

**ALBERTO KATSUMITI KODO FILHO**

**USO DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL NA  
AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO VAZAMENTO DE ÓLEO DERIVADO DE  
PETRÓLEO EM ECOSISTEMAS DE ÁGUA DOCE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Área de Concentração: Ecotoxicologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro.

**CURITIBA**

**2006**

## **Agradecimentos**

**Ao meu orientador Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro pela orientação e por toda a credibilidade na minha capacidade de trabalho.**

**Às Dra. Helena Cristina Assis e Dra. Marta Margarete Cestari pelos incentivos e participação na realização deste trabalho.**

**Ao Prof. Marco Ferreira Randi e meus colegas (e amigos) de laboratório: Francisco Filipak Neto, Fabíola Xochilt Valdez Domingos, João Ricardo Maleres Alves Costa, Inês Rabitto, Daniel Bussolaro, Anna Lúcia Miranda, Grazyelle Sebrenski, Patrícia Diogo, Patrícia França, Jocieli Maschio, Michele Torres, Maria Luiza Araújo, Bruno, Zagonel, Felipe Borgo por todo companheirismo e amizade.**

**Aos meus colegas (e amigos) do mestrado: Alan Mocoichinski, Kwok Chiu Cheung, Betina Ortiz Bruel, Sandra Guapyassu, Carolina Somaio Neves, Maria Elisa Marques Vieira, Lucíola Thais Baldan, Guilherme McLaren, Cláudio Natividade, Vitor Piacentini, Tatiane Uchoa, Célio Jönck, Elaine Camacho, Karla Monteiro Paranhos.**

**À Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Araucária, em especial ao Savério, pelo apoio.**

**Ao Museu de História Natural do Capão da Imbuia, em especial ao Dr. Vinicius Abilhoa e Leonardo Bastos por toda assistência prestada, sem a qual boa parte deste trabalho não teria sido possível.**

**A todos os grandes amigos que conquisei nestes trabalhos à fora durante o período deste trabalho: Eliandra Maria Zandoná, Luciana de Souza, Cristiane Benincá, Delia Olmedo, Giane Silva, César Aparecido, Maristela Azevedo, Valéria Gliglio que espero poder levar para o resto da minha vida...**

**À Dayana e Leonard Gofmann, Iracema Berri, Priscylla Marcenischen e em especial, minha mãe Viviane Isabel Berri por todo apoio e por sempre estarem ao meu lado.**

**Ao Tiago Luiz Daros por todo incentivo.**

**Ao Laerzio Chiesorin Júnior por todo apoio durante o mestrado.**

**Aos membros da minha banca por aceitar meu convite: Dr. Marco Fernandez, Dra. Carolina Freire e Dra. Helena Cristina Assis.**

**À Pós-graduação em Ecologia e Conservação e aos professores do curso.**

**Ao fundo setorial CT-Petro pelo financiamento do projeto.**

“O homem é parte da natureza e sua guerra contra a natureza é inevitavelmente uma guerra contra si mesmo... Temos pela frente um desafio como nunca a humanidade teve, de provar nossa maturidade e nosso domínio, não da natureza, mas de nós mesmos”.

Rachel Carson (1907 – 1964)

## Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIACOES.....	ix
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. O Petróleo.....	1
1.2. Uso de Bioindicadores e Biomarcadores de Contaminação Ambiental.....	1
1.3. Efeitos Tóxicos do Petróleo em Peixes.....	2
1.4. Estresse Oxidativo na Exposição  Poluentes.....	3
1.5. Acidentes com Derramamento de Petróleo.....	3
1.6. Aplicação de biomarcadores em acidentes com vazamento de petróleo.....	5
1.7. Caracterização do Acidente Com o Vazamento de óleo na Refinaria Getúlio Vargas.....	7
1.8. Contexto do trabalho.....	7
<b>2. Objetivo.....</b>	<b>8</b>
2.1. Objetivo Geral.....	8
2.2. Objetivo Específico.....	8
<b>3. Modelo Biológico.....</b>	<b>9</b>
<b>4. rea de Estudo.....</b>	<b>10</b>
4.1. Arroio Saldanha e rea Referência .....	10
<b>5. CAPÍTULO I: Avaliação dos efeitos do vazamento de óleo cinco anos após o acidente através de análises químicas e do uso de biomarcadores morfológicos em fígado e brânquias de <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> (Ellis, 1911).....</b>	<b>12</b>
<i>Resumo</i> .....	13
<i>Abstract</i> .....	14
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	17
Resultado.....	19
Discussão.....	26
Referências Bibliográficas.....	33
<b>6. CAPÍTULO II: Uso de biomarcadores bioquímico e genotóxicos em <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> (Ellis, 1911) na avaliação dos efeitos do derramamento de óleo cinco anos após o acidente .....</b>	<b>41</b>
<i>Resumo</i> .....	42
<i>Abstract</i> .....	43
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	46
Resultados.....	48
Discussão.....	53
Referências Bibliográficas.....	57
<b>7. Discussão Geral.....</b>	<b>64</b>
<b>8. Conclusão.....</b>	<b>68</b>
<b>9. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>69</b>
ANEXO.....	77

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> . Barra = 1cm.....	9
<b>FIGURA 2</b> – Localização dos pontos de coleta. A – Arroio Saldanha ; B – Parque Municipal do Iguazu (Área Referência).....	11
<b>FIGURA 3</b> – Imagem de satélite (TatukGIS Viewer) mostrando em destaque o Arroio Saldanha (contorno em vermelho) tangente ao curso do Rio Barigüí (seta branca), que constitui a área teoricamente mais afetada. A seta preta aponta o local das coletas. A seta azul indica o caminho percorrido pelo óleo desde o <i>scraper</i> até o Rio Barigüí.....	11
<b>FIGURA 4</b> – Fluorescência de compostos PAHs presentes no sedimento do Arroio Saldanha em diluições de 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000 e 1:16000. As curvas estão definidas de acordo com a fluorescência dos compostos de 2 a 6 anéis. Os picos de fluorescência encontram-se para os compostos formados por 5 e 6 anéis.....	19
<b>FIGURA 5</b> – PAHs totais presentes no sedimento do Arroio Saldanha entre os perfis mais superficiais (amostra 1 e 2) e os mais profundos (amostra 3 e 4) em ordem crescente de profundidade.....	20
<b>FIGURA 6</b> – Concentração de grupos específicos de PAHs no sedimento do Arroio Saldanha entre os perfis mais superficiais (amostra 1 e 2) e os mais profundos (amostra 3 e 4).....	21
<b>FIGURA 7</b> – Cortes histológicos de fígado de <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> coletados no Arroio Saldanha e corados com Hematoxilina e Eosina. A – A seta indica uma neoplasia. Barra = 10µm. B – A seta indica um centro eosinofílico. Barra = 10µm. C – A seta indica uma infiltração leucocitária. Barra = 10µm. D – A seta aponta para a presença de um parasita interno. Barra = 50µm.....	22
<b>FIGURA 8</b> – Corte histológico de brânquias de <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> coletados no Arroio Saldanha e corados com Hematoxilina e Eosina. Barra = 50µm. A - Brânquias saudáveis onde é possível verificar a organização das lamelas secundárias (seta escura) e a lamela primária (seta clara). B – As setas escuras indicam o desarranjo e a desestruturação das lamelas secundárias, a seta clara indica proliferação celular entre as lamelas secundárias e a seta azul, descolamento de epitélio. C – As setas escuras indicam fusão apical das lamelas secundárias. D – A seta escura indica fusão lamelar apical e as setas	

claras indicam a fusão total das lamelas secundárias.....	23
<b>FIGURA 9</b> – Análise histopatológica através de microscopia eletrônica de varredura em brânquias de <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> coletados no Arroio Saldanha. A – A seta azul indica o enrugamento de epitélio e a seta clara proliferação e fusão celular nas bases das lamelas secundárias. B – As setas indicam a presença de aneurismas na extremidade das lamelas secundárias. C – A seta aponta uma área de degeneração nas lamelas secundárias. D – A seta indica a presença de parasita branquial externo.....	24
<b>FIGURA 10</b> – Níveis de hidroperóxidos encontrados no tecido hepático de <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> (n = 30). (***) Diferença estatística (P<0,001) do sítio Arroio Saldanha em relação à área de referência.....	48
<b>FIGURA 11</b> – Ensaio Cometa – Classificação dos danos no DNA por categoria.....	49
<b>FIGURA 12</b> – Média dos escores das quebras de DNA encontradas no tecido hepático de <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> (n = 30). O símbolo (***) indica diferença estatística (P<0,001) do sítio Arroio Saldanha em relação à área referência.....	50
<b>FIGURA 13</b> – Eritrócitos de <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> . Coloração Giemsa 10%. A e B – alterações morfológicas dos tipos <i>notched</i> (seta). C e D – alterações morfológicas do tipo <i>lobed</i> (seta). Barra = 50 µm.....	51
<b>FIGURA 13 (CONTINUAÇÃO)</b> – Eritrócitos de <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> . Coloração Giemsa 10%. E - Eritrócitos da Área Referência. F - Presença de micronúcleo (seta) em eritrócito da área referência. Barra = 50 µm.. ..	52
<b>FIGURA 14</b> – Médias do número de alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> (n = 30). O símbolo (***) indica diferença estatística (P<0,001) do sítio Arroio Saldanha em relação à área referência.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Trabalhos desenvolvidos com biomarcadores em grandes acidentes com vazamento de petróleo e derivados em peixes, moluscos e aves. Todos os acidentes abaixo apresentados ocorreram em ambientes marinhos.....	6
<b>TABELA 2</b> – Ocorrência de lesões em fígado de <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> coletados do Arroio Saldanha.....	25
<b>TABELA 3</b> – Ocorrência de lesões em brânquia de <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> coletados do Arroio Saldanha.....	25
<b>TABELA 4</b> – Soma dos escores e medianas obtidas em fígado de <i>Hyphessobrycon reticulatus</i> do Arroio Saldanha e Área Referência.....	50

## LISTA DE ABREVIACOES

**PAHs** – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos).

**ROS** – Reactive Oxygen Species (Espécies reativas de oxigênio)

**EROD** – Ethoxyresorufina O-deetilase.

**CYP1A** – Citocromo P450 família 1A.

**MFO** – Multiple Function Oxigenases (Oxigenases de função múltipla).

**FACs** – Fluorescence Aromatic Compounds (Fluorescência de compostos aromáticos).

**EML** – Estabilidade de membrana lisossomal.

## **1. Introdução**

### **1.1. O Petróleo**

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio, além de baixas concentrações de compostos orgânicos metálicos, principalmente níquel e vanádio. (PEDROZO et al., 2002). A composição química do petróleo é diferente para cada fonte geográfica de extração (OVERTON et al., 2004), porém de maneira geral, cerca de 75% do petróleo é constituído por hidrocarbonetos de cadeias curtas e longas (NEFF, 1979).

Os PAHs são substâncias lipofílicas (FOUCHÉCOURT et al., 1998) formadas por anéis aromáticos arranjados em configurações isoméricas variadas, sendo que alguns destes possuem potenciais efeitos tóxicos para a biota (HOWERTON; GOODPASTER; MCGUFFIN, 2002). Os PAHs de cadeias curtas, mais tóxicos e voláteis, tendem a permanecer por menos tempo no ambiente; os PAHs de cadeias longas tendem a ser mais estáveis (BRAUNER et al., 1999).

### **1.2. Uso de Bioindicadores e Biomarcadores de Contaminação Ambiental**

O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação da toxicidade de compostos químicos de origem antrópica em áreas impactadas vem sendo amplamente utilizado nas últimas décadas (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005). Bioindicadores são definidos como uma espécie capaz de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em diferentes níveis de organização biológica (ADAMS, 2002). Biomarcadores são alterações biológicas que expressam a exposição e/ou o efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente (WALKER et al., 1996). Um biomarcador eficiente deve apresentar grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (STEGEMAN et al., 1992; BAINY, 1993).

### 1.3. Efeitos Tóxicos do Petróleo em Peixes

Os peixes podem entrar em contato com os componentes derivados do petróleo por diferentes vias. As principais são através das trocas gasosas e iônicas com a conseqüente contaminação via brânquias, e a via trófica, que também constitui uma importante rota de exposição para os peixes.

Espécimes de peixes expostos ao petróleo podem apresentar alterações cardíacas, disfunções respiratórias, alterações bioquímicas, celulares, reprodutivas e comportamentais (USEPA, 1999). A exposição aos PAHs pode causar inibição da atividade colinesterásica levando a alterações em respostas motoras, formação de aductos de DNA, pré-neoplasias e neoplasias hepáticas, alterações no epitélio branquial e lesões em outros tecidos como rins e baço (BEYER et al., 1996; REICHERT et al., 1998; AKAISHI et al., 2004; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005).

Entre os efeitos descritos no tecido hepático pode-se incluir fibrose, infiltração leucocitária, necrose, neoplasias e lipidoses (AKAISHI et al., 2004; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005). Dentre os efeitos mais específicos relacionados com a exposição aos PAHs, destaca-se a ação indutora do xileno sobre a atividade das enzimas microsossomais hepáticas com o aumento da concentração do citocromo P-450 e provável lipoperoxidação (ATSDR, 1999).

Os PAHs podem interagir com as membranas, levando a desestruturação e um aumento da superfície e área de contato das membranas celulares. Isto pode resultar na expansão da camada lipídica produzindo alterações estruturais e funcionais na membrana como o aumento da atividade do citocromo c oxidase e o aumento de permeabilidade para compostos de baixo peso molecular e determinados prótons e íons (PEDROZO et al., 2002).

#### **1.4. Estresse Oxidativo e Exposição aos Poluentes**

Dependendo das características químicas e do grau de solubilidade dos compostos xenobiontes, estes serão acumulados ou eliminados com maior ou menor facilidade. Sendo assim, com o intuito de facilitar a excreção destes compostos, as células utilizam vias de imobilização e transformação de compostos xenobiontes capazes de transformar compostos lipofílicos em formas químicas mais hidrosolúveis.

Estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio intracelular entre a geração e os níveis enzimáticos normais que formam os mecanismos de defesa aos agentes oxidantes numa dada espécie (SIES, 1985). O aumento na concentração das ROS pode levar a um aumento ou a inibição na atividade dos sistemas enzimáticos de proteção.

O estresse oxidativo pode estar relacionado a danos em diversos níveis tais como: mutagênese, carcinogênese, lipoperoxidação e a oxidação e fragmentação de proteínas e carboidratos (SIES, 1985).

Vários estudos de biomonitoramento ambiental relacionam o grande aporte de diversas classes de poluentes com a geração de ROS destacando inúmeras conseqüências aos organismos aquáticos e aos seus respectivos ecossistemas (RADI & MATKOVICS, 1988; MALINS et al., 1988; BAINY et al., 1996; TORRES et al., 2002).

#### **1.5. Acidentes com Derramamento de Petróleo**

O petróleo e seus produtos derivados são liberados para o ambiente através de acidentes durante a carga e descarga, transporte ou produção de seus subprodutos. A compreensão do comportamento dos diferentes componentes do petróleo no solo, água e ar é muito importante para a avaliação dos efeitos à saúde e à biota decorrente dessa exposição, constituindo hoje um grande desafio para os ecotoxicologistas (PEDROZO et al., 2002).

Uma vez presente no ambiente, o petróleo pode passar por diversos processos que envolvem desde a volatilização, hidrólise, fotólise, biodegradação, biotransformação, degradação física e dissolução (PEDROZO et al., 2002). No caso de acidentes os componentes polares e de baixo peso molecular tendem a volatilizar ou se solubilizar com a água e serem lixiviados para fora da mancha de óleo constituindo a chamada Fração Solúvel do Petróleo (FSA). A dimensão do impacto

gerado e a velocidade de cada um desses processos varia de acordo com as condições intrínsecas de cada ambiente, tornando-se muito difícil prever acuradamente a dissociação do petróleo e a composição dos subprodutos de degradação, bem como inferir o potencial de toxicidade dos mesmos (PEDROZO et al., 2002). A extensão da mancha de óleo depende da hidrogeologia local, sendo que áreas hidrogeológicas mais inclinadas e com alta permeabilidade favorecem a contaminação de águas subterrâneas, especialmente na estação seca (LEE et al., 2001).

Em caso de derrame terrestre, as frações mais leves tendem a se volatilizar ou migrar prontamente através do solo, podendo atingir as águas subterrâneas. Em contrapartida, as frações com peso molecular maior são mais persistentes devido à baixa solubilidade, volatilidade e elevada capacidade de adsorção (ATSDR, 1999).

A velocidade com que o petróleo ou seus derivados se espalham determina seu efeito no ambiente. Fatores como tensão superficial, gravidade específica e viscosidade são importantes determinantes da dispersão da mancha gerada com o derrame. Assim quanto maior a tensão superficial, menor a área de espalhamento e como a temperatura reduz a tensão superficial do petróleo, águas mais quentes favorecem o espalhamento do mesmo. Quanto à densidade, como a maioria dos componentes do petróleo é menos densa que a água, estes tendem a flutuar. No entanto com a evaporação dos componentes mais leves, a densidade tende a aumentar e os compostos mais pesados podem afundar e formar placas de asfalto conhecidas como *TAR balls*, que interagem com rochas e sedimento de fundo do corpo d'água (USEPA, 1999).

Os derivados de petróleo quando derramados comportam-se de forma muito diferenciada dependendo das características da área atingida. O impacto na água doce pode ser mais severo quando comparado com os ambientes de água salgada devido a pouca movimentação hidrológica nesses ambientes. Em rios e riachos de pequena vazão estes compostos tendem a permanecer no ambiente por um longo período, interagindo com gramíneas das margens ou sedimento de fundo dos rios afetando as relações tróficas dos organismos que interagem com estes microambientes (USEPA, 1999).

### **1.6. Aplicação de biomarcadores em acidentes com vazamento de petróleo**

Ao longo dos anos pesquisadores de todo o mundo perceberam a importância de estudos de biomonitoramento de acidentes ambientais que envolviam o vazamento de petróleo e derivados.

Muitos estudos se desenvolveram desde então para avaliar o grau de comprometimento dos ambientes devido a esses acidentes, a grande maioria com parâmetros químicos. Porém alguns estudos na área de biomarcadores procuram avaliar os impactos sobre a biota, analisando parâmetros, bioquímicos morfológicos e genéticos dentre outros (TABELA 1).

Acidentes como o que envolveu o petroleiro *Exxon Valdez* (Alaska) receberam e ainda recebem a atenção especial da comunidade científica em estudos que contemplam uma grande variedade de parâmetros físico-químicos e biológicos em diversas espécies para avaliar os efeitos aos organismos e aos ecossistemas ao longo dos anos.

Como a maior parte dos acidentes ocorre em ambientes marinhos, o conhecimento sobre os impactos em ecossistemas de água doce é escasso.

TABELA 1 – Trabalhos desenvolvidos com biomarcadores em grandes acidentes com vazamento de petróleo e derivados em peixes, moluscos e aves. Todos os acidentes abaixo apresentados ocorreram em ambientes marinhos.

Ano	Petroleiro	Local	Espécies	Biomarcadores	Autores
1970	Arrow	Nova Scotia	<i>P. americanus</i>	• MFO	VIGNIER et al. (1994)
1989	Exxon Valdez	Prince William Sound	<i>H. octogrammus</i> <i>P. laeta</i> <i>C. pallasii</i> <i>S. maliger</i> <i>H. decagrammus</i> <i>P. asper</i> <i>S. malma</i> <i>O. kisutch</i> <i>O. gorboscha</i> <i>T. chalcogramma</i> <i>A. purpurescens</i> <i>P. chirus</i> <i>X. atropurpureus</i>	• CYP1A • EROD • FACs em bile • Histopatologia • Hemosiderose • CYP1A • FACs em bile • FACs em bile • FACs em bile • CYP1A	JEWETT et al. (2002) MARTY et al. (1999) KHAN & NAG (1993) COLLIER et al. (1996) HOM et al. (1996) KRAHN et al. (1992) WOODIN & STEGEMAN (1993)
1992	Aegean Sea	Espanha	<i>M. edulis</i>	• CYP1A • Adutos de DNA	SOLÉ et al. (1996)
1996	Sea Empress	Reino Unido	<i>L. limanda</i> <i>P. platessa</i>	• EROD	KIRBY et al. (1999)
1999	Erica	Breton	<i>U. aalge</i> <i>M. nigra</i> <i>S. mollissima</i>	• Histopatologia	KAMMERER et al. (2004)
2002	Prestige	Baía de Biscaia	<i>M. galloprovincialis</i> <i>M. merluccius</i>	• Acetilcolinesterase • Histopatologia • EML	MARIGÓMEZ et al. (2006)

### **1.7. Caracterização do Acidente Com o Vazamento de Óleo na Refinaria Getúlio Vargas - PR**

Em 16 de julho de 2000, cerca de quatro e meio milhões de litros de óleo vazaram das proximidades da refinaria Getúlio Vargas (UN-REPAR/PETROBRAS) localizada no estado do Paraná, sul do Brasil. O vazamento ocorreu devido ao rompimento de um *scraper* (peça que faz a conexão entre ductos de transporte de óleo) situado nas encostas da cabeceira de uma região de banhado denominada Arroio Saldanha, atingindo porções de terra e os cursos dos Rios Barigüí e Iguaçu. Segundo MENICONI et al. (2002) o óleo derramado apresentava baixa densidade, sendo constituído por 71% de hidrocarbonetos saturados, 18% de compostos aromáticos e 0,8% por asfaltenos, onde os derivados do naftaleno, fenantreno e fluorenos foram os PAHs mais presentes. Segundo MENICONI et al. (2002), aproximadamente, 30% do óleo derramado alcançou os rios, cerca de 30% evaporou e o restante ficou retido no Arroio Saldanha.

### **1.8. Contexto do trabalho**

O presente estudo compõe um biomonitoramento na região impactada pelo acidente com vazamento de óleo nas proximidades da Refinaria Getúlio Vargas (UN-REPAR/PETROBRAS) denominada Arroio Saldanha. Neste estudo estão envolvidos ainda o Laboratório de Toxicologia Ambiental (Departamento de Farmacologia/UFPR) através das análises dos biomarcadores bioquímicos GST (Glutathione-S-Transferase), Catalase e Colinesterase de *Hyphessobrycon reticulatus*, e o Laboratório de Toxicologia Celular (Departamento de Biologia Celular/UFPR) através das análises de PAHs em bile e histopatologia de fígado e brânquias de *Phalloceros caudimaculatus*. Paralelamente ao trabalho de biomonitoramento do Arroio Saldanha estão sendo desenvolvidos trabalhos envolvendo bioensaios com *Astyanax sp.* para a avaliação da toxicidade aguda da água proveniente do Arroio Saldanha e do Rio Barigüí, através da avaliação de biomarcadores morfológicos, bioquímicos, genéticos e parâmetros hematológicos.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos tóxicos do derramamento de óleo derivado de petróleo em ambientes de água doce impactado pelo acidente, através de análises químicas e de biomarcadores morfológicos, bioquímico e genotóxicos de contaminação ambiental em *Hyphessobrycon reticulatus*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Realizar análise química do sedimento para PAHs totais e grupos aromáticos específicos (de 2 a 6 anéis) através de espectrofluorimetria;
- Avaliar o efeito dos componentes do óleo ainda encontrados na área afetada pelo derramamento através do uso de biomarcadores morfológicos (cito e histopatologia) em fígado e brânquias de *H. reticulatus*;
- Avaliar o efeito dos componentes do óleo ainda encontrados na área afetada pelo derramamento através da análise dos níveis de lipoperoxidação como biomarcador bioquímico em fígado de *H. reticulatus*;
- Avaliar o efeito dos componentes do óleo ainda encontrados na área afetada pelo derramamento através do uso de biomarcadores genotóxicos em fígado e sangue de *H. reticulatus*;

### 3. Modelo Biológico

*Hyphessobrycon reticulatus* (ELLIS, 1911) (Figura 1) conhecido popularmente por “lambarizinho”, pertence à família Characidae, sub-família Incertae sedis. É uma espécie que pode atingir até cerca de cinco centímetros de comprimento total (LIMA et al. 2003). É uma espécie bentopelágica sub-tropical que ocorre em córregos e riachos de água doce desde o estado do Rio de Janeiro até o nordeste de Santa Catarina (GERY, 1977).

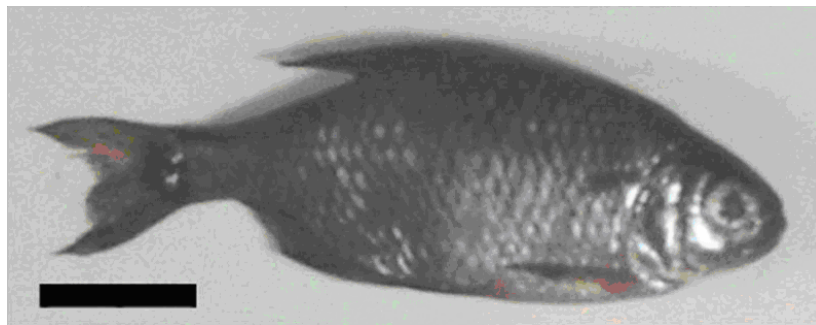


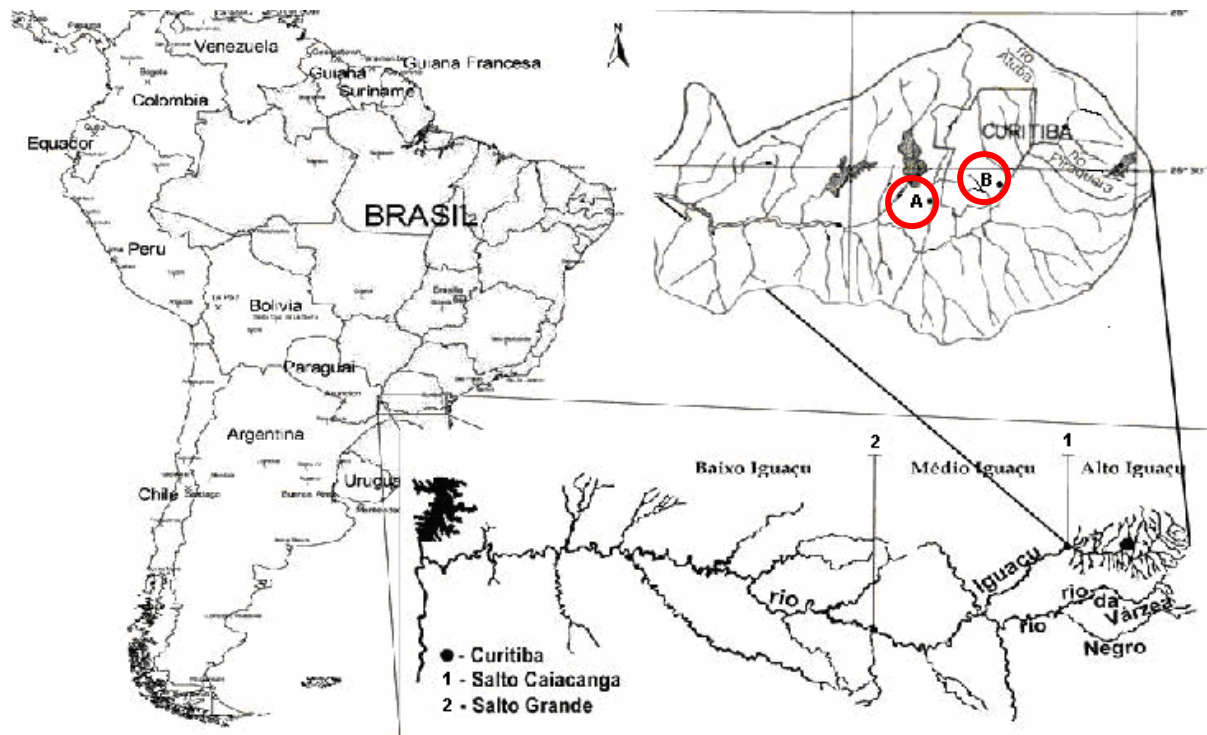
FIGURA 1: *Hyphessobrycon reticulatus*. Barra = 1cm.

## **4. Área de Estudo**

### **4.1. Arroio Saldanha e Área de Referência**

O Arroio Saldanha (Figuras 2 e 3) localiza-se no município de Araucária, no estado do Paraná, e constitui um tributário do Rio Barigüi no entorno da Refinaria Getúlio Vargas – UN-REPAR/PETROBRÁS. A área é recortada por pequenos cursos d'água possuindo dois riachos principais que deságuam no Rio Barigüí, estando, porém isolados por barreiras e diques de contenção construídos na época do acidente para conter o óleo derramado. O Arroio Saldanha é um ribeirão típico de Floresta Atlântica, cujas nascentes encontram-se dentro da área da UN-REPAR/PETROBRÁS, de baixo volume d'água e florestado em todo seu trajeto, espalhando-se em banhados em certos trechos (OSTRENSKI et al., 2001).

Para o grupo referência, os espécimes foram coletados na região de cavas do Parque Municipal do Iguaçu nas proximidades do Jardim Zoológico de Curitiba (Figura 2). Esta área foi escolhida pelas similaridades com a região estudada, pertencendo à mesma bacia hidrográfica na qual está inserido o Arroio Saldanha, sendo assim apta a fornecendo dados comparativos no presente trabalho.



Fonte: Adaptado de INGENITO et al., 2004.

FIGURA 2: Localização dos pontos de coleta. A – Arroio Saldanha ; B – Parque Municipal do Iguazu (Área Referência)

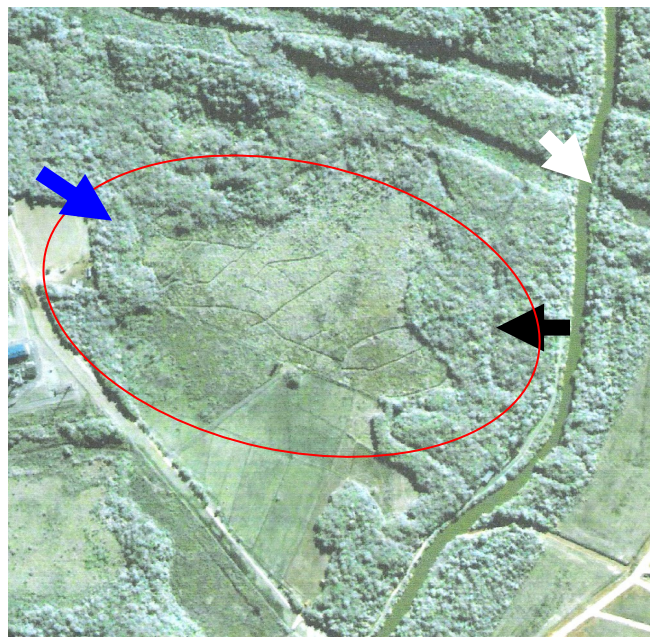


FIGURA 3: Imagem de satélite (TatukGIS Viewer) mostrando em destaque o Arroio Saldanha (contorno em vermelho) tangente ao curso do Rio Barigüí (seta branca), que constitui a área teoricamente mais afetada. A seta preta aponta o local das coletas. A seta azul indica o caminho percorrido pelo óleo desde o *scraper* até o Rio Barigüí.

## **CAPÍTULO I\***

**Avaliação dos efeitos do vazamento de óleo cinco anos após o acidente através de análises químicas e do uso de biomarcadores morfológicos em fígado e brânquias de *Hyphessobrycon reticulatus* (Ellis, 1911).**

**Orientação:**

**Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro/Departamento de Biologia Celular.  
UFPR**

**Colaboração:**

**Dra. Hélène Roche/Département d'Ecologie et Evolution.  
Université Paris XI**

---

\* Capítulo formatado de acordo com as normas da revista *Aquatic Toxicology* (ANEXO)

**CAPÍTULO I – Avaliação dos efeitos do vazamento de óleo cinco anos após o acidente através de análises químicas e do uso de biomarcadores morfológicos em fígado e brânquias de *Hyphessobrycon reticulatus* (Ellis, 1911).**

*Resumo*

Análises histopatológicas e ultra-estruturais tem sido reconhecidas como ferramentas úteis na expressão dos efeitos de contaminantes por serem respostas rápidas e expressarem as condições de saúde dos organismos expostos. Quando associadas às análises químicas dos compostos aos quais estão submetidos os organismos é possível inferir possíveis razões para as patologias observadas. Para a determinação dos impactos crônicos de derivados do petróleo resultantes do derramamento ocorrido em 2000 na Refinaria Getúlio Vargas (UN-REPAR/PETROBRAS), fígado e brânquias de *Hyphessobrycon reticulatus* foram analisados através de microscopia de luz e eletrônica de varredura para a verificação de alterações morfológicas. Foram realizados ainda análises químicas do sedimento do riacho onde foram coletados os exemplares, avaliando PAHs totais e determinação quali-quantitativa para os compostos de 2 a 6 anéis através de espectrofluorimetria. Para as análises morfológicas foram encontradas infiltrações leucocitárias, centros eusínófilicos e neoplasia em fígado; aneurismas, fusão de lamelas, proliferação celular e descolamento de epitélio em brânquias. Com relação aos dados químicos foi observada a presença de compostos de maior peso molecular nas amostras mais superficiais. Alguns desses compostos de alto potencial toxicológico estão diretamente em contato com a biota aquática e tendem a interagir com esta causando efeitos deletérios, como o observado para as análises morfológicas em fígado e brânquias.

## Abstract

Morphological analyses have been recognized as useful tools to evaluate the effects of pollutants due to the possibility of evaluation of the health conditions of the exposed organisms. When these findings are related to information about the concentration of chemicals in the impacted environment, the interpretations on the pathology, chemicals toxicity and conditions of exposure are more realistic. The aim of the present work to develop a study on the acute and chronic impact of the crude oil spill on a freshwater ecosystem occurred on July 16, 2000 around the Getúlio Vargas Refinery (UN-REPAR/PETROBRAS) – PR, south of Brazil where approximately 4.5 millions liters of crude oil were spilled. Five years after the accident chemical analysis in the sediment were developed to establish the concentration and availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). To study the morphological lesions on liver and gills, fishes of the specie *Hyphessobrycon reticulatus* (n=30) were collected from Saldanha Stream and analyzed through light and scanning electron microscopy. Chemical data showed that sediment from studied area is contaminated with important concentrations of PAHs. PAHs of 5 and 6 rings were detected on the more superficial layer of the sediment. In accord with this data, some lesions observed in the studied tissues showed a close correlation with the presence of PAHs in the sediment like eosinophilic center and neoplasias in liver. In addition abundant leukocytes infiltration were found in liver; aneurysms, lamellar fusion, cellular proliferation, and epithelial damages were observed in secondary lamellae. These findings confirm the high potential toxicity of PAHs still present in the sediment to the crude oil spill at 2000. In conclusion, the present data indicate that the region must still be studied and a project of recuperation of the affected environment is urgent and necessary.

## Introdução

Apesar de haver alguma variação na constituição do petróleo de acordo com sua bacia de extração, sabe-se que em sua constituição básica é formado por hidrocarbonetos saturados, compostos aromáticos e compostos NOS (formados por elementos como nitrogênio, oxigênio e enxofre) (Veiga, 2003) assim como baixas concentrações de compostos orgânicos metálicos como níquel e vanádio (Pedrozo et al., 2002). Geralmente a classificação mais adequada se faz de acordo com a área de extração do petróleo.

Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos apolares com diversas configurações espaciais que assumem diferentes propriedades físico-químicas. De forma geral encontram-se três principais grupos de hidrocarbonetos no petróleo: parafínicos, naftalênicos e aromáticos. Destes, os compostos policíclicos aromáticos são frequentemente incluídos em diversos estudos de contaminação ambiental por seu potencial tóxico (Brack et al., 1999; Savinov et al., 2000; Maskaoui et al. 2002; Rocher et al. 2004; Wang et al., 2005; Olajire et al., 2005, Barra et al., 2006). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) são compostos químicos apolares, tipicamente de dois a oito anéis aromáticos (Barra et al., 2006). Com base no peso molecular, os PAHs podem ser divididos em dois grupos: aqueles com baixos pesos moleculares, que possuem dois ou três anéis aromáticos e os de altos pesos moleculares, compostos por quatro a seis ou sete anéis aromáticos.

Estes compostos podem ser provenientes de fontes naturais e antropogênicas (Zakaria et al., 2001). As fontes antropogênicas incluem a queima de combustíveis fósseis ou da madeira e da atividade industrial (pirolítica) e da liberação dos produtos de petróleo (petrogênica) (Canton & Grimalt, 1992; Kowalewska & Konat, 1997). As fontes naturais de PAHs incluem o escoamento natural do petróleo e sua conseqüente deposição (Young & Cerniglia, 1995).

Uma vez no ambiente aquático, os PAHs tendem a associar-se a partículas sólidas (material em suspensão, tecidos biológicos e aos sedimentos) sedimentando-se (Chiou et al., 1998; Readman et al., 1996) e retardando possíveis alterações através da degradação microbiana, foto-degradação e oxidação química (Readman et al., 1996). Este sedimento pode representar um núcleo de registro histórico de mudanças de deposições de substâncias (Ikenaka et al., 2005).

Análises histopatológicas têm sido reconhecidas como ferramentas muito úteis no estudo e diagnóstico dos efeitos agudos e crônicos de poluentes em teleósteos (Akaishi et al., 2004; Oliveira-Ribeiro et al., 2002a, 2002b, 2005). Além disso, as características histopatológicas de órgãos alvos específicos podem expressar condições ambientais e representar o tempo de exposição aos quais estão submetidos os organismos (Schmalz et al., 2002). Sendo assim aparecem como uma resposta a estressores subletais fornecendo um método rápido na avaliação do comprometimento de tecidos e órgãos de espécimes expostos a agentes químicos estressores (Johnson et al., 1993).

O fígado é o principal órgão com potencial de biotransformação, bioativação e excreção de xenobiontes, sendo, portanto, um dos principais órgãos alvos que podem refletir a exposição aos contaminantes (Bernet et al., 1999). As brânquias exibem extensas superfícies que estão permanentemente em contato com o ambiente externo. Estas possuem células na sua estrutura que desempenham um importante papel na proteção do epitélio a substâncias tóxicas e patogênicas, bem como na fisiologia da osmoregulação além do papel na troca de gases (Bernet et al., 1999). Por essas razões, fígado e brânquias foram escolhidos como órgãos alvos para a realização deste estudo.

## Material e Métodos

### *Análise Química de Sedimento*

As amostras de sedimento foram obtidas com o uso de um coletor de perfil de solo de PVC, com o qual se obteve um testemunho de 30 centímetros de profundidade do sedimento do local onde foram coletados os exemplares do estudo. As amostras foram congeladas em freezer -20°C até seu processamento para as análises. O testemunho foi fracionado em amostras de 7,5 centímetros de comprimento que compunham os perfis de 1 a 4, sendo 1 o mais superficial e 4 o mais profundo. Estas amostras foram então mantidas em estufa a temperatura controlada em 45°C por 5 dias para a obtenção da fração seca de sedimento. Amostras de 10g do solo seco foram então solubilizadas em 20 ml de metanol P.A. (0,5g/ml) para a suspensão dos PAHs. A suspensão foi então filtrada constituindo uma solução estoque deste extrato metanólico. Desta solução foram tomados 20 µl e diluídos 4000X, baseado em testes de diluição, e realizada a leitura em espectrofluorímetro RF-5301 PC. As leituras ocorreram em comprimentos de onda de emissão e excitação de acordo com o número de anéis dos compostos aromáticos: dois anéis (288/330), três anéis (267/309), quatro anéis (334/376), cinco anéis (364/406) e seis anéis (380/422).

### *Análises Morfológicas*

Para as análises morfológicas e ultra-estruturais foram coletados 30 exemplares de *Hyphessobrycon reticulatus* do Arroio Saldanha nos meses de fevereiro/2005 e julho/2005, sendo transportados em caixas de isopor para o laboratório de Toxicologia Celular da UFPR.

No laboratório os animais foram anestesiados com Benzocaína 0,04%, tomadas às medidas de comprimento total (cm) e peso total (g), e realizada a sexagem dos exemplares. De cada indivíduo foram coletados os arcos branquiais direitos para microscopia de luz e arcos branquiais esquerdos para microscopia eletrônica de varredura. Após secção ventral, o fígado foi retirado para análise histopatológica em microscopia de luz.

Para a microscopia de luz, os órgãos foram fixados em ALFAC (álcool 80%, Formaldeído 40% e Ácido Acético Glacial 5%) durante 16 horas, desidratados em séries crescentes de etanol, e incluídos e emblocados em Paraplast (SIGMA®). Os

cortes (5µm) foram corados com Hematoxilina de Harris e Eosina (HE) e analisados em microscópio óptico *Leica*. Os resultados foram gravados em imagens digitalizadas através do fotomicroscópio *Axiophot Zeiss*.

Para as análises em microscopia eletrônica de varredura, as brânquias foram fixadas em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2 - 7,4) por 2 horas, desidratados em série crescente de etanol (MERCK®), realizado ponto crítico em CO<sub>2</sub> líquido e metalizado com ouro para então serem analisadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM – 6360 LV do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

## Resultados

### *Análises Químicas do Sedimento*

Para as análises químicas foi realizada uma curva de padronização onde foram testadas as diluições de 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000 e 1:16000. Das diluições realizadas, aquela que melhor demonstrou os resultados de fluorescência foi 1:4000 (Figura 4).

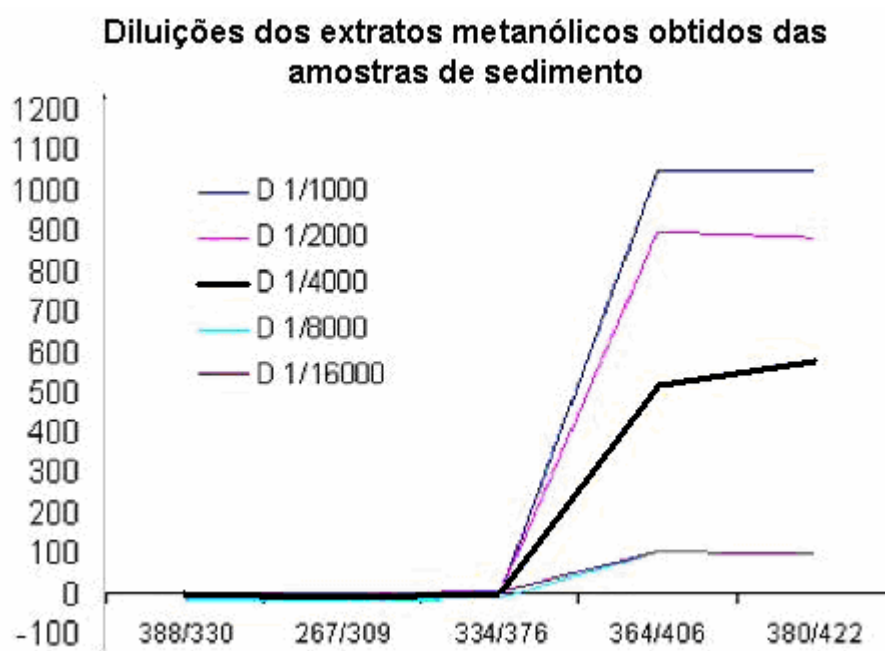


FIGURA 4: Fluorescência de compostos PAHs presentes no sedimento do Arroio Saldanha em diluições de 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000 e 1:16000. As curvas estão definidas de acordo com a fluorescência dos compostos de 2 a 6 anéis. Os picos de fluorescência encontram-se para os compostos formados por 5 e 6 anéis.

As análises quantitativas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos totais evidenciaram claramente uma estratificação por deposição de PAHs no sedimento onde as maiores concentrações foram registradas nas amostras superficiais do sedimento (Figura 5). Foram encontrados picos de PAHs de quase 14  $\mu\text{g/g}$  de sedimento na amostra superficial (Amostra 1, Figura 5). As amostras mais profundas apresentaram uma média em torno de 5  $\mu\text{g/g}$  de sedimento.

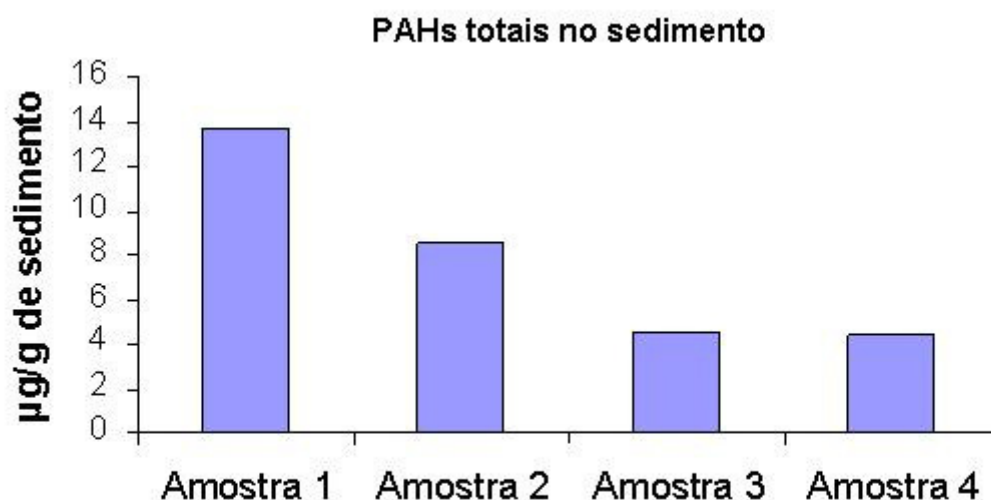


FIGURA 5: PAHs totais presentes no sedimento do Arroio Saldanha entre os perfis mais superficiais (amostra 1 e 2) e os mais profundos (amostra 3 e 4) em ordem crescente de profundidade.

Para a análise quali-quantitativas dos compostos específicos nas amostras do testemunho, os resultados indicam para uma maior concentração de PAHs de 5 e 6 anéis aromáticos na superfície do sedimento (amostras 1 e 2) e a presença de compostos mais leves (2, 3 e 4 anéis) nas amostras mais profundas (Figura 6). O composto de 2 anéis corresponde ao naftaleno, os de 3 anéis podem corresponder aos acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno e antraceno, e os compostos de 4 anéis aos fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno e criseno.

Os compostos de maiores pesos moleculares, PAHs de 5 e 6 anéis foram encontrados nas amostras superficiais atingindo valores entre 6 e 8  $\mu\text{g/g}$ , enquanto que os compostos de 2, 3 e 4 anéis atingiram picos entre 1 e 3  $\mu\text{g/g}$  (Figura 6). Os compostos de 5 anéis podem corresponder aos benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno e dibenzo[a,h]antraceno, e os compostos de 6 anéis aos indeno[1,2,3]pireno e benzo[g,h,i]perileno.

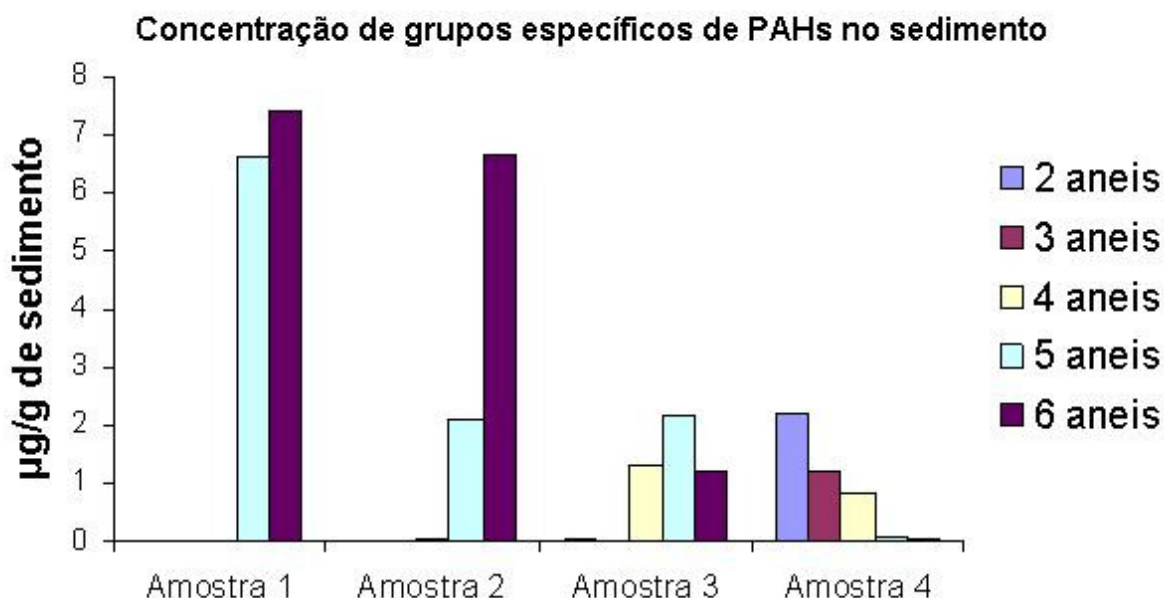


FIGURA 6: Concentração de grupos específicos de PAHs no sedimento do Arroio Saldanha entre os perfis mais superficiais (amostra 1 e 2) e os mais profundos (amostra 3 e 4).

### Análises Morfológicas

Os exemplares analisados apresentaram médias  $\pm$  SD (desvio padrão) de peso(g) de  $2,66 \pm 0,61$ , comprimento total(cm) de  $5,78 \pm 0,52$  e um percentual entre machos e fêmeas de M(36%) F(64%).

As lesões encontradas no fígado estão demonstradas na Figura 7, e Tabela 2. Em fígado foram identificadas neoplasias (Figura 7A), centro eosinofílico (Figura 7B) e infiltrações leucocitárias (Figura 7C). A Figura 7D ressalta a presença de um parasita.

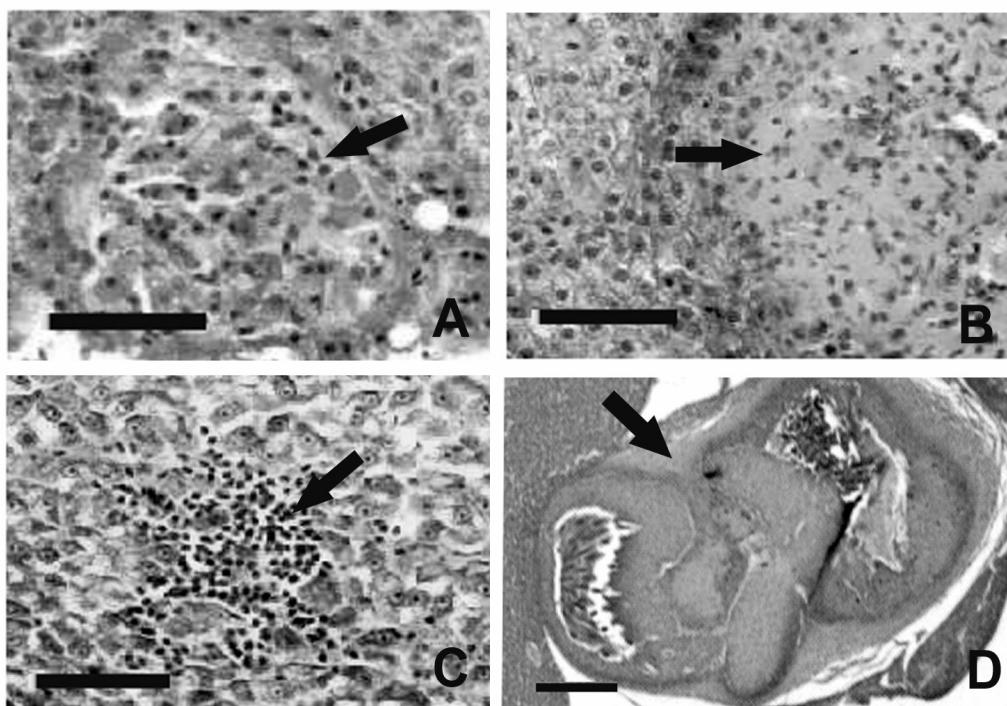


FIGURA 7 – Cortes histológicas de fígado de *Hyphessobrycon reticulatus* coletados no Arroio Saldanha e corados com Hematoxilina e Eosina. A – A seta indica uma neoplasia. Barra = 10 $\mu$ m. B – A seta indica um centro eosinofílico. Barra = 10 $\mu$ m. C – A seta indica uma infiltração leucocitária. Barra = 10 $\mu$ m. D – A seta aponta para a presença de um parasita interno. Barra = 50 $\mu$ m

As lesões encontradas em brânquias estão demonstradas nas Figuras 8 e 9, e Tabela 3. A Figura 8A representa um aspecto saudável das brânquias, indicando na seta clara a lamela primária e na seta escura a lamela secundária. Dentre as lesões consideradas foram registradas descolamento de epitélio (seta azul) e desestruturação das lamelas secundárias (seta escura) (Figura 8B), fusões lamelares apicais (seta escura) (Figuras 8C e 8D) e totais (setas claras) (Figura 8D) e proliferação celular entre as lamelas secundárias (seta clara) (Figura 8B).

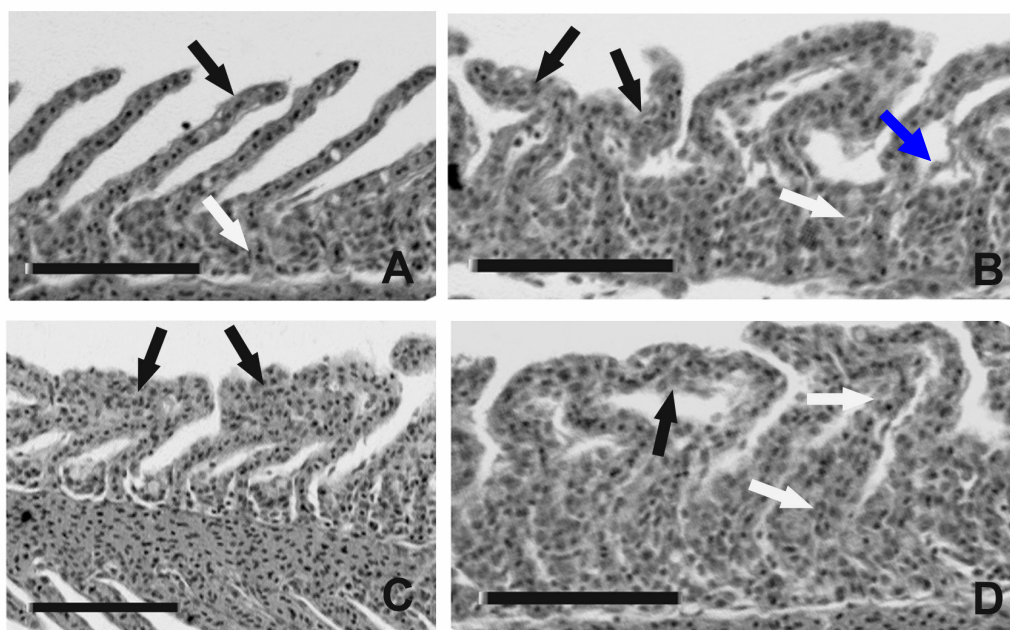


FIGURA 8 – Corte histológico de brânquias de *Hyphessobrycon reticulatus* coletados no Arroio Saldanha e corados com Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 $\mu$ m. A - Brânquias saudáveis onde é possível verificar a organização das lamelas secundárias (seta escura) e a lamela primária (seta clara). B - As setas escuras indicam o desarranjo e a desestruturação das lamelas secundárias, a seta clara indica proliferação celular entre as lamelas secundárias e a seta azul, descolamento de epitélio. C - As setas escuras indicam fusão apical das lamelas secundárias. D - A seta escura indica fusão lamelar apical e as setas claras indicam a fusão total das lamelas secundárias.

Em microscopia eletrônica de varredura (Figura 9) as lesões mais evidentes em brânquias foram: o enrugamento da superfície epitelial lamelar (seta azul) (Figura 9A), proliferação e fusão das bases das lamelas secundárias (seta clara) (Figura 9A); aneurismas (Figura 9B) e degeneração das lamelas secundárias (Figura 9C). A figura 9D indica a presença de um parasita branquial.

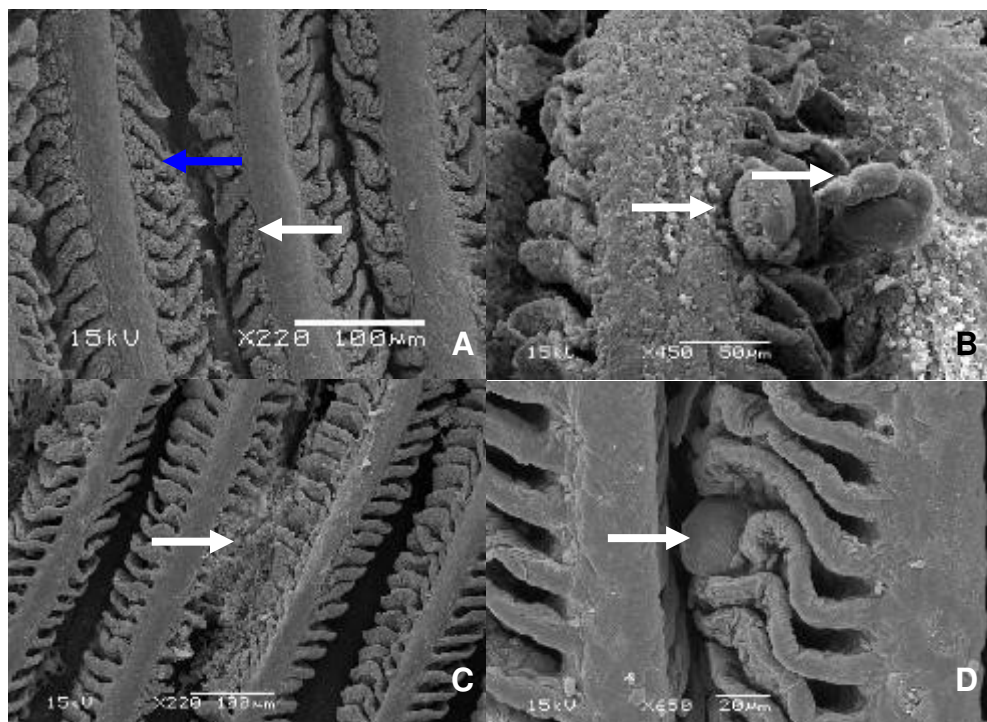


FIGURA 9 – Análise histopatológica através de microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Hyphessobrycon reticulatus* coletados no Arroio Saldanha. A – A seta azul indica o enrugamento de epitélio e a seta clara proliferação e fusão celular nas bases das lamelas secundárias. B – As setas indicam a presença de aneurismas na extremidade das lamelas secundárias. C – A seta aponta uma área de degeneração nas lamelas secundárias. D – A seta indica a presença de parasita branquial externo.

As Tabelas 2 e 3 apresentam os parâmetros histopatológicos avaliados e a ocorrência de cada lesão em fígado e brânquias respectivamente de *H. reticulatus*.

TABELA 2 - Ocorrência de lesões em fígado de *Hyphessobrycon reticulatus* coletados do Arroio Saldanha.

Lesões Consideradas	Ocorrência	%
Infiltração Leucocitária	5(30)	16%
Neoplasias	2(30)	6%
Centro Eosinófilico (pré-neoplásicos)	1(30)	3%
Presença de Parasita	1(30)	3%

TABELA 3 - Ocorrência de lesões em brânquias de *Hyphessobrycon reticulatus* coletados do Arroio Saldanha.

Lesões Consideradas	Ocorrência	%
Desorganização lamelar	9(30)	30%
Fusão lamelar	8(30)	26%
Proliferação celular	14(30)	46%
Descolamento de epitélio	10(30)	33%
Aneurisma	9(30)	30%

## Discussão

As análises químicas são ferramentas muito úteis na investigação da presença ou ausência da poluição ambiental quando é possível associá-las às fontes de emissão dos contaminantes como refinarias, campos agriculturáveis, áreas com intensa atividade urbana e áreas impactadas por acidentes ambientais (Beg et al., 2001).

Estudos prévios já demonstravam que derivados do petróleo de baixo peso molecular são degradados mais rapidamente nos sedimentos, enquanto PAHs com mais de três anéis são mais refratários em ambientes naturais (Jones et al., 1986). O naftaleno é derivado principalmente de atividades antropogênicas, em especial relacionadas ao aporte de petróleo e derivados no ambiente.

O naftaleno está dentro do espectro de fluorimetria de dois anéis e sua detecção nas amostras foi mais significativa em amostras mais profundas indicando a possibilidade deste composto estar mais internamente alojado nas camadas do sedimento. Esse composto ocorre como uma fração significativa no petróleo ou derivados formados por frações leves, e pode ser usado como marcador de origem petrogênica (Tam et al., 2001).

Os resíduos de derivados do petróleo contêm concentrações relativamente mais elevadas de compostos de dois e três anéis, tais como o naftaleno, fenantreno, antraceno (Tolosa et al., 1996), o que corrobora com os dados encontrados nas amostras mais profundas do sedimento.

As maiores concentrações em amostras superficiais (Amostras 1 e 2, Figura 6) foram para PAHs de 5 e 6 anéis. Segundo Stout et al. (2001) o composto pentacíclico benzo[a]pireno é considerado um marcador potencial da origem pirolítica dos PAHs, uma vez que sua principal derivação é a atividade industrial. Dos três PAHs pirolíticos típicos, pireno, criseno e benzo[a]pireno, Pereira et al. (1999) encontraram pireno e benzo[a]pireno geralmente em concentrações elevadas nos sedimentos. Resultado similar foi observado para compostos pentacíclicos no presente trabalho.

Os altos valores de PAHs de cinco e seis anéis entre as amostras mais superficiais podem indicar a soma de um componente externo pirolítica de deposição, proveniente da intensa atividade industrial existente na região. Esses valores, porém, podem também ser devidos somente a remobilização das frações

residuais do óleo devido à ação das chuvas associada às propriedades físico-químicas do solo.

De acordo com Zheng et al. (2002) e Ikenaka et al. (2005) relações entre compostos isômeros de mesmo número de anéis aromáticos tais como Fenantreno/Antraceno (compostos tricíclicos), Pireno/Fluorantreno (compostos tetracíclicos), e Benzo[e]Pireno/Benzo[a]Pireno (compostos pentacíclicos), podem identificar a fonte de contaminação, se petrogênica ou pirolítica.

Considerações similares podem ser aplicadas à relação Fluorantreno/Pireno. Altos valores indicam contaminação por combustão (pirolítica), sendo que valores baixos indicam uma origem petrogênica (Rocher et al., 2004).

No presente trabalho as baixas concentrações de compostos tetracíclicos podem ser um indicativo da contaminação petrogênica. Tais relações tem sido muito utilizadas em estudos como uma ferramenta útil para a identificação da fonte de PAHs em sedimentos marinhos (Budzinski et al., 1997; Baumard et al., 1998; Soclo et al., 2000; King et al., 2004; De Luca et al., 2004), no entanto a literatura é muito pobre ainda no que se refere aos ambientes aquático-terrestres.

Devido às características locais, é possível que os compostos mais leves sejam carregados mais facilmente pela ação do fluxo de águas, permanecendo nas amostras superficiais PAHs de maiores pesos moleculares. PAHs como naftaleno, fenantreno e pireno estariam assim melhor conservados em perfis pouco mais profundos porém ainda dentro de uma amostra superficial.

As próprias características do solo que impossibilitaram a realização de coletas mais profundas podem ter mascarado uma estratificação, ou mesmo a falta dessa, mais evidente. Isso pode corroborar com a flutuação dos índices de fluorescência de compostos como o naftaleno, ou mesmo a razão entre os pesos moleculares dos PAHs e sua distribuição nos perfis do sedimento. Maskaoui et al. (2002) e McGroddy et al. (1996) afirmam que, de maneira geral, PAHs se comportaram de maneira não conservativa no sedimento. Isto se deve a uma causa conjunta entre sua natureza altamente hidrofóbica e suas fortes interações com partículas orgânicas suspensas, conduzindo a sua remoção da coluna da água (Zhou et al., 1996; 2000).

Outros processos importantes tais como volatilização, fotodegradação e mediação biológica podem remover uma proporção destes compostos (Zoest & Eck, 1990). Além disso, as potenciais diferenças nas concentrações de carbonos orgânicos dissolvidos entre os poros induzirão transições de fase dos PAHs entre

níveis do sedimentos e colóides, produzindo relações muito diferentes na sua distribuição (Maskaoui et al., 2002).

As investigações sobre a presença de PAHs no ambiente aquático constituem uma parte muito importante da avaliação da qualidade ambiental por determinar o status da contaminação química e do impacto em potencial que possam causar aos ecossistemas (Kennicutt et al., 1994). Essas análises químicas auxiliam na determinação da contaminação antropogênica identificando os poluentes (Olajire et al., 2005), porém só fornece informações sobre o efeito tóxico sobre a biota quando corroborada de dados biológicos.

De acordo com Hinton et al. (1992), a histopatologia é um dos métodos mais rápidos e sensíveis na detecção dos níveis tóxicos de exposição dos organismos.

Danos às brânquias e ao fígado de peixes expostos a contaminantes derivados de PAHs têm sido amplamente utilizados nos últimos anos como parâmetros para avaliação de diferentes ambientes (Bogovski, et al., 1999; Simpson et al. 2000; Rudolph et al., 2001; Stentiford et al. 2003; Marty et al. 2003; Akaishi et al., 2004; Noroña-Barroso et al., 2004; Nero et al., 2006; Oliveira Ribeiro et al., 2005).

O fígado, por representar o principal órgão responsável pelos mecanismos de biotransformação e bioativação de xenobiontes lipossolúveis, apresenta-se como um excelente órgão alvo para estudos de danos resultantes da exposição a diferentes contaminantes (Oliveira Ribeiro et al., 2002a, 2002b; Damek-Proprawa & Sawicka-Kapusta, 2003; Padros et al., 2003; Akaishi et al., 2004; Rabitto et al., 2005), assim como pode ser constatado no presente trabalho.

Uma das razões que propiciaram a escolha do fígado como órgão alvo, foi o fato de ser um dos tecidos de maior atividade metabólica de componentes endógenos e exógenos (como poluentes), tendo, portanto um alto potencial de expressão dos efeitos deletérios na exposição a poluentes.

A presença de infiltrações leucocitárias pode ser um indicativo de lesões inflamatórias no tecido. Noreña-Barroso et al. (2004) encontraram esta patologia em cerca de 65% dos animais analisados expostos à múltiplos xenobiontes como PAHs e PCBs. O aparecimento de focos de infiltração leucocitária encontrados para *H. reticulatus* pode indicar um processo inflamatório no fígado dos peixes em virtude da exposição aos contaminantes ou mesmo expressar uma maior susceptibilidade imune à ação de agentes externos como bactérias e vírus, ou mesmo de parasitas oportunistas.

A presença de parasitas pode ser um indicativo de estresse ambiental sendo utilizado como um parâmetro morfológico (Galli et al. 2001). Em estudos de biomonitoramento, a presença de parasitas pode ser considerada um importante indicador de toxicidade, visto que o aumento da sua incidência indica diminuição na resistência imunológica, e a sua diminuição pode indicar um desequilíbrio nas relações hospedeiro-parasita do ecossistema (Akaishi, 2003). O único registro dessa incidência, porém, tende a corroborar com a falta de relação entre a exposição crônica e a debilidade imune. A presença de parasita, na ocasião, pode ser considerada um aspecto ecológico normal, porém maiores estudos seriam necessários para se obter dados conclusivos sobre alterações nos padrões de parasitismo na espécie.

Stehr et al. (2003) trabalhando com *Pleuronectes vetulus* expostos a hidrocarbonetos aromáticos, descreveram lesões no fígado como neoplasias também encontradas neste trabalho. Em estudos hitopatológicos de fígado, rins e gônadas de *Platichthys flesus*, Simpson et al. (2000) evidenciaram altos índices de focos pré-neoplásicos relacionadas à presença de múltiplos xenobiontes como metais pesados, PCBs, DDT e PAHs no estuário de Mersey – Inglaterra. Já Spies et al. (1996) identificou diversas alterações em fígado de *Hypsurus caryi* e *Rachochilus toxodes* expostos aos componentes do petróleo. Oliveira Ribeiro et al. (2005) também encontraram neoplasias em *A. anguilla* exposto a pesticidas organoclorados, PAHs e metais pesados na Reserva Natural Camargue na França.

Dentre as alterações registradas nestes trabalhos destaca-se a presença de neoplasias. Estas representam um dano extremo da exposição ao contaminante. Esse dado demonstra a ineficiência dos sistemas de detoxificação, ou mesmo sua supressão frente aos contaminantes.

Os focos neoplásicos e PAHs estão estreitamente relacionados (Myers et al., 1998) devido ao grande potencial carcinogênico destes compostos (Shailaja & D'Silva, 2004) resultado da exposição crônica (Roche et al., 2002). Estas alterações são consideradas 'lesões transicionais' entre um foco de alteração celular e um carcinoma de fígado (Nunez et al., 1991) e suas características podem indicar a natureza do distúrbio subcelular ocorrido (Boorman et al., 1997; Vethaak & Wester, 1996). No presente estudo, as características da contaminação pelo vazamento de óleo no Arroio Saldanha reforçam a ligação desse tipo de lesão pela presença dos PAHs (Köhler, 1990; Köhler et al, 1992; Myers et al., 1992, 1994; Simpson et al., 2000; Vethaak e Wester, 1996).

Os centros eosinofílicos encontrados nos exemplares no presente trabalho, podem ser considerado como um estágio pré-neoplásico (Hawkins et al., 1990) servindo ainda como um potencial biomarcador de exposição aos PAHs (Hawkins et al., 1990, Stentiford et al., 2003). Estes foram encontrados também em Stehr et al., (2003), reforçando a relação encontrada das alterações em fígado com a presença de PAHs alojados em sedimento e possivelmente biodisponibilizado pelo regime de chuvas.

Noreña-Barroso et al. (2004) encontraram tumores em *Ariopsis assimilis* expostos à xenobiontes como PCBs e PAHs na Baía de Chetumal, México. Nesse estudo, também foram evidenciados altos índices nos peixes de PAHs como benzo[a]pireno ( $30,3 \pm 88,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) de reconhecido potencial carcinogênico, sendo os mais altos índices de compostos de maiores pesos moleculares (5 anéis). Essa correlação corrobora com os dados encontrados neste trabalho levando-se em conta que foram evidenciados compostos de 5 e 6 anéis aromáticos nas amostras mais superficiais do sedimento. Estes por estarem em contato direto com as zonas de forrageamento da espécie estudada corroboram com as estreitas relações entre PAHs de altos pesos moleculares e neoplasias hepáticas.

Em brânquias, a prevalência de proliferação celular e fusão das lamelas secundárias em áreas contaminadas por múltiplos xenobiontes incluindo PAHs, também foi observada por Stentiford et al. (2003).

Alterações branquiais como aneurismas, desorganização das lamelas secundárias, proliferação celular, descolamento de epitélio branquial, fusão lamelar, descolamento de epitélio e hiperplasias em peixes expostos ao petróleo ou seus derivados já foram descritas em trabalhos prévios (Spies et al., 1996; Akaishi, 2003; Nero et al., 2006; Oliveira Ribeiro et al., 2005). Rudolph et al. (2001) constatou em brânquias de *Oncorhynchus mykiss* descolamentos de epitélio e hipertrofia celular nas bases das lamelas secundárias assim como constatado em microscopia de luz neste trabalho.

Para *H. reticulatus* foram observadas fusões lamelares de ápice e base (Figuras 8C e 8D). O aparecimento de fusão de lamelas secundárias sugere uma exposição aguda aos contaminantes. Esta lesão pode levar à fusão lamelar parcial ou completa diminuindo a superfície de trocas gasosas. Essas alterações também foram evidenciadas em *H. reticulatus*. Weinstein et al. (1997) observaram forte correlação entre a presença do PAH fluorantreno e danos à integridade das membranas de células mucosas em brânquias. Este órgão, que normalmente

apresenta um arranjo espacial paraleliforme das lamelas secundárias, indicou uma evidente alteração estrutural com forte indicativo da presença de contaminantes dissolvidos na coluna de água.

Essas alterações certamente prejudicarão o funcionamento normal do órgão, pelos processos de regulação iônica e trocas gasosas. Esses fatores indicam um comprometimento devido ao estresse respiratório que pode levar a consequências adversas nas respectivas populações.

No estudo de Oliveira Ribeiro et al. (2005) com *Anguilla anguilla*, as brânquias dos peixes coletados apresentaram além de outras patologias, a presença de parasitas internos entre as lamelas secundárias e parasitas externos assim como pode ser observado em microscopia eletrônica de varredura (Figura 9D). Da mesma forma que analisado para os dados de parasitismo no fígado, esses dados não podem ser conclusivos sobre uma fragilidade imune em função da falta de informações sobre os padrões normais dessas relações ecológicas para *H. reticulatus*.

Em estudo realizado após o vazamento de óleo e patrocinado pela PETROBRAS (Ostrenski et al., 2001), foram evidenciadas lesões hepáticas e branquiais agudas em *Corydoras paleatus* e *Astyanax sp.*

Neste estudo, cerca de 80% dos indivíduos coletados em abril de 2001 no Arroio Saldanha apresentavam descolamento do epitélio respiratório, sendo que no mesmo período, todos os indivíduos coletados apresentaram hipertrofia do epitélio branquial. Aproximadamente 66% dos peixes apresentavam proliferação celular nas lamelas branquiais, e quase 83% apresentaram fusões lamelares. Em abril de 2001, foram constatados cerca de 57% de indivíduos com infiltração leucocitária, e 14% com focos necróticos. Os maiores índices foram registrados à montante do Rio Iguaçu, nas áreas de Guajuvira e Areal Água Azul (Bases 5, 6 e 8 respectivamente, segundo classificação no estudo em questão), provavelmente acrescido pelo grande aporte de resíduos doméstico e industrial que recebe a região.

Os índices de danos branquiais em *Astyanax sp* e *C. paleatus* relacionados por Ostrenski et al. (2001) para patologias como proliferação tecidual, fusões lamelares e descolamento do epitélio branquial revelaram forte correlação com contaminação aguda. Valores mais baixos foram registrados para *H. reticulatus* (TABELA 3) provavelmente devido aos mecanismos compensatórios para essa espécie após a ocorrência do acidente.

As análises histopatológicas de fígado em Ostrenski et al. (2001) também demonstram aspectos agudos da contaminação como a presença de focos necróticos não evidenciados neste estudo para *H. reticulatus*. Em Ostrenski et al. (2001) não foram relacionados danos como focos pré-neoplásicos e neoplasias, demonstrando que tais lesões encontram-se altamente associadas com a exposição crônica como constatado no presente trabalho. Outras patologias em fígado registradas pós-acidente tiveram registros menores em *H. reticulatus* talvez por estarem mais relacionadas mais com efeitos agudos. Estes fatos corroboram com a hipótese de haver uma constante exposição dessas frações residuais do óleo biodisponíveis repercutindo em muitas das alterações crônicas observadas no presente trabalho.

As alterações registradas servem de subsídio para o fornecimento de um testemunho da condição dos organismos nesse ecossistema profundamente alterado. Cortes histológicos representam, porém, apenas uma pequena parcela do órgão, sendo incapazes de detectar a totalidade de lesões presentes a menos que sejam realizados cortes seriados que pudessem avaliar o órgão como um todo. Portanto, muitas alterações podem na realidade não terem sido constatadas neste trabalho, ou mesmo podem ter sido registradas em menor número do que realmente ocorrem.

As análises histopatológicas demonstraram que cerca de 6% dos indivíduos analisados apresentaram focos neoplásicos, outros 3%, apresentaram focos pré-neoplásicos. Essas alterações totalizam 9% da amostra populacional com tais alterações extremas. É possível que se fossem realizadas análises histológicas através de cortes seriados do material o número dessas alterações bem como outras fossem ainda maior.

## Referências Bibliográficas

- Akaishi, F.M., 2003. Avaliação do potencial tóxico da fração solúvel do petróleo em água (FSA) em *Astyanax* sp. utilizando biomarcadores de contaminação. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba/PR. 141pp.
- Akaishi, F.M., Silva de Assis, H.C., Jakobi, S.C.G., StJean, S., Couternay, S.C., Lima, E., Wagner, A.L.R., Scofield, A., Oliveira Ribeiro, C.A., 2004. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46, 244–253.
- Barra, R., Popp, P., Quiroz, R., Treutler, H., Araneda, A., Bauer, C., Urrutia, R., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons fluxes during the past 50 years observed in dated sediment cores from Andean mountain lakes in central south Chile. Ecotoxicol. Environ. Saf. 63, 52–60.
- Baumard, P., Budzinski, H., Michon, Q., Garrigues, P.H., Burgeot, T., Bellocq, J., 1998. Origin and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean Sea mussel and sediment records. Estuar. Coast. Shelf Sci. 47, 77–90.
- Beg M.U., Saeed T., Al-Muzaini S., Beg K.R., Al-Obaid T., Kurian A., 2001. Extraction, fractionation and toxicity determination of organic contaminants in sediment from Coastal Area Receiving Industrial Effluents in Kuwait. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67, 881– 888.
- Bernet, D., Schimidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. Fish Dis. 22, 25–34.
- Bogovski, S., Lang, T., Mellergaard, S., 1999. Short communication: histopathological examinations of liver nodules in flounder (*Platichthys flesus* L.) from the Baltic Sea. ICES J. Mar. Sci. 56, 152–156.
- Boorman, G.A., Botts, S., Bunton, T.E., Fournie, J. W., Harshbarger, J.C., Hawkins, W.E., Hinton, D.E., Jokinen, M.P., Okihiro, M.S., Wolfe, M.J., 1997. Diagnostic criteria for degenerative, inflammatory, proliferative nonneoplastic and neoplastic liver lesions in medaka (*Oryzias latipes*): consensus of a

- national toxicology programme pathology working group. *Toxicol. Pathol.* 25, 202–210.
- Brack, W., Altenburger, R., Ensenbach, U., Mfder, M., Segner, H., Schqqrman, G., 1999. Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediments in the industrial region of Bitterfeld (Germany)—a contribution to hazard assessment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37,164–174.
  - Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Pierrad, C., Garrigues, P., 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Mar. Chem.* 58, 85–97.
  - Canton, L., Grimalt, J.O., 1992. Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in polluted coastal sediments. *J. Chromatogr.* 607, 279–286.
  - Chiou C.T., McGroddy S.E., Kile, D.E., 1998. Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* 32, 264–269.
  - Damek-Proprawa, M., Sawicka-Kapusta, K., 2003. Damage to the liver; kidney and testis with reference to burden of heavy metals in yellow-necked mice from areas around steelworks and zinc smelters in Poland. *Toxicology* 186, 1–10.
  - De Luca, G., Futonio, A., Leardo, R., Micera, G., Panzanelli, A., Piu, P.C., Sanna, G., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons assessment in the sediments of the Porto Torre Harbor (Northern Sardinia, Italy). *Mar. Chem.* 86, 15–32.
  - Galli, P., Crosa, G., Mariniello, L., Ortis, M., D'Amelio, S., 2001. Water quality as a determinant of the composition of fish parasite communities. *Hydrobiologia* 452, 173–179.
  - Hawkins, W.E., Walker, W.W., Overstreet, R.M., Lytle, J.S., Lytle, T.E., 1990. Carcinogenetic effects of some polycyclic aromatic hydrocarbons on the Japanese medaka and guppy in waterborne exposures. *Sci. Total Environ.* 94, 155–167.
  - Hinton, D.E., Baumen, P.C., Gardener, G.C., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okhiro, M.S., 1992. Histopathological biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. (Eds.) *Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.*

Society of Environmental Toxicology and Chemistry Special Publication Series, Lewis Publishers, Chelsea, MI., USA, pp. 155–210.

- Ikenaka, Y., Eun, H., Watanabe, E., Kumon, F., Miyabara, Y., 2005. Estimation of sources and inflow of dioxins and polycyclic aromatic hydrocarbons from the sediment core of Lake Suwa, Japan. *Environ. Pollut.* 138, 529–537.
- Johnson, L.L., Casillas, E., Sol, S., Collier, T., Stein, J., Varanasi, U., 1993. Contaminant effects on reproductive success in selected benthic fish. *Mar. Environ. Res.* 35, 165–170.
- Jones, D.M., Rowland, S.J., Douglas, A.G., Howells, S., 1986. An examination of the fate of Nigerian crude oil in surface sediments of the Humber estuary by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Environ. Anal. Chem.* 24, 227–247.
- Kennicutt II, M.C., Wade, T.L., Presley, B.J., Requejo, A.G., Brooks, J.M., Denoux, G.J., 1994. Sediment contaminants in Casco Bay, Maine: inventories, sources, and potential for biological impact. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1–15.
- King, A.J., Readman, J.W., Zhou, J.L., 2004. Dynamic behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons in Brighton marina, UK. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 229–239.
- Köhler, A., 1990. Identification of contaminant-induced cellular and subcellular lesions in the liver of flounder (*Platichthys flesus L.*) caught at differently polluted estuaries. *Aquat. Toxicol.* 16, 271–294.
- Köhler, A., Deisemann, H., Lauritzen, B., 1992. Histological and cytological indices of toxic injury in the liver of the dab *Limanda limanda*. *Dis. Aquat. Organ.* 91, 141–153.
- Kowalewska G., Konat J., 1997. Distribution of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of the Southern Baltic Sea. *Oceanologia* 39, 83–104.
- Marty, G.D., Hoffmann, A., Okihiro, M.S., Hepler, K., Hanes, D., 2003. Retrospective analyses: Bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Mar. Environ. Res.* 56, 569–584.
- Maskaoui, K., Zhou, J.L., Hong, H.S., Zhang, Z.L., 2002. Contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Jiulong River Estuary and Western Xiamen Sea, China. *Environ. Pollut.* 118, 109–122.

- McGroddy, S.E., Farrington, J.W., Gschwend, P.M., 1996. Comparison of the in situ and desorption sediment-water partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. *Environ. Sci. Technol.* 30, 172–177.
- Myers, M.S., Olson, O.P., Johnson, L.L., Stehr, C.M., Hom, T., Varanasi, U., 1992. Hepatic lesions other than neoplasms in subadult flatfish from Puget Sound, WA: relationships with indices of contaminant exposure. *Mar. Environ. Res.* 34, 45–51.
- Myers, M.S., Stehr, C.M., Olson, O.P., Johnson, L.L., McCain, B.B., Chan, S-L., Varanasi, U., 1994. Relationships between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the pacific coast, USA. *Environ. Health Perspec.* 102, 200–215.
- Myers, M., Johnson, L., Hom, T., Collier, T., Stein, J., Varanasi, U., 1998. Toxicopathic hepatic lesions in subadult English sole (*Pleuronectes vetulus*) from Puget Sound, Washington USA: relationships with other biomarkers of contaminant exposure. *Mar. Environ. Res.* 45, 47–67.
- Nero, V., Farwell, A., Lister, A., Van der Kraak, G., Lee, L.E.J., Van Meer, T., Mackinnon, M.D., Dixon, D.G., 2006. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 365-377.
- Noroña-Barroso, E., Simá-Álvarez, R., Gold-Bouchot, G., Zapata-Pérez, O., 2004. Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan catfish *Ariopsis assimilis* from the Bay of Chetumal, México. *Mar. Environ. Res.* 48, 263–269.
- Nunez, O., Hendricks, J.D., Duimstra, J.R., 1991. Ultrastructure of hepatocellular neoplasms in aflatoxin B1 (AFB1)-initiated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Pathol.* 19, 11–23.
- Olajire, A.A., Altenburger, R., Kqster, E., Brack, W., 2005. Chemical and ecotoxicological assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon — contaminated sediments of the Niger Delta, Southern Nigeria. *Sci. Total Environ.* 340, 123–136.
- Oliveira Ribeiro, C.A., Schatzmann, M., Silva de Assis, H.C., Silva, P.H., Pelletier, E., Akaishi, F.M., 2002a. Evaluation of tributyltin subchronic effects in

- tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 161–167.
- Oliveira Ribeiro, C.A., Belger, L., Pelletier, É., Rouleau, C., 2002b. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). USA: *Environ. Res.* 90, 217 – 225.
  - Oliveira Ribeiro, C.A., Vollaire, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H., 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquat. Toxicol.* 74, 53–69.
  - Ostrenski, A., Chaves, P.T.C., Duboc, L.F., Guimarães, A.T.B., Cruz, S.R.Z., Wegbecher, F.X., Pilchowski, R.W., Teixeira, U.A., Belz, C.E., 2001. Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigüí e Iguaçu. In: UN-REPAR/PETROBRÁS, 2001. 2° Seminário do Rio Iguaçu. Araucária, PR, Brasil, p. 32–52.
  - Padros, J., Pelletier, E., Oliveira Ribeiro, C.A., 2003. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 192, 45–55.
  - Pereira, W.E., Hostettler, F.D., Luoma, S.N., Green, A., Fuller, C.C., Anima, R.J., 1999. Sedimentary record of anthropogenic and biogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in San Francisco Bay, California. *Mar. Chem.* 64, 99–113.
  - Rabbito, I., Alves Costa, J.R.M., Akaishi, F.M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Oliveira Ribeiro, C.A., 2005. Dietary Pb(II) and TBT (tributyltin) exposures to neotropical fish *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 147–156.
  - Readman, J.W., Bartocci, J., Tolosa, I., Fowler, S.W., Oregioni, B., Abdulraheem, M.Y., 1996. Recovery of the coastal marine environment in the Gulf following the 1991 war – related oil spills. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 493–498.
  - Roche, H., Buet, A., Ramade, F., 2002. Accumulation of lipophilic microcontaminants and biochemical responses in Eels from the Camargue biosphere reserve. *Ecotoxicology* 11, 155–164.
  - Rocher, V., Garnaud, S., Moilleron, R., Chebbo, G., 2004. Hydrocarbon pollution fixed to combined sewer sediment: a case study in Paris. *Chemosphere* 54, 795–804.

- Rudolph, A., Yanez, R., Troncoso, L., 2001. Effects of Exposure of *Onchorhynchus mykiss* to the Water Accomodated Fraction of Petroleum Hydrocarbons. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 400–406.
- Savinov, V.M., Savinova, N.T., Carroll, J., Matishov G.G., Dahle, S., NÆS, K., 2000. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Sediments of the White Sea, Russia. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 807–818.
- Schmalz, W.F., Hernandez, A.D., Weis, P., 2002. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. USA: *Mar. Environ. Res.* 54, 539–542.
- Shailaja, M.S., D'Silva, C., 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish. *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* 53, 835–841.
- Simpson, M.G., Parry, M., Kleinkauf, A., Swarbreck, D., Walker, P., Leah, R.T., 2000. Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from a UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals. *Mar. Environ. Res.* 50, 283–287.
- Soclo, H.H., Garrigues, P., Ewald, M., 2000. Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 387–396.
- Spies, R.B., Stegeman, J.J., Hinton, D.E., Woodin, B., Smolowitz, R., Okihiro, M., Shea, D., 1996. Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid fishes from a natural petroleum seep in the Santa Barbara channel. *Aquat. Toxicol.* 34, 195–219.
- Stehr, C.M., Myers, M.S., Johnson, L.L., Spencer, S., Stein, J.E., 2003. Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbor, Canada. *Mar. Environ. Res.* 57, 55–74.
- Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M., Feist, S.W., 2003. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. USA: *Mar. Environ. Res.* 55, 137–159.
- Stout, S.A., Magar, V.S., Uhler, R.M., Ickes, J., Abbott, J., Brenner, R., 2001. Characterization of naturally – occurring and anthropogenic PAHS in urban sediments – Wycof / Eagle Harbor Superfund site. *Environ. Forens.* 2, 287–300.

- Tam, N.F.Y., Ke, L., Xang, X.H., Wong, Y.S., 2001. Contamination of PAH in surface sediments of mangroves swamps. *Environ. Poll.* 114, 255–263.
- Tolosa, J., Bayona, J.M., Albaigés, J., 1996. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons and sulfur/oxygen derivatives in northwestern Mediterranean sediments: spatial and temporal variability, fluxes, and budgets. *Environ. Sci. Technol.* 30, 2495–2503.
- Veiga, I.G., 2003. Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da Baía de Todos os Santos/Bahia. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Campos/RJ. 225p.
- Vethaak, A. D., Wester, P. W., 1996. Diseases of flounder *Platichthys flesus* in Dutch coastal and estuarine waters, with particular reference to environmental stress factors. II. Liver histopathology. *Dis. Aquat. Organ.* 26, 99–116.
- Wang, X., Sun, S., Ma, H., Liu, Y., 2006. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments of Jiaozhou Bay, Qingdao, China. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 129-138.
- Weinstein, J.E., Oris, J.T., Taylor, D.H., 1997. An ultrastructural examination of the mode of UV-induced toxic action of fluoranthene in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquat. Toxicol.* 39, 1–22.
- Young L.Y., Cerniglia C.E., 1995. *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. New York. Wiley.
- Zakaria, M.P., Okuda, T., Takada, H., 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) and hopanes in stranded tar-balls on the Coasts of Peninsular Malaysia: applications of biomarkers for identifying sources of oil pollution. *Mar. Poll. Bull.* 42, 1357–1366.
- Zheng, G.J., Man, B.K.W., Lam, J.C.W., Lam, M.H.W., Lam, P.K.S., 2002. *Wat. Res.* 36, 1457–1468.
- Zhou, J.L., Fileman, T.W., Evans, S., Donkin, P., Mantoura, R.F.C., Rowland, S.J., 1996. Seasonal distribution of dissolved pesticides and polynuclear aromatic hydrocarbons in the Humber Estuary and Humber coastal zone. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 599–608.
- Zhou, J.L., Hong, H., Zhang, Z., Maskaoui, K., Chen, W., 2000. Multi-phase distribution of organic micropollutants in Xiamen Harbour, China. *Wat. Res.* 34, 2132–2150.

- Zoest, R., van Eck, G.T.M., 1990. Behaviour of particulate polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in the Scheldt Estuary, Netherlands. *J. Sea Res.* 26, 89–96.

## **CAPÍTULO II\***

**Uso de biomarcadores bioquímico e genotóxicos em *Hyphessobrycon reticulatus* (Ellis, 1911) na avaliação dos efeitos do derramamento de óleo cinco anos após o acidente.**

**Orientação:**

**Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro/ Departamento de Biologia Celular.  
UFPR**

**Colaboração:**

**Dra. Helena Cristina Silva Assis/Departamento de Farmacologia.  
UFPR**

**Dra. Marta Margarete Cestari/Departamento de Genética.  
UFPR**

---

\* Capítulo formatado de acordo com as normas da revista *Aquatic Toxicology* (ANEXO)

**CAPÍTULO II - *Uso de biomarcadores bioquímico e genotóxicos em Hyphessobrycon reticulatus (Ellis, 1911) na avaliação dos efeitos do derramamento de óleo cinco anos após o acidente.***

*Resumo*

Compostos orgânicos derivados do petróleo como PAHs podem provocar alterações na lipoperoxidação em organismos expostos, levando a produção de espécies reativas de oxigênio. Sabe-se que algumas moléculas de PAHs apresentam considerável potencial mutagênico e carcinogênico. Em 2000, cerca de 4 e meio milhões de litros de óleo vazaram de um ducto de transmissão da Refinaria Getúlio Vargas - PR (UN-REPAR/PETROBRAS), sendo que cerca de 45% do óleo ficou contido numa região denominada Arroio Saldanha. Para avaliar os danos agudos e crônicos da exposição, foram coletados o fígado e o sangue de 30 exemplares de *H. reticulatus* do Arroio Saldanha, para avaliação da lipoperoxidação pelo ensaio FOX, quebras de DNA e anomalias nucleares respectivamente através dos ensaios Cometa e Teste de Micronúcleo Písceo. Os índices de hidroperóxidos foram significativamente maiores ( $p < 0,001$ ) na Área do Arroio Saldanha quando comparados aos índices da área de referência, indicando estresse oxidativo devido a presença de PAHs e outros componentes do óleo visíveis ainda no sedimento. Os índices de danos evidenciados pelo Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleo Písceo foram significativamente maiores ( $p < 0,001$ ) no Arroio Saldanha. Os valores obtidos para lipoperoxidação encontrados no presente trabalho corroboram os dados encontrados nos testes de genotoxicidade, onde os danos no DNA indicam efeitos das frações residuais do óleo sobre a molécula diretamente, ou indiretamente pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

## Abstract

Organic compounds like PAHs present in the crude oil are potential mutagenic and carcinogenic agents. Some of these compounds can induce lipoperoxidation in exposed organisms after acute or chronic exposure with consequent effects on DNA structure. In 2000, about 4.5 million of liters of crude oil spilled from a transmission duct around the Getúlio Vargas Refinery - PR (UN-REPAR/PETROBRAS). From the total amount of crude oil spilled, about 45% was accumulated into the Saldanha Stream due to the small barriers constructed to control the oil dispersion and to protect other rivers. To evaluate the acute and chronic exposure to these residual oil fractions present in the sediment, samples of livers and blood of 30 individuals of *Hyphessobrycon reticulatus* from the Saldanha Stream were collected, to study the lipoperoxidation (FOX assay), DNA breaks and nuclear abnormalities respectively through the comet and micronucleus test assays. The presence of hidroperoxides was significantly higher ( $p < 0,001$ ) in individuals from Saldanha Stream when compared with the reference group, suggesting an oxidative stress due to presence of PAHs and others compounds of the oil detected in the sediment. The current results of the comet assay and micronucleus test, showed significantly increase frequency of DNA damages ( $p < 0,001$ ) in fishes from Saldanha Stream. The values obtained for lipoperoxidation found in the present work, corroborate the data found with the genotoxicity tests, where the damages in DNA indicates effects of the residual fractions of the oil on the molecule. Also these damages can be associated with the reactive species of oxygen (ROS) production.

## Introdução

O constante desenvolvimento urbano propicia a produção de resíduos industriais tais como bifenis policlorados (PCBs), dioxinas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), além de uma série de substâncias orgânicas que causam danos aos tecidos através da formação de radicais livres (Winston et al., 1991), podendo ocasionar peroxidação lipídica e conduzir a processos patológicos adversos (Di Giulio et al., 1995; Solé et al., 1996; Cossu et al., 1997; Doyotte et al., 1997; Canova et al., 1998; Torres et al., 2002).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é um processo fisiológico regular visto que possui um importante papel na maturação celular (Schewe et al., 1986; Matsui et al. 1997; van Leyen et al., 1998) e mobilização de lipídeos (Feussner, et al. 1995; Feussner, et al. 2001). Porém determinadas classes de contaminantes podem conduzir a efeitos deletérios (Benzie, 1996; Sevanian & Ursini, 2000) que podem resultar no mau funcionamento celular (Kozar et al., 1994; Baker & Kramer, 1999), destruição da função das membranas celulares e organelas essenciais tais como o processo de transporte, a manutenção de gradiente de metabólitos e íons e a transdução de sinais mediada por receptores (Meagher & Fitzgerald, 2000), com conseqüentes modificações estruturais dos complexos lipoprotéicos das membranas celulares (Mason et al. 1997; Girotti, 1998).

Durante a lipoperoxidação os grupos hidroperóxidos ligam-se aos sítios hidrofóbicos dos ácidos graxos insaturados, tendo este processo uma dupla conseqüência: perturbação nas interações lipídicas, que levam a alterações estruturais das biomembranas e das lipoproteínas; e a formação de espécies reativas de oxigênio, que podem induzir a modificação secundária de outros constituintes da membrana (Girotti, 2002).

Estas espécies reativas de oxigênio, produzidas em sistemas biológicos, são detoxificadas por mecanismos antioxidantes do organismo. Estes são encontrados com freqüência em organismos aquáticos e suas características já foram relatadas por outros autores (Livingstone, 1991; Livingstone et al., 1992; Avci et al. 2005).

A peroxidação lipídica apresenta expressivas respostas frente a danos oxidativos, possuindo também estreita correlação com dados genéticos.

Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) seis PAHs são prováveis carcinogênicos: benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, e indeno [1,2,3]pireno.

Dependendo da estrutura química e do nível de exposição, os PAHs e seus metabólitos têm potenciais mutagênicos e/ou carcinogênicos em peixes e em outros vertebrados, incluindo os humanos (Aas et al., 2000; Macrae & Hall, 1998; Monteiro et al., 2000). Existem fortes evidências de que este potencial esteja relacionado à sua biotransformação, com a formação de subprodutos altamente reativos que podem ligar-se ao DNA, com interferência nos processos de reparo e replicação celular, resultando em danos cromossômicos e muitas vezes carcinogênese. Segundo Al-Sabti & Metcalfe (1995), concentrações elevadas de PAHs em sedimento foram associadas a altas incidências de tumores em peixes pelágicos.

A interferência de compostos tóxicos na integridade e funcionamento do DNA, formação de adutos de DNA, anomalias nucleares vêm sendo cada vez mais utilizadas em estudo de biomonitoramento devido à alta especificidade deste tipo de lesão com os PAHs (Al-Sabti, 1986; Minissi et al., 1996; Obe et al., 2002; Bombail et al., 2001; Ferraro et al., 2004; Cestari et al. 2004).

Dentre as ferramentas para avaliação genotóxica, os ensaios Cometa e Teste de Micronúcleo Píscico constituem ferramentas valiosas devido à resposta clara e de rápida interpretação (Heddle et al., 1991; Bombail et al., 2001). Apesar do pouco conhecimento sobre os mecanismos de formação dos micronúcleos em peixes, a contagem de micronúcleos e o registro de alterações morfológicas nucleares fornecem dados importantes nas avaliações de genotoxicidade em função da sua capacidade de detecção da presença de substâncias clastogênicas na água (Al-Sabti & Metcalfe, 1995). Ao contrário de outros testes de genotoxicidade, o Ensaio Cometa fornece informações valiosas pelo fato de não necessitar de células em proliferação, podendo ser aplicado a vários tipos celulares (Padranghi et al., 1995). Além do sangue, o fígado é um dos tecidos mais estudados para Ensaio Cometa por se tratar do principal órgão do metabolismo de xenobiontes (Belpaeme et al., 1998).

## Material e Métodos

### *Lipoperoxidação*

Os animais foram transportados em caixas de isopor para o laboratório de Toxicologia Celular da UFPR, onde foram anestesiados com Benzocaína 0,04%, tomadas as medidas de comprimento total (cm) e peso total (g), e realizada a sexagem dos exemplares. Para a realização do ensaio de lipoperoxidação foram coletados os fígado de 30 indivíduos de cada área (referência e Arroio Saldanha) perfazendo 10 *pools* de 3 indivíduos cada em julho/2005.

O ensaio seguiu o método FOX descrito por Jiang et al. (1992). Para obtenção da fração sobrenadante o fígado foi desagregado em tampão fosfato (0,1M pH 6,5) no homogeneizador Potter, e as amostras centrifugadas (1000g; 10 minutos a 4°C). A cada fração sobrenadante obtida foi adicionada a solução de reação: metanol (grau HPLC) 90% (90% do volume final), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), hidroxitolueno butilado (BHT) e sulfato ferroso amoniacal (ASF) e xilenol orange para a reação de cor. A análise foi no espectrofotômetro de micro placa TECAN A-5082 (560nm) e comparadas às amostras brancas contendo apenas metanol. A concentração de proteínas totais foi quantificada pelo método de Bradford (1976).

### *Ensaio Cometa*

Os animais foram transportados em caixas de isopor para o laboratório de Toxicologia Celular da UFPR, onde foram anestesiados com Benzocaína 0,04%, tomadas as medidas de comprimento total (cm) e peso total (g), e realizada a sexagem dos exemplares. Para a realização do Ensaio Cometa, foram coletados os fígados de 30 indivíduos de cada área (referência e Arroio Saldanha) em julho/2005.

Para o teste cometa, utilizou-se a técnica descrita por Singh et al. (1988). Uma pequena porção do fígado foi colocada em solução tampão de homogeneização Tris-HCl Sacarose, e levado para desagregação de tecido em homogeneizador Potter a 1500 rpm por cerca de 30 segundos. Do produto homogeneizado retirou-se 10 µl que foi então misturado a 120 µl de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C). A suspensão celular obtida foi pipetada sobre lâminas previamente cobertas por agarose normal, e então coberta por uma lamínula e acondicionada em geladeira por 15 minutos. Decorrido o tempo de refrigeração, as lamínulas foram retiradas e levadas à solução de lise por 24

horas. Após o tempo de lise as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese no escuro, mantidas a 4°C onde foi acrescida a solução de eletroforese (pH>13) por 30 minutos para a desespiralização do DNA. A corrida eletroforética ocorreu a 25V, 300mA por 25 minutos. Após a corrida as lâminas foram neutralizadas em tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos 3 vezes. Após a secagem das lâminas estas foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos. Para as análises as lâminas foram coradas com Brometo de Etídio e visualizadas em microscópio de epifluorescência *Leica*.

#### *Teste de Micronúcleo Písceo*

Para a realização do Teste de Micronúcleo Písceo foi coletado o sangue dos mesmos indivíduos processados para o Ensaio Cometa. Para a realização da técnica utilizaram-se os métodos propostos por Heddle (1973) e Schimid (1975) com modificações. Além do registro de micronúcleos, foram registradas também as alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *H. reticulatus*.

Foi realizada a distensão de 25µl de sangue sobre uma lâmina previamente limpa. Após sua secagem, as lâminas foram fixadas em etanol P.A. (MERCK®) por 30 minutos, e coradas com GIEMSA 10%. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico *Leica*. Foi padronizada a análise dos núcleos de duas mil células por lâmina.

#### *Estatística*

Para os testes estatísticos foi utilizado o programa Bioestat 3.0. Para as análises foi utilizado nível de significância de 1%. Os índices obtidos no Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleo Písceo foram analisados através de Mann-Whitney comparando-se suas médias. Para o ensaio de Lipoperoxidação foi utilizado Kolmogorv-Smirnov comparando-se os valores de médias±SD (desvio padrão).

## Resultados

Os exemplares coletados foram os mesmos para o ensaio de Lipoperoxidação, Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleo Písceo. Os indivíduos provenientes do Arroio Saldanha apresentaram médias  $\pm$  SD de peso(g)  $2,16 \pm 0,64$ , comprimento total(cm)  $5,43 \pm 0,58$  e um percentual entre machos e fêmeas de M(43%) e F(57%). Na área de referência, para os mesmos parâmetros, os indivíduos apresentaram médias  $\pm$  SD de peso(g)  $2,17 \pm 0,54$ , comprimento total(cm)  $5,71 \pm 0,65$  e um percentual entre machos e fêmeas de M(36%) e F(64%), não havendo assim, diferenças significativas entre os grupos analisados.

### Lipoperoxidação

Os resultados para os níveis de produção de hidroperóxidos em tecido hepático de *Hyphessobrycon reticulatus* do Arroio Saldanha em relação à área de referência está representado na Figura 10. Foram constatados níveis mais elevados da formação de hidroperóxidos nos indivíduos provenientes do Arroio Saldanha ( $28,38 \pm 3,75 \text{ nmol.mg}^{-1}$ ) em relação à área referência ( $15,64 \pm 3,86 \text{ nmol.mg}^{-1}$ ).

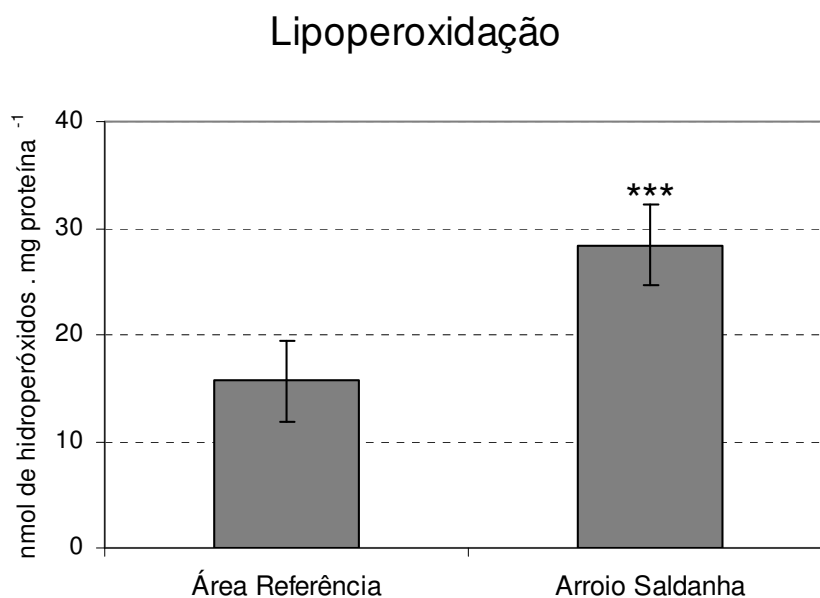


FIGURA 10: Níveis de hidroperóxidos encontrados no tecido hepático de *Hyphessobrycon reticulatus* (n = 30). (\*\*\*) Diferença estatística (P<0,001) do sítio Arroio Saldanha em relação à área de referência.

### Ensaio Cometa

Foram analisadas 100 células (nucleóides) de cada indivíduo, totalizando 3000 nucleóides de cada área de estudo. Os danos aos nucleóides seguiram a classificação: 0 (sem dano aparente), 1 (danos pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano máximo) e 4 (morte celular) conforme a Figura 11.

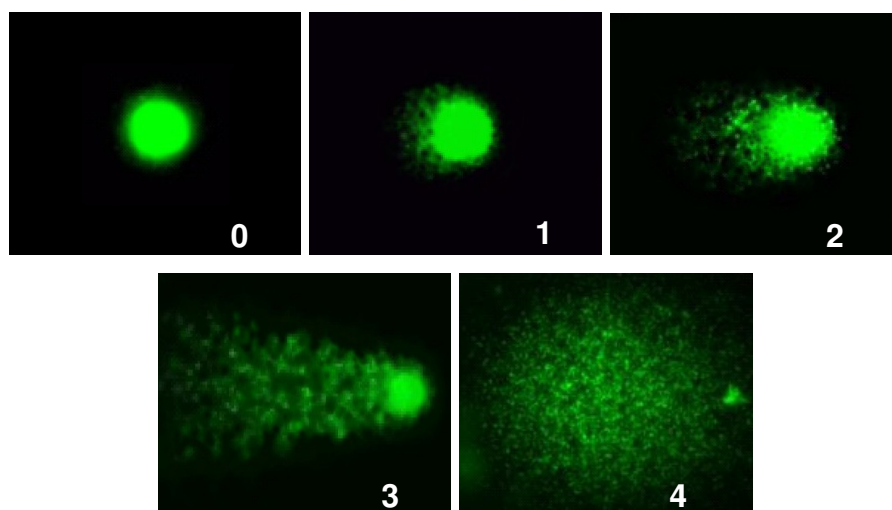


FIGURA 11: Ensaio Cometa – Classificação dos danos no DNA por categoria.

Para o cálculo dos escores estabeleceu-se uma relação numérica multiplicando-se o valor correspondente à gravidade das quebras nas fitas de DNA (Figura 11) pela sua ocorrência em cada lâmina analisada. Dos resultados individuais das lâminas foram obtidas médias dos grupos analisados (referência e Arroio Saldanha), sendo estes escores então comparados estatisticamente.

Os resultados para os escores de quebras de DNA em tecido hepático de *Hyphessobrycon reticulatus* provenientes do Arroio Saldanha em relação à área referência está representado na Figura 12 e Tabela 4. Foram observados níveis mais elevados de danos no DNA em espécimes provenientes do Arroio Saldanha ( $210,67 \pm 20,69$ ) em relação aos exemplares coletados na área de referência ( $58 \pm 16,39$ ).

## Ensaio Cometa

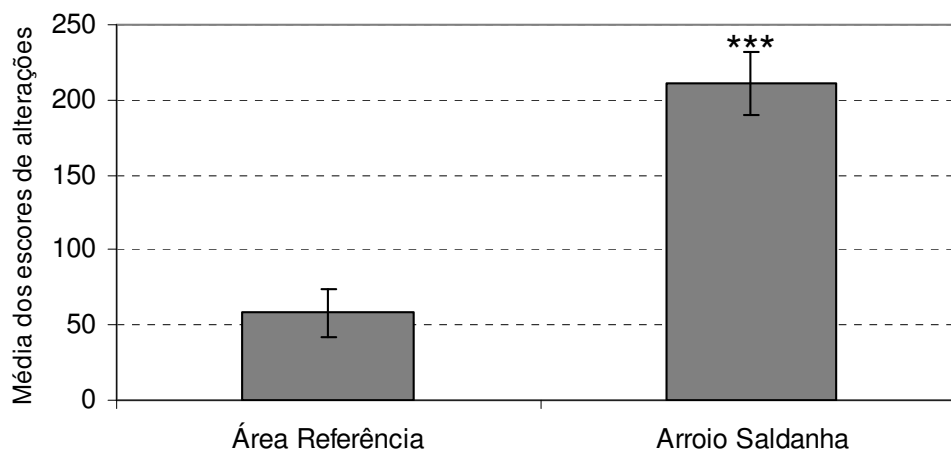


FIGURA 12: Média dos escores das quebras de DNA encontradas no tecido hepático de *Hyphessobrycon reticulatus* (n = 30). O símbolo (\*\*\*) indica diferença estatística ( $P < 0,001$ ) do sítio Arroio Saldanha em relação à área referência.

TABELA 4 – Soma dos escores e medianas obtidas em fígado de *H. reticulatus* do Arroio Saldanha e Área Referência.

	Arroio Saldanha	Área Referência
Soma dos escores	6320	1740
Mediana dos escores	210	54

### Teste de Micronúcleo Písceo

Para o cálculo dos escores do Teste de Micronúcleo Písceo, foram contabilizados os números de células com micronúcleos somados as células com alterações morfológicas nucleares de um total de 2000 células analisadas em cada lâmina. Assim sendo, foram obtidas posteriormente as médias de células alteradas dos grupos analisados (referência e Arroio Saldanha) que foram então comparadas estatisticamente.

Para o Teste de Micronúcleo Písceo foram encontradas também diferenças significativas entre os peixes provenientes do Arroio Saldanha e da área de referência ( $p < 0,001$ ) (Figura 14). As alterações morfológicas nucleares foram classificadas de acordo com Carrasco et al (1990) e as registradas em maior número foram dos tipos *notched* e *lobed* (Figuras 13A, 13B e 13C, 13D respectivamente) e a presença do micronúcleo (Figura 13F). A Figura 13E apresenta eritrócitos de peixes da área referência.

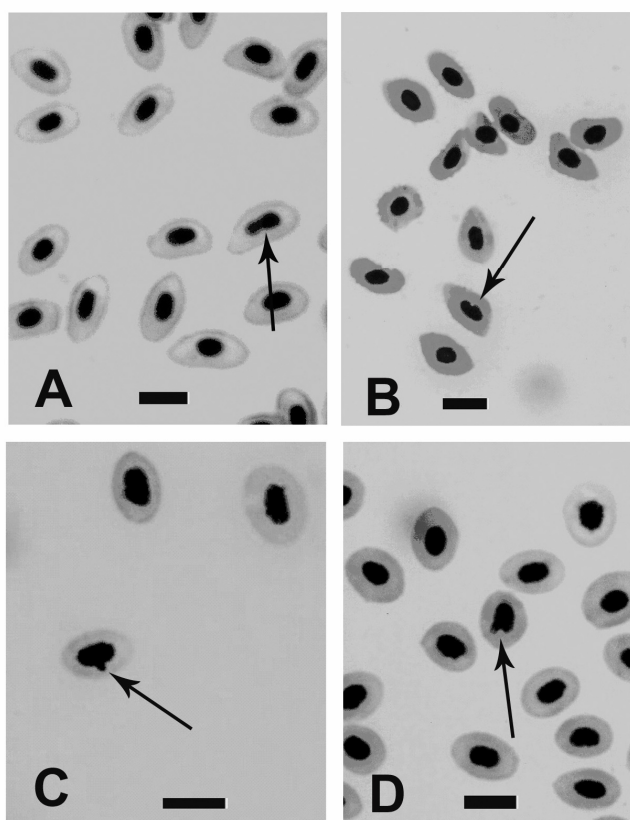


FIGURA 13: Eritrócitos de *Hyphessobrycon reticulatus*. Coloração Giemsa 10%. A e B – alterações morfológicas dos tipos *notched* (seta). C e D – alterações morfológicas do tipo *lobed* (seta). Barra = 50  $\mu$ m.

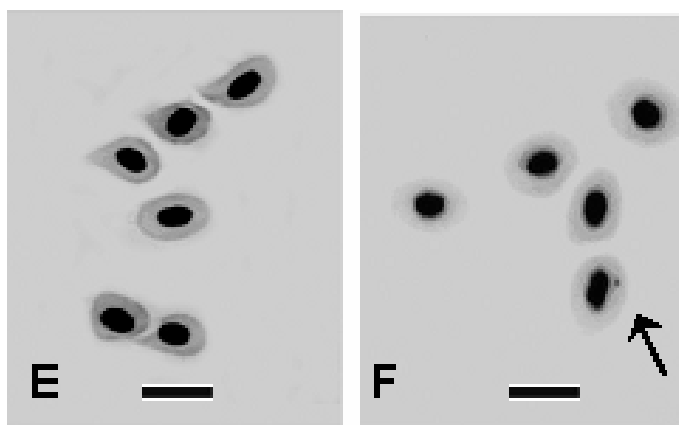


FIGURA 13 (CONTINUAÇÃO): Eritrócitos de *Hyphessobrycon reticulatus*. Coloração Giemsa 10%. E - Eritrócitos da Área Referência. F - Presença de micronúcleo (seta) em eritrócito da área referência. Barra = 50 μm.

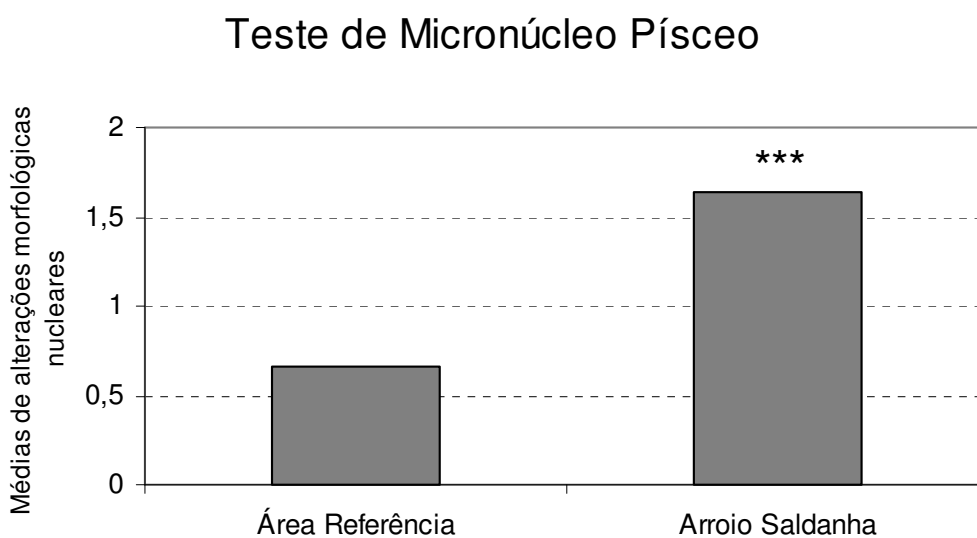


FIGURA 14: Médias do número de alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de *Hyphessobrycon reticulatus* (n = 30). O símbolo (\*\*\*) indica diferença estatística ( $P < 0,001$ ) do sítio Arroio Saldanha em relação à área referência.

## Discussão

Variações nos níveis de lipoperoxidação vêm sendo apresentadas como uma resposta eficiente na exposição a poluentes em organismos aquáticos (Thomas & Wofford, 1993; Remeo & Gnassia-Barelli, 1997; Sridevi et al., 1998). O aumento significativo encontrado nos níveis de lipoperoxidação em *Hyphessobrycon reticulatus* permite inferir que estes animais estão sob estresse oxidativo pela exposição aos PAHs encontrados no sedimento (Capítulo I).

Vários estudos demonstraram que o aumento da lipoperoxidação em organismos aquáticos está associado a elevadas concentrações de xenobióticos. Cossu et al. (1997) observaram danos oxidativos em *Unio tumidus* expostos a contaminantes como PAHs em rios poluídos da França. Shi et al. (2005) observaram um aumento significativo nos índices de lipoperoxidação em *C. auratus* exposto ao naftaleno, demonstrando a estreita relação entre PAHs e a elevação das taxas de lipoperoxidação.

Barron et al. (2005) descreveram um aumento significativo na lipoperoxidação em fígado de *Onchorhynchus gorboscha* expostos ao óleo cru. Os mesmos autores relatam danos à integridade das brânquias atribuídos às abruptas reações de lipoperoxidação no tecido associada à exposição à radiação UV (Barron et al. 2005). Estes estudos corroboram diretamente com os resultados obtidos para *H. reticulatus*.

Wilhelm Filho et al. (2001) demonstraram a eficiência da avaliação da lipoperoxidação como biomarcador de estresse oxidativo em espécies neotropicais de água doce expostas a diversas classes de contaminantes como PAHs.

Associado aos acidentes de petróleo, Almroth et al. (2005) encontraram um aumento dos níveis de lipoperoxidação em *Zoarces viviparus* após exposição crônica aos efeitos do derrame de óleo tipo *bunker* em *Göteborg Harbor*, tendo sido comprovado como um eficiente ensaio para o biomarcador. Os dados mencionados acima mostram que como nos dados discutidos neste trabalho, os níveis alterados de lipoperoxidação possuem uma relação direta entre a exposição aos PAHs e a geração de espécies reativas, aumentando o potencial oxidativo na célula.

Mais recentemente, a avaliação simultânea das alterações bioquímicas junto às informações de testes para a avaliação genotóxica, tem recebido atenção especial nos estudos de biomonitoramento ambiental.

Frenzilli et al. (2004) encontraram altos níveis de danos ao DNA associados à lipoperoxidação em *Göteborg Harbor* um ano após a ocorrência do derramamento

de óleo. Analisando a mesma área, Sturve et al. (2005) encontraram ainda um expressivo aumento de atividade para EROD, níveis de CYP1A em fígado e metabólitos de PAHs em bile para a mesma espécie.

A forma mais direta de efeito da lipoperoxidação por PAHs foi descrita por Xu et al. (1999), onde os danos ao material genético (adutos de DNA) foram associados a inativações enzimáticas e lipoperoxidação em *Perna viridis*.

PAHs, particularmente benzo[a]pireno podem ser metabolizados e reduzidos gerando metabólitos quimicamente instáveis com alto potencial de gerar estresse oxidativo (Cheung et al., 2001) e danos genéticos.

Sendo assim, os dados de lipoperoxidação encontrados no presente trabalho corroboram com os dados encontrados nos testes de genotoxicidade, onde os danos ao DNA podem estar diretamente associados também à produção de espécies reativas de oxigênio. Estas moléculas altamente reativas são conhecidas por atuarem sobre a estrutura de macromoléculas celulares como proteínas e ácidos nucléicos.

Os dados obtidos pelo Teste de Micronúcleo Písceo e o registro de alterações morfológicas nucleares em avaliações genotóxicas confirmam sua utilidade e eficiência em estudos de biomonitoramento para detectar agentes genotóxicos ambientais (Rao et al., 1997).

Embora os mecanismos para sua formação não sejam inteiramente explicados, diversos estudos indicam que as alterações morfológicas nucleares são induzidas em resposta à exposição aos agentes genotóxicos (Tolbert et al., 1992; Serrano-Garcia & Montero-Montoya, 2001). A hipótese para explicar a formação de tais alterações é a ocorrência de problemas durante a segregação das cromátides no processo de divisão celular, ou mesmo durante a amplificação gênica (Shimizu et al., 1998).

Há diversos estudos na literatura que indicam a indução das alterações morfológicas nucleares em organismos aquáticos expostos a xenobiontes sob condições de laboratório. Por exemplo, altas frequências de alterações morfológicas nucleares foram detectadas em eritrócitos de *Mytilus galloprovincialis* expostos ao benzo[a]pireno (Vernier et al., 1997).

Ayllon & Garcia-Vazquez (2000) relataram a indução de alterações em eritrócitos de *Phoxinus phoxinus* após o tratamento com colchicina, mitomicina-C e ciclofosfamida, e Çavas & Ergene-Gozukara (2003) demonstraram a indução de alterações em eritrócitos e células do epitélio branquial de *O. niloticus* expostos a

resíduos de refinaria do petróleo. Resíduos de refinaria do petróleo induziram aparentemente a formação de várias anomalias nucleares como as formas *lobed* e *blebbed* em significativo aumento quando comparado ao grupo controle (Çavas et al., 2005). Tais resultados também foram observados para *H. reticulatus* neste trabalho.

As alterações na estrutura do DNA incluindo rupturas, modificações na ordem da seqüência de bases no DNA, tem sido encontradas associadas com a exposição à um grande número de contaminantes, incluindo os PAHs (Padrangi et al., 1995; Steinert, 1996; Steinert et al., 1998). Muitos PAHs e seus metabólitos são conhecidos pelo seu potencial carcinogênico (Aas et al., 2001) sendo considerados os compostos derivados do petróleo de maior potencial tóxico (Yanik et al., 2003). Alguns dos metabólitos produzidos por PAHs são altamente reativos e possuem uma alta afinidade com a molécula de DNA, realizando pontes covalentes com essa e resultando na formação de adutos (Pisoni et al. 2004). As alterações nas cadeias de DNA podem causar críticas mutações e levar a uma cascata de eventos subseqüentes levando, dentre outros a morte celular, disfunções na replicação e reparação das fitas ou mesmo a um processo descontrolado de divisões celulares (Vernier, 2001) o que pode gerar neoplasias nos tecidos.

Sendo a ativação metabólica ocorrida geralmente no fígado, o Ensaio Cometa hepático apresenta-se como uma ferramenta mais sensível para detectar respostas genotóxicas em peixes do que o ensaio sanguíneo (Metcalf, 1989; Williams e Metcalf, 1992; Arcand-Hoy & Metcalf, 2000). As quebras do DNA evidenciadas pelo Ensaio Cometa podem estar relacionadas ao sistema de reparo da própria célula ou da exposição a contaminantes ambientais (Fairbairn et al., 1995), porém a diferença significativa encontrada entre os exemplares de *H. reticulatus* provenientes do Arroio Saldanha e da área de referência corrobora com a estreita relação entre a exposição aos resíduos químicos do Arroio Saldanha e o resultado encontrado no Ensaio Cometa.

A avaliação dos danos do DNA através do Ensaio Cometa é considerada um método eficaz para o monitoramento dos efeitos de PAHs como comprovado nesse estudo, assim como tem sido eficaz na detecção de danos gerados por PAHs e outros compostos xenobióticos (Padrangi et al., 1995; Steinert et al., 1998; Aas et al., 2000).

Estudos prévios já relacionavam a presença de PAHs a danos genéticos como quebras nas fitas de DNA (Mitchelmore et al., 1998; Cotellet & Féraud, 1999),

tendo sido demonstrado para hemolinfa de *Mytilus edulis* expostos a vários agentes genotóxicos como benzo[a]pireno (Mitchelmore et al., 1998).

Mitchelmore et al. (1998) também observaram quebras em DNA devido à exposição à xenobiontes como PAHs, como relatado no presente trabalho, e mais recentemente Laffon et al. (2006), observaram aumento de quebras de DNA significativo no monitoramento do naufrágio do petroleiro *Prestige* na costa da Galícia.

Esses dados servem de apoio aos resultados encontrados não apenas na aparente relação entre derivados do petróleo e danos genéticos, mas também na gravidade dos efeitos gerados por vazamentos de derivados do petróleo em diversos ecossistemas, como ambientes dulcícolas no Arroio Saldanha.

Além disso, os resultados apresentados demonstram concordância entre os índices de lipoperoxidação e alterações genotóxicas, garantindo a validade dos ensaios juntos como forma de avaliação da qualidade ambiental da biota.

## Referências Bibliográficas

- Aas, E. Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., Andersen, O.K., 2000. PAH metabolites in bile, citochrome P450 1A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquat. Toxicol.* 51, 241–258.
- Aas, E., Beyer, J., Jonsson, G., Reichert, W.L., Andersen, O.K., 2001. Evidence of uptake, biotransformation and DNA binding of polyaromatic hydrocarbons in Atlantic cod and corkwing wrasse caught in the vicinity of an aluminium works. *Mar. Environ. Res.* 52, 213–229.
- Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A., Förlin, L., 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers *Aquat. Toxicol.* 73, 171–180.
- Al-Sabti, K., 1986. Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochem. Physiol.* 85, 5–9.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121–135.
- Arcand-Hoy, L.D., Metcalfe, C.D., 2000. Hepatic micronuclei in brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) as a biomarkers for exposure to genotoxic chemicals. *J. Great Lakes Res.* 26, 408–415.
- Avci, A., Kaçmaz, M., Durak, I., 2005. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 101–105.
- Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: as assessment of the fish micronucleus test. *Mutat. Res.* 467, 177–186.
- Baker, R.C., Kramer, R.E., 1999. Cytotoxicity of short-chain alcohols. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 127–150.
- Barron, M.G., Carls, M.G., Short, J.W., Rice, S.D., Heintz, R.A., Rau, M., Di Giulio, R., 2005. Assessment of the phototoxicity of weathered Alaska North Slope crude oil to juvenile pink salmon. *Chemosphere.* 60, 105–110.

- Belpaeme, K., Cooreman, K., Kirsch-Volders, M., 1998. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat. Res.* 415, 167–184.
- Benzie, I.F., 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 47, 233–261.
- Bombail, V., Aw, D., Gordon, E., Batty, J., 2001. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere.* 44, 383–392.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–256.
- Canova, S., Degan, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., Voltan, R., Vernier, P., 1998. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat. Res.* 399, 17–30.
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminants effects. *Can. J. Fish. Sci.* 47, 2123–2136.
- Çavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.* 538, 81–91.
- Çavas, T., Garanko, N.N., Arkhipchuk, V.V., 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food Chem. Toxicol.* 43, 569–574.
- Cestari, M.M., Lemos, P.M.M., Oliveira-Ribeiro, C.A., Costa, J.R.M.A., Pelletier, E., Ferraro, M.V.M., Mantovani, M.S., Fenocchio, A.S., 2004. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Gen. Mol. Biol.* 27, 270–274.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*, *Aquat. Toxicol.* 52, 189–203.

- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., 1997. Gluthatione reductase, selenium dependent gluthatione peroxidase, gluthatione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 38, 122–131.
- Cotelle, S., Férard, J., 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ. Mol. Mutagen.* 34, 246–255.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1995. Biochemical Mecanisms: Metabolism, Adaptation and Toxicity. In: Avci, A., Kaçmaz, M., Durak, I., 2005. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60,101–105.
- Doyotte, A, Cossu, C., Jacquin, M.C. , 1997. Antioxidant enzymes, gluthatione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental on field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumindus*. *Aquat. Toxicol.* 39, 93–110.
- Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339, 37–59.
- Ferraro, M.V.M., Fenocchio, A.S., Mantovani, M.S., Cestari, M.M., Oliveira-Ribeiro, C.A., 2004. Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated of using the Comet Assay, Piscine Micronucleous and Chromosome Aberrations tests. *Gen. Mol. Biol.* 27, 103–107.
- Feussner, I., Wasternack, C., Kindl, H., Kühn, H., 1995. Lipoxygenase catalysed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination of cucumber. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 11849–11853.
- Feussner, I., Kühn, H., Wasternack, C., 2001. The lipoxygenase dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci.* 6, 268–273.
- Frenzilli, G., Scarcelli, V., Barga, I.D., Nigro, M., Forlin, L., Bolognesi, C., Sturve, J., 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbour. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen.* 552, 187–195.
- Girotti, A.W., 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39, 1529–1542.
- Girotti, A.W., 2002. Serial Review: Regulatory and Cytoprotective Aspects of Lipid Hydroperoxide Metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 154–172.

- Heddle, J.A., 1873. A rapid *in vivo* test for chromossome damage. *Mutat. Res.* 18, 187–192.
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, M.D., Tucker, J.D., Vanprais, P.H., McGregor, J.T., 1991. Micronuclei as a index of Citogenetic Damage: past, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.* 18, 277–291.
- Jiang, Z-Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detectation of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384–389.
- Kozar, R. A., McKeone, B. J., Pownall, H. J., 1994. Free radical induced alterations in endothelial cell function. *J. Surg. Res.* 56, 32–36.
- Laffon, B., Rábade, T., Pásaro, E., Méndez, J., 2006. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. *Environ. Internat.* 32, 342–348.
- Livingstone, D.R., 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: Gilles, R. (Ed.), *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, 7. Springer, Berlin, pp. 45–185.
- Livingstone, D.R., Lips, F., Garcia Martinez, P., Pipe, R.K., 1992. Antioxidant enzymes in digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Biol.* 112, 265–276.
- Macrae, J., Hall, K., 1998. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in marine sediment under denitrifying conditions. *Water Sci. Technol.*, 38, 177–185.
- Mason, R.P., Walter, M.F., Mason, P.E., 1997. Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 419–425.
- Matsui, K., Shibata, Y., Tateba, H., Hatanaka, A., Kajiwara, T., 1997. Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 199–201.
- Meagher, E.A.; Fitzgerald, G.A., 2000. Indices of lipid peroxidation *in vivo*: Strengths and limitation. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 202–226.
- Metcalfe, C.D., 1989. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocyte of Mudminnows (*Umbra limi*) and Brown Bullheads (*Ictalurus nebulosus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 489–495.

- Minissi, S., Ciccotto, E., Rizzoni, M., 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutat. Res.* 367, 245–251.
- Mitchelmore, C.L., Birmelin, C., Chipman, J.K., Livingstone, D.R., 1998. Evidence for cytochrome P450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo[a]pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells. *Aquat. Toxicol.* 41, 193–212.
- Monteiro, P.R.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 2000. Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* 49, 453–467.
- Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J.R.K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A.T., Martínez-Lopez, W., Folle, G.A., Drets, M.E., 2002. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat. Res.* 504, 17–36.
- Padrangi, R., Petras, M., Ralph, S., Vrzoc, M., 1995. Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ. Mol. Mutagen.* 26, 345–356.
- Pisoni, M., Cogotzi, L., Frigeri, A., Corsi, I., Bonacci, S., Iacocca, A., Lancini, L., Mastrototaro, F., Focardi, S., Svelto, M., 2004. DNA adducts, benzo[a]pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilus galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy). *Environ. Res.* 96, 163–175.
- Rao, S.S., Neheli, T., Carey, J.H., Cairns, V.W., 1997. Fish hepatic micronuclei as an indication of exposure to genotoxic environmental contaminants. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12, 217–222.
- Remeo, M., Gnassia-Barelli, M., 1997. Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean Clam *Ruditapes decussatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 118, 33–37.
- Schewe, T., Rapoport, S. M., Kühn, H., 1986. Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 58, 191–272.
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31, 9–15.
- Serrano-Garcia, L., Montero-Montoya, R., 2001. Micronuclei and chromatine buds are related genotoxic events. *Environ. Mol. Mutagen.* 38, 38–45.

- Sevanian, A., Ursini, F., 2000. Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 306–311.
- Shi, H., Sui, Y., Wang, X., Luo, Y, Ji, L., 2005. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140, 115–121.
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., Vahl, G.M., 1998. Selective entrapment of extrachromosomally DNA by nuclear budding and micronucleation during the S phase. *J. Cell Biol.* 140, 1307–1320.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Solé, M., Porte, C., Biosca, X., Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., Livingstone, D.R., Albaigés, J., 1996. Effects of the “Aegean Sea” oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNAadducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis L.*). *Comp. Biochem. Physiol.* 113, 257–265.
- Sridevi, B., Reddy, K.V., Reddy, S.L.N., 1998. Effect of trivalent and hexavalent chromium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab, *Barytelphusa guerini*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 384–390.
- Steinert, S.A., 1996. Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. *Mar. Environ. Res.* 42, 253–259.
- Steinert, S.A., Streib-Montee, R., Leather, J.M., Chadwick, D.B., 1998. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat. Res.* 399, 65–85.
- Sturve, J., Berglund, A., Balk, L., Broeg, K., Böhmert, B., Massey, S., Savva, D., Parkkonen, J., Stephensen, E., Koehler, A., Förlin, L., 2005. Effects of dredging in Göteborg harbour assessed by biomarkers in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 223–230.
- Thomas, P., Wofford, H.W., 1993. Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. *Aquat. Toxicol.* 27, 159–178.
- Tolbert, P.E., Shy, A.C., Allen, J.W., 1992. Micronuclei and other nuclear abnormalities in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.* 271, 69–77.

- Torres, M.A., Testa, C.P.; Gáspari, C., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Poll. Bull.* 44, 923–932.
- Van Leyen, K., Duvoisin, R. M., Engelhardt, H., Wiedmann, M. A., 1998. Function for lipoygenase in programmed organelle degradation. *Nature* 395, 392–395.
- Venier, P., Maron, S., Canova, S., 1997. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. *Mutat. Res.* 390, 33–44.
- Vernier, P., 2001. DNA adducts detection in mussels exposed to bulkyaromatic compounds in laboratory and field conditions. In: Pisoni, M., Cogotzi, L., Frigeri, A., Corsi, I., Bonacci, S., Iacocca, A., Lancini, L., Mastrototaro, F., Focardi, S.; Svelto, M., 2004. DNA adducts, benzo[a]pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilus galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy). *Environ. Res.* 96, 163–175.
- Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Tribess, T.B., Pedrosa, R.C., Soares, C.H.L., 2001. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 34, 719–726.
- Williams, R.C., Metcalfe, C.D., 1992. Development of an in vivo hepatic micronucleus assays with rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 23, 193–202.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.
- Xu, L., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Richardson, B.J., 1999. Relationship between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA adducts in green-lipped mussels (*Perna viridis*). *Ecotoxicology* 8, 73–82.
- Yanik, P.J., O'Donnell, T.H., Macko, S.A., Qian, Y., Kennicutt, I., Mahlon, C., 2003. The isotopic compositions of selected crude oil PAHs during biodegradation. *Org. Geochem.* 34, 291–304.

## 7. Discussão Geral

As últimas décadas têm sido marcadas por acidentes com vazamento de petróleo e seus derivados em diferentes ambientes e diferentes escalas de grandeza e impacto. No entanto dois grandes acidentes marítimos merecem destaque: em março de 1978 o vazamento do petroleiro *Amoco Cadiz* (Inglaterra) com a mortalidade em massa de peixes demersais (GUNDLACH et al. 1983) dentre outros, e o vazamento de óleo cru do petroleiro *Exxon Valdez*, sendo considerado o maior vazamento da história dos Estados Unidos (CARLS et al., 2004).

MARTY et al. (2003) estudando os impactos do derramamento do *Exxon Valdez* em espécies de peixes demersais observaram com relação a parâmetros histopatológicos, alterações que perduraram mesmo após anos transcorridos. Para outros parâmetros também foram observados efeitos crônicos (WOODIN & STEGEMAN, 1993; COLLIER et al., 1996).

HAENSLY et al. (1982) estudando os efeitos pelo derramamento do petroleiro *Amoco Cadiz* também registraram efeitos crônicos.

Seis anos após o derramamento do *Exxon Valdez*, ainda encontravam-se traços de petróleo no sedimento e em moluscos (CARLS et al., 2001) ao longo da costa de *Prince William Sound*.

PIETRAPIANA et al. (2002) observaram que após o acidente com o vazamento de 36.000 toneladas de óleo do petroleiro *Haven*, os peixes dessa área estavam sujeitos constantemente a baixas doses de hidrocarbonetos ao longo dos anos.

Estudos revisados por NEFF & STUBBLEFIELD (1995) sobre o acidente com o petroleiro *Exxon Valdez* concluíram que a maior parte da fração solúvel em água (FSA) do petróleo já tinha sido perdida nos primeiros momentos do acidente, enquanto que frações de PAHs de maior peso molecular e maior estabilidade química permaneceram no ambiente e são cerca de 1000 vezes mais tóxicas que as frações perdidas (HEINTZ, SHORT, & RICE, 1999).

No acidente de 16 de julho de 2000, a intensa atividade de escavações para a retirada do óleo no Arroio Saldanha produziu óleos em fase livre. Essas frações, antes boa parte adsorvidas em partículas orgânicas do sedimento, perfundiram o sedimento ampliando a profundidade de contaminação do solo (NETO et al., 2001). Embora sejam difíceis de avaliar, sabe-se que as emissões atmosféricas de

hidrocarbonetos através da alta atividade industrial da região podem ter contribuído como fonte pirolítica de hidrocarbonetos.

Particularmente os compostos de 5 a 6 anéis benzênicos são alguns dos PAHs com potencial carcinogênico e mutagênico (LAW et al., 2002). Em virtude disso, estes PAHs são listados pela OSPAR Commission (OSPAR, 2005) como alguns dos produtos químicos de prioridade de ação.

Em ambientes aquáticos a toxicidade dos PAHs aumenta com o peso molecular, e sua bioacumulação tende a ser rápida (PEDROZO et al., 2002). Uma vez na coluna da água, esses PAHs especialmente persistentes ligam-se à partículas orgânicas e sedimentam-se (GUSTAFSSON et al., 1997; McGRODDY et al., 1996). Os dados de análise química do sedimento apresentados neste trabalho indicam um somatório de fontes de contaminação agindo sobre a área (atividade industrial somada as frações residuais do óleo derramado) e mostram de forma preocupante que algumas formas de reconhecido potencial tóxico encontram-se disponíveis nas frações mais superficiais do sedimento, mesmo que transcorridos cinco anos após o acidente.

As interações entre ROS e o DNA, assim como outras macromoléculas, resultando em quebras nas fitas de DNA já foram observadas por outros autores (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984; MARNETT, 1999). Sendo assim, o estresse oxidativo apresentado pelos valores de lipoperoxidação está comprovadamente relacionado com efeitos adversos como hepatotóxicos e genotóxicos pela formação de espécies reativas de oxigênio, como demonstrado neste trabalho.

Evidências mais recentes sugerem que os radicais livres associados com a exposição a compostos aromáticos, podem também estar relacionados aos danos ao DNA hepático. Esta hipótese é evidenciada pela presença de focos neoplásicos em fígado dos exemplares coletados no Riacho Saldanha. Tais resultados são importantes a partir do momento que os exemplares provenientes da área de referência não apresentaram os mesmos tipos de alterações.

MYERS et al. (1998) demonstraram uma relação entre o aparecimento de neoplasias associado ao aumento na atividade de CYP1A em peixes expostos a PAHs. Segundo KASPRZAK (2002), a formação de focos carcinogênicos em mamíferos teve como consequência também o estresse oxidativo. A exposição a compostos aromáticos como o naftaleno está associada com diversas manifestações tóxicas (SCHREINER, 2003), porém alguns trabalhos indicam que a que sua toxicidade está intrinsecamente relacionada à formação de ROS e ao estresse

oxidativo (BAGCHI et al., 2002; STOHS; OHIA; BAGCHI, 2002; VIJAYAVEL et al., 2004).

A correlação entre os focos carcinogênicos e os altos índices de danos encontrados no Ensaio Cometa na população de *Hyphessobrycon reticulatus* do presente trabalho, revelam uma efetiva resposta dos efeitos dos resíduos de óleo ainda presentes e biodisponíveis no sedimento do Riacho Saldanha mesmo 5 anos após o acidente.

Tudo indica, portanto, que a formação de neoplasias em *H. reticulatus* provenientes do Arroio Saldanha é resultante de um processo de detoxificação ineficiente ou insuficiente (BRESCHIA et al., 1999). MALINS et al. (1988) já haviam constatado uma correlação entre a presença de neoplasias hepáticas em *Parophrys vetulus* e a concentração de hidrocarbonetos em sedimento.

Um fator que provavelmente tenha contribuído para o aparecimento de tais danos crônicos em *H. reticulatus*, foi a construção de barreiras de contenção do óleo nas desembocaduras dos braços de riachos na ocasião do acidente. Estas construções foram uma estratégia eficiente para reduzir a dispersão do óleo derramado e evitar conseqüências mais drásticas ao abastecimento de água de muitos municípios ribeirinhos ao Rio Iguaçu. No entanto, esta medida teve como conseqüência o represamento do óleo no Arroio Saldanha onde cerca de 45% do seu total ficou retido na área na ocasião do acidente (MENICONI et al., 2002) submetendo as populações locais a concentrações mais elevadas das frações do óleo.

BICKHAM et al. (2000), sugerem que a constante exposição dos contaminantes sobre a estrutura genética de populações naturais, como no Arroio Saldanha, poderia levá-las a duas prováveis conseqüências: ou a variabilidade genética pode ser aumentada pelo aparecimento de novas mutações, ou a variabilidade é diminuída pelo efeito gargalo sobre a população onde a exposição contínua a um dado contaminante selecionaria indivíduos mais aptos a sobrevivência nestas dadas condições.

Baseado nas hipóteses de BICKHAM et al. (2000), é possível que a presença dessas frações residuais do óleo tenha contribuído para uma alteração na organização das populações locais do Arroio Saldanha devido a constante exposição. Assim sendo estariam agora estabelecidas populações com uma maior tolerância à presença desses compostos tóxicos.

Atualmente constante exposição de animais e populações humanas a um número crescente de xenobióticos constitui umas das principais causas do estabelecimento de vários processos mutagênicos (Di GIULIO et al., 1995). Associado a isso, é comprovado pela literatura que compostos tais como PAHs, dioxinas, e furanos possuem efeitos fisiológicos e patológicos em populações de peixes e outros vertebrados e invertebrados em concentrações subletais (GOKSØYR & HUSØY, 1998).

O conhecimento sobre as fontes de contaminação ambiental, comportamento e distribuição dos compostos químicos no ambiente, é um requisito essencial para um melhor controle das atividades humanas responsáveis pela contaminação e poluição de ambientes por PAHs. Tais estudos podem influenciar a tomada de decisão quanto à limpeza e remediação dos locais impactados (FIGUEIREDO, 1999; STOUT et al., 2001).

Este trabalho mostrou que a aplicação de diferentes biomarcadores associados a análises químicas, constitui a forma mais acertada para se obter um diagnóstico mais seguro.

O presente estudo vem a contribuir com o incremento de informações sobre biomarcadores aplicados ao estudo dos impactos de vazamentos de petróleo em água doce, bem menos estudado quando comparado aos impactos sobre o ambiente marinho. Sendo assim, estes dados vêm subsidiar informações sobre atitudes mitigadoras de proteção ambiental de ecossistemas aquáticos dulcícolas expostos a compostos policíclicos aromáticos.

Esse estudo indica ainda que a região necessita de maiores investimentos em projetos de recuperação ambiental.

## 8. Conclusões

- A espécie *Hyphessobrycon reticulatus* mostrou-se um organismo capaz de expressar os efeitos tóxicos de componentes do óleo como PAHs, comportando-se satisfatoriamente como uma espécie bioindicadora para o presente estudo;
- Os resultados de análise química do perfil do sedimento de um dos tributários do Arroio Saldanha mostram que cinco anos após a ocorrência do acidente, ainda persistem no sedimento quantidades significativas de alguns compostos de grande potencial tóxico;
- Os dados demonstram uma relação entre a presença das frações residuais do óleo resultante do vazamento de 2000 e as alterações encontradas através dos biomarcadores utilizados na avaliação, evidenciando a biodisponibilidade destes compostos;
- O potencial genotóxico dos PAHs ainda presentes no Arroio Saldanha ficou evidenciado pela presença de neoplasias no fígado, pelos altos índices de lipoperoxidação e pelos dados genotóxicos através das lesões na estrutura e organização do DNA;
- A análise conjunta dos resultados apresentados neste trabalho demonstra de forma incontestável que as populações de peixes presentes no Arroio Saldanha encontram-se ainda seriamente comprometidas apesar de transcorridos cinco anos desde o acidente em 2000.

## 9. Referências Bibliográficas

- ADAMS, M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem stress**. Maryland: American Fisheries Society Bethesda, USA, 2002.
- AKAISHI, F.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; JAKOBI, S.C.G.; STJEAN, S.; COUTERNAY, S.C.; LIMA, E.; WAGNER, A.L.R.; SCOFIELD, A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 46, p. 244–253, 2004.
- ATSDR – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Total petroleum hydrocarbons. 1999. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles>. Acesso em: 20 de ago. 2005.
- BAGCHI, D.; BALMOORI, J.; BAGCHI, M.; YE, X.; WILLIAMS, C.B.; STOHS, S.J. Comparative effects of TCDD, endrin, naphthalene and chromium (VI) on oxidative stress and tissue damage in the liver and brain tissues of mice. **Toxicology**, v. 175, p. 73 – 78, 2002.
- BAINY, A.C.D. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. **Ciência e Cultura**, n. 45, p.10 –11, 1993.
- BAINY, A.C.D.; SAITO, E.; CARVALHO, P.S.M.; JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v. 34, p.151 –162, 1996.
- BEYER, J., SANDVIK, M., HYLLAND, K., FJELD, E., EGAAS, E., AAS, E., SKARE, J.U., GOKSØYR, A. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sørfrjorden, **Norway Aquatic Toxicology**, v. 36, p.75 – 98, 1996.
- BICKHAM, J. W.; SHABEG, S.; HEBERT, P.D.N.; CHIKHI, L.; ATHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**, v. 463, p. 33 – 51, 2000.
- BRAUNER, C.J.; BALLANTYNE, C.J.; VIJAYAN, M.M.; VAL A.L. Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate levels and ion

- regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. **Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, n. 123, p. 127 – 134, 1999.
- BRESCIA, G.; CELOTTI, L.; CLONFERO, E.; NEUMANN, H.G.; FORNI, A.; FOÀ, V.; PISONI, M.; FERRI, G.M.; ASSENNATO, G. The influence of cytochrome P4501A1 and glutathione-S-transferase M1 genotypes on biomarker levels in coke-oven works. **Archives Toxicology**, v. 73, p. 431 – 439, 1999.
  - CARLS, M.G.; BABCOCK, M.M.; HARRIS, P.M.; IRVINE, G.V.; CUSIK, J.A.; RICE, S.D. Persistence of oiling in mussels bed after the Exxon Valdez oil spill. **Marine Environment Research**, v. 51, p. 167 – 190, 2001.
  - CARLS, M.G.; HARRIS, P.M.; RICE, S.D. Restoration of oiled mussels beds in Prince William Sound, Alaska. **Marine Environment Research** v. 57, p. 359 – 376, 2004.
  - COLLIER, T.K.; KRONE, C.A.; KRAHN, M.M.; STEIN, J.E.; CHAN, S-L.; VARANASI, U. Petroleum exposure and associated biochemical effects in subtidal fish after the Exxon Valdez oil spill. **American Fisheries Society Symposium**, v. 18, p. 671 – 683, 1996.
  - Di GIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. **Biochemical Mecanisms: Metabolism, Adaptation and Toxicity**. In: RAND, G. (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. London: Taylor & Francis , 1995.
  - FIGUEIREDO, L.H.M. **Investigação das contribuições orgânicas antrópicas e naturais em sedimentos costeiros utilizando-se hidrocarbonetos marcadores** – Tese de doutorado – PUCRJ, Rio de Janeiro/RJ, 169p., 1999.
  - FOUCHÉCOÛRT, M.O.; ARNOLD, M.; BERNY, P.; VIDEMANN, B.; RETHER, B.; RIVIÉRE, J.L. Assessment of the bioavailability of PAHs in rats exposed to a polluted soil by natural routes: induction of EROD activity and DNA adducts and PAH burden in both liver and lung. **USA: Environmental Research**, v. 80, p. 330 – 339, 1998.
  - GERY, J. **Characoids of the world**. T.F.H. Publications, Inc., 672 p., 1977.
  - GOKSØYR, A.; HUSØY, A.M. Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish. **Fish Ecotoxicology**, n. 86, p.165 – 202, 1998.

- GUNDLACH, E.R.; BOEHM, P.D.; MARCHAND, M.; ATLAS, R.M.; WARD, D.M.; WOLF, D.A. The fate of Amoco Cadiz oil. **Science**, n. 221, p. 122 – 129, 1983.
- GUSTAFSSON, O.; HAGHSETA, F.; CHAN, C.; MACFARLANE, J.; GSCHWEND, P.M. Quantification of the dilute sedimentary soot-phase: Implication for PAH speciation and bioavailability. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 203 – 209, 1997.
- HAENSLY, W.E.; NEFF, J.M.; SHARP, J.R.; MORRIS, A.C.; BEDGOOD, M.F.; BOEM, P.D. Histopathology of *Pleuronectes platessa* L. from Amber Wrach and Amber Benoit, Brittany, France: long-term effects of the Amoco Cadiz crude oil spill. **Journal of Fish Diseases**, v. 5, p. 365 – 391, 1982.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, v. 219, p. 1 – 14, 1984.
- HEINTZ, R.A.; SHORT, J.W.; RICE, S.D. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Onchorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil. **Environment Toxicology Chemistry**, v. 18, p. 494 – 503, 1999.
- HOM, T.; VARANASI, U.; STEIN, J.E.; SLOAN, C.A.; TILBURY, K.L.; CHAN, S-L. Assessment of the exposure of subsistence fish to aromatic compounds after the Exxon Valdez oil spill. **American Fisheries Society Symposium**, v. 18, p. 856 – 866, 1996.
- HOWERTON, S.B.; GOODPASTER, J.V.; MCGUFFIN, V.L. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples by selective fluorescence quenching. **USA: Analytica Chimica Acta**, n. 459, p. 61 – 73, 2002.
- INGENITO, L.F.S.; DUBOC, L.F.; ABILHOA, V. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do alto Rio Iguaçu, Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciência Veterinária - UNIPAR**, v. 7 p. 23 – 36, 2004.
- JEWETT, S.C.; DEAN, T.A.; WOODIN, B.R.; HOBERG, M.K.; STEGEMAN, J.J. Exposure to hydrocarbons 10 years after the Exxon Valdez oil spill: evidence from cytochrome P4501A expression and biliary FACs in nearshore demersal fishes. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 21 – 48, 2002.
- KAMMERER, M.; MASTAIN, O.; LE DRÉAN-QUENECH'DU, S.; POULIQUEN H.; LARHANTEC, M. Liver and kidney concentrations of vanadium in oiled

- seabirds after the Erika wreck. **Science of the Total Environment**, v. 333, p. 295 – 301, 2004.
- KASPRZAK, K. Oxidative DNA and protein damage in metalinduced toxicity and carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, p. 958 – 967, 2002.
  - KHAN, R.A.; NAG, K. Estimation of hemosiderosis in seabirds and fish exposed to petroleum. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, p. 125 – 131, 1993.
  - KIRBY, M.F.; NEALL, P.; TYLOR, T. EROD activity measured in flatfish from the area of the Sea Empress oil spill. **Chemosphere**, v. 38, p. 2929 –2949, 1999.
  - KRAHN, M.M.; BURROWS, D.G.; YLITALO, G.M.; BROWN, D.W.; WIGREN, C.A.; COLLIER, T.K.; CHAN, S-L.; VARANASI, U. Mass spectrometric analysis for aromatic compounds in bile of fish sampled after the Exxon Valdez oil spill. **Environmental Science and Technology**, v. 26, p. 116 – 126, 1992.
  - LAW, R.J.; KELLY, C.; BAKER, K.; JONES, J.; MCINTOSH, A.D.; MOFFAT, C.F. Toxic equivalency factors for PAH and their applicability in shellfish pollution monitoring studies. **Journal of Environmental Monitory**, v. 4, p. 383 – 388. 2002.
  - LEE, J.; CHEON, J.; LEE, K.; LEE, S.; LEE, M. Factors affecting the distribution of hydrocarbon contaminants and hydrogeochemical parameters in a shallow sand aquifer. **Journal of Contamination Hydrology**, v. 50. p. 139 – 158, 2001.
  - LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; PEZZI DA SILVA, J.F.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASSATI L.; BERTACO V.A. **Genera Incertae Sedis in Characidae**. p. 106 – 168. In: **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil, 2003
  - MALINS, D.C.; MCCAIN, B.B.; LANDAHL, J.T.; MYERS, M.S.; KRAHN, M.M.; BROWN, D.W.; CHAN, S.; ROUBAL, W.T. Neoplastic and other diseases in fish in relation to toxic chemicals: an overview. **Aquatic Toxicology**, v.11, p. 43 – 67, 1988.

- MARIGÓMEZ, I.; SOTO, M.; CANCIO, I.; ORBEA, A.; GARMENDIA, L.; CAJARAVILLE, M.P. Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill (Monitoring Campaign 2003). **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, p. 287 – 304, 2006.
- MARNETT, L.J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research**, v. 424, p. 83 – 95, 1999.
- MARTY, G.D.; OKIHIRO, M.S.; BROWN, E.D.; HANES, D.; HINTON, D.E. Histopathology of adult Pacific herring in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 56, p. 419 – 426, 1999.
- MARTY, G.D.; HOFFMANN, A.; OKIHIRO, M.S.; HEPLER, K.; HANES, D. Retrospective analyses: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. **Marine Environment. Research**, v. 56, p. 569 – 584, 2003.
- MCGRODDY, S.E.; FARRINGTON, J.W.; GSCHWEND, P.M. Comparison of the in situ and desorption sediment-water partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. **Environmental Science and Technology**, v. 30, p.172 – 177, 1996.
- MENICONI, M.F.G.; GABARDO, I.T.; CARNEIRO, M.E.R.; BARBANTI, S.M.; SILVA, G.C.; MASSONE, C.G. Brazilian Oil Spills Chemical Characterization—Case Studies. **Environmental Forensics**, v. 3, p. 303 – 321, 2002.
- MYERS, M.; JOHNSON, L.; HOM, T.; COLLIER, T.; STEIN, J.; VARANASI, U. Toxicopathic hepatic lesions in subadult English sole (*Pleuronectes vetulus*) from Puget Sound, Washington USA: relationships with other biomarkers of contaminant exposure. **Marine Environment Research**, v. 45, p. 47 – 67, 1998.
- NEFF, H.M. **Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment sources, fates and biological effects**. UK: Applied Science Publishers Ltd., Inglaterra, 1979.
- NEFF, J.M.; STUBBLEFIELD, W.A. **Chemical and toxicological evaluation of water quality following the Exxon Valdez oil spill**. In: WELLS, P.G.; BUTLER, J.N.; HUGHES, J.S. (Eds.) **Exxon Valdez oil spill: fate and effects in Alaskan waters**, p.141–177. Philadelphia, USA, 1995.

- NETO, A.C.B.; CAICEDO, N.L.; MELO, C.L. **Avaliação da contaminação do lençol freático na área do ponto zero (Município de Araucária, Paraná)**. In: **UN-REPAR/PETROBRÁS. 2º Seminário do Rio Iguaçu**, p. 90 – 93. Araucária/PR, 2001.
- 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, p. 53 – 69, 2005.
- OSPAR Comission. <http://www.ospar.org>. Acessado em setembro/2005
- OSTRENSKI, A.; CHAVES, P.T.C.; DUBOC, L.F.; GUIMARÃES, A.T.B.; CRUZ, S.R.Z.; WEGBECHER, F.X.; PILCHOWSKI, R.W.; TEIXEIRA, U.A.; BELZ, C.E. **Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos rios Barigui e Iguaçu**. In: **UN-REPAR/PETROBRÁS. 2º Seminário do Rio Iguaçu**, p. 32 – 52, Araucária/PR, 2001.
- OVERTON, E.B.; ASHTON, B.M.; MILES, M.S. Historical Polycyclic aromatic and petrogen hydrocarbon loading in Northern Central Gulf of Mexico shelf sediments. USA: **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 557– 563, 2004.
- PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M.; CORSEUIL, H.X.; SCHENEIDER, M.R.; LINHARES, M.M. **Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo**. Série Cadernos de Referência Ambiental, v.12, 229 p., Salvador/BA, 2002.
- PIETRAPIANA, D.; MODENA, M.; GUIDETTI, P.; FALUGI, C.; VACCHI, M. Evaluating the genotoxic damage and hepatic tissue alterations in demersal fish species: a case study in the Ligurian Sea (NW-Mediterranean). **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 238 – 243, 2002.
- RADI, A.A.R.; MATKOVICS, B. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein content and lipid peroxidation of carp tissues. **Biochemical Physiology**, v. 90, p. 60 – 72, 1988.
- REICHERT, W.L.; MYERS, M.S.; PECK-MILLER, K.; FRENCH, B.; ANULACION, B.F.; COLLIER, T.K.; STEIN, J.E.; VARANASI, U., Molecular epizootiology of genotoxic events in marine fish: linking contaminant exposure, DNA damage, and tissue-level alterations. **Mutation Research**, v. 411, p. 215 – 225, 1998.
- SCHREINER, C.A. Genetic toxicity of naphthalene: a review. **Journal of Toxicology Environment Health**, v. 6, p.161 – 183, 2003.

- SIES, H. **Oxidative stress: Introductory remarks** Academic Press, London, UK. In: SIES, H. **Oxidative Stress**, London: Academic Press, p. 1 – 8, 1985.
- SOLÉ, M.; PORTE, C.; BIOSCA, X.; MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K.; LIVINGSTONE, D.R.; ALBAIGES, J. Effects of the “Aegean Sea” oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis*). **Comparative Biochemical Physiology**, v. 113, p. 257 – 265, 1996.
- STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. **Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect**. In: HUGGETT, R.J., KIMERLY, R.A., MEHRLE JR., P.M., BERGMAN, H.L. (Eds.) **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**, Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 1992.
- STEGEMAN, J.J. **Cytocrome P450 Forms in Fish**. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v. 105, 1993.
- STOHS, S.J.; OHIA, S.; BAGCHI, D. Naphthalene toxicity and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 180, p. 97 – 105, 2002.
- STOUT, S.A.; MAGAR, V.S.; UHLER, R.M.; ICKES, J.; ABBOTT, J.; BRENNER, R. Characterization of naturally – occurring and anthropogenic PAHS in urban sediments – Wycof / Eagle Harbor Superfund site – **Environmental Forensics**, v. 2 , p. 287 – 300, 2001.
- TORRES, M.A.; TESTA, C.P.; GÁSPARI, C., Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 923 – 932, 2002.
- USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. United States Office of Emergency. Environmental Protection and Remedial. Oil Program Center. **Understanding oil spills and oil spill response in freshwater environments**. Washington, 1999.
- VIGNIER, V.; VANDERMEULEN, J.H.; SINGH, J.; MOSSMAN, D. Interannual mixed function oxidase (MFO) activity in Winter Flounder (*Pleuronectes americanus*) from a coal tar contaminated estuary. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 51, p. 1368 –1375, 1994.

- VIJAYAVEL, K.; GOMATHI, D.; DURGABHAVANI, K.; BALASUBRAMANIAN, M.P. Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible marine crab *Scylla serrata*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 429 – 433, 2004.
- WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis. Londres, 321p., 1996.
- WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J. Elevated P4501A protein in intertidal fish in Prince William Sound associated with the Exxon Valdez oil spill. **Marine Environmental Research**, v. 35, p. 203 – 204, 1993.

## ANEXO

*Os referidos capítulos seguem as normas abaixo citadas com alterações para servir ao formato consultivo de dissertação.*

### **AQUATIC TOXICOLOGY**

#### **Submission of manuscripts**

Submission of an article is understood to imply that the article is original and unpublished and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content.

Manuscripts should be submitted online by using the Elsevier Editorial System at: <http://ees.elsevier.com/aqtox>

#### **Preparation of manuscripts**

1. Manuscripts should be written in English. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review. The following external services are offered here for your consideration only: *International Science Editing Limited* and *Asia Science Editing* offer a language and copyediting service to authors who want to publish in scientific peer-reviewed journals. All of their science editors are native English speakers and those working for International Science Editing Limited also have postgraduate qualifications and experience in science research. For more information please see: <http://www.internationalscienceediting.com/> or <http://asiascienceediting.com/>. With Asia Science Editing, Elsevier has negotiated a rate of EUR 0.024 per word (ca EUR 6 per page). A EUR 10 handling fee per

manuscript is added, if payment is by credit card. Different rates apply for mathematic-based manuscripts. Turnaround time is typically 5 days.

2. Manuscripts should have wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered in the upper right-hand corner. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Underline words that should be in italics, and do not underline any other words. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

- Title (should be clear, descriptive and concise)
- Name(s) of author(s): Complete postal address(es) of affiliations. Present address(es) of author(s) if applicable, full telephone, fax numbers and E-mail addresses of the corresponding author
- Abstract
- Keywords (normally 3-6 items). Please refer to the cumulative index
- Introduction
- Material studied, area descriptions, methods, techniques
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.
- References
- Tables
- Figure captions

4. In typing the manuscript, titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. If a special instruction to the copy editor or typesetter is written on the copy it should be encircled. The typesetter will then know that the enclosed matter is not to be set in type. When a typewritten character may have more than one meaning (e.g. the lower case letter l may be confused with the numeral 1), a note should be inserted in a circle in the margin to make the meaning clear to the typesetter. If Greek letters or uncommon symbols are used in the manuscript, they should be written very clearly, and if necessary a note such as "Greek lower-case chi" should be put in the margin and encircled.

7. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

### **Abstracts**

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should provide a very brief introduction to the problem and a statement about the methods used in the study. This should generally be followed by a brief summary of results, including numerical data (means and standard errors, for example). The abstract should end with an indication of the significance of the results.

### **Tables**

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Drawn tables, from which prints need to be made, should not be folded.

4. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

5. Each table should be typewritten on a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.

6. Each table should have a brief and self-explanatory title.

7. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurements should be added between parentheses.
8. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
9. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

### **Illustrations**

1. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
2. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
3. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
4. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
5. Explanations should be given in the typewritten legend. Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
6. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity. Sharp and glossy copies are required. Reproductions of photographs already printed cannot be accepted.
7. Colour illustrations cannot usually be included, unless the cost of their reproduction is paid for by the author.

### **Colour illustrations**

Submit colour illustrations as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. Polaroid colour prints are not suitable. If, together with your accepted article, you

submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version.

For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see:

<http://authors.elsevier.com/artwork>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you opt to not pay for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

## **References**

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1993) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1994, pp. 12-16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and

chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1994a, 1994b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. *For periodicals*

Van der Weiden, M.E.J., Bleumink, R., Seinen, W., van den Berg, M., 1994. Concurrence of P450 1A induction and toxic effects in the mirror carp (*Cyprinus carpio*), after administration of a low dose of 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Aquat. Toxicol.* 19, 147-162.

b. *For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical*

Benzie, J.A.H., Ballment, E., Frusher, S., 1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. In: Gall, G.A.E., Chen, H., (Eds.), *Genetics in Aquaculture IV. Proceedings of the Fourth International Symposium, 29 April-3 May 1991, Wuhan, China.* *Aquaculture* 111, 89-93.

c. *For books*

Gaugh, Jr., H.G., 1992. *Statistical Analysis of Regional Yield Trials.* Elsevier, Amsterdam.

d. *For multi-author books*

Stegeman, J.J., 1993. The cytochromes P450 in fish. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), *Molecular Biology Frontiers. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, 2.* Elsevier, Amsterdam, pp. 137-158.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references according to the International *List of Periodical Title Word Abbreviations*.

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

### **Formulae**

1. Formulae should be typewritten, if possible. Leave ample space around the formulae.

2. Subscripts and superscripts should be clear.

3. Greek letters and other non-Latin or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter I.

4. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

5. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

6. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

7. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of  $e$  are often more conveniently denoted by exp.

8. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$ .

9. In chemical formulae, valence of ions should be given as e.g.  $\text{Ca}^{2+}$  not as  $\text{Ca}^{++}$ .

10. Isotope numbers should precede the symbols, e.g.  $^{18}\text{O}$ .

11. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as  $P_2O_5$ ).

### **GenBank/DNA sequence linking**

DNA sequences and GenBank Accession numbers Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. A1631510, A1631511, A1632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

### **Footnotes**

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

### **Nomenclature**

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.
2. All biota (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

**Copyright**

1. An author, when quoting from someone else's work or when considering reproducing an illustration or table from a book or journal article, should make sure that he is not infringing a copyright.
2. Although in general an author may quote from other published works, he should obtain permission from the holder of the copyright if he wishes to make substantial extracts or to reproduce tables, plates, or other illustrations. If the copyright-holder is not the author of the quoted or reproduced material, it is recommended that the permission of the author should also be sought.
3. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.
4. A suitable acknowledgement of any borrowed material must always be made.

**Proofs**

One set of proofs will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed.

**Offprints**

1. Twenty-five offprints will be supplied free of charge.
2. Additional offprints can be ordered on a print order form, which is included with the proofs.
3. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra offprints.

