os resultados obtidos em um estudo de biomonitoramento em três regiões da costa brasileira utilizando três organismos bioindicadores e um abordagem de múltiplos biomarcadores, o capítulo III traz uma abordagem cinética de alguns derivados de baixa massa molecular de petróleo e também apresenta uma simulação de derramamento de petróleo em laboratório como uma nova abordagem para estudo dos efeitos da fração solúvel do petróleo na água.

CAPÍTULO I

BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM PEIXES NOS ESTUÁRIOS BRASILEIROS DE PARANAGUÁ (PR), PIRAQUÊ-AÇÚ (ES) E ITAMARACÁ (PE)

COLABORAÇÃO:

Patrícia de Souza Diogo

Michelle da Cunha Torres

Manuela Dreyer da Silva

Prof. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis

Publicação relacionada:

Valdez Domingos, F.X.; Silva de Assis, H.C.; Silva, M.D.; Damian, R.C.; Almeida, A.I. M.; Cestari, M.M.; Randi, M.A.F.; Oliveira Ribeiro, C.A. Biomonitoring of Estuarine Areas in the Brazilian Coast: a Multi-Biomarker Approach. Manuscrito submetido a revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

I. 1. INTRODUÇÃO

Despejos urbanos, agrícolas e industriais representam as principais fontes de contaminação em rios, estuários e oceanos (De la Torre et al. 2005; Nigro et al. 2006). Poluentes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs), compostos organoclorados (OCs) e metais pesados estão entre as principais classes de contaminantes que são frequentemente encontrados nestes ecossistemas (Oliveira Ribeiro et al., 2005; Munteanu e Munteanu, 2006; Nigro et al. 2006).

Para medir efeitos agudos e crônicos de contaminantes no ambiente alguns parâmetros como crescimento, fator de condição, índice gonadossomático e hepatossomático podem ser avaliados (Deviller et al., 2005; Teles e Santos, 2006).

Lesões histopatológicas e alterações em atividades enzimáticas são alguns dos efeitos relatados em estudos prévios em organismos aquáticos em áreas impactadas (Akaishi et al., 2004; Mouchet et al. 2006). A ocorrência de danos celulares e teciduais em fígado e brânquias de peixes ambientalmente expostos a HPAs, PCBs, metais pesados, esgoto, efluentes portuários e industriais tem sido descrita por vários autores (Stentiford et al., 2003; Norena-Barroso et al., 2004; Oliveira Ribeiro et al., 2005). Além desses efeitos, a avaliação da atividade da colinesterase (Dellali et al., 2001; Tortelli et al., 2006; Quintaneiro et al. 2006) representa um parâmetro bastante utilizado em programas de monitoramento ambiental.

Estudos que avaliam o impacto das atividades humanas em áreas costeiras brasileiras tem aumentado recentemente principalmente nas regiões sul e sudeste (Joyeux et al., 2004; Medeiros et al., 2005; Pereira e Kuch, 2005; Lemos et al., 2005; Martins et al., 2005; Amado et al., 2006; Camargo e Martinez, 2006; Silva et al., 2006; Umbuzeiro et al., 2006; Zanette et al., 2006), mas não há registros de estudos comparativos entre áreas costeiras brasileiras nem investigações que utilizem diferentes classes de biomarcadores. Aqui no Brasil, assim como em outros países, os impactos ambientais em áreas costeiras representam causa de preocupação no que se refere aos efeitos de poluentes na saúde dos organismos aquáticos e na qualidade dos alimentos de origem marinha e estuarina.

O Projeto Instituto do Milênio - RECOS - Uso e Apropriação dos Recursos Costeiros (vide introdução geral) objetivou avaliar e comparar cinco diferentes regiões da costa brasileira impactadas por atividades antropogênicas, através da utilização de diferentes classes de biomarcadores, bem como estabelecer e padronizar metodologias que possam ser efetivamente aplicadas em estudos de biomonitoramento em regiões costeiras do Brasil.

O objetivo deste capítulo foi avaliar comparativamente três regiões estuarinas impactadas por ocupação humana devido à liberação de efluentes industriais e urbanos e também por atividades portuárias que ocorrem ao longo da costa brasileira, empregando-se diferentes classes de biomarcadores como índices somáticos, histopatologia e neurotoxicidade em duas espécies de peixes.

I.2. MATERIAIS E MÉTODOS

I.2.1. ESPÉCIES BIOINDICADORAS

O bagre amarelo, *Cathorops spixii* (Siluriformes, Ariidae) habita áreas costeiras marinhas, estuários, lagoas e desembocaduras de rios, podendo ser encontrado até em águas hipersalinas. Esta espécie distribui-se desde Belize (América Central) até o sul do Brasil, podendo ser encontrado em profundidades de até 50 m (Figueiredo e Menezes, 1978). Os adultos podem apresentar comprimento total máximo de 30 centímetros (Fishbase, 2006). Esta espécie de bagre é abundante na Baía de Paranaguá (Fávaro et al. 2005), e economicamente importante na pesca artesanal da região sul do Brasil. *C. spixii* apresenta hábito carnívoro e utiliza invertebrados e pequenos peixes como itens principais de sua dieta (Fishbase, 2006).

O vermelho arioco, *Lutjanus synagris* (Perciformes, Lutjanidae) apresenta registros de ocorrência desde o atlântico oeste (Carolina do Norte, USA) até o sudeste do Brasil, incluindo o golfo do México e o Caribe. Esta espécie pode encontrar-se associada a diferentes tipos de substrato, desde áreas de recifes de coral até áreas lodosas; alimenta-se em geral a noite de invertebrados bentônicos e pequenos peixes e pode atingir até 60 cm de comprimento total na fase adulta (Fishbase, 2005).

I.2.2. ÁREAS DE ESTUDO E ESTRATÉGIA AMOSTRAL

O projeto foi desenvolvido em três regiões da costa brasileira: nos estados de PE, ES e PR (Figura 1). As coletas foram realizadas através de rede de arrasto pelos integrantes da área temática de Biodiversidade, pertencentes ao Projeto

Instituto do Milênio – RECOS, nas universidades envolvidas em cada região (UFPR-CEM em Paranaguá, UFES em Piraquê-Açu, UFPE e UFRPE em Itamaracá).

Para as amostragens foram escolhidas duas áreas em cada estuário (Figura 1). A área contaminanda (C) representa a área mais próxima as fontes de impacto antrópico e área referência (R) constitui uma área afastada da influência de atividades humanas. Em cada uma dessas áreas foram coletados dez indivíduos de cada espécie nas duas estações amostrais: inverno (agosto de 2003) e verão (fevereiro de 2004). Alguns parâmetros físico-químicos (salinidade, temperatura e pH) foram coletados durante as amostragens.

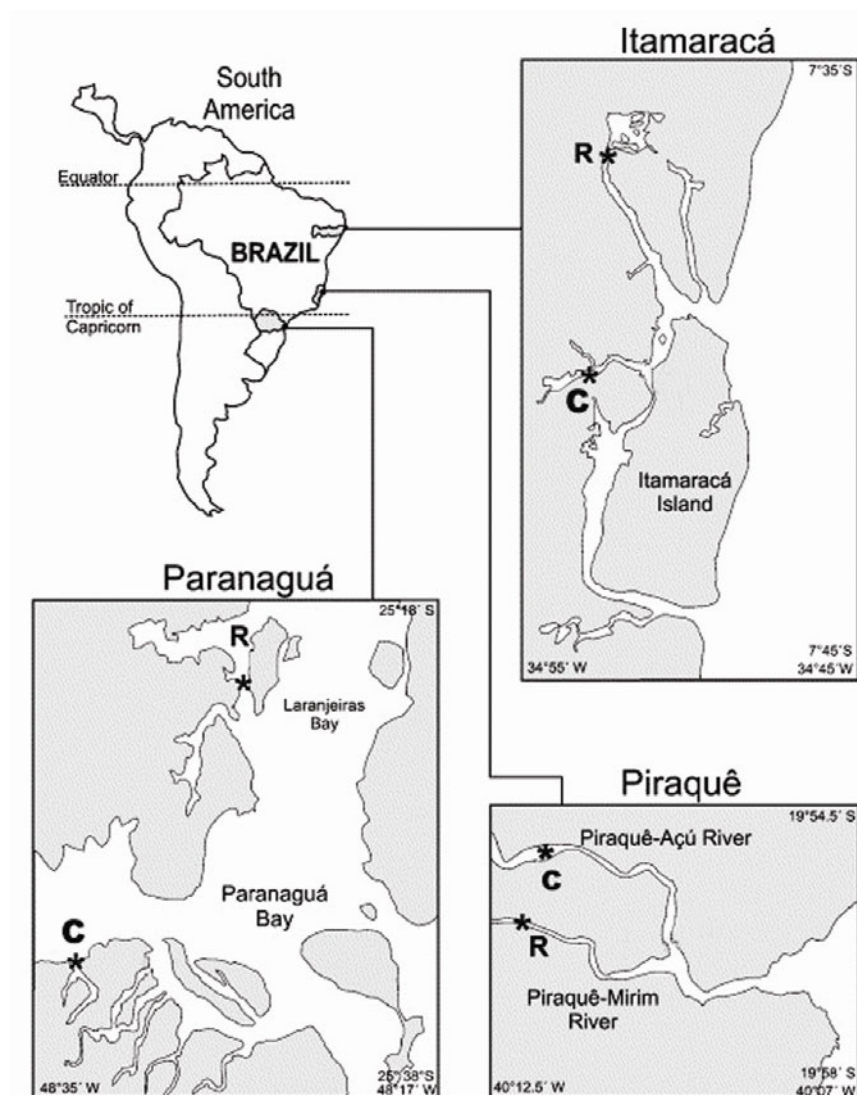


Figura 1. Localização geográfica dos pontos referência (R) e contaminado (C) nas três regiões estuarinas avaliadas na costa brasileira. Adaptado de Zanette et al. 2006.

1.2.2.1. Itamaracá - Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz - PE

A Baía de Itamaracá onde está localizado o Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz (Figura 1) está situada no nordeste do Brasil, 40 km ao norte de Recife, Pernambuco ($7^{\circ}34'-7^{\circ}55'S$; $34^{\circ}49'-34^{\circ}52'W$, Meyer et al., 1998). Existem duas estações bem definidas na região: a estação seca, compreendida entre setembro a janeiro, e a estação chuvosa, que ocorre entre fevereiro e agosto. O rio Botafogo é o principal rio que desemboca no Canal de Santa Cruz, e segundo Meyer et al. (1998), até 1991 recebeu grande aporte de mercúrio proveniente de uma fábrica de soda cáustica na região (Cavalcanti, 2003).

Atualmente ainda existem fábricas de soda cáustica operando na região do canal de Santa Cruz, também há fábricas de cloro e papel bem como de plantações de cana-de-açúcar (Manuel de Jesus Flores Montes, membro da UFPE e participante do Projeto do Milênio-RECOS, comunicação pessoal). Além do aporte de efluentes industriais e agrícolas é muito provável que esgotos urbanos estejam chegando ao Canal de Santa Cruz.

O ponto C no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz localiza-se no rio Botafogo ($7^{\circ}40'047''S$; $34^{\circ}51'486''W$). No rio Carrapicho, considerado isento de impacto antropogênico, foi determinada a área R ($7^{\circ}43'042''S$; $34^{\circ}53'383''W$). A precipitação média mensal de chuvas em agosto permaneceu na faixa de 100 a 150mm enquanto que em fevereiro atingiu a faixa de 150 a 200mm (CPTEC, 2005).

1.2.2.2. Piraquê - Sistema Estuarino dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim - ES

Situado no distrito de Santa Cruz em Aracruz, Espírito Santo encontra-se o Sistema Estuarino dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim (Figura 1). Este estuário apresenta 65 km de extensão e área de 73,38 km², estando apenas 2,25% de sua área protegida pela Reserva Biológica de Manguezais dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim (Luiz Fernando Loureiro Fernandes, membro da UFES e participante do Projeto do Milênio-RECOs, comunicação pessoal). Segundo Luiz Fernando Loureiro Fernandes (comunicação pessoal), o manguezal do rio Piraquê-mirim avança aproximadamente 9 km em direção ao continente, enquanto o rio Piraquê-açu avança cerca de 13 km, representando o maior avanço de maré do Espírito Santo. As épocas de maior ocorrência de precipitação estão compreendidas entre outubro e maio nesta região, não havendo estação seca pronunciada na região (Cuzzuol e Lima, 2003).

No município de Aracruz há uma indústria de fabricação de celulose de fibra curta e branqueada de eucalipto (que é utilizada como matéria prima para produção de papel) que é reconhecida como a maior do mundo no gênero, e que está em plena atividade desde 1978. Associado a esta indústria existe um terminal portuário privativo especializado no transporte da celulose exportada, que embarca 2 milhões de toneladas que vão para os Estados Unidos, Europa e Ásia e 900 mil toneladas produzidas por outra indústria localizada em Minas Gerais, que concentra suas vendas para o Japão e Ásia. Ainda nesta região existem indústrias de produção de peróxido de hidrogênio, metal-mecânicas e eletrônicas (Prefeitura de Aracruz, 2005). Além das atividades industriais existe ainda atividade agrícola expressiva (IBGE, 2005) e aporte de esgoto da cidade

de Aracruz. De acordo com as atividades acima descritas espera-se que os principais contaminantes presentes no Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açú, onde está localizada a área C (19°55'20,22"S; 40°11'31,24"W), sejam metais, organoclorados, pesticidas e esgoto doméstico. O ponto R está situado no rio Piraquê-mirim (19°56'14,67"S; 40°12'42,33"W).

1.2.2.3. Paraná - Complexo Estuarino Baía de Paranaguá

O Complexo Estuarino Baía de Paranaguá (25°16'34"S; 48°17'42"W, Figura 1) constitui o maior estuário do Paraná, estendendo-se aproximadamente 50 km para o interior do continente (Kolm et al., 2002). Às margens deste estuário localiza-se a cidade de Paranaguá, cuja população é estimada em mais de 140.000 pessoas (IBGE, 2005). Kolm et al. (2002), citam que a região ainda não possui tratamento de esgotos adequado, sendo a maior parte do esgoto urbano lançado em dois rios da região: Itiberê e Emboguaçú. Além do esgoto urbano, existe ainda o aporte de fertilizantes, pesticidas e efluentes industriais gerados pelas atividades agropecuárias e industriais da região, respectivamente.

O Porto de Paranaguá é considerado o maior porto do Sul do Brasil e possui expressiva participação na exportação de granéis sólidos, principalmente de soja, na América Latina. Em 2002 e 2003, os principais produtos exportados foram grãos e as principais importações foram fertilizantes (Portos do Paraná, 2005). Além de resíduos dos produtos importados e exportados, a região do porto está diretamente exposta à presença de combustíveis devido ao fluxo de embarcações. As influências antrópicas regionais sugerem a presença de metais,

hidrocarbonetos, pesticidas e grande aporte orgânico no Complexo Estuarino Baía de Paranaguá.

No complexo Estuarino Baía de Paranaguá o ponto C (25°19'430" S; 48°29'690" W) situa-se na região próxima ao terminal de carga/descarga portuária de fertilizantes de Paranaguá (Fospar), onde há o aporte de efluentes industriais, resíduos de combustíveis (devido ao intenso tráfego de navios) e resíduos de mercadorias carregadas/descarregadas no Porto de Paranaguá. O ponto R está situado na Baía de Laranjeiras (25°31'271" S; 48°29'690" W; Figura 1).

I.2.3. PROCEDIMENTOS INICIAIS

Imediatamente após a coleta os peixes foram acondicionados em caixas isotérmicas (contendo água do local de captura) providas de aeração constante e transportados ao laboratório.

Os peixes foram anestesiados com ácido-etil éster-3-aminobenzóico (MS 222) à 0,02% e as medidas de peso total (g), comprimento total (cm) e peso do fígado foram tomadas, previamente à dissecação.

I.2.4. BIOMARCADORES SOMÁTICOS

Os fígados coletados foram pesados (P) e os índices somáticos calculados segundo as seguintes fórmulas: IHS = índice hepatossomático $[(P_{\text{fígado}}/P_{\text{peixe}})] \times 100$ e o fator de condição, $FC = P_{\text{peixe}} / C^b$, onde b é o coeficiente angular da relação peso-comprimento (C = comprimento total).

1.2.5. BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

1.2.5.1. Avaliação Histopatológica

Fígado e brânquias dos animais coletados foram fixados em Alfac (Etanol, formol e ácido acético), desidratados e incluídos em Paraplast (Sigma®). O índice de lesões utilizado na avaliação do material foi descrito por Bernet et al. (1999), para a aplicação deste índice é necessário atribuir um valor numérico a cada lesão observada (0, 2, 4 ou 6), esse valor deve ser multiplicado por um valor de fator de importância apresentado por Bernet et al. (1999) e exemplificado na tabela 1 (1, 2 ou 3), dessa forma é obtido um índice para cada tipo de lesão em cada órgão avaliado, todos os índices de cada órgão são somados obtendo-se assim um índice por órgão. A ocorrência de melanomacrófagos foi avaliada de acordo com Rabitto et al. (2005), de acordo com esta metodologia centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres são contados em 15 campos de cada lâmina.

Tabela 1. Exemplos de fatores de importância utilizados no cálculo do índice de lesões segundo Bernet et al. (1999).

Órgão	Lesão	Fator de Importância
Brânquias	descolamento de epitélio	1
	fusão de lamelas	2
	hiperplasia	2
	desorganização de lamelas secundárias	1
	neoplasias	2
Fígado	Necrose	3
	infiltrações de leucócitos	2
	vacuolização de hepatócitos	1

1.2.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As brânquias dos peixes e os fragmentos de fígado foram fixados em Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 2%, CaCl_2 2,5 mM, NaCl em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2-7,4 por duas horas, emblocados em resina PoliEMBED 812 (Electron Microscopy Sciences©) e analisados no microscópio eletrônico de transmissão (MET) JEOL – 1200.

1.2.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

As brânquias foram fixadas em 3% glutaraldeído, 0,1 M cacodilato de sódio, pH 7,2 - 7,4 desidratadas com etanol (Merck®) submetidas ao ponto crítico (CO_2), e observadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6360LV.

1.2.6. BIOMARCADOR BIOQUÍMICO - AVALIAÇÃO DA COLINESTERASE

Fragmentos de músculo branco sem pele e sem sangue foram coletados da região dorsal dos peixes e congelados. No laboratório as amostras de músculo foram homogenizadas (5% p/v) em tampão fosfato (0,05 M à 4° C) com 20% de glicerol pH 7,0 e centrifugados a 850 x g (4° C) por 15 min. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 12.800 x g (4° C) por 15 min e utilizado como fonte de enzima. 9mM de iodeto de acetiltiocolina (AcSCh) foram utilizados na realização dos ensaios. A atividade colinesterásica foi analisada de acordo com Ellman et al. (1961), com adaptações para microplaca, e a concentração de proteínas foi determinada segundo o método de Bradford (1976).

I.2.7. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Dois tipos de comparação foram realizadas. A avaliação de contaminação foi feita através da comparação da área contaminada e referência em cada estuário, exceto para Itamaracá que foi comparada com a área de referência de Paranaguá. Comparações sazonais também foram realizadas em cada um dos estuários avaliados. Os dados de histopatologia foram comparados através do teste Mann-Whitney. Os parâmetros cinéticos enzimáticos (V_{max} e K_m) foram estimados pela equação de Michaelis-Menten; e a atividade enzimática foi avaliada através de teste T de "student". Índices somáticos e ocorrência de melanomacrófagos foram avaliados através de teste T. A correlação entre peso, comprimento dos peixes e atividade da colinesterase foi analisado através da correlação de Pearson. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado nas comparações sazonais (Zar, 1984). O nível de significância considerado foi de 0,05.

I.3. RESULTADOS

Nos estuários de Paranaguá e Itamaracá foi coletada a espécie *Cathorops spixii*, como esta espécie não ocorre no complexo estuarino Piraquê-Açú, foi necessário definir outro bioindicador para esta área. Por apresentar hábito alimentar carnívoro e ser abundante na área de interesse, *Lutjanus synagris* foi a espécie selecionada como bioindicadora para amostragem no complexo estuarino Piraquê-Açú.

Os parâmetros físico-químicos obtidos durante as amostragens são apresentados na Tabela 2. Diferenças expressivas de temperatura entre verão e inverno foram detectadas apenas em Paranaguá. Itamaracá apresenta uma estação seca e uma estação chuvosa bem definida em fevereiro e agosto, respectivamente.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água nos três estuários avaliados.

Áreas Estudadas	Pontos	Inverno			Verão		
		T (°C)	S (ppm)	pH	T (°C)	S (ppm)	pH
Itamaracá	Contaminado	28	21,7	7,8	29,9	13,7	8,1
Piraquê	Referência	23,9	35	6,1	29,7	20,8	10,1
	Contaminado	24,1	33,5	7,1	28,7	17,6	11,3
Paranaguá	Referência	20	25	8,0	28	20	8,2
	Contaminado	22	23	7,9	28	17	8,4

T = Temperatura; S = Salinidade

I.3.1. INDICES SOMÁTICOS

Os índices IHS e FC são apresentados na Tabela 3. Comparando-se as áreas referência e contaminada de cada estuário durante o inverno ou verão observou-se fator de condição similar nos indivíduos entre as áreas referência (R)

e contaminada (C) em Paranaguá no inverno, enquanto o IHS apresentou valores mais altos na área contaminada no verão. Em Piraquê valores mais altos no FC foram encontrados na área contaminada durante o inverno. Tanto o IHS quanto o FC foram similares em Piraquê durante o verão. Quando comparado com a área referência de Paranaguá os valores de IHS de Itamaracá apresentaram-se menores no inverno e maiores no verão.

Através de comparações sazonais em cada estuário, foi observado que no ponto R de Paranaguá o IHS apresentou valores maiores no inverno e o FC foi similar. Na área referência de Piraquê o FC foi maior no verão e o IHS não variou sazonalmente. Todos os índices apresentaram valores similares nas áreas Paranaguá C e Piraquê C entre as estações. Em Itamaracá C o IHS foi mais alto no verão enquanto o FC foi similar entre as estações.

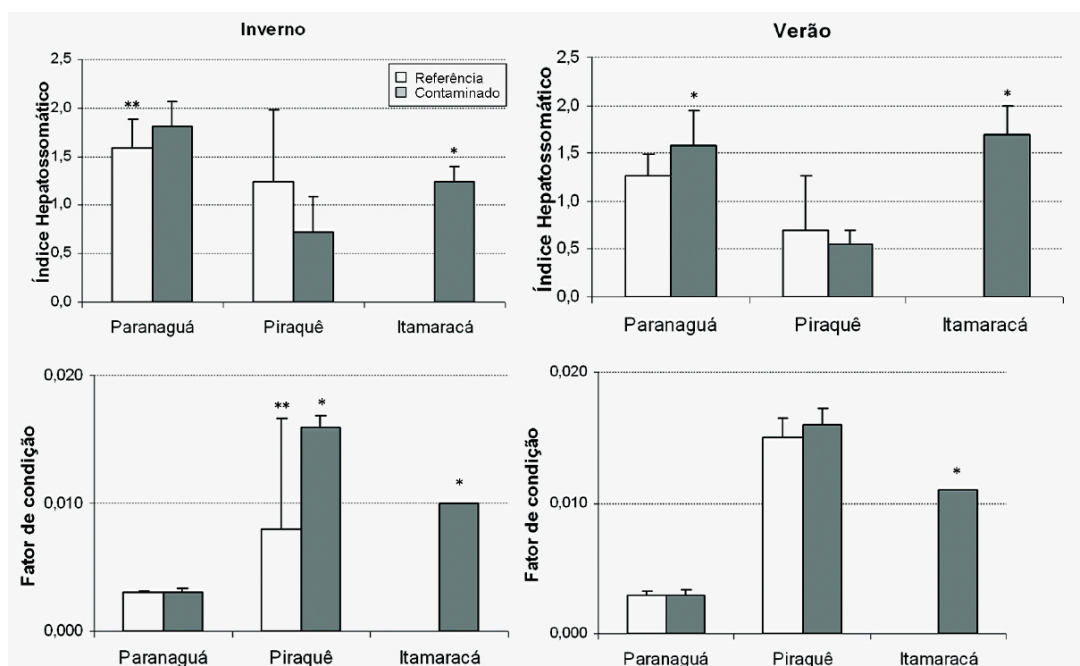


Figura 2. Índice hepatossomático (IHS), e fator de condição (FC) de peixes coletados em três estuários brasileiros, n=10. * Indica diferença entre referência e contaminado, **indica diferença na mesma área amostral entre inverno e verão ($p < 0,05$, Teste T).

I.3.2. HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS

Descolamento de epitélio, fusão de lamelas, hiperplasia, desorganização de lamelas secundárias e neoplasias foram as lesões mais relevantes observadas nas brânquias (Figura 3). O descolamento de epitélio é caracterizado pelo descolamento de células epiteliais na lamela secundária (Figura 3C). Áreas de fusão de lamelas estão frequentemente associadas com hipertrofia e proliferação de células mucosas (Figura 3D). A fusão integral e parcial base das lamelas secundárias identificada através de microscopia de luz foi confirmada pela análise ao MEV (Figura 3F e G).

As lesões histopatológicas nas brânquias apresentaram ocorrência similar entre os pontos R e C de Paranaguá, Piraquê e Itamaracá no inverno e em Piraquê no verão (Figura 4). Os peixes coletados nas áreas contaminadas de Paranaguá e Itamaracá no verão que apresentaram índices de lesão menores do que na área referência de Paranaguá (Figura 4).

I.3.3. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO

Necroses, infiltrações de leucócitos e vacuolização de hepatócitos foram as lesões mais expressivas identificadas no fígado das espécies estudadas (Figura 5). Proliferação do retículo endoplasmático (Figura 5B) e a presença de numerosos grânulos elétron densos nos hepatócitos (Figura 5C e E) foram observados através de MET. As necroses observadas através de microscopia de luz também foram visualizadas através de MET como focos de necrose (Figura 5D, E, F). Na coleta de inverno os animais amostrados no ponto R de Paranaguá apresentaram índice de lesões hepáticas maior que as áreas C de Paranaguá e

Itamaracá, enquanto a ocorrência de lesões hepáticas foi similar entre os pontos R e C em Piraquê (Figura 6). No verão os indivíduos coletados em Paranaguá apresentaram índices de lesões similares entre os pontos R e C, enquanto em Piraquê foi detectado maior índice de lesões no ponto R. As lesões hepáticas detectadas nos animais coletados em Itamaracá foram similares as do ponto R de Paranaguá no verão (Figura 6).

Melanomacrófagos (MM) podem ser visualizados como células pigmentadas ou grupos de células pigmentadas que são denominados centros de melanomacrófagos (CMM) em órgãos como fígado, rim anterior e intestino de peixes. Seu material granular apresenta coloração que oscila entre amarelo e preto quando corado com hematoxilina e eosina. Os indivíduos coletados no estuário de Piraquê não apresentaram CMM nem MM hepáticos em ambas as áreas amostradas (R e C). A ocorrência de CMM foi similar entre os pontos R e C nos indivíduos amostrados em Paranaguá tanto no inverno quanto no verão, enquanto a ocorrência de MM foi maior em Paranaguá R apenas no inverno (Figura 7). Itamaracá apresentou valores menores de MMC e MM quando comparadas com Paranaguá R no inverno e ocorrência de MM similar à Paranaguá no verão (Figura 7).

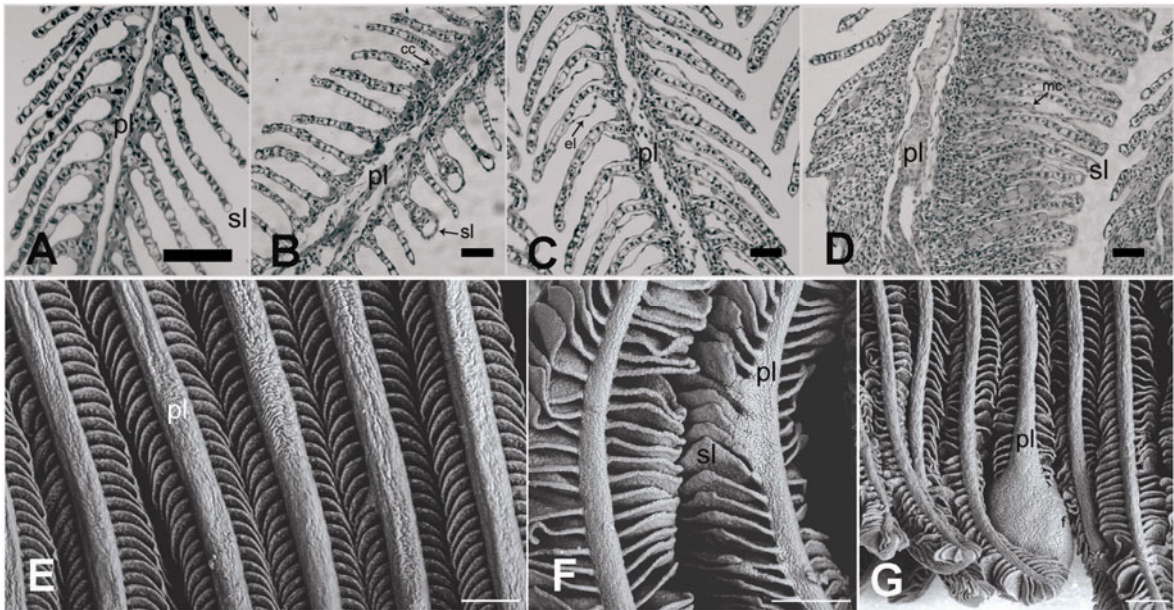


Figura 3. Histopatologia de brânquias de peixes das áreas estuarinas avaliadas. (A) Estrutura normal das brânquias. (B) Dilatação de vasos nas extremidades das lamelas secundárias e inchaço das células de cloreto. (C) Descolamento de epitélio nas lamelas secundárias. (D) Fusão de lamelas secundárias, hipertrofia e proliferação de células de muco (mc). (E) Estrutura normal das brânquias em MEV. Barra = 100 μ m. (F) Fusão na base das lamelas secundárias. Barra = 100 μ m. (G) Fusão completa de lamelas secundárias. Barra = 200 μ m. pl= lamela primária, sl= lamela secundária, cc=célula de cloreto, el=descolamento de epitélio, f=fusão de lamelas secundárias. Barra A, B, C, D = 50 μ m. *Cathorops spixii*: B, C, D, F; *Lutjanus synagris*: A, E, G.

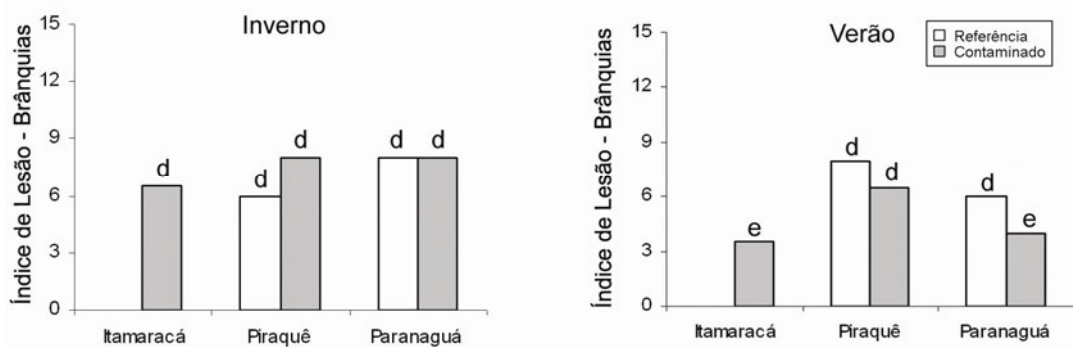


Figura 4. Índice histopatológico de lesões branquiais de indivíduos coletados nas áreas estuarinas estudadas (mediana). Diferenças entre as áreas estudadas são indicadas por letras ($p < 0,05$).

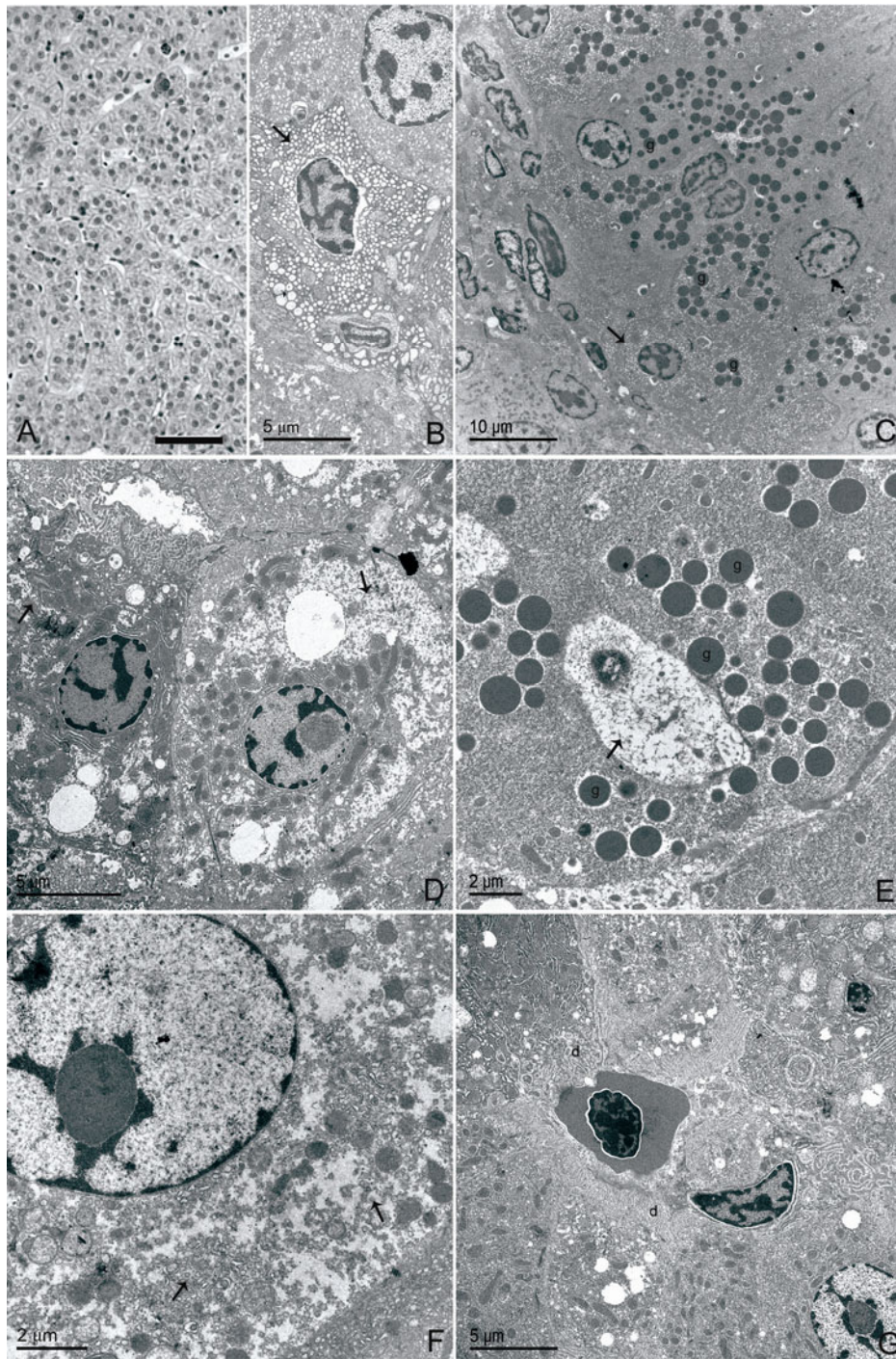


Figura 5. Histopatologia de fígado em indivíduos coletados nas áreas estuarinas avaliadas. (A) Estrutura característica do fígado. (B) Vacuolização do citosol dos hepatócitos; (C) Presença de diversos grânulos elétron densos (g) e vacúolos (seta) no citosol dos hepatócitos; (D) Desorganização citosólica indicativa de necrose; (E) Área de necrose focal e presença de grânulos elétron densos; (F) Detalhe da desorganização do citosol (setas); (G) Espaço de Disse (d). Barra = 50 μ m. *Cathorops spixii*: A, B, C, E, F; *Lutjanus synagris*: D, G.

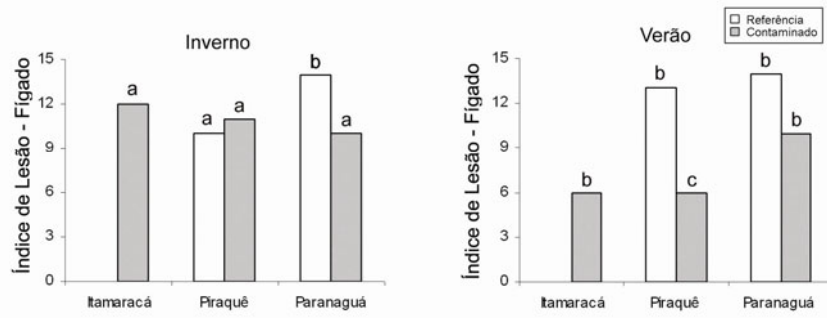


Figura 6. Índice histopatológico de lesões hepáticas de indivíduos coletados nas áreas estuarinas estudadas (medianas). Diferenças entre as áreas estudadas são indicadas por letras ($p < 0,05$).

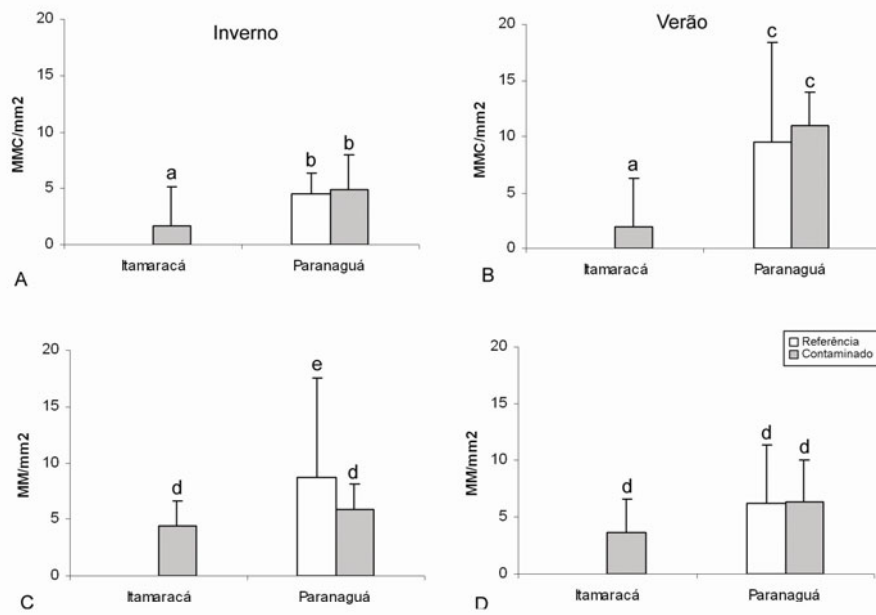
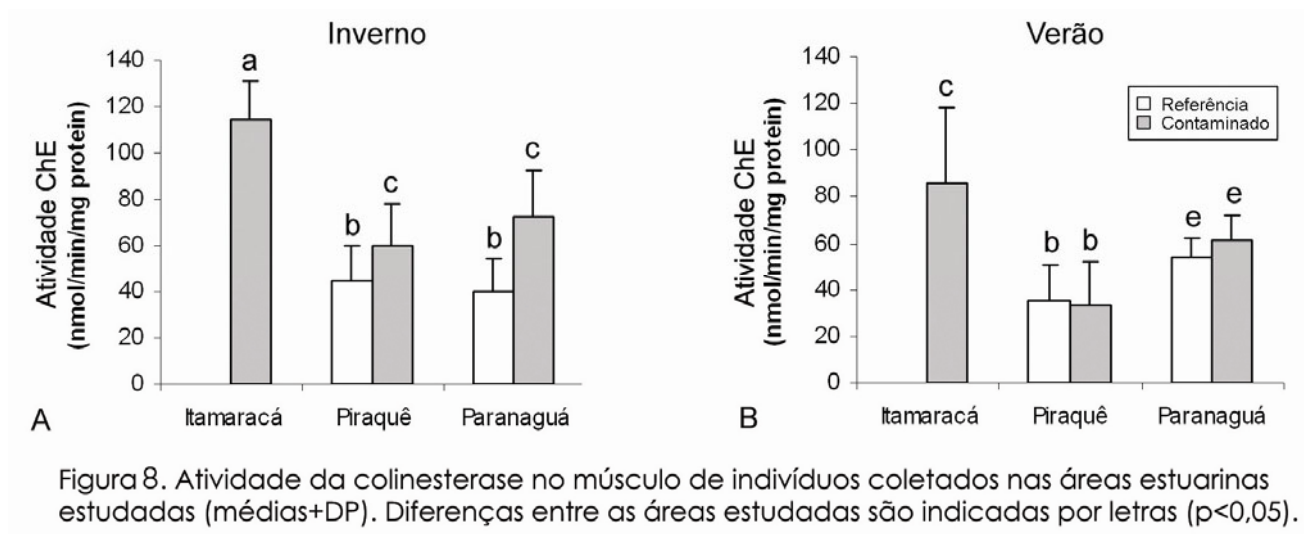


Figura 7. Ocorrência de centros de melanomacrófagos (CMM) e melanomacrófagos livres (MM) no fígado de indivíduos coletados nas áreas estuarinas estudadas (médias+DP). Diferenças entre as áreas estudadas são indicadas por letras ($p < 0,05$).

I.3.4. ATIVIDADE DA COLINESTERASE

As espécies estudadas não apresentaram correlação entre os parâmetros: peso, comprimento e a atividade colinesterásica nas áreas avaliadas. A atividade enzimática foi mais alta nas áreas C de Paranaguá, Piraquê e Itamaracá quando comparadas com as respectivas áreas R no inverno (Figura 8A). Durante o verão Piraquê e Paranaguá apresentaram atividade da colinesterase similar, enquanto Itamaracá C apresentou maior atividade se comparado com Paranaguá R (Figura 8B). A atividade da colinesterase apresentou-se mais elevada nos indivíduos coletados no inverno se comparados aos coletados no verão em todas as áreas estudadas (Figura 8A e B).



I.4. DISCUSSÃO

Estudos de biomonitoramento são geralmente focados em uma única ou em poucas áreas de rios, estuários ou lagoas, a utilização de biomarcadores nestes estudos é frequentemente restrita a uma ou poucas classes de biomarcadores (Shailaja e Silva, 2003; Petrovic et al., 2004; de la Torre et al., 2005; Oliveira Ribeiro et al., 2005; Munteanu e Munteanu, 2006; Nigro et al., 2006). Este trabalho apresenta respostas de três classes de biomarcadores (somáticos, histopatológicos e bioquímicos) de três diferentes áreas estuarinas impactadas por atividades humanas ao longo da costa brasileira.

Um dos parâmetros de avaliação dos organismos neste estudo foi a aplicação de índices somáticos, como utilizado por outros autores (Khan et al. 1994, Karels et al., 1998; Couillard et al., 1999; Oliveira Ribeiro et al., 2005). Segundo Huuskonen e Lindstrom Seppa (1995) e Teles et al. (2006) IHS pode indicar estado metabólico alterado em peixes. Alguns estudos reportam que animais coletados em áreas contaminadas frequentemente apresentam aumento no IHS e decréscimo no FC (Adams e Ryon, 1994; Karels et al., 1998; van der Oost et al., 1996), um aumento no IHS foi observado na área C de Paranaguá durante o verão, porém o FC permaneceu similar ao da área referência. Como *Cathorops spixii* apresenta hábito alimentar carnívoro é possível que esteja ocorrendo biomagnificação e bioacumulação de poluentes nesta espécie, estes fenômenos poderiam estar associados aos altos valores IHS observados em Paranaguá e Itamaracá durante o verão. Segundo Soimasuo et al. (1995), Felder et al. (1998) e de la Torre et al. (2005), indivíduos expostos a contaminantes podem apresentar baixos valores de FC como também índices similares entre os grupos avaliados,

como foi observado neste trabalho em Paranaguá em ambas estações sazonais e em Piraquê no verão. Incrementos no FC nos indivíduos de Piraquê no inverno podem ser atribuídos a uma maior disponibilidade de alimento que ocorre nesta estação, especialmente em ecossistemas tropicais (Townsend et al., 2006).

Lesões histopatológicas tem sido frequentemente descritas como importantes ferramentas em estudos de biomonitoramento devido à facilidade de interpretação tanto em situações de exposição aguda quanto crônica (Wester et al., 1991; Couillard et al., 1999; Wester et al., 2002; Gül et al., 2004; Oliveira Ribeiro et al., 2005). Assim como relatado neste trabalho, a ocorrência de lesões branquiais e hepáticas em animais expostos ambientalmente a contaminantes tem sido reportada em organismos aquáticos por outros autores como Gül et al. (2004), Lyons et al. (2004), Noreña-Barroso et al. (2004) e Oliveira Ribeiro et al. (2005).

A presença de lesões nas brânquias de peixes pode ser interpretada como resultado de efeitos agudos de xenobiontes (Zodrow et al. 2004). Neste estudo a ocorrência de fusão de lamelas foi detectada em todas as áreas avaliadas. A ocorrência de fusão lamelar já foi relacionada por alguns autores à fontes de contaminação específica como: efluente de indústria de papel clorado (Pacheco e Santos, 2002; Valdez Domingos, 2001), cobre (Arellano et al., 1999) e efluente de esgoto com tratamento secundário (Coutinho and Gokhale, 2000, Valdez Domingos, 2001). O descolamento de epitélio observado neste estudo também foi relatado por Arellano et al. (1999) e Fanta et al. (2003) em peixes expostos a cobre e organofosforados, respectivamente. Tanto o descolamento de epitélio quanto a fusão de lamelas aumenta a distância entre as células

epiteliais e os capilares sanguíneos causando prejuízo nas trocas gasosas e também pode levar à distúrbios na osmorregulação, mecanismos essenciais à sobrevivência de peixes. A ocorrência de proliferação nas células de muco observada em indivíduos de diferentes áreas está relacionada a um mecanismo de proteção em situações de injúria causada por contaminantes aquáticos ou respostas de estresse devido a exposições agudas e/ou crônicas, ocorre uma maior secreção de muco nestas situações a fim de minimizar o contato do tecido afetado com a água. Hipertrofia celular e tecidual podem ser indicativas de disfunção celular e podem levar ao desenvolvimento de neoplasias em situação de exposições crônicas a certos poluentes como HPAs, pesticidas clorados ou PCBs (Ali e Sreekrishnan, 2001; Shailaja e Silva, 2003).

Devido aos processos de absorção e metabolização as lesões observadas no fígado estão relacionadas à exposição crônica a poluentes. A ocorrência de áreas de necroses foi a lesão hepática mais evidente neste estudo, este tipo de lesão tem sido registrada em peixes de áreas impactadas por múltiplos contaminantes (Simpson et al., 2000; Pacheco e Santos, 2002; Schmalz et al., 2002; Marty et al., 2003; Stehr et al., 2003; Stentiford et al., 2003; Oliveira Ribeiro et al., 2005). No presente trabalho a presença de necroses em indivíduos das áreas referência e contaminadas representa um indicativo de que os estuários estão impactados, o que poderia ser confirmado através de análises químicas de biota, água e sedimento nestas áreas. Este tipo de lesão causa prejuízos funcionais e estruturais no fígado de peixes (Stentiford et al., 2003), diminui a funcionalidade, podendo causar a falência do órgão e conseqüentemente afetar maiores níveis de organização biológica (Rabbitto et al., 2005). Embora a ocorrência de áreas

necróticas não tenha correlação específica com um determinado contaminante, a ocorrência de necrose tem sido frequentemente observada em áreas estuarinas associadas à presença de contaminantes como HPA's (Stentiford et al., 2003), pesticidas clorados (Oliveira Ribeiro et al. 2005), metais pesados (Schmalz et al., 2002), organofosforados (Fanta et al., 2003), efluente de indústria de papel clorado e ácido dehidroabiético (Pacheco e Santos, 2002). A presença de vesículas lipídicas observada no fígado de indivíduos das áreas estudadas sugere um mecanismo de imobilização de compostos lipofílicos como descrito por Oliveira Ribeiro et al. (2005) em *Anguilla anguilla* ambientalmente exposta a pesticidas clorados, HPAs e PCBs.

A incidência de melanomacrófagos (CMM ou MM) no fígado e outros tecidos está relacionada a um aumento na atividade fagocítica como resposta imune a lesões em indivíduos expostos a contaminantes (Couillard et al., 1999; Mondon et al., 2001; Oliveira Ribeiro et al., 2005; Rabitto et al., 2005). No presente trabalho a ocorrência de CMM ou MM não apresentou resultados expressivos para o diagnóstico das áreas estudadas.

Embora as lesões histopatológicas não apresentem relação específica com os contaminantes este tipo de abordagem tem sido uma ferramenta bastante utilizada em biomonitoramento na avaliação da qualidade da água de áreas supostamente impactadas (Wester et al., 2002). As áreas R e C de Paranaguá, Piraquê e Itamaracá apresentaram índices de lesão branquial e hepático similares durante o inverno e o verão, indicando que ambas as áreas estão sendo afetadas pela liberação de compostos químicos nestes estuários em consequência de atividades humanas.

A atividade da colinesterase em peixes e outros organismos aquáticos tem sido utilizada globalmente como biomarcador de contaminação em peixes em programas de monitoramento por diferentes grupos (Sturm et al., 1999; Monserrat e Bianchini, 2001; Rodriguez-Fuentes e Gold-Bouchot, 2000; Monserrat et al., 2002; Ventura et al., 2002; Corsi et al., 2003; Monteiro et al., 2005; Binelli et al. 2006; Tortelli et al., 2006). A atividade da colinesterase representa um eficiente biomarcador para detectar efeitos subletais de xenobiontes, principalmente organofosforados, carbamatos e alguns metais pesados (Sturm et al., 1999; Monserrat e Bianchini, 2001; Silva de Assis et al. 2005; Rabitto et al, 2005), compostos que são reportados na literatura como inibidores da colinesterase. Além dos contaminantes acima citados, hidrocarbonetos também podem alterar a atividade da colinesterase em peixes, inibindo-a em diluições da fração solúvel na água de 15 e 33% na espécie *Astyanax sp.* (Akaishi et al., 2004), porém os mecanismos de ação dos hidrocarbonetos sobre a atividade da colinesterase ainda não foram esclarecidos. No presente estudo uma maior atividade da colinesterase foi observada na maioria das áreas C estudadas durante o inverno. A indução da atividade desta enzima foi também descrita em *Puntius conchonius* após exposição a endossulfano em músculo e fígado (Gill et al. 1990). O trabalho realizado por Tortelli et al. (2006) nas mesmas áreas de estudo mostrou que as constantes de Michaelis–Menten, Km e Vmax apresentaram diferentes padrões no cérebro de *C. spixii* coletado nas áreas R e C de Paranaguá, neste trabalho os autores sugerem que o complexo reversível enzima-inibidor é mais facilmente formado em peixes coletados na área C, enquanto a formação do complexo irreversível enzima-inibidor ocorre com maior facilidade nos animais das áreas R.

Embora não tenham sido realizados em amostras de músculo, estes resultados poderiam ser atribuídos como uma possível hipótese para justificar os menores valores de atividade da colinesterase observados nestas áreas.

Dados que relacionam a atividade da acetilcolinesterase com variações de temperatura estão disponíveis apenas para peixes, nestes estudos os autores atribuem a temperatura como fator responsável pelas diferenças sazonais observadas na atividade enzimática, apresentando de forma geral maiores valores de atividade enzimática nas estações mais quentes e vice-versa (Bocquené e Galgani, 1991; Kirby et al. 2000).

Os resultados apresentados sugerem que os maiores valores na atividade da colinesterase observada nos espécimens das áreas estudadas no inverno possam estar relacionados a presença de compostos anticolinesterásicos nas áreas R, ou de compostos indutores da colinesterase nas áreas C. Acredita-se que todos os resultados apresentados neste estudo estejam sendo influenciados por contaminantes como metais pesados, hidrocarbonetos, pesticidas, os quais infere-se que estejam presentes nas áreas estudadas através da avaliação das influências antrópicas de cada estuário (item 1.2.2.).

De acordo com os dados apresentados, as três regiões estuarinas estão seriamente impactadas por atividades antropogênicas. Entre os biomarcadores utilizados a medida da atividade da colinesterase em músculo mostrou-se como o biomarcador mais eficiente para a realização do diagnóstico das áreas estudadas. Embora a atividade da colinesterase permita diferenciar as áreas R e C nos estuários avaliados durante o inverno, as lesões histopatológicas ocorreram em ambas espécies em todas as áreas e estuários avaliados tanto no inverno

quanto no verão, o que sugere um impacto por xenobiontes decorrente de atividades antrópicas em todas as áreas avaliadas dos três estuários, tanto nas áreas R quanto nas áreas C, os índices somáticos também sustentam esta conclusão.

Os presentes dados reforçam a importância da utilização de diferentes biomarcadores em programas de biomonitoramento e validam a utilização de lesões histopatológicas como uma resposta sensível e representativa no diagnóstico de ecossistemas aquáticos impactados.

Os resultados apresentados neste trabalho (índices somáticos, histopatologia de brânquias e fígado e atividade da colinesterase) podem ser considerados como respostas de curto e médio prazo as quais podem ser prejudiciais ao ecossistema se medidas de controle de contaminação ambiental não forem implementadas.

CAPÍTULO II

BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM OSTRAS NOS ESTUÁRIOS BRASILEIROS DE PARANAGUÁ (PR), PIRAQUÊ-AÇÚ (ES) E ITAMARACÁ (PE)

COLABORAÇÃO:

Patrícia de Souza Diogo

Michelle da Cunha Torres

Manuela Dreyer da Silva

Prof. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis

Publicação relacionada:

Valdez Domingos, F. X.; Azevedo, M.; Silva, M. D.; Randi, M. A. F.; Freire, C.A.; Silva de Assis, H. C.; Oliveira Ribeiro, C. A. Multibiomarker Assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. Manuscrito submetido à revista Environmental Research.

II. 1. INTRODUÇÃO

Os bivalves representam um dos grupos de organismos aquáticos mais estudados em programas de biomonitoramento (Viarengo e Canesi, 1991; Silva et al., 2001; Alves et al., 2002; Lionetto et al., 2003; Ricciardi et al., 2006; Zanette et al., 2006) e em estudos toxicológicos (Monserat et al., 2002; Valbonesi et al., 2003; Corsi et al., 2003; Binelli et al., 2006). As vantagens mais evidentes da utilização destes organismos são a sua ampla distribuição geográfica, hábito sésil e habilidade de concentrar compostos químicos em até 10^2 - 10^5 vezes em relação às concentrações detectadas na água (Sunila, 1987). Vários estudos de biomonitoramento tem utilizado bivalves para monitorar os efeitos de contaminantes (Nicholson, 1999; Shaw et al., 2004; Ricciardi et al., 2006), no entanto, a grande maioria dos estudos tem baseado suas conclusões em biomarcadores de um único ível de organização biológica, como o nível bioquímico, por exemplo (Lowe, 2000; Doran et al., 2001; Alves et al. 2002; da Ros et al., 2002; Nasci et al., 2002; Svärðh, 2003; Riba et al., 2005; Binelli et al., 2006; Nigro et al., 2006; Zanette et al., 2006).

A presença de contaminantes no ambiente freqüentemente leva a depleção de reservas energéticas nos animais como um mecanismo compensatório à alta demanda de energia requerida pelos processos de detoxificação (Lucas e Beninger, 1985). Assim, índices somáticos ou de condição corporal têm sido seguidamente avaliados em programas de biomonitoramento (Guolan e Yong, 1995; Granby e Spliid, 1995; Nicholson, 1999; Bairy et al., 2000; Mubiana et al., 2006; Silva et al., 2006).

Avaliações histopatológicas das brânquias podem identificar lesões causadas por exposição à contaminantes. Alterações como fusão de filamentos lamelares, inchaço de células epiteliais, e desorganização ou perda de cílios são reportadas como importantes respostas nas brânquias de bivalves (Sunila, 1987; Gregory et al., 1999; Riba et al., 2005).

A bioacumulação de compostos organofosforados em sedimentos tem sido documentada em níveis consideráveis em áreas costeiras, especialmente em estuários, e estes contaminantes representam uma potencial fonte de injúrias aos organismos aquáticos (Readman et al., 1992). Respostas na atividade da colinesterase em bivalves tem sido frequentemente reportadas como sensíveis a presença de organofosforados e carbamatos (Fulton e Key, 2001; Valbonesi et al., 2003), além disso a atividade desta enzima já foi previamente empregada como um eficiente biomarcador de contaminação em bivalves (Doran et al., 2001; Alves et al., 2002; Ventura et al., 2002; Valbonesi et al., 2003; Bonaci et al., 2004; Binelli et al., 2006; Ricciardi et al., 2006).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto de atividades antrópicas em três diferentes áreas estuarinas ao longo da costa brasileira. Os biomarcadores propostos para se fazer esta avaliação foram índices somáticos, histopatologia de brânquias e avaliação da atividade da colinesterase em uma espécie de organismo bivalve, *Crassostrea rizophorae*. A padronização de métodos para utilização desta espécie também é proposta e poderá ser utilizada em outras regiões estuarinas da costa brasileira em futuros estudos de biomonitoramento.

II.2. MATERIAIS E MÉTODOS

II.2.1. ESPÉCIE BIOINDICADORA

A ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae* (Ostreidae) é uma espécie eurialina que está distribuída desde o sul do Brasil até o Caribe, pode ser encontrada em substratos como rochas e raízes de árvores que ocorrem em áreas de mangue (Mancera e Mendo, 1996; Silva et al., 2001), e como os demais bivalves, apresenta hábito alimentar filtrador. Esta espécie representa uma importante fonte alimentar nas áreas costeiras do Brasil e Colômbia (Mancera e Mendo, 1996; Silva et al., 2001; Silva et al., 2006), e já vem sendo utilizada como modelo biológico para estudos toxicológicos ambientais no Brasil (Silva et al., 2001; Alves et al., 2002; Ferreira et al., 2004; Zanette et al., 2006).

II.2.2. ÁREAS DE ESTUDO E ESTRATÉGIA AMOSTRAL

O projeto foi desenvolvido em três regiões da costa brasileira: nos estados de PE, ES e PR (Figura 1). As coletas foram realizadas com auxílio de integrantes da área temática de Biodiversidade, pertencentes ao Projeto Instituto do Milênio – RECOS, nas universidades envolvidas em cada região (UFPR-CEM em Paranaguá, UFES em Piraquê-Açu, UFPE e UFRPE em Itamaracá).

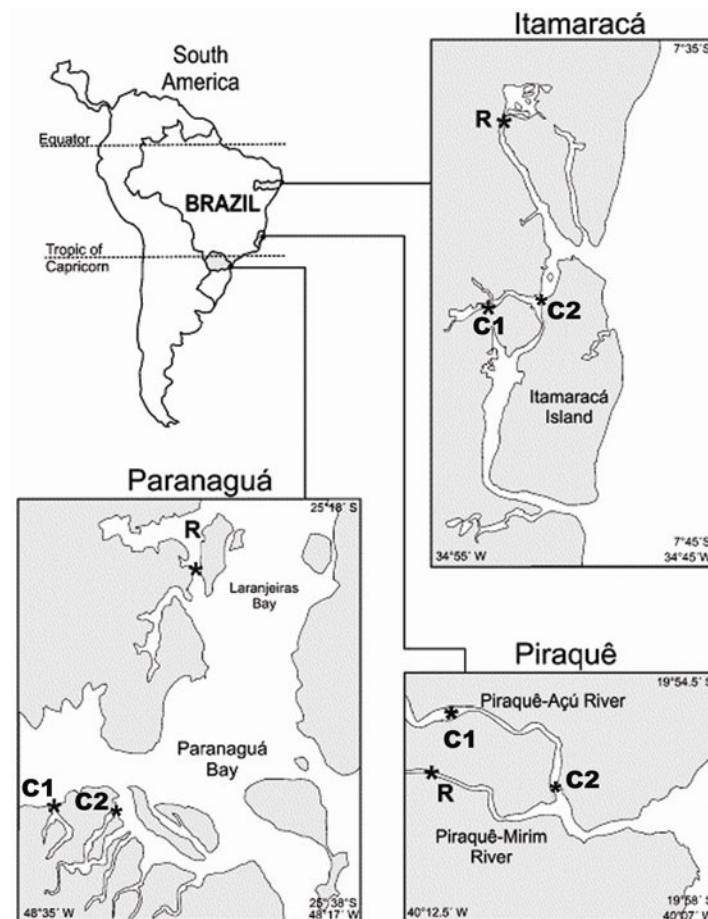


Figura 1. Localização geográfica dos pontos referência (R) e contaminados (C1 e C2) nas três regiões estuarinas avaliadas. Adaptado de Zanette et al. 2006.

Em todos os estuários foram definidas 3 áreas de coleta para amostragem das ostras: duas áreas contaminadas e uma área considerada referência (R). Uma das áreas contaminadas localizava-se mais próxima, contaminado 1 (C1) e outra mais afastada da principal fonte de poluição, contaminado (C2), para avaliação de um gradiente de contaminação. Em cada uma das áreas foram coletados 10 indivíduos em cada uma das regiões propostas em duas estações amostrais: agosto de 2003 (inverno) e fevereiro de 2004 (verão). Alguns parâmetros físico-químicos da água (temperatura, pH e salinidade) foram coletados durante as amostragens.

II.2.2.1. Itamaracá - Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz - PE

A Baía de Itamaracá onde está localizado o Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz (Figura 1) está situada no nordeste do Brasil, 40 km ao norte de Recife, Pernambuco. Existem duas estações bem definidas na região: a estação seca, compreendida entre setembro a janeiro, e a estação chuvosa, que ocorre entre fevereiro e agosto (Medeiros e Kjerfve, 1993).

O rio Botafogo é o principal rio que desemboca no Canal de Santa Cruz, segundo Meyer et al. (1998) até 1991 este rio recebeu grande aporte de mercúrio proveniente de uma fábrica de soda cáustica na região. Em 2003, ainda foram detectados altos níveis de mercúrio nas ostras desta região (Cavalcanti, 2003). Atualmente ainda existem fábricas de soda cáustica operando na região do canal de Santa Cruz, também há fábricas de cloro, papel e de plantações de cana-de-açúcar (Manuel de Jesus Flores Montes, membro da UFPE e participante do Projeto do Milênio-RECOS, comunicação pessoal). Além do aporte de efluentes industriais e agrícolas é muito provável que esgotos urbanos estejam chegando ao Canal de Santa Cruz.

Os pontos C1 ($7^{\circ}40'047''S$; $34^{\circ}51'486''W$) e C2 ($7^{\circ}40'574''S$; $34^{\circ}50'564''W$) no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz localizam-se no rio Botafogo (Figura 1). No rio Carrapicho, considerado isento de impacto antropogênico, foi determinada a área R ($7^{\circ}43'042''S$; $34^{\circ}53'383''W$) (Figura 1). A precipitação média mensal de chuvas em agosto permaneceu na faixa de 100 a 150mm enquanto que em fevereiro atingiu a faixa de 150 a 200mm (CPTEC, 2005).

II.2.2.2. Piraquê - Sistema Estuarino dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim - ES

Situado no distrito de Santa Cruz em Aracruz, Espírito Santo encontra-se o Sistema Estuarino dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim (Figura 1). Este estuário apresenta 65 km de extensão e área de 73,38 km², estando apenas 2,25% de sua área protegida pela Reserva Biológica de Manguezais dos rios Piraquê-açú e Piraquê-mirim (Luiz Fernando Loureiro Fernandes, membro da UFES e participante do Projeto do Milênio-RECOS, comunicação pessoal). Segundo Luiz Fernando Loureiro Fernandes (comunicação pessoal), o manguezal do rio Piraquê-mirim avança aproximadamente 9 km em direção ao continente, enquanto o rio Piraquê-açú avança cerca de 13 km, representando o maior avanço de maré do Espírito Santo. As épocas de maior ocorrência de precipitação estão compreendidas entre outubro e maio nesta região, não havendo estação seca pronunciada na região.

No município de Aracruz há uma indústria de fabricação de celulose de fibra curta e branqueada de eucalipto (que é utilizada como matéria prima para produção de papel) que é reconhecida como a maior do mundo no gênero, e que está em plena atividade desde 1978. Associado a esta indústria existe um terminal portuário privativo especializado no transporte da celulose exportada, que embarca 2 milhões de toneladas que vão para os Estados Unidos, Europa e Ásia e 900 mil toneladas produzidas por outra indústria localizada em Minas Gerais, que concentra suas vendas para o Japão e Ásia. Ainda nesta região existem indústrias de produção de peróxido de hidrogênio, metal-mecânicas e eletrônicas (Prefeitura de Aracruz, 2005). Além das atividades industriais existe ainda atividade agrícola expressiva (IBGE, 2005) e aporte de esgoto da cidade

de Aracruz. Segundo dados da CPTEC a precipitação média mensal de chuvas na região em agosto permaneceu na faixa de 100 a 150 mm enquanto que em fevereiro atingiu a faixa de 150 a 200mm em 2005. De acordo com as atividades acima descritas espera-se que os principais contaminantes presentes no Sistema Estuarino dos rios Piraquê-açu e Piraquê-mirim sejam metais, organoclorados, pesticidas e esgoto doméstico. No rio Piraquê-Açu estão situados os pontos C1 (19°55'20,22"S; 40°11'31,24"W) e C2 (19°56'31,52"S; 40°10'37,60"W) e o ponto R (19°56'14,67"S; 40°12'42,33"W) está situado no rio Piraquê-mirim (Figura 1).

II.2.2.3. Paraná - Complexo Estuarino Baía de Paranaguá

O Complexo Estuarino Baía de Paranaguá (25°16'34"S; 48°17'42"W, Figura 1) constitui o maior estuário do Paraná, estendendo-se aproximadamente 50 km para o interior do continente (Kolm et al., 2002). Às margens deste estuário localiza-se a cidade de Paranaguá, cuja população é estimada em mais de 140.000 pessoas (IBGE, 2005). Kolm et al. (2002), citam que a região ainda não possui tratamento de esgotos adequado, sendo a maior parte do esgoto urbano lançado em dois rios da região: Itiberê e Emboguaçú. Além do esgoto urbano, existe ainda o aporte de fertilizantes, pesticidas e efluentes industriais gerado pelas atividades agropecuárias e industriais da região, respectivamente.

O Porto de Paranaguá é considerado o maior porto do Sul do Brasil e possui expressiva participação na exportação de grãos sólidos, principalmente de soja, na América Latina. Em 2002 e 2003, os principais produtos exportados foram grãos e as principais importações foram fertilizantes (Portos do Paraná, 2005). Além de resíduos dos produtos importados e exportados, a região do porto está

diretamente exposta à presença de combustíveis devido ao fluxo de embarcações. As influências antrópicas regionais sugerem a presença de metais, hidrocarbonetos, pesticidas e grande aporte orgânico no Complexo Estuarino Baía de Paranaguá.

No complexo Estuarino Baía de Paranaguá os pontos C1 e C2 situam-se na região próxima ao terminal de carga/descarga portuária de fertilizantes de Paranaguá (Fospar), onde há o aporte de efluentes industriais, resíduos de combustíveis (devido ao intenso tráfego de navios) e resíduos de mercadorias carregadas/descarregadas no Porto de Paranaguá. O ponto R está situado na Baía de Laranjeiras (25°31'271" S; 48°29'690" W; Figura 1).

Os pontos mais contaminados no complexo Estuarino Baía de Paranaguá foram escolhidos em áreas com histórico diferente de contaminação: o ponto C1 (25°19'430" S; 48°29'690" W) situa-se na região próxima ao terminal de carga/descarga portuária de fertilizantes de Paranaguá (Fospar), onde há o aporte de efluentes industriais, resíduos de combustíveis (devido ao intenso tráfego de navios) e resíduos de mercadorias carregadas/descarregadas no Porto de Paranaguá. O segundo ponto contaminado, C2 (25°21'050" S; 48°25'97" W), está localizado em uma região próxima à desembocadura do rio Itiberê, que recebe a maior parte do esgoto da cidade de Paranaguá e que possivelmente recebe restos de pesticidas carregados de lavouras da região.

II.2.3. PROCEDIMENTOS INICIAIS

Foram coletados fragmentos de raízes de árvores do mangue que as ostras utilizam como substrato, este material foi acondicionado em recipientes plásticos

e transportado ao laboratório, onde as ostras foram retiradas das raízes co auxílio de faca. Antes da obtenção dos tecidos (brânquias e músculo adutor) as ostras foram anestesiados em gelo, medidas (comprimento total) e pesadas (peso da massa visceral).

II.2.4. BIOMARCADOR SOMÁTICO

O índice de condição (IC) é muito utilizado em ostras como indicador geral de saúde. Este índice representa a relação entre a massa visceral e a massa da concha. Quanto maior a proporção de massa visceral em relação à concha, melhores são as condições gerais de saúde do organismo avaliado. O $IC = PMV/PC \times 1000$ (onde PMV representa o peso da massa visceral em gramas e PC representa o peso da concha em gramas).

II.2.5. BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

II.2.5.1. Avaliação Histopatológica

As lesões histopatológicas foram identificadas e descritas através de microscopia óptica e eletrônica, os resultados serão apresentados de forma qualitativa. Para a microscopia óptica as brânquias das ostras foram fixadas em ALFAC (Etanol, formol e ácido acético), desidratadas e incluídas em Paraplast (Sigma©). Os cortes (5 μ m) foram corados com hematoxilina e eosina.

II.2.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Fragmentos de brânquias foram fixados em Karnovsky modificado (Glutaraldeído 2.5%, Paraformaldeído 2%, CaCl_2 2.5 mM, NaCl 200 mM em cacodilato de sódio 100 mM pH 7.2-7.4) por 2 horas, incluídos em resina PoliEMBED 812 (Electron Microscopy Sciences©) e avaliados no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EXII.

II.2.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

As brânquias foram fixadas em glutaraldeído 3%, cacodilato de sódio 100 mM, pH 7,2 – 7,4, lavadas em tampão cacodilato 100mM, desidratadas em etanol (Merck®), submetidas ao ponto crítico (CO_2), e observadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6360LV em baixo vácuo.

II.2.6. BIOMARCADOR BIOQUÍMICO - AVALIAÇÃO DA COLINESTERASE

Após a dissecação o músculo adutor das ostras foi congelado. Em laboratório estas amostras foram homogenizadas (5% p/v) em tampão fosfato (50 mM à 4° C) com 20% de glicerol pH 7,0 e centrifugados a 850 x g (4° C) por 15 min. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 12.800 x g (4° C) por 15 min e utilizado como fonte de enzima, esta foi exposta a 5, 10, 15, 20 e 30 mM de iodeto de acetiltiocolina (AcSCh) a fim de determinar a afinidade pelo substrato (Km) e velocidade máxima (Vmax). A partir destes resultados foram utilizados 30mM de iodeto de acetiltiocolina (AcSCh) para os ensaios. A atividade colinesterásica foi analisada de acordo com Ellman et al. (1961), com adaptações para

microplaca, e a concentração de proteínas de cada amostra foi determinada segundo o método de Bradford (1976).

II.2.7. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Dois tipos de comparação foram realizadas para avaliar todos os resultados. Os dados foram comparados de acordo com o nível de contaminação de cada área (R, C1 ou C2) em cada estuário, e os resultados de cada estuário foram comparados sazonalmente (inverno e verão). Os dados foram testados para verificar sua normalidade e homogeneidade de variâncias. Tanto os dados de atividade da colinesterase quanto os de IC não apresentaram homocedasticidade e foram avaliados através do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de Dunn (Zar, 1984). O nível de significância considerado foi de 0,05.

II. 3. RESULTADOS

II.3.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

As maiores temperaturas e menores salinidades foram observadas no verão, a estação que apresenta maiores índices pluviométricos (Tabela 1). Um gradiente de temperatura latitudinal pode ser detectado em Piraquê e Paranguá no inverno, como esperado. Altos valores de pH foram registrados no estuário de Piraquê no verão (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água nos três estuários avaliados.

Áreas	Pontos	Inverno			Verão		
		T (°C)	S (ppm)	pH	T (°C)	S (ppm)	pH
Itamaracá	R	27,3	29,9	8,2	30,4	20,7	8,3
	C1	28,0	21,7	7,8	29,9	13,7	8,1
	C2	28,5	26,5	8,0	30,1	21,0	8,6
Piraquê	R	23,9	35,0	6,1	29,7	20,8	10,1
	C1	24,1	33,5	7,1	28,7	17,6	11,3
	C2	24,4	37,6	7,8	28,5	23,2	13,3
Paranaguá	R	20,0	25,0	8,0	28,0	20,0	8,2
	C1	22,0	23,0	7,9	28,0	17,0	8,4
	C2	21,0	26,0	7,8	30,0	20,0	7,9

T = Temperatura; S = Salinidade; R=Referência; C1= Contaminado 1; C2=Contaminado 2.

II.3.2. ÍNDICE SOMÁTICO

O índice de condição foi similar nas ostras entre as áreas amostrais (R, C1 e C2) em cada um dos estuários avaliados. Paranaguá foi o estuário que apresentou os maiores valores de IC, se comparado aos demais, tanto no inverno quanto no verão (Figura 2).

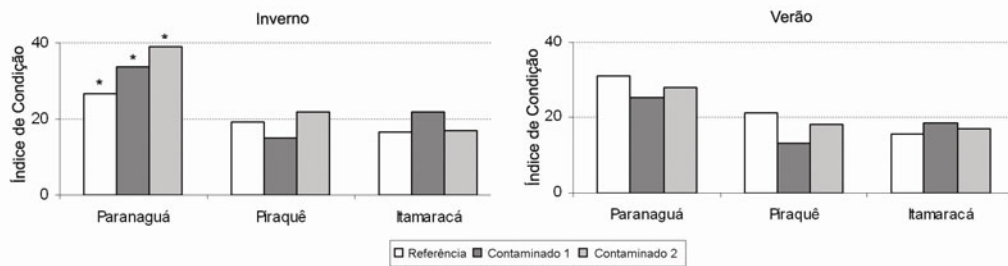


Figura 2. Índice de condição (IC) de *Crassostrea rhizophora* coletada no inverno e verão em três estuários brasileiros. Valores foram expressos como medianas, * indica diferença significativa sazonal entre os estuário ($p < 0.05$).

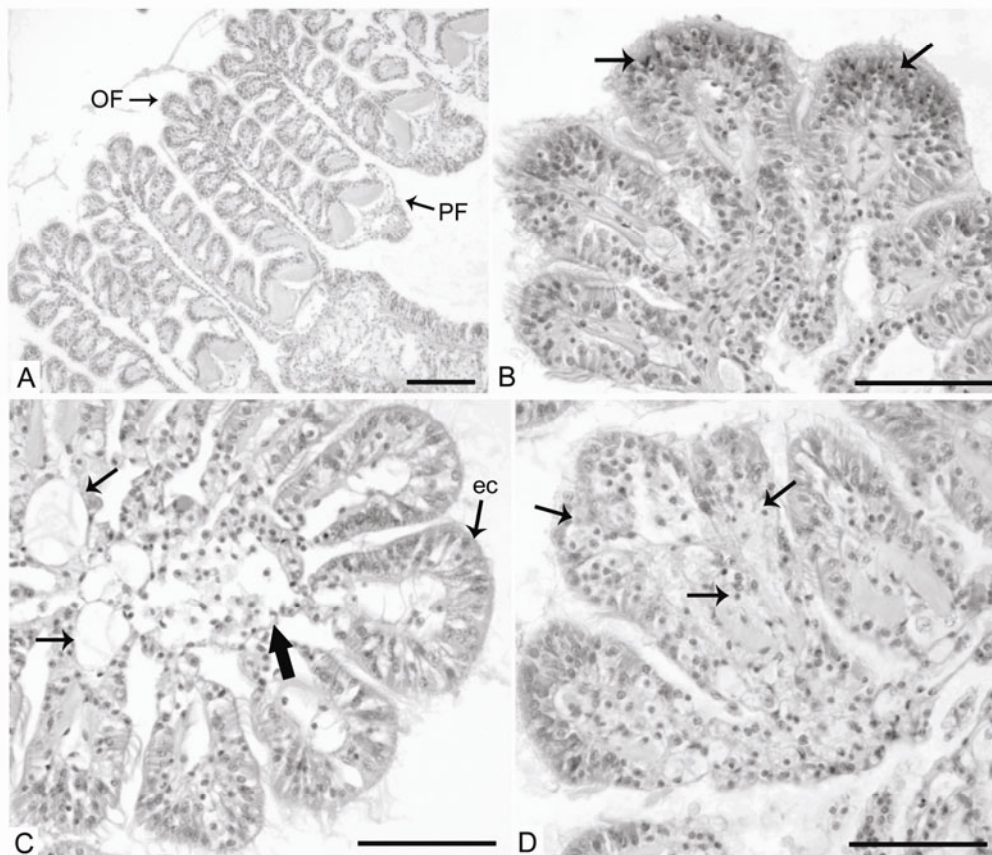


Figura 3. Lesões histopatológicas observadas nas brânquias de *Crassostrea rhizophora*. (A) Vista geral das brânquias, observe os filamentos ordinários (OF) e filamentos principais (PF). (B) Hiperplasia de células epiteliais nos filamentos ordinários, note o aspecto basofílico das células (setas). (C) Secção de filamentos ordinários mostrando a desorganização interna do tecido (seta grande) e a intensa vacuolização (seta pequena), observe o aspecto normal e organizado das células epiteliais (ec) nos filamentos ordinários. (D) Fusão de filamentos ordinários, note a desorganização do epitélio e dos tecidos internos (setas). Barra = 100 μ m.

II.3.3. HISTOPATOLOGIA

II.3.3.1. Lesões Detectadas

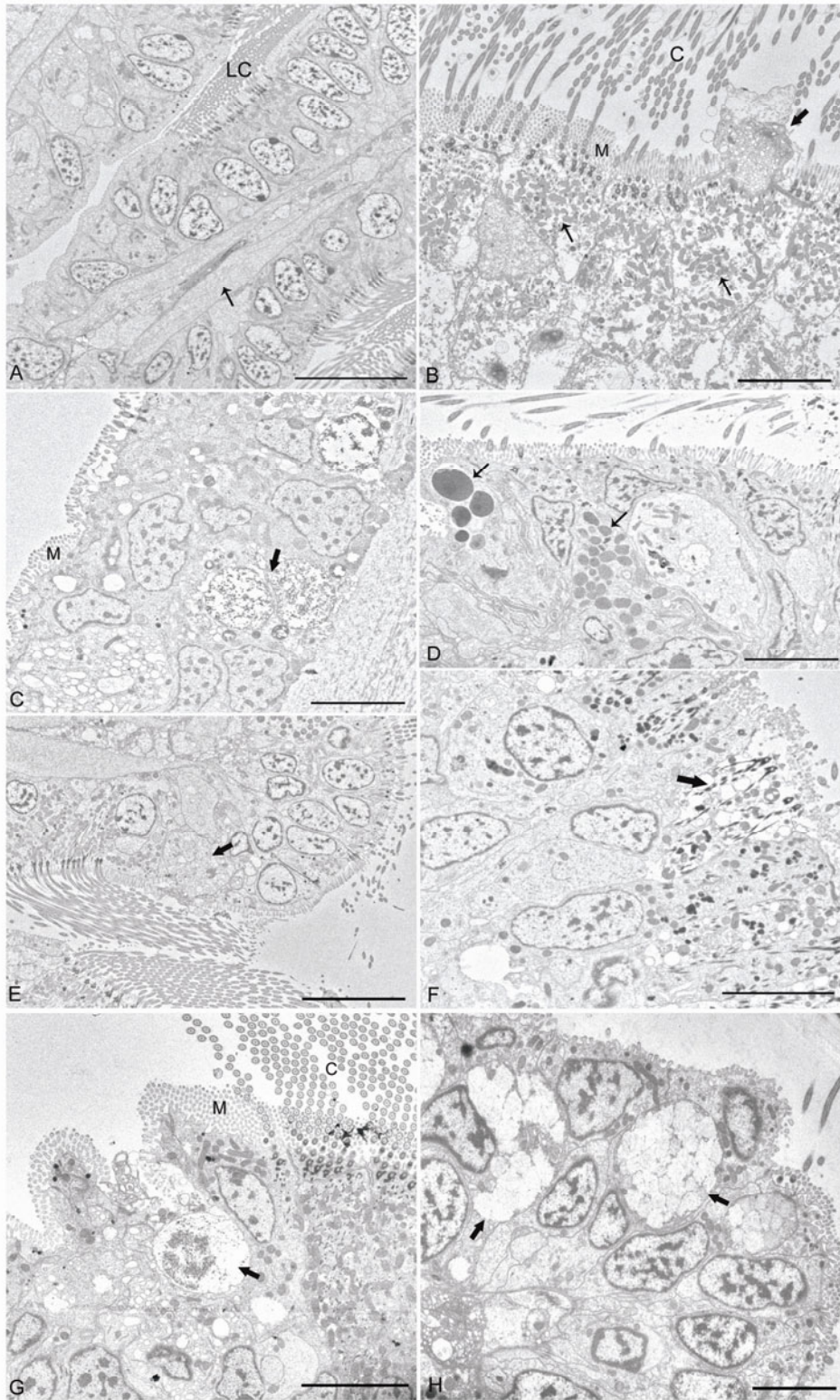
As brânquias de ostras apresentam filamentos paralelos bem delimitados denominados filamentos ordinários (Figuras 3A e 5A), os quais são interconectados por filamentos principais (Figura 3A) e fisicamente sustentados pela estrutura de suporte (Figura 4A). Um filamento ordinário apresenta pequenos e numerosos cílios na região frontal (Figuras 5C e 5E), longos cílios nas regiões laterais (Figuras 4E, 5C e 5E) e microvilosidades na região apical (Figuras 4B, 4C e 4G) do filamento ordinário. A maioria das amostras analisadas mostraram cílios laterais normais (Figuras 4A e 4E) e desorganização ou perda de cílios nas células frontais (Figura 5D). Algumas das alterações observadas por microscopia óptica foram confirmadas por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, como a hiperplasia tecidual observada nos filamentos ordinários (Figuras 3B e 5B), estas áreas de proliferação celular apresentaram um aspecto inchado (Figura 5B) e um caráter basofílico que não é evidente em brânquias normais (Figura 3B). Outra lesão observada em algumas ostras foi a vacuolização e desorganização celular na base dos filamentos ordinários (Figura 3C), e aumento na ocorrência de fusão nos filamentos ordinários (Figura 3D). As áreas de necrose detectadas por microscopia óptica foram confirmadas pela observação de células necróticas em MET (Figuras 4C, 4F e 4G). Áreas epiteliais de intensa atividade secretora foram também observadas (Figuras 4D, 4H, 5F e 5G). A presença de mucócitos (Figura 4H) justifica a alta liberação de muco na superfície dos

filamentos (Figura 5G). Áreas de grande desorganização celular no epitélio foram observadas nas Figuras 4F e 4G.

A hiperplasia epitelial foi uma importante lesão identificada através de microscopia de luz (Figura 3B), foi também evidente ao MEV nos filamentos ordinários (Figura 5B), sendo que em alguns indivíduos estes filamentos parecem ser menos individualizados (Figura 5B) que o normal (Figura 5A). A intensa atividade secretora foi também confirmada por MEV (Figuras 5F e 5G). Desorganização celular com perda de cílios foi detectada nos filamentos ordinários (Figura 4E e 5D). Perda de cílios frontais foi observada através de microscopia de luz, a perda de cílios laterais não foi detectada, apresentando um aspecto similar entre as amostras (Figura 4A, 4E, 5C e 5E).

Legenda da página 61.

Figura 4. Organização ultraestrutural dos filamentos branquiais de *Crassostrea rhizophorae*. (A) Aspecto geral do epitélio branquial, note o padrão de organização das células no filamento ordinário, estrutura de suporte (seta) e cílios laterais (LC). Barra = 10 μ m. (B) Liberação de muco na superfície epitelial (seta grande), observe a presença de numerosas mitocôndrias (setas) nas células epiteliais, cílios (C) e microvilosidades (M). (C) Área epitelial mostrando degeneração celular, necrose (seta), note a presença de microvilosidades (M). (D) Área epitelial com intensa atividade de secreção, observe células com grânulos de secreção elétron densos (setas). (E) Visão da extremidade dos filamentos ordinários mostrando o aspecto bem organizado deste epitélio e uma área de tecido desorganizado (seta). Barra = 10 μ m. (F) Foco de necrose epitelial (seta), note a degeneração celular na superfície do epitélio. (G) Área necrótica evidente no epitélio do filamento ordinário (seta), note também a desorganização epitelial associada a esta área, cílios (C) e microvilosidades (M). (H) Epitélio dos filamentos ordinários mostrando a intensa proliferação de mucócitos (setas). Barra B, C, D, F, G e H = 5 μ m.



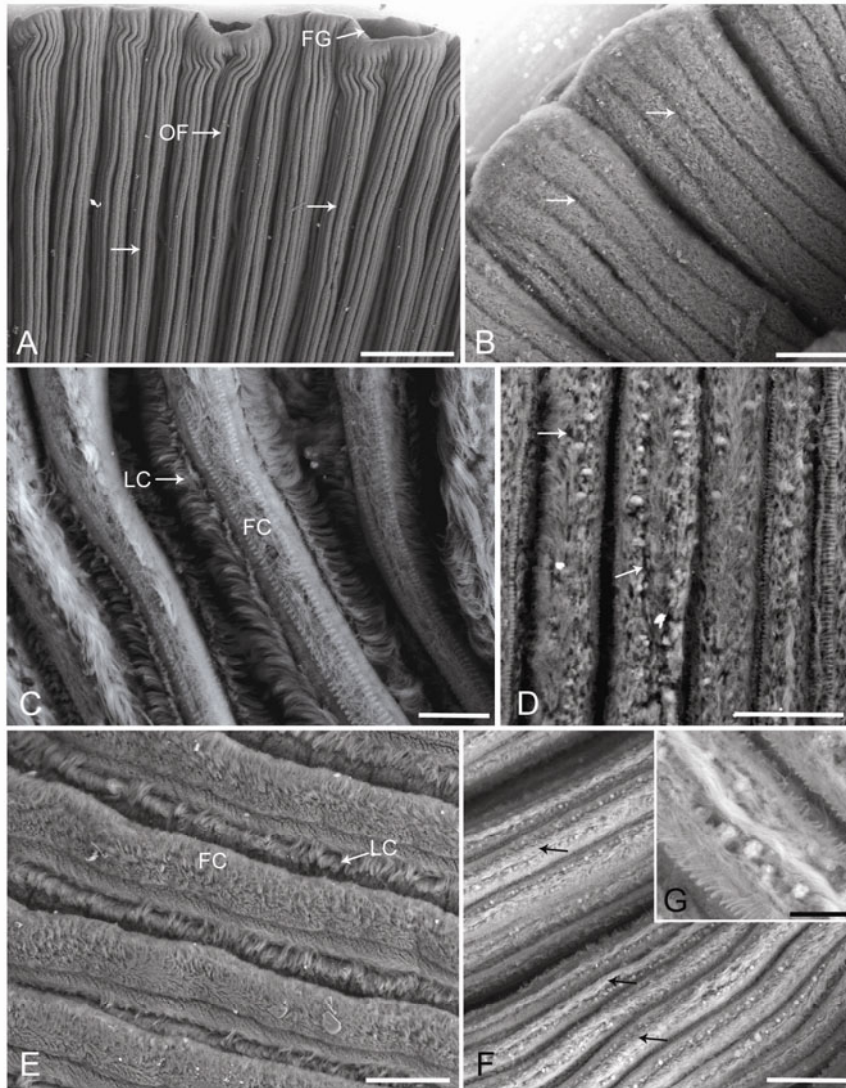


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura das brânquias de *Crassostrea rhizophorae*. (A) Vista geral dos filamentos ordinários (OF) e sulco alimentar (FG). Observe os limites evidentes entre os filamentos ordinários. Barra = 500 μm . (B) Filamentos ordinários inchados, note que o limite entre os filamentos é menos evidente (setas). Barra = 100 μm . (C) Detalhe da organização dos filamentos ordinários mostrando cílios laterais (lc) e cílios frontais (fc). Barra = 100 μm . (D) Aspecto alterado da superfície dos filamentos com áreas sem cílios (setas). Barra = 50 μm . (E) Aspecto geral da desorganização dos cílios laterais e frontais. Barra = 20 μm . (F) Aspecto geral da intensa atividade de secreção de muco nos filamentos ordinários (seta). Barra = 50 μm . (G) Detalhe da secreção mucosa nos filamentos ordinários. Barra = 20 μm .

II.3.3.2. Ocorrência de Lesões

Necroses foram observadas em todas as áreas amostrais de Paranaguá, Piraquê e Itamaracá durante o inverno, com a menor ocorrência (menor que 20%) em Paranaguá C2 (Figura 6A). Durante o verão necroses foram observadas apenas em Piraquê C1 e C2 e Itamaracá R e C2 (Figuras 6A e 6B). Alta ocorrência de hiperplasia (acima de 80%) foi detectada em todas as áreas e em ambas estações amostrais (Figuras 6C e 6D), exceto por Paranaguá C1 no inverno onde não foi registrada a ocorrência de hiperplasia (Figura 6C). Hipertrofia de mucócitos foi observada em todas as áreas amostrais e estações, exceto em Itamaracá C1 e C2 em no inverno (Figuras 6E) e em Itamaracá C2 no verão (Figuras 6F). A ocorrência mais expressiva de hipertrofia de mucócitos (acima de 50%) foi observada nas áreas C1 de Paranaguá e Piraquê no inverno (Figura 6E) e em Piraquê R e C1 bem como em Itamaracá R (Figura 6F). Dois tipos de fusão nos filamentos branquiais foram detectados: fusão das regiões frontal e abfrontal (AB) dos filamentos. As fusões abfrontais ocorreram em todos os estuários e ambas as estações (Figuras 6G e 6H), em ao menos um ponto amostral (R, C1 ou C2) com maior ocorrência em Paranaguá R e C1 no inverno (Figura 6G) e C1 e C2 no verão (Figura 6H). Fusões frontais ocorreram em todos os estuários durante o inverno (Figura 6I), e apenas em Piraquê R e C1 durante o verão (Figura 6J).

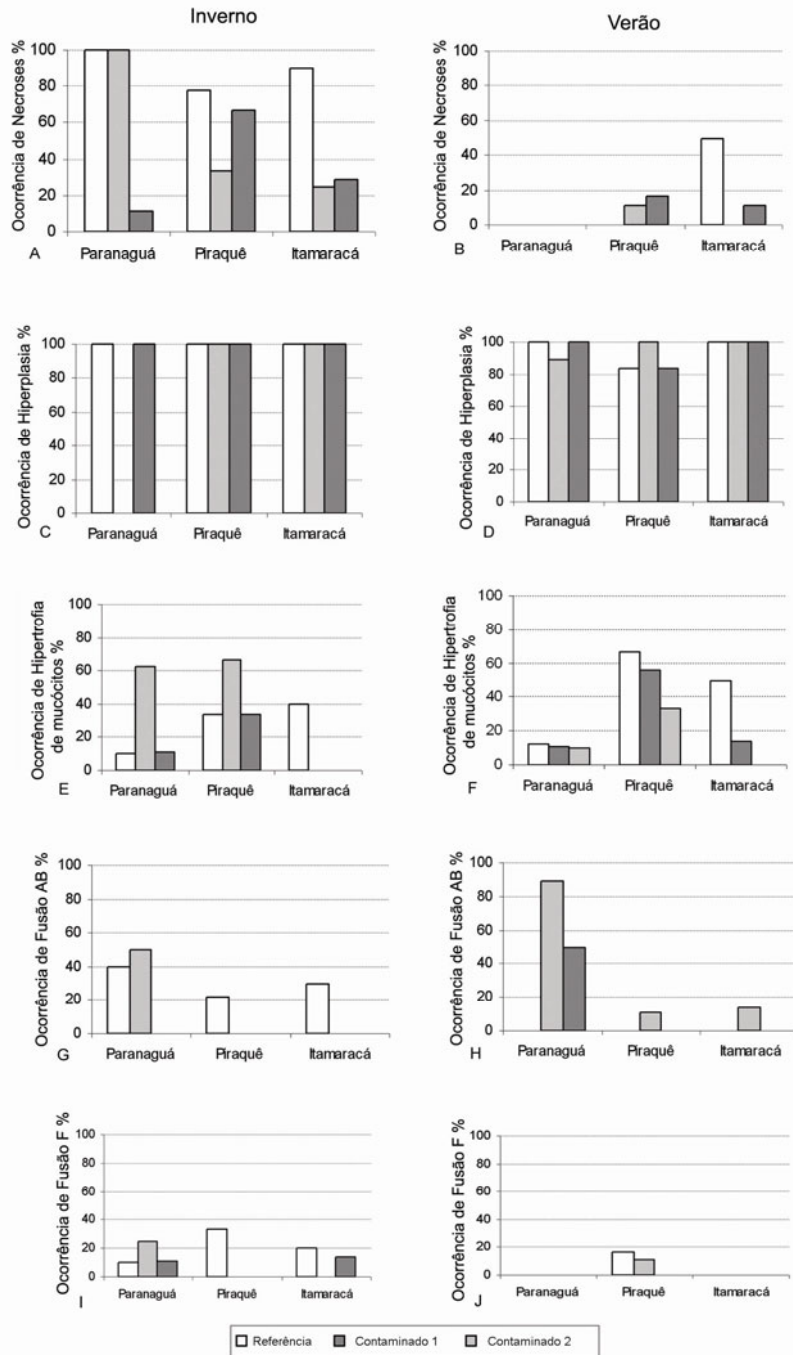


Figura 6. Ocorrência comparativa de lesões histopatológicas nas brânquias de *Crassostrea rhizophorae* entre três regiões estuarinas da costa brasileira. AB = abfrontal, F = frontal.

II.3.4. ATIVIDADE DA COLINESTERASE

A atividade da colinesterase foi medida no músculo das ostras e apresentou-se similar entre as áreas amostradas (R, C1 e C2) em todas as áreas estuarinas (Figura 7). Os valores da atividade da colinesterase no inverno foram significativamente maiores que os valores obtidos no verão para as mesmas áreas de cada estuário (Figura 7).

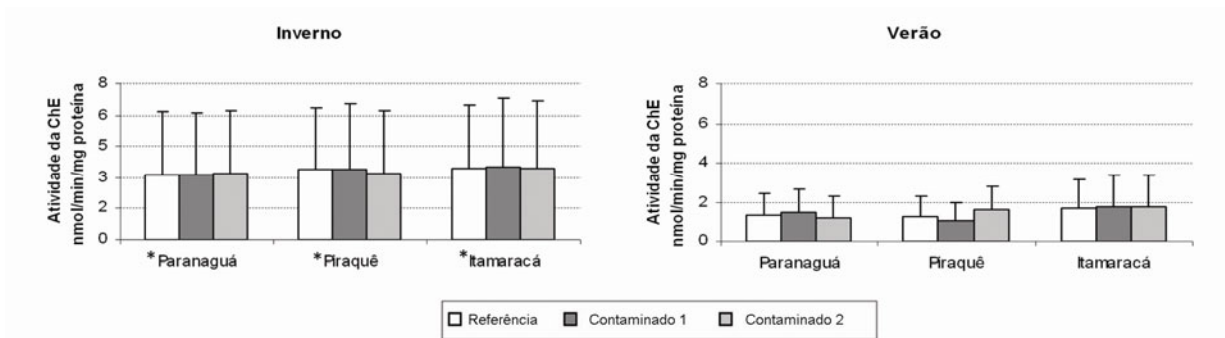


Figura 7. Atividade da colinesterase no músculo de *Crassostrea rhizophorae* entre três regiões estuarinas da costa brasileira. Valores foram expressos como medianas, # indica diferença entre inverno e verão no mesmo ponto amostral.

II. 4. DISCUSSÃO

A maioria dos estudos de biomonitoramento que tem sido realizados avaliam o efeitos de contaminantes em uma única área ou região (Petrovic et al., 2004; De la Torre et al., 2005; Munteanu e Munteanu, 2006; Nigro et al., 2006). Este estudo foi parte de uma amplo projeto de pesquisa brasileiro em recursos costeiros o qual foi financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia. O monitoramento químico de água e sedimento tem sido realizado globalmente nas últimas décadas com foco principal na detecção e bioacumulação de contaminantes (e.g., Joyeux et al. 2004; Ueno et al., 2005), enquanto estudos de biomonitoramento avaliando os efeitos de contaminantes em organismos aquáticos tem aumentado recentemente (Silva et al., 2001, Alves et al., 2002, Lionetto et al, 2003, Ricciardi et al., 2006, Zanette et al., 2006). Ambos tipos de abordagem são importantes especialmente quando é possível associar os efeitos biológicos observados à quantificação e detecção de xenobiontes em uma área específica.

Índices somáticos são indicativos do estado geral de saúde de um organismo. Geralmente, o índice de condição é calculado em bivalves desidratados (Orban et al., 2002); no entanto neste estudo este procedimento foi feito com material obtido de animais frescos, a fim de utilizar os mesmos espécimens na obtenção de todos os dados referentes à biomarcadores. Segundo Granby e Spliid (1995), Guolan e Yong (1995) e Nicholson (1999) índices de condição (IC) podem ser utilizados para avaliar contaminação ambiental. Alterações nas taxas de crescimento podem ser induzidas por contaminantes,

pois o estresse causado pela poluição pode levar à utilização de energia para detoxificação, depletando reservas que seriam originalmente destinadas ao crescimento do organismo (Lucas e Beninger, 1985; Nicholson e Lam, 2005). Animais coletados no campo frequentemente apresentam baixos valores de IC em áreas contaminadas com HPA's, PCB's (Granby e Spliid, 1995), metais (Nicholson, 1999) e TBTCI (Guolan e Yong, 1995), ou em áreas próximas a centros urbanos (Nicholson, 1999). A ocorrência de valores similares no IC das ostras nas áreas amostrais (R, C1 e C2), é um indicativo de que o estado de saúde destes organismos seja similar em cada um dos estuários avaliados. Considerando-se apenas este parâmetro poderia-se inferir que os altos valores de IC encontrados em Paranaguá sugerem que um melhor estado geral de saúde das ostras é encontrado em Paranaguá se comparado a Piraquê e em Itamaracá. Estes índices de condição mais elevados em Paranaguá poderiam estar relacionados a um incremento de material orgânico neste estuário devido à presença de um grande centro urbano, indústria de fertilizantes e aporte orgânico resultante de perdas geradas pela exportação de grãos no porto que se localiza próximo as áreas C.

A ocorrência de lesões histopatológicas foi freqüente em todas as áreas amostradas nos estuários avaliados, sugerindo que os níveis de contaminação são similares nas áreas estudadas. Algumas das alterações histopatológicas detectadas neste estudo como fusão de filamentos, desorganização celular, necrose e hipertrofia de mucócitos foi observada por outros autores após exposição à contaminantes no campo ou em experimentos de laboratório (Tabela 3). Apenas a ocorrência de necroses apresentou um comportamento

mais diferenciado entre as estações, ocorrendo mais intensamente durante o inverno (Figura 6), estação que possui em geral menor pluviosidade, na qual talvez haja maior concentração de contaminantes na água. As alterações na distribuição dos cílios nas brânquias das ostras reportadas neste estudo podem estar relacionadas a prejuízos na circulação de água e ingestão alimentar (Nicholson e Lam, 2005). Lesões como necroses, desorganização de células epiteliais, fusão em filamentos frontais e abfrontais podem diminuir a eficiência das trocas gasosas nas brânquias. Hiperplasia epitelial e aumento na atividade secretora de muco provavelmente está associada à proliferação de mucócitos e poderia ser interpretada como uma resposta ao estresse pela presença de contaminantes. A secreção de muco tem sido relatada como um mecanismo de proteção, pois este forma uma barreira protetora entre o epitélio e a água do ambiente (Bigas et al., 2001).

Tabela 2. Alterações histopatológicas relacionadas a exposição à contaminantes observadas por alguns autores nas brânquias de bivalves.

Espécie	Efeitos	Contaminante	Autor
<i>Mytilus edulis</i>	Inchaço de células endoteliais, descolamento de células abfrontais, dilatação das veias branquiais fusão frontal e abfrontal de filamentos branquiais	Cobre e cádmio	Sunila, 1987
<i>Mytilus edulis</i>	Alterações morfológicas nos filamentos branquiais e distúrbio severo nas células epiteliais ciliadas	Fração acomodada de diesel e cobre	Auffret, 1988
<i>Crassostrea virginica</i>	Hiperplasia e necrose	Exposição ambiental a	Gold-Bouchot et al., 1995

		hidrocarbonetos	
		de petróleo e	
		cádmio	
<i>Ostrea edulis</i>	Dilatação dos espaços intercelulares e ruptura ocasional de células	Mercúrio	Bigas et al., 1997
<i>Ostrea edulis</i>	Bolhas nas membranas das microvilosidades de células absorptivas e ciliadas, disocilia, lise celular e hipertrofia de mucócitos	Mercúrio	Bigas et al., 2001
<i>Perna perna</i>	Decréscimo na quantidade de cílios e necroses	Mercúrio	Gregory et al., 1999
<i>Scrobicularia plana</i>	Descamação do epitélio branquial e necroses	Exposição ambiental e laboratorial a metais pesados	Riba et al., 2005
<i>Crassostrea angulata</i>	Alterações nas estruturas epiteliais e ciliares das brânquias	Exposição ambiental e laboratorial a metais pesados	Riba et al., 2005
<i>Crassostrea rizophorae</i>	Decréscimo na quantidade de cílios, hiperplasia, hipertrofia de mucócitos, necroses e fusão nas regiões frontal e abfrontal dos filamentos	Exposição ambiental a uma mistura de contaminantes	Presente estudo

Segundo Alves et al. (2002) *C. rizophorae* tem sido considerada uma espécie sensível, sendo recomendada para a detecção de efeitos neurotóxicos. Estudos referentes a atividade da colinesterase geralmente relatam inibição das amostras de bivalves coletados em áreas impactadas. Galloway et al. (2002), Owen et al.

(2002), Binelli et al. (2006), Ricciardi et al. (2006) relataram a inibição da colinesterase em tecidos moles e hemolinfa de várias espécies de bivalves. Resultado similar foi observado em tecidos moles de *Mytilus galloprovincialis* coletado em áreas costeiras italianas sob influência industrial e urbana (Lionetto et al., 2003), e no músculo adutor de *Amblema plicata* após exposição aguda (96 horas) a clorpirifos (Doran et al., 2001). Pérez et al. (2004) relataram inibição da colinesterase em *Scrobicularia plana* após exposição a esgoto doméstico não tratado. No presente estudo a atividade da colinesterase apresentou-se similar entre as áreas amostrais em cada uma das estações sazonais avaliadas, sugerindo que provavelmente os níveis de compostos anticolinesterásicos sejam similares entre os estuários avaliados. Porém observou-se que, de forma geral, a atividade da colinesterase apresentou mais elevada no inverno do que no verão contrariando os resultados relatados por Bocquené e Galgani (1991), Kirby et al. (2000) e Ricciardi et al. (2006) que observaram incrementos na atividade da colinesterase em bivalves nas estações mais quentes do ano; bem como a tendência de atividade metabólica mais intensa no verão demonstrada em *Crassostrea gigas* por Mão (2006) e *Mytilus galloprovincialis* por Bochetti (2006).

Atividades agrícolas representam de fato fonte de contribuição antrópica em todos os estuários avaliados. Alves et al. (2002) observaram inibição na atividade da colinesterase após exposição de 96 h à 100 µg/L do pesticida carbamato (furadan) nas brânquias de duas espécies de bivalves, *C. rhizophorae* (a mesma espécie avaliada neste estudo) e *Perna perna*, estes autores observaram que *C. rhizophorae* apresentou 64% de inibição, enquanto *P. perna*

apresentou apenas 35% de inibição da enzima, sugerindo que a ostra *C. rhizophorae* é uma espécie sensível para este tipo de análise.

Diferenças na salinidade e pH podem estar associadas a diferentes taxas de precipitação. De fato, dados das agências estaduais disponíveis *on-line* indicam que os meses de verão de dezembro a fevereiro são os que apresentam as maiores taxas pluviométricas nos estados do Espírito Santo e Paraná, respectivamente onde estão localizados os estuários de Piraquê e Paranaguá (CPTEC, 2005 e SIMEPAR, 2005). Diferentes taxas pluviométricas poderão alterar não apenas a salinidade e o pH dos estuários, bem como a disponibilidade de contaminantes pela turbulência da água e revolvimento de sedimentos (Fent, 1996; Bahena-Manjarrez et al., 2002), fator que pode estar relacionado aos menores valores na atividade da colinesterase durante o verão (Figura 7). Além disso, é durante o verão que ocorre um maior tráfego de barcos e a presença de turistas contribui para um grande aumento na geração de efluentes domésticos, incrementando a contaminação dos estuários.

O trabalho de Vidal et al. (2002) relata que a espécie de bivalve *Corbicula fluminea* apresenta redução de parâmetros como: catalase peroxidação de lipídeos e NADH citocromo c redutase em pH alcalino (8-9); indicando que a alcalinização da água pode aumentar a suscetibilidade de bivalves a ação de contaminantes aquáticos.

A uniformidade nas respostas observadas em Itamaracá poderia estar associada a menor variabilidade nos parâmetros abióticos que ocorre nesta região e também a resposta similar de bioacumulação de mercúrio observada por Meyer et al. (1998) em um estudo que comparou as taxas de bioacumulação

entre as estações seca e chuvosa no estuário de Itamaracá, no nordeste do Brasil, com *C. rhizophorae*.

A interpretação dos resultados de campo é sempre muito complexa, pois um grande número de fatores pode influenciar as variáveis analisadas de maneira não controlada (Roche et al., 2002; Zanette et al., 2006). Abordagens realizadas com múltiplos biomarcadores fornecem uma melhor caracterização de uma dada área durante um período de tempo em estudos de biomonitoramento. Os presentes resultados apontam que em corpos aquáticos relativamente próximos é pouco provável que exista uma área referência totalmente desprovida de contaminação de origem antropogênica.

Estudos com múltiplos biomarcadores apresentam a vantagem de se analisar diferentes respostas induzidas pela ação de contaminantes nos mesmos organismos, proporcionando resultados que podem ser complementares. Além disso, permite uma melhor compreensão e interpretação de respostas. As respostas observadas neste trabalho através da abordagem de múltiplos biomarcadores permite concluir que as ostras das áreas avaliadas apresentam estado de saúde similar, ou seja, todas estão sob influência dos contaminantes liberados nos estuários avaliados.

CAPÍTULO III

CINÉTICA DE DERIVADOS DE PETRÓLEO EM *Fundulus heteroclitus* E *Salvelinus alpinus* APÓS EXPOSIÇÃO HÍDRICA

COLABORAÇÃO:

Prof. Dr. Claude Rouleau - Université du Québec à Rimouski - UQAR

Prof. Dr. Émilien Pelletier - Institute Maurice Lamontagne (Fish and Oceans)

Manuscrito em preparação:

Valdez Domingos, F. X.; Pelletier, E. ; Oliveira Ribeiro, C. A.; Rouleau, C. Uptake and distribution of waterborne ¹⁴C-labelled naphthalene, naphthol-1, and phenanthrene in *Fundulus heteroclitus*.

III.1. INTRODUÇÃO

Ambientes aquáticos são frequentemente contaminados por derivados de petróleo. Efluentes industriais, urbanos, deposição atmosférica, tráfego marinho e derramamentos de petróleo representam as principais fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em estuários e regiões costeiras. A presença de HPAs derivados de petróleo nos ecossistemas aquáticos é causa de preocupação, pois peixes e outros organismos aquáticos são capazes de absorver HPAs tanto por via hídrica quanto por via trófica (Akaishi et al. 2004). Além disso, evidências sugerem que hidrocarbonetos derivados de derramamentos de petróleo podem persistir no sedimento por décadas (Reddy et al., 2002) prolongando o contato com os organismos da área afetada.

Embora HPAs leves permaneçam menos tempo no ambiente (por serem altamente voláteis) do que HPAs de maior massa molecular eles ainda representam potencial tóxico aos organismos aquáticos (Akaishi et al., 2004). HPAs leves são mais hidrofílicos e mais voláteis que HPAs mais pesados e podem ser detectados em água contaminada com óleo cru, constituindo a FSA (fração solúvel do petróleo na água) (Al-Yakoob et al., 1996; Akaishi, 2003). Alguns autores como Al-Yakoob et al. (1996), Lockhart et al. (1996), Aas et al. (2000), Pollino e Holdway (2002) reportaram que a FSA pode afetar a sobrevivência, crescimento, reprodução e metabolismo de organismos marinhos. Além disso, a FSA pode também induzir lesões histopatológicas como necroses hepáticas, aneurismas, hiperplasia e desorganização nas brânquias de peixes e outros órgãos internos de peixes expostos (Akaishi, 2003).

A autoradiografia (WBARG - whole-body autoradiography) tem sido utilizada a fim de melhor compreender a absorção e distribuição de contaminantes em organismos vivos (Amlund et al., 2006; Fowler et al., 2004; Rouleau et al., 1998, 1999, 2001, 2003; Wood et al., 2002). Os objetivos deste capítulo são verificar a absorção e distribuição de três HPAs leves: naftaleno, fenantreno e naftol em *Fundulus heteroclitus* através de exposição hídrica a estes contaminantes marcados com radioisótopos e também verificar a presença de HPAs leves na água, e metabólitos na bile e fígado de *Fundulus heteroclitus* após simulação de derramamento de petróleo.

III.2. MATERIAIS E MÉTODOS

III.2.1. ESPÉCIES BIOINDICADORAS

O “mummichog” *Fundulus heteroclitus* (Ciprinodontidae), é um dos peixes eurialinos mais abundantes na costa leste da América do Norte (Radtke, 1979). Esta espécie apresenta comprimento aproximado de 9 cm, sendo amplamente utilizada como isca para peixes de maior porte. Pode ser encontrada em ambientes estuarinos, principalmente em regiões próximas a vegetação em áreas rasas e lodosas, constituindo populações sedentárias (Radtke, 1979).

Pela facilidade de coleta, abundância e adaptabilidade às condições de laboratório esta espécie vem sendo utilizada há mais de 20 anos tanto em estudos de laboratório quanto de campo (Eisler, 1986; Mulvey et al., 2002; Radtke, 1979; Roling et al., 2004; Rose et al., 2001).

A truta *Salvelinus alpinus* (Salmonidae) pode ser encontrada em algumas áreas da Europa desde o Atlântico norte até o sul da Noruega, ao norte do Reino

Unido, Escandinavia, Finlândia, nos Alpes e também na América do Norte em Quebec, (Canadá) e em Maine e New Hampshire (USA). Apresenta hábito bentopelágico e é uma espécie anádroma. Alimenta-se de crustáceos planctônicos, anfípodos, moluscos, insetos e peixes. É uma espécie extremamente sensível a poluição aquática e oscilações no nível de oxigênio na água (Fishbase, 2006).

III.2.1. EXPERIMENTO COM RADIOISÓTOPOS

Exemplares adultos de *Fundulus heteroclitus* (8-10 cm de comprimento) foram aclimatados em aquários de 40 litros durante duas semanas através de um sistema de água em fluxo contínuo. A temperatura da água variou entre 8,6°C e 16,5°C durante o experimento. Os peixes foram expostos a Naftaleno (NAPH), Naftol -1 (NOH) e Fenantreno (PHE) radiomarcado com C₁₄ (Tabela 1) por via hídrica durante 24h em sistema estático. NAPH e PHE foram adquiridos da American Radiolabelled Chemicals e NAPH da Moravek Biochemicals. A atividade por aquário foi de 1μCi/L para cada contaminante avaliado. Após o período de exposição os animais foram mantidos em sistema de fluxo contínuo de água e amostrados após 0, 1, 3, 7, 14 e 21 dias de depuração.

Tabela 1. Características dos contaminantes testados.

Contaminante	MM	Log KOW	Solubilidade (mg/L)	Concentração do radiomarcador (kBq/L)	Concentração Química (μg/L)
NAPH	128,16	3,30	31	37	0,390
NOH	144,16	2,85	866	37	0,309
PHE	178,22	4,86	1,15	37	0,380

MM= massa molecular, KOW= coeficiente de partição octanol-água.

III.2.1.2. Autoradiografia (WBARG – “Whole-body Autoradiography”)

Após anestesia letal (MS222 0,1g/L), os peixes foram incluídos (inteiros) em gel de carboximetilcelulose e congelados em etanol-gelo seco. Foram obtidos cortes congelados (20 µm) de diferentes partes do corpo à -25°C, em micrótomo LEICA CM3600, os quais foram coletados em fita adesiva e desidratados no interior do micrótomo. Os cortes foram colocados em contato com telas de fósforo (Cyclone Storage Phosphor Screen, Canberra-Packard) protegidos da luz e da radiação cósmica. Após o período de sensibilização das telas de fósforo (3 dias), os cortes foram removidos e as telas escaneadas (Cyclone Storage Phosphor Screen, Canberra-Packard). A distribuição da radioatividade foi visualizada e quantificada em um mínimo de cinco cortes por peixe utilizando o programa OptiQuant 4.0 (Canberra-Packard). Os resultados foram expressos de acordo com o tempo de exposição em telas de fósforo e expressos como unidade digital de luz por mm² (DLU/mm²). A distribuição dos contaminantes foi expressa como índice de concentração relativo ao fígado (IC): $IC = \text{DLU/mm}^2_{\text{fígado}} / \text{DLU/mm}^2_{\text{tecido}}$, DLU= unidade de densidade luminosa (Rouleau et al. 2001). A constante de eliminação (K_e), e a meia vida biológica ($t_{1/2}$) foram calculadas: $t_{1/2} = 0.693/k_e$, tempo de equilíbrio de 95% $t_{0.95} = -(\ln 0.05)/K_e$.

III.2.2. SIMULAÇÃO DE DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO

Para a simulação de derramamento de petróleo (fonte: North Sea) foram utilizados 6 aquários, 3 controles e 3 contaminados. Nove indivíduos de *Salvelinus alpinus* (truta) (22-27 cm de comprimento) foram avaliados em

cada aquário. Os animais foram expostos a 300ml de petróleo (óleo cru) em sistema de fluxo contínuo, para isso o petróleo foi acondicionado em recipientes que permitiam o contato do óleo apenas com a água, portanto não houve contato direto dos peixes com o óleo (Figura 1) a fim de expor os animais a fração solúvel do petróleo na água (fonte de HPAs leves). Após 7 dias de exposição o petróleo foi removido dos aquários e os animais permaneceram em período de recuperação durante 10 dias.

Ambos experimentos descritos neste capítulo foram realizados nas dependências da Université du Québec à Rimouski (UQAR), em Rimouski, Quebec, Canadá no período de julho de 2005 a janeiro de 2006.

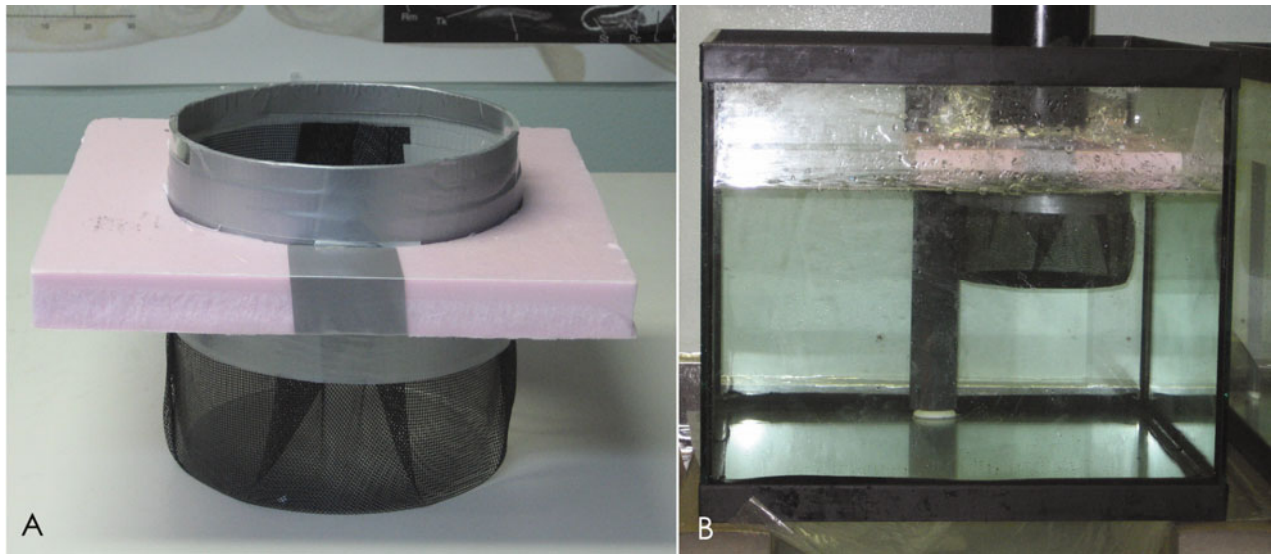


Figura 1. Aparato utilizado para contenção de petróleo. (A) Vista geral do aparato, a parte cilíndrica mede ~ 20 cm de diâmetro, a tela utilizada para cobrir o fundo da peça possui malha de 1-2 mm. Em volta do cilindro é acoplada uma peça de isopor para viabilizar a flutuação do aparato. (B) Vista do aparato de ntro do aquário. O petróleo é adicionado através da parte superior e como o aparato flutua, permite a manutenção da interface petróleo-água durante o experimento, assim os organismos tem contato direto apenas com compostos solúveis em água.

III.2.2.1. Análise de HPAs na água

A fim de verificar a presença de HPAs, amostras de água foram coletadas após 0, 3, 7, 24 horas e 7 dias durante o período de exposição e também após 1, 4 e 10 dias de recuperação. Os HPAs foram obtidos a partir das amostras de água do experimento através de extração líquido-líquido em hexano (10 mL para 500 mL de água dos aquários). Após a extração as amostras foram concentradas em fluxo de N_2 até o volume final de 2-3 mL. Duas técnicas foram utilizadas para avaliar a presença de HPAs na água, espectrofotometria (Perkin Elmer LS50B) e HPLC (cromatografia líquida de alta performance). A HPLC foi realizada utilizando coluna Supelcosil LC-HPA (25cm x 3mm. 5 μ m) com eluição em acetronitrilo 75%.

III.2.2.2. Análise de HPAs na bile

Após 7 dias de exposição os animais foram anestesiados com MS222 0,1g/L e sacrificados. A bile foi coletada com seringa e acondicionada em frascos âmbar. A extração da bile foi realizada através da filtração com metanol (1:20) sobre membrana Millex®-GV (PVDF Durapore) de 0,2 µm. Após a extração as amostras eram protegidas da luz e injetadas no HPLC-fluorescência durante o mesmo dia da extração a fim de evitar a degradação. A HPLC foi realizada em coluna Zorbax C18 (25cm x 4,6 mm; 5,0µm) com metanol 80% em água nano pura na fase móvel durante 8 minutos com débito de 0,8 mL/min. Como padrões foram utilizados 1-naftol, 9-fenantrol e pirenol (1-hidropireno) (Aldrich). O detector de fluorescência foi programado em 244 nm - λ emissão e 394 nm - λ excitação.

III.3. RESULTADOS

III.3.1. EXPERIMENTO COM RADIOISÓTOPOS

III.3.1.1. Análise Qualitativa

Observou-se a absorção e acumulação de todas as substâncias testadas por via hídrica. Os órgãos radiomarcados após exposição a todos os contaminantes foram vesícula biliar, fígado e intestino (Figura 2).

Animais expostos a naftaleno apresentaram marcação em apenas três órgãos: vesícula biliar, fígado e intestino (Fig. 2). A radioatividade apresentou decréscimo de acordo com a progressão do tempo de depuração (do dia 0 ao dia 21) em todos os órgãos (Figs 3 e 4).

Após exposição ao fenantreno, os órgãos marcados radioativamente foram os mesmos que os observados nos animais expostos ao naftaleno, vesícula biliar, fígado, intestino e também no rim. Naftol foi o contaminante que apresentou maior capacidade de distribuição e foi detectado em maior número de órgãos que os demais contaminantes avaliados, estando presente na vesícula biliar, fígado, intestino, rim, baço, pele e cérebro.

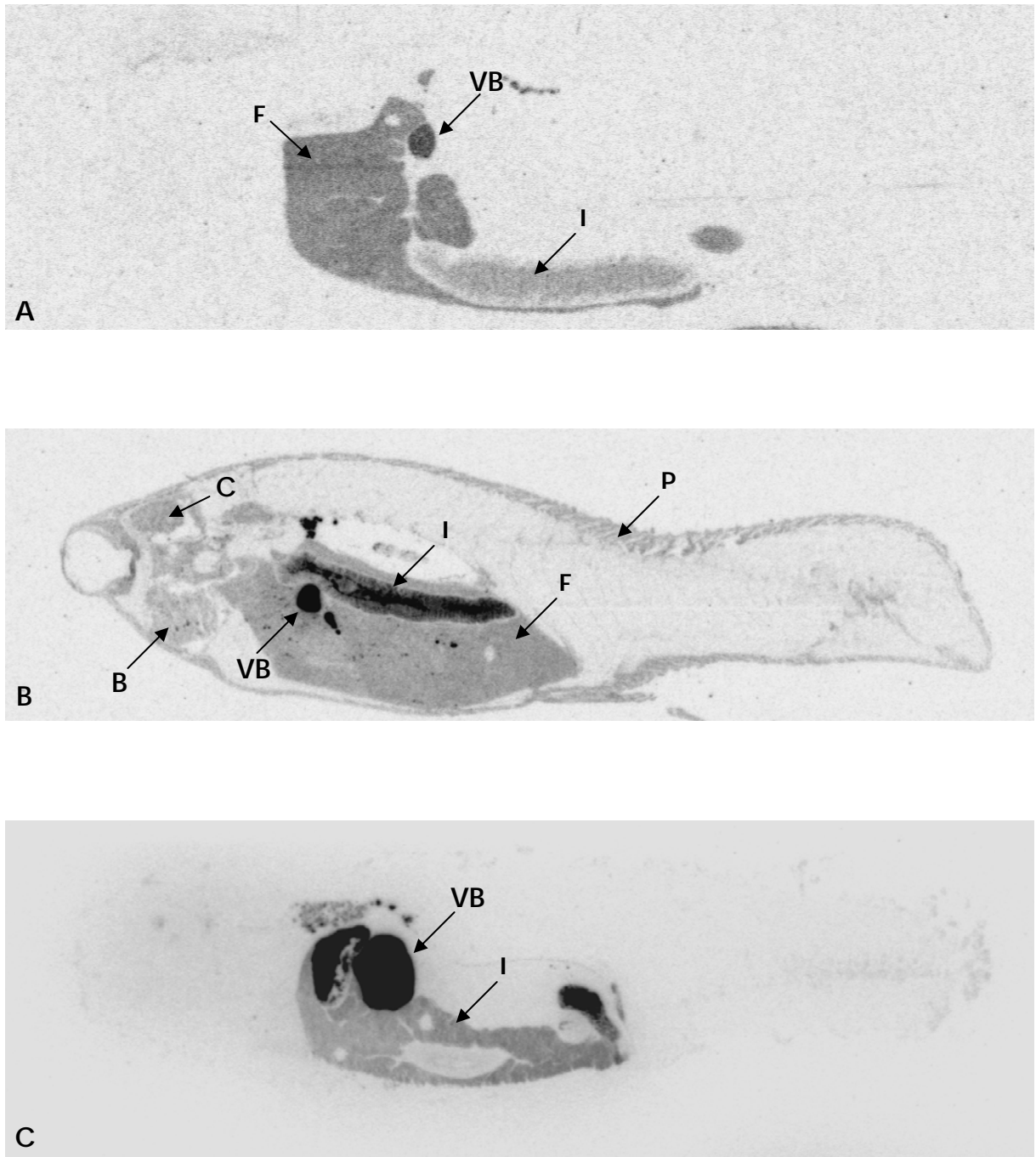


Figura 2. Autoradiogramas de *Fundulus heteroclitus* após exposição de 24h. (A) Naftaleno, (B) Naftol e (C) Fenantreno. As áreas em preto indicam os locais de maior concentração de contaminantes. VB=vesícula biliar, F=fígado, I= intestino, B= brânquias, C= cérebro, P=pele.

III.3.1.2. Análise Quantitativa

A distribuição dos contaminantes foi quantificada e apresentada como índice de concentração em relação ao fígado (IC) (Figura 3). Como tendência geral detectou-se um maior acúmulo de contaminantes na vesícula biliar em todos os tratamentos (Figura 3). Os animais expostos ao naftol apresentaram de forma geral maior capacidade de absorção tanto quantitativa quanto qualitativa. Os níveis mais altos de radioatividade na vesícula biliar foram observados no dia 1 para NAPH, no dia 0 para NOH e no dia 3 para PHE. No intestino a marcação mais expressiva foi observada no dia 1 para NAPH, no dia 0 para NOH e no dia 1 para PHE.

De forma geral, a marcação radioativa apresentou decréscimo durante o período de depuração nos animais avaliados para todos os contaminantes (Figura 3 e 4). Nos animais expostos ao naftaleno apenas o intestino e fígado permaneceram marcados após 14 dias de eliminação e nenhum órgão apresentou marcação no 21º dia de experimento. A resposta observada nos animais expostos ao fenantreno foi similar a do naftaleno, observou-se marcação apenas até o 14º dia de experimento. O único contaminante que apresentou marcação nos animais até o 21º dia de experimento foi o naftol (Figura 4).

As maiores concentrações de contaminantes foram encontradas na vesícula biliar>intestino>fígado para todos os contaminantes testados, exceto para os animais expostos ao naftol nos quais as concentrações encontradas no fígado foram maiores que as do intestino (Figura 4). Porém os sinais mais intensos de radioatividade foram detectados na vesícula biliar (vesícula biliar>fígado>intestino) (Figura 2).

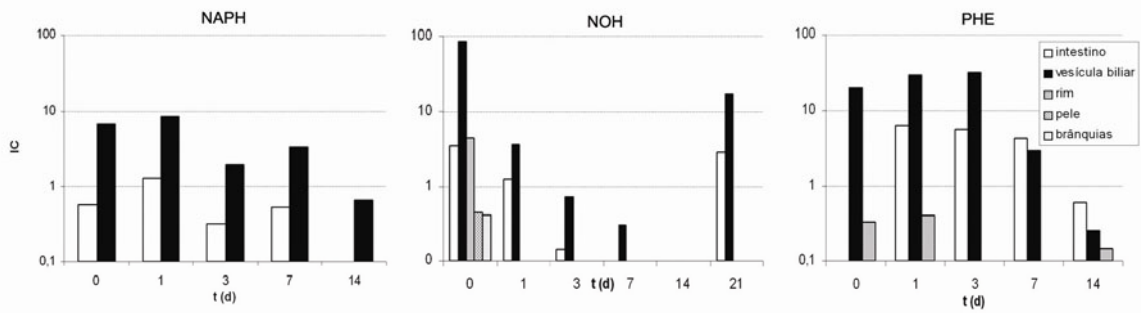


Figura 3. Índice de concentração (IC) de Naftaleno, Naftol e Fenantreno em *Fundulus heteroclitus* durante 21 dias de experimento.

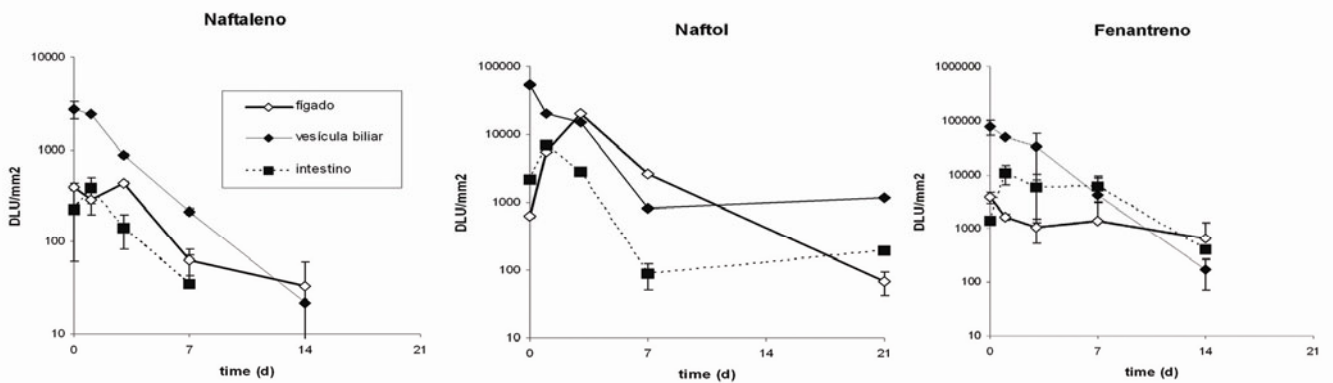


Figura 4. Eliminação de Naftaleno, Naftol e Fenantreno durante o período de depuração em *Fundulus heteroclitus* durante 21 dias de experimento.

III.3.2. SIMULAÇÃO DE DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO

III.3.2.1. Análise de HPAs na água

HPAs foram detectados na água dos aquários durante o período experimental através das duas técnicas utilizadas. Através de espectrofotometria foi possível observar um acréscimo na concentração de HPAs a partir de 72 horas de exposição que atingiu um pico em 7 dias de exposição (Figura 5).

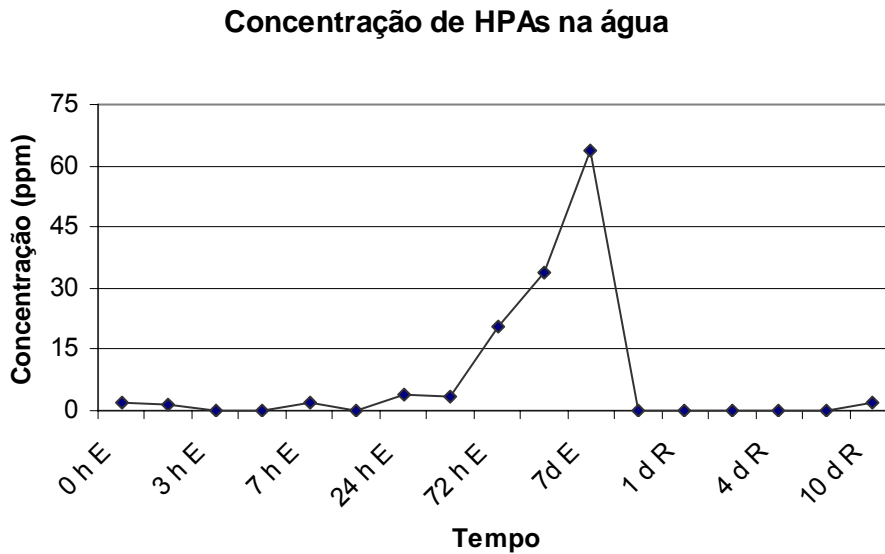


Figura 5. Detecção espectrofotométrica da presença de HPAs na água durante o experimento de simulação de derramamento de petróleo em *Salvelinus alpinus*. E=exposição, R=recuperação.

Através de HPLC a presença de HPAs metilados contendo 2-3 anéis benzênicos foi detectada e quantificada (Tabela 2). Os mesmos compostos foram identificados tanto na amostra de petróleo utilizada no experimento quanto na amostra de água que foi exposta ao petróleo.

Tabela 2. Estimativa da concentração de HPAs metilados em amostras de água provenientes da simulação de derramamento de petróleo por HPLC-FL.

Amostra		Petróleo	Água
HPA	TR	ng/μL	ng/μL
naftalenos- C1	5,55	0,34	0,03
naftalenos- C2	7,55	1,20	0,03
naftalenos- C3	8,55	0,97	0,05
antracenos - C1+C2	11,53	0,08	0,002

III.3.2.2. Análise de HPAs na bile

Os metabólitos naftol, fenantrol e pirenol não foram identificados na bile dos animais avaliados, suas características são apresentadas na tabela 3. Nos cromatogramas obtidos observou-se apenas um grande pico que eluiu em 3,4 minutos o qual acredita-se que seja o pigmento biliverdina (Figura 6).

Tabela 3. Características dos metabólitos naftol, fenantrol e pirenol.

Metabólito	Massa Molecular	Tempo de Retenção (min)
1-naftol	144,17	5,67
9-fenantrol	194,23	8,23
Pirenol	218,25	11,00

III.4. DISCUSSÃO

Alguns autores têm estudado a cinética de contaminantes como cádmio (Inza et al., 2001), mercúrio (Oliveira Ribeiro et al., 1999; Rouleau et al., 1999), prata (Wood et al., 2002; Bianchini et al., 2005), tributil estanho (Rouleau et al., 2003), nonilfenol (Arukwe et al., 2005), arsenobetaína (Amlund et al., 2006) e zinco (Rouleau et al., 1998; Persson et al., 2003) através de autoradiografia, porém ainda não há muitos estudos sobre a cinética de derivados de petróleo. Exceto pelo trabalho realizado por Mielbrecht et al. (2005) o qual relata a cinética do fenantreno e sua relação com o uso de dispersantes, estudos relacionados a compostos como naftaleno, fenantreno e naftol geralmente abordam a detecção destes xenobiontes no ambiente ou nos organismos (Klumpp et al., 2002; Vives et al., 2004; Silva et al., 2006), a cinética destes compostos ainda é pouco conhecida.

Dentre os três compostos avaliados o naftol foi observado em uma diversidade maior de tecidos que o naftaleno e fenantreno, mostrando maior capacidade de distribuição em *F. heteroclitus* do que os demais contaminantes testados. O naftol também se mostrou mais persistente nos organismos avaliados uma vez que foi detectado nos tecidos até o último dia de experimento, enquanto que após 21 dias de depuração, não foi observada radioatividade nos animais expostos ao naftaleno e fenantreno indicando que a metabolização destes contaminantes seja mais rápida que a do naftol.

As concentrações de naftaleno, naftol e fenantreno na água utilizadas no experimento com radioisótopos (0,300-0,390 µg/L) foram baixas se comparadas aos dados da literatura que citam concentrações de 0,06-1 mg/L (Aas et al., 2000), 3 mg/L (Çavas e Ergene-Gozukara, 2005) na água e apesar de estarem presentes

em baixas concentrações puderam ser detectados em vários órgãos dos animais avaliados.

Acredita-se que os naftalenos e fenantrenos (HPAs com respectivamente 2 e 3 anéis aromáticos) sejam os principais responsáveis pela toxicidade aguda do óleo cru (Anderson, 1974 *apud* Pollino e Holdway, 2002). Óleos crus contêm aproximadamente 1,5% de HPAs, dos quais o naftaleno é o principal componente perfazendo 65% da constituição de HPAs totais (Truscott et al, 1992).

Experimentos relacionados aos compostos solúveis do petróleo geralmente utilizam a metodologia da obtenção da fração solúvel do petróleo para realizar os estudos de toxicidade (Thomas e Budiantara, 1995; Al-Yakoob et al., 1996; Lockhart et al., 1996; Escartín e Porte, 1999; Pollino e Holdway, 2002, Akaishi, 2003; Akaishi et al., 2004; Ramachandran et al., 2004; Inunza et al., 2006). Neste estudo uma nova metodologia foi empregada para avaliar a dispersão e acumulação de derivados de petróleo através da realização de uma simulação de derramamento de petróleo em aquário.

As técnicas de espectrofotometria e HPLC-FL permitiram detectar a presença de derivados do petróleo nas amostras de água do experimento, indicando que através desta metodologia é possível obter compostos solúveis na água. Outra vantagem desta metodologia foi a utilização de um sistema de fluxo contínuo de água que simulou a renovação de água que ocorre normalmente em rios e estuários. Este tipo de abordagem permitirá simular e avaliar diversos parâmetros que necessitam ser compreendidos e que fornecerão subsídios para ações futuras em situações de derramamento de petróleo.

Os derivados de petróleo de 2-3 anéis benzênicos identificados por HPLC corresponderam ao tipo de composto que se esperava encontrar dissolvido na água dos aquários (HPAs leves). Em contrapartida, metabólitos de HPAs como naftol, fenantrol e pirenol não foram identificados na bile dos animais durante o experimento. Talvez a quantidade absorvida por esses organismos esteja abaixo do limite de detecção do HPLC-FL nas amostras de bile. Metabólitos de HPAs tem sido identificados na bile de peixes por outros autores tanto em estudos realizados em laboratório quanto em campo (Lin et al., 1996; Escartín e Porte, 1999; Aas et al., 2000; Klumpp et al., 2002; Oliveira Ribeiro et al., 2005; Yang e Bauman, 2005; Silva et al., 2006).

Na análise da bile detectou-se um pico que elui antes do tempo de retenção do naftol, o qual provavelmente corresponde a biliverdina, que é um pigmento normalmente presente na bile, acredita-se que este pico possa interferir na interpretação dos resultados, revelando um falso positivo para a presença de naftol, pois apresenta tempo de retenção similar ao deste composto. As concentrações de hidrocarbonetos detectadas na água no experimento de simulação de derramamento de petróleo foram de aproximadamente 0,03 ng/mL, valores bem inferiores aos dados da literatura que citam concentrações de 0,06-1 mg/L (Aas *et al.*, 2000) e 3 mg/L (Çavas e Ergene-Gozukara, 2005). As baixas concentrações detectadas na água poderiam justificar a não detecção de metabólitos na bile dos animais avaliados.

A compreensão dos processos cinéticos que envolvem naftaleno, fenantreno e naftol é fundamental para o planejamento de ações e decisões a serem tomadas em casos de contaminação aquática por estes compostos.

A simulação de derramamento de petróleo mostrou-se uma metodologia eficaz para a avaliação da dispersão de derivados de petróleo, podendo também utilizada para avaliar os efeitos da fração solúvel em organismos aquáticos.

Experimentos que avaliam o comportamento de derivados do petróleo e os efeitos de sua fração solúvel na água, como os apresentados nos experimentos do capítulo III, podem fornecer subsídios valiosos à exploração de petróleo e a previsão de efeitos que podem ser gerados por derramamento acidental.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados nos Capítulos I e II, foram obtidos através da avaliação de 3 espécies (*Cathorops spixii*, *Lutjanus synagris* e *Crassostrea rizophorae*) de níveis tróficos distintos (carnívoros e filtradores) através de múltiplos biomarcadores (somáticos, histopatológicos e bioquímicos). Os resultados demonstraram que todas as áreas estudadas em cada um dos estuários avaliados (Paranaguá, Piraquê e Itamaracá) estão impactadas por atividades antrópicas. A utilização de espécies de níveis tróficos diferentes na avaliação das mesmas áreas foi testada a fim de observar se os resultados seriam convergentes, neste estudo os resultados obtidos com os peixes forneceram respostas que permitiram diferenciar melhor as áreas avaliadas, enquanto os resultados obtidos com as ostras apresentaram-se bastante uniformes entre as áreas. Isto demonstra e consolida a importância do uso de espécies de diferentes níveis tróficos no diagnóstico de área impactadas.

A avaliação de respostas obtidas em campo representa um desafio, pois, salvo casos específicos, são induzidas por múltiplos contaminantes os quais podem interagir de forma sinérgica ou antagônica. Apesar das dificuldades interpostas na interpretação, os estudos de biomonitoramento são extremamente relevantes para que se possa diagnosticar o estado de saúde dos organismos expostos, subsequentemente a saúde e o comprometimento das populações.

Os dados referentes à presença e quantificação de contaminantes nas áreas amostradas constituem dados importantíssimos para a interpretação dos dados obtidos através da avaliação de biomarcadores, esses parâmetros foram

analisados pelo grupo de hidroquímica e contaminantes do projeto RECOS porém esses dados infelizmente não estavam disponíveis no momento de elaboração desta tese, esses dados certamente contribuiriam para uma melhor compreensão dos resultados aqui apresentados. O Projeto RECOS, Instituto do Milênio, foi inovador na costa brasileira, englobou vários grupos de pesquisa de diferentes áreas de atuação. Nos seus quatro anos de duração viabilizou a interação entre diferentes grupos de pesquisa e a geração de resultados importantes para o gerenciamento da costa brasileira. É lamentável o indeferimento da continuidade da segunda edição deste projeto, o qual após a primeira experiência, poderia trazer ainda mais informações sobre diversos aspectos relacionados aos recursos costeiros no Brasil.

Estudos de laboratório fornecem subsídios para uma melhor compreensão dos resultados obtidos em campo uma vez que apontam os tecidos alvos e identificam melhor os efeitos em nível específico. Dentro desta perspectiva justifica-se a realização dos estudos apresentados no Capítulo III, os quais tratam da dispersão, cinética e distribuição de uma classe de contaminantes encontrada facilmente nas áreas de estudo apresentadas nos dois primeiros capítulos, os HPAs. Estudos semelhantes a este como a avaliação associada de dois ou mais contaminantes em laboratório constituem uma ferramenta importante e geram resultados que podem ser aplicados em avaliação de exposição a múltiplos contaminantes e também em situações específicas como acidentes de petróleo e derivados, ou outros poluentes.

CONCLUSÕES

- A utilização de múltiplos biomarcadores fornece um diagnóstico mais confiável na avaliação dos danos provocados pela emissão de poluentes em áreas estuarinas impactadas.
- Os resultados obtidos através da avaliação dos índices somáticos e histopatologia em peixes e ostras indicam que todas as áreas avaliadas encontram-se afetadas.
- A atividade da colinesterase em peixes foi o biomarcador que melhor permitiu diferenciar as áreas avaliadas, diferentemente do encontrado para ostras.
- É importante e recomendável a utilização de organismos bioindicadores diferentes, pois os resultados obtidos com os peixes permitiram diferenciar as áreas estudadas e os obtidos com as ostras indicaram que todas as áreas avaliadas estão impactadas.
- Os derivados de petróleo: naftaleno, fenantreno e naftol foram absorvidos, acumulados e metabolizados em *Fundulus heteroclitus* após exposição hídrica durante os 21 dias de depuração.
- A simulação em laboratório de derramamento de petróleo desenvolvida neste trabalho constitui uma metodologia eficiente na reprodução das condições de dispersão de HPAs dissolvidos na água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aas, E.; Baussant, T.; Balk, L.; Liewenborg, B.; Andersen, O.K. HPA metabolites in bile, cytochrome P450 1A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic Cod. *Aquatic Toxicology*. v. 51, p. 241-258. 2000.

Abel, P. D. *Water pollution biology*. Chichester: Ellis Howood, 1989. 328p.

Adams, S. M., Ryon, M. G. A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant-related stress on fish populations. *Journal of Aquatic Ecosystem and Health*. v. 3, p. 15-25. 1994.

Akaishi, F.M. Avaliação do potencial tóxico da fração solúvel do petróleo em água (FSA) em *Astyanax sp.* utilizando biomarcadores de contaminação. Curitiba, 2003. 141 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Akaishi, F. M., Silva de Assis, H. C., Jakobi, S. C. G., Eiras-Stofella, D. R., St-Jean, S., Courteney, S. C., Lima, E. F., Wagener, A. L., Scofield, A. L., Oliveira Ribeiro, C. A. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax sp*) after Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 46, n. 2, p. 244-253. 2004.

Albers, P. H. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A.; Cairns, J (Eds.). *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton : Lewis publishers, 1995. p.330-355.

Ali, M., Sreekrishnan, T. R. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Advances in Environmental Research*. v.5, p. 175-196. 2001.

Al-Yakoob, S.M.; Gundersen, D.; Curtis, L. Effects of the water-soluble fraction of partially combusted crude oil from Kuwait's oil fires (from Desert Storm) on survival and growth of the marine fish *Menidia beryllina*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 35, p. 142-149. 1996.

Alves Costa, J. R. M. Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus*. Curitiba, 2001. 133 f. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia Celular, UFPR.

Alves, S.R.C., Severino, P.C, Ibbotsom, D.P., Silva, A.Z.X., Lopes, F.R.A.S., Sáenz, L.A., Bainy, A.C.D. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. *Marine Environmental Research*. v. 54, p. 241-245. 2002.

Alves Costa, J. R. M. Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus*. Curitiba, 2001.133 f. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia Celular, UFPR.

Alves Costa, J. R. M., Mela, M., Silva de Assis, H. C., Pelletier, E., Handi, M. A. F., Oliveira Ribeiro, C. A. Enzymatic inhibition and morphological aspects as biomarker to dietary lead (II) and methylmercury exposure to neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. *In Press*. 2006.

Amado, L. L., da Rosa, C. E., Leite, A. M., Moraes, L., Pires, W. V., Leães Pinho, G. L., Martins, C. M. G., Robaldo, R. B., Nery, L. E. M., Monserrat, J. M. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. *Marine Pollution Bulletin*. v. 52, n. 2, p. 199-206. 2006a.

Amado, L. L., Robaldo, R. B., Geracitano, L., Monserrat, J. M., Bianchini, A. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Marine Pollution Bulletin*. v. 52,n. 2, p. 207-213. 2006b.

Amlund, H.; Ingebrigtsen, K.; Hylland, K.; Ruus, A.; Eriksen, D. O.; Berntssen, M. H G. Disposition of arsenobetaine in two marine fish species following administration of a single oral dose of [¹⁴C]arsenobetaine. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. v.143, p. 171-178. 2006.

Arellano, J. M., Storch, V., Sarasquete, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 44, p. 62-72. 1999.

Arukwe, A.; Thibaut, R.; Ingebrigtsen, K.; Celius, T.; Goksoyr, A., Cravedi, J. *In vivo* and *in vitro* metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*. v. 49, n. 249, p. 289-304. 1999.

Auffret, M. Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. *Marine Ecology - Progress Series*. v. 46, p. 101-107. 1988.

Bahena-Manjarrez, J.L., Rosales-Hoz, L., Carranza-Edwards, A. Spatial and temporal variation of heavy metals in a tropical estuary. *Environmental Geology*. v. 42, p. 575-582. 2002.

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

Bainy, A. C. D., Almeida, E. A., Muller, I. C., Ventura, E.C., Medeiros, I.D. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Marine Environmental Research*. v. 50, p. 411-416. 2000.

Barreiro, R.; Picado, L.; Real, C. Biomonitoring heavy metals in estuaries: a field comparison of two brown algae species inhabiting upper estuarine reaches, *Environmental Monitoring and Assessment*. v. 75, n. 2, p. 121-134. 2002.

Bernet, D., Schmidt, 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.

Bianchini, A., Rouleau, C., Wood, C. M. Silver accumulation in *Daphnia magna* in the presence of reactive sulfide. *Aquatic Toxicology*. v. 72, p. 339-349. 2005.

Bigas, M., Amiard-Triquet, C., Durfort, M., Poquet, M. Sublethal effects of experimental exposure to mercury in european, flat oyster *Ostrea edulis*: cell alterations and quantitative analysis of metal. *Biometals*. v.10, p. 277-284. 1997.

Bigas, M., Duefort, M., Poquet, M. Cytological effects of experimental exposure to hg on the gill epithelium of the european oyster *Ostrea edulis*: ultrstructural and quantitative changes related to bioaccumulation. *Tissue e Cell*. v. 33, n. 2, p. 178-188. 2001.

Binelli, A., Ricciardi, F., Riva, C., Provini, A. New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*. v. 62, n. 4, p. 510-519. 2006.

Bocchetti, R.; Regoli, F. Seasonal Variability of oxidative biomarkers, lusosomal parameters, metallothioneins and peroxissomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere*, v. 65, p. 913-921. 2006.

Bocquene,G.; Galgani, F. L`acetylcholinesterase chez les organisms marines, outil de surveillance des effets des pesticides organophosphorés et carbamates. *Oceanis*. v. 17, p. 439-448. 1991.

Bonacci, S., Brownie, M. A., Dissanayake, A., Hagger, J. A., Corsi, I., Focardi, S., Galloway,T.S. Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colbeki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antartic marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. v.49, n. 5-6, p. 445-455. 2004.

Blus, L. J. Organochlorine pesticides. In: Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A.; Cairns, J (Eds.). *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton: Lewis, 1995. p. 275-300.

Brown, S. B., Maclatchy, D. L., Hara, T. J., Eales, J. G. Effects of cortisol on aspects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*. v.81, p. 207-216. 1991.

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

Cajaraville, M. P.; Bebianno, M. J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, S. e 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.

Camargo, M. M. P., Martinez, C. B. R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 21, p. 61-69. 2006.

Cavalcanti, A. D. Monitoring of trace elements in oysters marketed in Recife, Pernambuco, Brazil. *Cadernos de Saúde Publica*. v.19, p. 1545-1551. 2003.

Çavas, T. and Ergene-Gözükara, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*. v.74, p. 264-271. 2005.

Collier, T. K.; Johnson, L. L.; Stehr, C. M.; Myers, M. S. e 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.

Correa, M. e Garcia, H. I. Physiological responses of juvenile white mullet, *Mugil curema*, exposed to benzene. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. v.44, p. 428-434. 1990.

Corsi, I., Mariottini, M., Sensini, C., Lancini, L., Focardi, S. Fish as biomarkers of brackish ecosystem health: integrating biomarker responses and target pollutant concentrations. *Oceanologica Acta*. v. 26, p. 129-138. 2003.

Coughlan, B. M.; Hartl, M. G. J.; O'Reilly, S. J.; Sheehan, D.; Morthersill, C.; van Pelt, F. . A. M.; O'Halloran, J.; O'Brien, N. M. Detecting genotoxicity using the comet assay following chronic exposure of Manila clam *Tapes semidecussatus* to polluted estuarine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, p. 1359-1365. 2002.

Couillard, C. M., Williams, P. J., Courtenay, S. C., Rawn, G. P. Histopathological evaluation of Atlantic Tomcod (*Microgadus tomcod*) collected at estuarine sites receiving pulp and paper mill effluent. *Aquatic Toxicology*. v. 44, p. 263-278. 1999.

Coutinho, C., Gokhale, K. S. Selected oxidative enzymes and histopathological changes in the gills of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus* cultures in secondary sewage effluent. *Water Research*. v. 34, n. 11, p. 2997- 3004. 2000.

CPTEC, 2005. Disponível em: <<http://www.cptec.inpe.br/>>. Acesso em: junho de 2006.

Dallinger, R. e Raimbow, P.S. *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Boca Raton: Lewis publishers, 1993. 461pp.

Da Ros, L. Meneghetti, F., Nasci, C. Field application of lysosomal destabilisation indices in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: biomonitoring and transplantation in the Lagoon of Venice (north-east Italy). *Marine Environmental Research*. v. 54, n. 3, p. 817-822. 2002.

Dellali, M.; Barelli, M. G.; Romeo, M.; Aissa, P. The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussates* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 130 227-235. 2001.

De La Torre , F R; Ferrari, L; Salibián, A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*. v. 131, n. 3, p. 271-280.2002.

de la Torre, F. R., Ferrari, L., Salibián, A. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere*. v. 59, n. 4, p. 577-583. 2005.

Deviller, G., Palluel, O., Aliaume, C., Asanthi, H., Sanchez, W., Franco Nava, M.A., Blancheton, J-P., Casellas, C. Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 61, n. 1, p. 89-97. 2005.

Dimichele, L. e Taylor, M. H. Histopathological and physiological responses of *Fundulus heteroclitus* to naphthalene exposure. *Journal of Fisheries Research Board Canada*. v.35, p.1060-1066. 1978.

Doran, W. J., Cope, G. W., Rada, R.G., Sandheinrich, M. B. Acetylcholinesterase inhibition in the threeridge mussel (*Amblema plicata*) by chlorpyrifos: implications for biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 49, p. 91-98. 2001.

Edginton, A. Rouleau, C. Toxicokinetics of ¹⁴C-Atrazine and its metabolites in stage-66 *Xenopus leavis*. *Environmental Science and Technology*. v. 39, p. 8083-8089. 2005.

Ellman, G. L, Courtney, K. O., Andres, V., Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology*. v. 7, p. 88-95. 1961.

Engelhardt, F. R., Wong, M. P. And Duey, M. E. Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water, as affected by petroleum exposure. *Aquatic Toxicology*. v.1, p. 175-186. 1981

Escartín, E.; Porte, C. Assessment of PAH pollution in coastal areas from the NW Mediterranean through the analysis of fish bile. *Marine Pollution bulletin*. v. 38, p. 1200-1206. 1999.

Fanta E., Rios, F. S., Romão, S., Vianna, A. C. C., Freiberger, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 54, p. 119-130. 2003.

Fávaro, L., F.; Fehse, F. A.; Oliveira, R. N.; Júnior, R. S. Reprodução do bagre amarelo, *Cathorops spixii* (Agassiz) (Siluriformes, Ariidade), da Baía dos Pinheiros, região estuarina do litoral do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. v.22, n. 4, p. 1022-1029. 2005.

Felder, D. P., D'Surney, S. J., Rodgers, J. H., Deardorff, T. L. A comprehensive environmental assesment of a receiving aquatic system near an unbleached kraft mill. *Ecotoxicology*. v. 7, p. 313-324. 1998.

Fent, K. Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology*. v. 26, p. 1-117. 1996.

Fent, K. e Bucheli, T. D. Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins *in vitro* in fish. *Aquatic Toxicology*. 28, p. 107-126. 1994.

Fent, K. e Hunn, J. Organotins in freshwater harbours and rivers: temporal distribution, annual trends and fate. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v.14, p. 1123-1145. 1995.

Fent, K. e Meier, W. Tributyltin- induced effects on early stages of minnows *Phoxinus phoxinus*. *Archives of Environmental Toxicology*. v. 22, p. 428-438. 1992.

Fent, K. e Stegman, J. J. Effects of tributyltin in vivo on hepatic cytochrome P450 forms in marine fish. *Aquatic Toxicology*. v. 24, p. 219-240. 1993.

Ferreira, A. G., Santos Machado, A. L., Zalmon, I. R. Temporal and spatial variation on heavy metal concentrations in the bivalve *Perna perna* (Linnaeus, 1758) on the Northern Coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 47, n. 2, p. 319-327. 2004.

Figueiredo, J. L. e Menezes, N. A. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II. Teleostei (1). São Paulo: Museu de Zoologia-USP, 1978. 110 p.

Fillman, G.; Readman, J. W.; Tolosa, I. ; Bartocci, J.; Villeneuve, J. P.; Cattini, C. e Mee, L.D. Persistent organochlorine residues in sediments from the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*. v. 44, p. 122-133. 2002.

Fishbase, 2006. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em: agosto de 2006.

Fowler, S. W.; Teyssié, J.; Cotret, O.; Danis, B. ; Rouleau, C. ; Warnau, M. Applied radiotracer techniques for studying pollutant bioaccumulation in selected marine organisms (jellyfish, crabs and sea stars). *Nukleonika*. v. 49, p. 97-100. 2004.

Fulton, M. H., Key, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry/ SETAC*. v. 20, n.1, p. 37-45. 2001.

Galloway, T. S., Millward, N., Browne, M. A.; Depledge, M. H. Rapid assessment of organophosphorus/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aquatic Toxicology*. v. 61, p. 169-180. 2002.

Gill, T.S., Jaishree, P., Tewari, H. Enzyme modulation by sublethal concentrations of aldicarb, phosphamidon, and endosulfan in fish tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v. 38, p. 231-244. 1990.

Gold-Bouchot, G.; Simá-Alvarez, R.; Zapata-Pérez, O.; Güemez-Ricalde, J. Histopathological effects of petroleum hydrocarbons and heavy metals on the american oyster (*Crassostrea virginica*) from Tabasco, México. *Marine Pollution Bulletin*. v. 31, n. 4-12, p. 439-445. 1995.

Goksøyr, A.; Larsen, H.E. e Huson, A. Application of a cytochrome P-450 1A1 – Elisa in environmental monitoring and toxicological testing of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 100C, n.1/2, p. 157-160. 1991.

Granby, K., Spliid, N. H. Hydrocarbons and organochlorines in common mussels from the Kattegat and the Belts and their relation to condition indices. *Marine Pollution Bulletin*. v. 30, n. 1, p. 74-82. 1995.

Gregory, M. A., George, R. C., Marshall, D. J., Anandraj, A., McClurg, T. P. The effects of mercury on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). *Marine Pollution Bulletin*. v. 39, n. 1-12, p. 116-121. 1999.

Gül, S., Belge-Kurutas, E., Yıldız, 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, n. 5, p. 605-609. 2004.

Guolan, H., Yong, W. Effects of tributyltin chloride on marine bivalve mussels. *Water Research*. v. 29, n. 8, p. 1877-1884. 1995.

Harvey, R. G. Polycyclic Aromatic Hidrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity. Cambridge Monographs on Cancer Research. Cambridge University Press, Cambridge, 1991. 396 p.

Heath, A. G. Water pollution and fish phisiology. Virginia: Lewis Publishers, 1995. 359 p.

Hill, E. F. Organophosphorus and carbamate pesticides. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J (Eds.). Handbook of ecotoxicology. Boca Raton: Lewis, 1995. p.243-274.

Holm, G.; Norrgren, L. e Lindén, O. Reprodutive and histopatological effects of long-term experimental exposure to bis(tributylti)oxide (TBTO) on the trhee-spined sickleback, *Gasterosteus culeatus Linnaeus*. Journal of Fish Biology. v. 38, p. 373-386. 1991.

Hsu, T. e eng, 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.

Huuskonen, S., Lindstrøm Seppa, P. Hepatic cytochrome P4501A and other biotransformation activities in perch (*Perca fluviatilis*) – the effects of unbleached pulp-mill effluents. Aquatic Toxicology. v. 31, p. 27–41. 1995.

IBGE, 2005. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: setembro de 2005.

Inza, B.; Rouleau, C.;Tjälve, H. ; Ribeyre, F. ; Campbell, P.G.C.; Pelletier, É., Boudou, A. Fine-scale tissue distribution of cadmium, inorganic mercury, and methylmercury in nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* studied by whole-body autoradiography. Environmental Research Section A. v. 85, p. 265-271. 2001.

Inunza, B.; Orrego, R.; Peñalosa, M.; Gavilán, J. F.; Barra, R. Analysis of CYP450A1, PAHs 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.

Joyeux, J., Filho, E. A. C., Jesus, H. C. Trace metal contamination in estuarine fishes from Vitória Estuary, ES, Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology. v. 47, n. 5, p. 765-774. 2004.

Karels, A. E., Soimasuo, M., Lappivaara, J., Leppanen, H., Aaltonen, T., Mellanen, P., Oikari, A. O. J. Effects of EFC-bleached kraft mill effluent on reproductive steroids and liver MFO activity in populations of perch and roach, *Ecotoxicology*. v. 7, p. 123-132. 1998.

Kennish, M. J. Ecology of estuaries: anthropogenic effects. Boca Raton: CRC Press. 1991. 494p.

Kehrig, H. A., Pinto, F. N., Moreira, I., Malm, O., 2003. Heavy metals and methylmercury in a tropical coastal estuary and a mangrove in Brazil. *Organic Geochemistry*. v. 34, n. 5, p. 661-669.

Khan, R. A., Barker, D. E., Hooper, R., Lee, E. M. Ryan, K., Nag, K. Histopathology in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) living adjacent to a pulp and paper mill. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 26, p. 95-102. 1994.

Kirby, M. F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S. J., Neall, P., Tylor, T., Fagg, A. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Mar. Polut. Bull.* v. 40, p. 780-791. 2000.

Klumpp, D. W.; Huasheng, H.; Humphrey, C.; Xinhong, W., Cordi, S. Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. I. Organic pollutants in mussel and fish tissues. *Marine Pollution Bulletin*. v. 44, p. 752-760. 2002.

Kolm, H.E., Schoenenberger, M.A., Piemonte, M.R., Souza, P.S.A., Schnell E Scühli, G., Mucciatto, M.B., Mazzuco, R. Spatial variation of bacteria in surface waters of Paranaguá and Antonina Bays, Paraná, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 45, p. 27-34. 2002.

Lange, C.R.; Scott, S.R.; Tanner, M. Biomonitoring. *Water Environment Research*. v. 68, n. 4, p. 801-818. 1996.

Leloup-Hatey, J And Hardy, A . Effet d'une pollution par les hydrocarbures sur la fonction interrenale de l'anguille *Anguilla anguilla*). *Ichthyophysiological Acta*. v. 9, p. 39-50. 1985.

Lemos, N. G., Dias, A. L., Silva-Souza, A. T., Mantovani, M. S. Evaluation of environmental waters using comet assay in *Tilapia rendalli*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v.19, p. 197-201. 2005.

Lemos, C. L., Rödel, P. M., Terra, N. R., Oliveira, N. C. D., Erdtmann, B. River toxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes *Ecotoxicology and Environmental Safety*. *In press*. 2006.

Levitan, W. M. e Taylor, M. H. Physiology of salinity-dependent naphthalene toxicity in *Fundulus heterclitus*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. v. 36, p. 615-620. 1979.

Lin, E. L. C.; Cormier, S. M.; Torsella, J. A. Fish Biliary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites Estimated by Fixed-Wavelength Fluorescence: Comparison with HPLC-Fluorescent Detection. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 35, n. 1, p. 16-23. 1996.

Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Pascariello, M. F., Marinosci, L., Schettino, T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin*. v. 46, p. 324-330. 2003.

Lockhart, W.L.; Duncan, D.A.; Billeck, B.N.; Danell, R.A.; Ryan, M.J. Chronic toxicity of the 'water-soluble fraction' of North West crude oil to juvenile fish. *Spill Science e Technology Bulletin*. v. 3, n. 4, p. 259-262. 1996.

Lowe, D. The field application of cellular and physiological biomarkers, in the mussel *Mytilus edulis*, in conjunction with early life stage bioassays and adult histopathology. *Marine Pollution Bulletin*. v. 40, n. 3, p. 257-267. 2000.

Lucas, A., Beninger, P.G. The use of physiological condition indexes in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*. v. 44, p. 187-200. 1985.

Lyons, B. P., Stentiford, G. D., Green, M., Bignell, J., Bateman, K., Feist, S. W., Goodsir, F., Reynolds, W. J., Thain, J. E. DNA adduct analysis and histopathological biomarkers in

European flounder (*Platichthys flesus*) sampled from UK estuaries. *Mutation Research*. v. 552, p. 177-186. 2004.

Mancera, E. e Mendo, J. Population dynamics of the oyster *Crassostrea rhizophora* from the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. *Fisheries Research*. v. 26, pp. 139-148. 1996.

Martins, L. K. P., Nascimento, I. A., Fillmann, G., King, R., Evangelista, A. J. A., Readman, J. W., Depledge, M. H. Lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of chronic petroleum pollution at Todos os Santos Estuary, Brazil. *Environmental Research*. v. 99, n. 3, p. 387-396. 2005.

Mao, Y.; Zhou, Y.; Yang, H.; Wang, R. Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. *Aquaculture*. v. 253, p. 322-333. 2006.

Marty, G. D., Hoffmann, A., Okihiro, M. S., Hepler, K., Hanes, D. Retrospective analysis: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Marine Environmental Research*. v. 56, p. 559-584. 2003.

Medeiros, P. M., Bicego, M. C., Castelao, R. M., Del Rosso, C., Fillmann, G., Zamboni, A. J. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Environmental International*. v. 31, n. 1, p. 77-87. 2005.

Melancon, M. J. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In: Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A.; Cairns, J. (Eds.). *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton: LEWIS, 1995. p. 220-240.

Meyer, U., Hagen, W., Medeiros, C. Mercury in a northeastern Brazilian mangrove area, a case study: potential of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* as bioindicator for mercury. *Marine Biology*. v. 131, p. 113-121. 1998.

Mielbrecht, E. E.; Wolfe, M. F.; Tjeerdema, R. S.; Sowby, M. L. Influence of a dispersant on the bioaccumulation of phenantrene by topsmelt (*Atherinops affinis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 61, p. 44-52. 2005.

Mondon, J. A., Duda, S., Nowak, B. F. Histological, growth and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* to contaminated marine sediment and diet. *Aquatic Toxicology*. v. 54, n. 3-4, p. 231-247. 2001.

Monserrat, J. M., Bianchini, A. Anticholinesterase effect of eserine (physostigmine) in fish and crustacean species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 44, n. 1, p. 63-68. 2001.

Monserrat, J. M., Bianchini A., Bainy, A. C. D. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Marine Environmental Research*. v. 54, n. 3-5, p. 781-785. 2002.

Monteiro, M., Quintaneiro, C., Morgado, F., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 62, n. 3, p. 341-347. 2005.

Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Jourdain, M.J., Ferrier, V., Triffault, G., Devaux, A. Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox® and Ames tests). *Science of the Total Environment*. v. 355, n. 1-3, p. 232-246. 2006.

Mubiana, V. K.; Vercauteren, K.; Blust, R. The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution*. *In press*. 2006.

Mulvey, M.; Newman, M. C.; Vogelbein, W.; Unger, M. A. Genetic structure of *Fundulus heteroclitus* from PAH-contaminated and neighboring sites in the Elizabeth and York rivers. *Aquatic Toxicology*. v. 61, p. 195-209. 2002.

Munteanu, V., Munteanu, G. Biomonitoring of mercury pollution: A case study from the Dniester River. *Ecological Indicators*. *In Press*. 2006.

Nasci, C., Nesto, N., Monteduro, R. A., Da Ros, L. Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and

biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy), *Marine Environmental Research*. v. 54, n. 3-5, p. 811-816. 2002.

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. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 63, p. 365-377.

Nicholson, S. Cytological and physiological biomarker responses from green mussels, *Perna viridis* (L.) transplanted to contaminant sites in Hong Kong coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*. v. 39, n. 1-12, p. 261-268. 1999.

Nicholson, S.; Lam, P. K. S. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environment International*. v. 31, p. 121-132. 2005.

Nigro, M., Falleni, A., Del Barga, I., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F., Frenzilli, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology*. v. 77, n. 4, p. 339-347. 2006.

Noaksson, E., Linderöth, M., Tjärnlund, U., Balk, L. 2005. Toxicological effects and reproductive impairments in female perch (*Perca fluviatilis*) exposed to leachate from Swedish refuse dumps. *Aquatic Toxicology*, 75, 162-177.

Noreña-Barroso, E., Simá-Álvarez, R., Gold – Bouchot, G. e Zapata- Pérez, O. Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan catfish *Ariopsis assimilis* from the the Estuary of Chetumal, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*. v. 48, p. 263- 269. 2004.

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., Fanta, E.; Turcatti, N. R. J., Carvalho, C. S. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces; Siluroidei). *Biocell*. v.20, n.3, p.171-178. 1996.

Oliveira Ribeiro, C. A.; Pelletier, É.; Pfeiffer, W. C. e Rouleau, C. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. *Environmental Research Section A*. v.83, p.286-292. 2000.

Oliveira Ribeiro, C. A.; Rouleau, C.; Pelletier, É.; Audet, C. e Tjälve, H. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Artic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Science e Technology*. v.33, p.902-907. 1999.

Oliveira Ribeiro, C. A., Vollaire, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*. v. 74, n. 1, p. 53-69. 2005.

Orban, E.; Lena, G.; Di Navigato, T.; Casini, I.; Marzetti, A.; Caproni, R. Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chemistry*. v. 77, p. 57-65. 2002.

Van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 13, p. 57-149. 2003.

Owen, R., Buxton, L., Sarkis, S.; Toaspern, M., Knap, A., Depledge, M. An evaluation of hemolymph cholinesterase activities in the tropical scallop, *Euvola (Pecten) zizac*, for the rapid assessment of pesticide exposure. *Marine Biology*. v. 44, p. 1010-1017. 2002.

Pacheco, M., Santos, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v.53, n. 3, p. 331-347. 2002.

Padrós, J.; Pelletier, É.; Reader, S.; Denizeau, F. Mutual in vitro interactions between benzo[a]pirene and tributyltin in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. v. 19, n. 4, p. 1019-1027. 2000.

Pelletier, E. Environmental Organometalic Chemistry of Mercury, Tin and lead: Present Status and Perspectives. In: Tessier, A. e Turner, D. R. *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley e Sons Ltd, pp 103-148. 1995.

Pereira, M. S., Kuch, B. Heavy metals, PCDD/F and PCB in sewage sludge samples from two wastewater treatment facilities in Rio de Janeiro State, Brazil. *Chemosphere*. v. 60, n. 7, p. 844-853. 2005.

Pérez, E., Blasco, J., Solé, M. Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cádiz bay (SW Spain). *Marine Environmental Research*. v. 58, p. 275-279. 2004.

Persson, E.; Henriksson, J.; Tallkvist, J.; Rouleau, C.; Tjalve, H. Transport and subcellular distribution of intranasally administered zinc in the olfactory system of rats and pikes. *Toxicology*. v. 191, p. 97-108. 2003.

Petrovic, S., Semencic, L., Ozretic, B., Ozretic, M. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north adriatic coastal waters (Croatia). *Marine Pollution Bulletin*. v. 49, n. 9-10, p. 713-720. 2004.

Poirier, A., Laurencin, F. B., Bodennec, G. e Quentel, C. Intoxication expérimentale de la truite arc-en ciel *Salmo gairdneri* Richardson, par du gas-oil moteur: Modifications Haematologiques, histologie. *Aquaculture*. v.55, p. 115-137. 1986.

Pollino, C.A.; Holdway, D.A. Toxicity testing of crude oil and related compounds using early life stages of the Crimson-Spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 52, p. 180-189. 2002.

Portos do Paraná, 2005. Disponível em: < <http://www.portosdoparana.com.br>>. Acesso em: setembro de 2005.

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.

Prefeitura de Aracruz, 2005. Disponível em: < <http://www.pma.es.gov.br>>. Acesso em: outubro de 2005.

Quintaneiro, C.; Monteiro, M.; Pastorinho, R.; Soares, A. M. V. M.; Nogueira, A. J. A.; Morgado, F.; Guilhermino, L. Environmental pollution on natural populations: A biomarkers case study from the Iberian Atlantic Coast. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, p. 1406-1413. 2006.

Rabitto, I. S., Alves Costa, J. R. M., Silva de Assis, H. C., Pelletier, É., Akaishi, F. M., Anjos, A., Randi, M. A. F., Oliveira Ribeiro, C. A. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 60, p. 147-156. 2005.

Radtko, R. The mummichog: a fish for all reasons. *Sea Frontiers*. v.5, p. 145-149. 1979.

Rainbow, P. S. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. v. 31, n. 4-12, p. 183-192. 1995.

Ramachandran, S.D.; Hodson, P.V.; Khan, C.W.; Lee, K. Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 59, p. 300-308. 2004.

Readman, J.W., Liong Wee Kwong, L., Mee, L.D., Bartocci, J., Nilve, G., Rodriguez-Solano, J.A., Gonzalez-Farias, F. Persistent organophosphorous pesticides in tropical marine environments. *Marine Pollution Bulletin*. v. 24, p. 398-402. 1992.

Redding, J. M., Deluze, A., Leloup-Hatey, J., Leloup J. Suppression of plasma thyroid hormone concentrations by cortisol in the European eel *Anguilla anguilla*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 83 A, p. 209-413. 1986.

Reddy, C.M.; Eglinton, T. I.; Hounshell, A.; White, H. K.; Xu, L.; Gaines, R. B. Fryzinger, G. S. The West Falmouth oil spill after thirty years: the persistence of petroleum hydrocarbons in marsh sediments. *Environmental Science and Technology*. v. 36, p. 4754-4760. 2002.

Riba, I., Blasco, J., Jiménez-Tenorio, González de Canales, M. L., Angel DelValls, T. Heavy metal bioavailability and effects: II. Histopathology-bioaccumulation relationships caused by mining activities in the gulf of Cádiz (SW, Spain). *Chemosphere*. v. 58, p. 671-682. 2005.

Ricciardi, F., Binelli, A., Provinmi, A. Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebra mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 63, p. 406-412. 2006.

Roche, H., Buet, A., Ramade, F. Accumulation of lipophilic microcontaminants and biochemical responses in eels from the Camargue Biosphere Reserve. *Ecotoxicology*. v. 11, p.155-164. 2002.

Rodriguez-Fuentes, G., Gold-Bouchot, G. Environmental monitoring using acethylcholinesterase inhibition *in vitro*. A case study in two Mexican lagoons. *Marine Environmental Research*. v. 50, p. 357-360. 2000.

Rose, W. L.; French, B. L.; Reichert, W. L.; Faisal, M. Persistence of benzo[a]pyrene-DNA adducts in hematopoietic tissues and blood of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic Toxicology*. v. 52, p. 319-328. 2001.

Roling, J. A.; Bain, L. J.; Baldwin, W. S. Differential gene expression in mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) following treatment with pyrene: comparison to a creosote contaminated site. *Marine Environmental Research*. v. 57, 377-395. 2004.

Rouleau, C., Block, M., Tjälve, H. Kinetics and body distribution of waterborne $^{65}\text{Zn}(\text{II})$, $^{109}\text{Cd}(\text{II})$, $^{203}\text{Hg}(\text{II})$, and $\text{CH}_3^{203}\text{Hg}(\text{II})$ in phantom midge larvae (*Chaoborus americanus*) and effects of complexing agents. *Environmental Science and Technology*. v. 32, p. 1230-1236. 1998.

Rouleau, C., Gobeil, C., Tjälve, H. Pharmacokinetics and distribution of dietary tributyltin and methylmercury in the snow crab (*Chionoecetes opilio*). *Environmental Science and Technology*. v. 33, p. 3451-3457. 1999.

Rouleau, C., Gobeil, C., Tjälve, H. Cadmium accumulation in the snow crab *Chionoecetes opilio*. *Marine Ecology Progress Series*. v. 224, p. 207-217. 2001.

Rouleau, C., Xiong, Z.; Pacepavicius, G.; Huang, G. Uptake of waterborne tributyltin in the brain of fish: axonal transport as a proposed mechanism. *Environmental Science and Technology*. v.37, p. 3298-3302. 2003.

Schmalz, W. F.; Hernandez, A. D.; Weis, P. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog *Fundulus heteroclitus*. *Marine Environmental Research*. v. 54, p. 539-542. 2002.

Schmitt, C. J.; Zajicek, J. L.; May, T. W. e Cowman, D. F. Organochlorine residues and elemental contaminants in U.S. freshwater fish, 1976-1986: National Contaminant Biomonitoring Program. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 162, p. 43-104. 1999.

Schwaiger, J.; Bucher, F.; Ferling, H.; Kalbfus, W. e Negele, R. A prolonged toxicity study of the effects of sublethal concentrations of bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO): histopatological and histochemical findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. v. 23, p. 31-48. 1992.

Shailaja, M. S. e D'Silva, C. Evaluation of impact pf PAH on a tropical fish *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere*. v. 3, p. 835-841. 2003.

Shaw, J.P., Large, A. T., Donkin, P., Evans, S. V., Staff, F. J., Livingstone, D. R., Chipman, J. K., Peters, L. D. Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*. v. 67, p. 325-336. 2004.

Silva, D. A. M. ; Buzitis, J. ; Krahn, M. M. ; Bicego, M. C. ; Pires-Vanin, A. M. S. Metabolites in bile of fish from São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. *Marine Pollution Bulletin*. v. 52, p. 175-183. 2006.

Silva, C. A. R., Rainbow, P. S., Smith, B. D., Santos, Z. 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, p. 4072-4078. 2001.

Silva, C. A. R., Smith, B. D., Rainbow, P. S. Comparative biomonitors of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). *Marine Environmental Research*. *In press*. 2006.

Silva de Assis, H.C., Sánchez-Chardi, A., Reis, R. C., Nicaretta, L., Mencinauski, C., Jakobi, S. C. G., Silva, P. H., Zampronio, A. R., Pelletier, E., Oliveira Ribeiro, C. A. Subchronic toxic effects of

tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 19, n. 1, p. 113-120. 2005.

SIMEPAR, 2005. Disponível em: <<http://www.simepar.br>>. Acesso em: junho de 2005.

Simpson, M. G., Parry, M., Kleinkauf, A., Swarbreck, D, Walker, P., Leah, R.T. Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from a UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals. *Marine Environmental Research*. v. 50, p. 283-287. 2000.

Spiers, R. B.; Stegeman, J. J.; Hinton, D. E.; Woodin, B.; Smolowitz, R.; Okihiro, M. e 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.

Soimasuo, R., Jokinen, I., Kukkonen, J., Petänen, T., Ristola, T., Oikari, A. Biomarker responses along a pollution gradient: Effects of pulp and paper mill effluents on caged whitefish. *Aquatic Toxicology*. v. 31, p. 329-345. 1995.

Stegeman, J. J.; Brouwer, M.; Di Giulio, R. T.; Förlin, L; Fowler, B. A.; Sanders, B. M. e Van Veld, P. A. Molecular responses to enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Hugget, R. J.; Kimerle, R. A.; Mehrle J. R. e Bergman, H. L. (Eds.) *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. Chelsea: SETAC/Lewis Publishers, p. 235-335. 1992.

Stehr, C. M., Myers, M. S., Johnson, L. L., Spencer, S., Stein, J. E. Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada. *Marine Environmental Research*. v. 57, p. 55-74. 2003.

Stentiford, G. D., Longshaw, M., Lyons, B. P., Jones, G., Green, M., Feist, S. W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*. v. 55, n. 2, p. 137-159. 2003.

Stewart, R. e Malley, D. Technical evaluation of molluscs as a biomonitoring tool for the canadian mining industry. *Aquatic Effects Technology Evaluation Program (AETE)*, 1997. 20 p.

Sturm, A.; Silva de Assis, H. C., Hansen, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*. v. 47, p. 1-10. 1999.

Sunila, I. Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Annales Zoologica Fennici*. v. 24, p. 55-69. 1987.

Svärdh, L. Tissue sampling from live blue mussels, *Mytilus edulis*. A field study from the Swedish west coast. *Journal of Sea Research*. v. 322, p. 1-5. 2003.

Tam, N. F. Y. e Yao, M. W. Y. Concentrations in coastal mangrove sediments of Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*. v. 44, p. 642-651. 2002.

Teles, M. P., Santos, M. A. Biotransformation, stress and genotoxic effects of 17 β -estradiol in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) *Environment International*. 32, 4, 470-477. 2006.

Thurman, H. V. e Trujillo, A. P. *Essentials of oceanography*. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 527 p.

Tortelli, V., Colares, E. P., Robaldo, R. B., Nery, L. E. M., Pinho, G. L. L., Bianchini, A., Monserrat, J. M. Importance of cholinesterase kinetic parameters in environmental monitoring using estuarine fish. *Chemosphere*. v. 65, p. 560-566. 2006.

Townsend, C. R., Begon, M., Harper, J. L. *Fundamentos em Ecologia*. 2. ed. Artmed, Porto Alegre. 2006.

Thomas, P., Budiantara, L. Reproductive life history stages sensitive to oil and naphthalene in atlantic croaker. *Marine Environmental Research*. v. 39, p. 147-150. 1995.

Truscott, B., Idler, D., Fletcher, G. Alteration of reproductive steroids of male winter flounder (*Pleuronectes americanus*) chronically exposed to low levels of crude oil in sediments. *Canadian Journal of Aquatic Science*. v. 49, p. 2190-2195. 1992.

Ueno, S.; Susa, N.; Furukawa, Y. e Sugiyama, M. Comparison of hepatotoxicity caused by mono-, di- and tributyltin compounds in mice. *Archives of Toxicology*. v. 69, p. 30-34. 1994.

Ueno, S.; Susa, N.; Furukawa, M. e Sugyama, M. Role of cytochrome P450 in hepatotoxicity induced by di- and tributyltin compounds in mice. *Archives of Toxicology*. v. 69, p. 655-658. 1995.

Ueno, D., Wattanabe, M., Subramanian, A., Tanaka, H., Fillmann, G., Lam, P. K. S., Zheng, G. J., Muchtar, M., Razak, H., Prudente, M., Chung, K., Tanabe, S. Global pollution monitoring of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), furans (PCDFs) and coplanar polychlorinated biphenyls (coplanar PCBs) using skipjack tuna as a bioindicator. *Environmental Pollution*. v. 136, p. 303-313. 2005.

Umbuzeiro, G. A., Kummrow, F., Roubicek, D. A., Tominaga, M. Y. Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges. *Environment International*. v. 32, n. 3, p. 359-364. 2006.

Van Der Oost, R., Opperhuizen, A., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulen, N. P. E. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquatic Toxicology*. v. 35, n. 1, p. 21-46. 1996.

Valbonesi, P., Sartor, G., Fabbri, R. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic Sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *The Science of Total Environment*. v. 312, p. 79-88. 2003.

Valdez Domingos, F. X. Análise Estrutural dos Efeitos do BaP (Benzopireno) e TBT (Tributil-estanho) na Espécie Nórdica *Salvelinus alpinus*. Curitiba, 1999. 43f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná.

Valdez Domingos, F. X. Utilização de biomarcadores imunológicos e morfológicos em *Fundulus heteroclitus* (Teleostei, Ciprinodontidae) na avaliação do impacto antropogênico em Pictou, Nova Scotia – Canadá. Curitiba, 2001. 93 f. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia Celular, UFPR.

Ventura, E. C., Gaelzer, L. R., Zanette, J., Marques, M. R. F., Bainy, A. C. D. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three estuaries of Rio de Janeiro coast. *Marine Environmental Research*. v. 54, p. 775-779. 2002.

Viarengo, A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Reviews in Aquatic Sciences*. v.1, p.295. 1989.

Viarengo, A., Canesi, L. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*. v. 94, p. 225-243. 1991.

Vidal, M.; Basseres, A.; Narbonne, J. Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 132, 93-104. 2002.

Vives, I., Grimalt, J. O. Method for integrated analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine compounds in fish liver. *Journal of Chromatography B*. v. 768, p. 247-254. 2002.

Vives, I., Grimalt, J. O., Fernandez, P., Rosseland, B. Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish from remote and high mountain lakes in Europe and Greenland. *Science of the Total Environment*. v. 324, p. 67-77. 2004.

Walker, C. H.; Hopkin, S. P.; Sibly, R. M. e Peakall, D. B. *Principles of Ecotoxicology*. Londres: Taylor e Francis. 1996. 321pp.

Watanabe, R.; Coler, A. e Paz, R. J. The implementation of a regional biomonitoring program in northeast Brazil. *Aquatic Ecosystem Health and Management*. v. 2, n. 2, p. 187-189. 1999.

Wester, P. W., Canton, J. H. The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 100C, p. 115-117. 1991.

Wester, P. W., Van Der Ven, L. T. M., Vethaak, A. D., Grinwis, G. C. M., Vos, J. G., *Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 11, p. 289-295. 2002.

Wood, C. M., Grosell, M., Hogstrand, C., Hansen, H. Kinetics of radiolabelled silver uptake and depuration in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and European eel (*Anguilla anguilla*): the influence of silver speciation. *Aquatic Toxicology*. v. 56, p. 197-213. 2002.

Yang, X.; Baumann, P. C. Biliary PAH metabolites and the hepatosomatic index of brown bullheads from lake Erie tributaries. *Ecological Indicators*. v. 6, p. 567-574. 2005.

Zanette, J., Monserrat, J. M., Bianchini, A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 143 C, p. 187-195. 2006.

Zar, J.H. *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice-Hall, 1984. 715 pp.

Zodrow, J. M., Stegeman, J. J., Tanguay, R. L. Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorobibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquatic Toxicology*. v. 66, p. 25-38. 2004.