



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA POLITÉCNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL URBANA**



**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM CORPOS D'ÁGUA UTILIZANDO UM  
BIOMARCADOR DE COMPOSTOS AROMÁTICOS: ESTUDO EM RECEPTOR DE  
EFLUENTES INDUSTRIAIS**

**GRAÇA REGINA ARMOND MATIAS**

Salvador - Bahia

2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA POLITÉCNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL URBANA**



**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM CORPOS D'ÁGUA UTILIZANDO UM BIOMARCADOR DE COMPOSTOS AROMÁTICOS: ESTUDO EM RECEPTOR DE EFLUENTES INDUSTRIAIS**

**GRAÇA REGINA ARMOND MATIAS**

**Orientador: Dr. Lafayette Dantas da Luz**

**Co-orientação: Dr<sup>a</sup>. Iracema Andrade Nascimento**

Salvador - Bahia

Novembro/2007

**GRAÇA REGINA ARMOND MATIAS**

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM CORPOS D'ÁGUA UTILIZANDO UM  
BIOMARCADOR DE COMPOSTOS AROMÁTICOS: ESTUDO EM RECEPTOR DE  
EFLUENTES INDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia Ambiental Urbana- MEAU, Universidade Federal da Bahia – UFBA, em cumprimento às exigências para obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lafayette Dantas da Luz  
Co-orientadores: Prof. Dra. Iracema Andrade Nascimento

Salvador

2007

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Matias, Graça Regina Armond  
M433a Avaliação ecotoxicológica em corpos d'água utilizando um biomarcador de compostos  
aromáticos: estudo em receptor de efluentes industriais [manuscrito] / Graça Regina Armond  
Matias. - 2008.  
109 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

**Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental Urbana) – Universidade  
Federal da Bahia,**

**Escola Politécnica, 2008.**

Orientador: Prof. Dr. Lafayette Dantas da Luz, Departamento de Engenharia Ambiental.

1. Toxicologia. 2. Citocromo P450. 3. EROD. 4. *Oreochromis niloticus*. I.Título.

CDU 597:515.355

**GRAÇA REGINA ARMOND MATIAS**

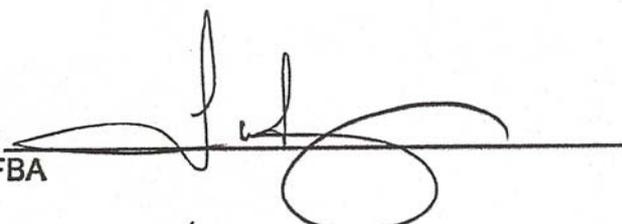
**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM CORPOS D'ÁGUA UTILIZANDO UM BIOMARCADOR DE COMPOSTOS AROMÁTICOS: ESTUDO EM RECEPTOR DE EFLUENTES INDUSTRIAIS**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Ambiental Urbana.

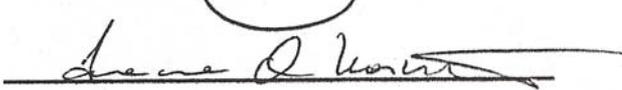
Salvador, 23 de Novembro de 2007

Banca Examinadora:

Prof. PhD. Lafayette Dantas da Luz  
Universidade Federal da Bahia –UFBA



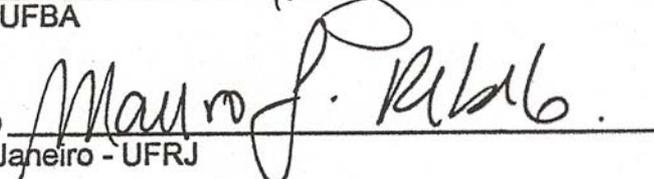
Profa. Dra. Iracema Andrade Nascimento  
Universidade Federal da Bahia –UFBA



Profa. Dra. Viviana Maria Zanta  
Universidade Federal da Bahia –UFBA



Prof. Dr. Mauro de Freitas Rebelo  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



Salvador

2007

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a minha família, pelo amor, compreensão e confiança depositados em mim.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado força e tranquilidade para transpor todas as dificuldades encontradas durante esta caminhada. Obrigada, Senhor, por me permitir a concretização deste momento.

A meus pais Ubiratan Conceição Matias e Regina Célia Armond de Araújo Matias e ao meu irmão Ubiratan Conceição Matias Júnior pelo apoio, carinho e amor em todas as etapas da minha vida.

A meu companheiro Fábio Santos Ferreira pela compreensão e auxílio incondicional, sem o qual não teria conseguido.

À toda a minha família pela compreensão e ausência em momentos importantes da nossa vida.

À Escola Politécnica da UFBA e a todos os professores desta jornada que me acolheram e tornaram possível a viabilização de um sonho que é a concretização deste trabalho

Ao LABIOMAR e aos meus amigos do Instituto de Biologia, pelo auxílio em todos os momentos.

À Prof. Iracema Andrade Nascimento pela acolhida em seu grupo de pesquisa, compreensão, apoio e dedicação à mim, concedendo todo o recurso para a realização deste trabalho; à FAPESB pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Prof. Lafayette Dantas da Luz pela orientação e acolhida neste mestrado.

Ao Prof. Mauro de Freitas Rebelo, um agradecimento especial, pela acolhida em seu laboratório na Universidade Federal do Rio de Janeiro e pela orientação atendida.

Ao amigo Thiago Estevam Parente pela acolhida em seu Laboratório na Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ pelos ensinamentos das técnicas que foram primordiais para execução do trabalho experimental.

A toda a equipe do TECLIM pela ajuda nas coletas e recursos financeiros através do projeto ECOBRASKEM.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram ao sucesso deste trabalho.

Muito Obrigada!!!!

## RESUMO

Este trabalho avaliou a biodisponibilidade de hidrocarbonetos aromáticos em lagoas de retenção de efluentes não orgânicos de uma área industrial em Camaçari, Bahia, para averiguar a possibilidade de reuso em processos industriais com base nas respostas biológicas em tilápias *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) expostas a água e sedimento. As amostras de água e sedimento, foram coletadas de oito pontos distintos no local de estudo, seguindo metodologias adequadas. A análise baseou-se na indução dos citocromos P450 da subfamília 1A (CYP1A), que são enzimas envolvidas na oxidação de xenobióticos e vem tendo grande sucesso como biomarcadores de exposição a hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) e outros poluentes oriundos de atividades industriais. A utilização desta técnica é associada ao aumento da atividade enzimática da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) nos hepatócitos que, embora seja uma medida indireta da expressão da proteína CYP4501A, vem sendo identificada como primeiro sinal para avaliar a indução deste sistema, devido a sua elevada sensibilidade e especificidade. Os resultados indicam que os peixes submetidos à água superficial e sedimento da área de estudo foram expostos a indutores de CYP1A, por apresentarem um aumento significativo da EROD ficando expostos às amostras os testes referentes quando comparados ao controle; entretanto, esta contaminação pode ser definida como significativamente moderada, provavelmente pela menor biodisponibilidade dos contaminantes presentes.

**PALAVRAS-CHAVE:** HPAs; Citocromo P450; Biomarcadores; Biomonitoramento de Recursos Hídricos.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the water and sediment quality, in terms of toxic responses and biodisponibility, of contaminants in an area, in the Camaçari, Bahia. In order to characterize the effect of contamination in this freshwater ecosystem juveniles of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Were used the organisms were exposed to water and sediments sampled in eight distinct sites of the study area according adequate methodologies. The analysis was based on Cytochromes P450 subfamily 1A (CYP1A), which are enzymes involved in the xenobiotics oxidation successfully used as exposition biomarker for poliaromatics hydrocarbons (HPAs) and other deriving pollutants of industrial activities. The use of this technique is frequently associated to the increase of the enzymatic activity of Ethoxiresorufin-*O*-deetilase (EROD) in hepatocytes. Even thought that effect is taken as an indirect measure of the expression of protein CYP4501A, often it is identified as the first answer of this induction system due to its high sensitivity and specificity. Results indicated that the fishes exposed to surface water and sediment from de pond exhibited CYP1A inductors, presenting a significant increase of the EROD in relation to negative control, in fishes exposed to some of the local samples. However this contamination can be defined as moderate, probably because the aromatics present in the system was not bioavailable.

**KEYWORD:** HPAs; Cytochrome P450; Biomarker; Biomonitoring.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01-	Seqüência temporal dos efeitos do estresse de poluentes (SINDERMAN, 1996)	22
Figura 02-	Ativação do BaP e formação de aductos com macromoléculas; em foco a representação esquemática na região de baía (COSTA, 2001).	27
Figura 03-	Esquema de biotransformação de xenobióticos (RAND <i>et al.</i> , 1995).	31
Figura 04-	Fases da biotransformação de xenobióticos (COSTA, 2001).	31
Figura 05-	P450 (MARCUSSEN, 1997)	34
Figura 06-	Estrutura de uma hemoproteína (Fonte: MARCUSSEN, 1997).	34
Figura 07-	Mecanismos de ação da CYP1A. (Fonte: REBELO, 2002).	35
Figura 08-	Sistema de ação do citocromo P450 (STEGMAN <i>et al.</i> , 1987)	36
Figura 09	<i>Oreochomis niloticus</i> .	39
Figura 10-	Foto aérea da área de estudo (Fonte: CETREL).	41
Figura 11-	Mapa de localização dos pontos de coleta, gerado pelo software Arc View.	41
Figura 12-	Garrafa de Van Dorn/; coleta de amostras líquidas.	42
Figura 13-	Coleta de Sedimento através da Draga de Pettersen	43
Figura 14-	Momtagem dos testes com amostras líquidas	44
Figura 15-	Montagem dos testes com amostras líquidas	44
Figura 16-	Montagem dos testes de sedimento	44
Figura 17-	Montagem dos testes de sedimento	44
Figura 18-	Determinação de proteínas totais por espectrometria através da técnica de Bradford.	45
Figura 19-	Determinação de proteínas totais por espectrometria através da técnica de Bradford.	45
Figura 20-	Biometria e Sacrificio dos animais testes	45
Figura 21-	Biometria e Sacrificio dos animais testes	45
Figura 22-	Biometria e Sacrificio dos animais testes	45
Figura 23-	Retirada do fígado, separação e congelamento em N2 (liq.)	46
Figura 24-	Retirada do fígado, separação e congelamento em N2 (liq.)	46
Figura 25-	Retirada do fígado, separação e congelamento em N2 (liq.)	46
Figura 26-	Esquema de obtenção da fração S9 (PARENTE, 2007)	46
Figura 27-	Spectrofluorcephotometer-Shimadreu RF-5000 e gráfico gerado por ele, pela leitura das amostras.	47
Figura 28-	Spectrofluorcephotometer-Shimadreu RF-5000 e gráfico gerado por ele, pela leitura das amostras.	47
Figura 29-	Estrutura química do ascarel (VEJA-LOPEZ <i>et al.</i> , 2006)	49
Figura 30-	Valores Médios de Atividade EROD em diferentes tratamentos realizados	50

	no controle positivo com ascarel.	
Figura 31-	Valores médios da indução da atividade EROD (pmoles resorufina/mg proteína/min) em células hepáticas (fração S9) de tilápias ( <i>O. niloticus</i> ) expostas à água superficial da área de estudo Camaçari-BA.	51
Figura 32-	Valores Médios da indução da Atividade EROD (pmoles resorufina/mg proteína/min) em fígado de tilápias ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) expostas à água superficial no período seco por ordem de fluxo da área de estudo, Camaçari-BA.	52
Figura 33-	Valores Médios da indução da Atividade EROD (pmoles resorufina/mg proteína/min) em fígado de tilápias ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) expostas a água superficial no período chuvoso, por ordem de fluxo, da área de estudo, Camaçari-BA.	52
Figura 34-	Valores médios da indução da atividade EROD (pmoles resorufina/mg proteína/min) em células hepáticas (fração S9) de tilápias ( <i>O. niloticus</i> ) expostas ao sedimento da área de estudo Camaçari-BA.	53
Figura 35-	Valores Médios da indução da Atividade EROD (pmoles resorufina/mg proteína/min) em fígado de tilápias ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) expostas ao sedimento do período seco, por ordem de fluxo, da área de estudo, Camaçari-BA.	54
Figura 36-	Valores Médios da indução da Atividade EROD (pmoles resorufina/mg proteína/min) em fígado de tilápias ( <i>O. niloticus</i> ) expostas ao sedimento do período chuvoso, por ordem de fluxo, da área de estudo, Camaçari-BA.	54
Figura 37-	Estrutura química do benzeno (MAZZULO <i>et al.</i> , 2003)	60
Figura 38-	Média dos valores de Benzeno (ug/L) analisados em água superficial da área de estudo, Camaçari - Ba. A linha horizontal vermelha indica o padrão segundo CONAMA nº 357/05.	61
Figura 39-	Estrutura química do Etil benzeno (MAZZULO <i>et al.</i> , 2003)	61
Figura 40-	Média dos valores de Etil-benzeno (ug/L) analisados em água superficial da área de estudo, Camaçari - Ba. A linha horizontal vermelha indica o padrão segundo CONAMA nº 357/05.	62
Figura 41-	Estrutura química do tolueno (MAZZULO <i>et al.</i> , 2003)	62
Figura 42-	Média dos valores de Tolueno (ug/L) analisados em água superficial na área de estudo Camaçari - Ba. A linha horizontal vermelha indica o padrão segundo CONAMA nº 357/05.	63
Figura 43-	Estrutura química de três classes de xilenos (MAZZULO <i>et al.</i> , 2003)	63
Figura 44-	Média dos valores p+m+o Xilenos (ug/L) analisados em água superficial na área de estudo Camaçari - BA. A linha horizontal vermelha indica o padrão segundo CONAMA nº 357/05.	64
Figura 45-	Média dos valores de C9's Aromáticos (ug/L) analisados em água superficial na área de estudo Camaçari - BA.	64
Figura 46-	Média dos valores de Aromáticos (ug/Kg) analisados em sedimentos na área de estudo (Camaçari- BA).	65
Figura 47-	Análise de componentes principais em <i>O. niloticus</i> através dos testes relacionados a indução da atividade EROD com parâmetros ambientais analisados, durante o <u>Período seco</u> .	68
Figura 48-	Análise de componentes principais em <i>Oreochromis niloticus</i> através dos testes relacionados a indução da atividade EROD com parâmetros ambientais analisados, durante o <u>Período chuvoso</u> .	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 –	Alguns HPAs, especificando o peso molecular (ROOS <i>et al.</i> , 2004)	24
Tabela 02 –	Utilização da família dos Citocromos P450 em biomonitoramento	34
Tabela 03 -	Coordenadas geográficas dos pontos amostrais	42
Tabela 04-	Valores Médios dos parâmetros físico-químicos analisados no período seco das amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA	56
Tabela 05-	Valores Médios dos parâmetros físico-químicos analisados no período chuvoso das amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA.	56
Tabela 06-	Valores Médios dos parâmetros físico-químicos analisados no período seco das amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA	57
Tabela 07-	Valores Médios dos parâmetros físico-químicos analisados no período chuvoso das amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA.	57
Tabela 08-	Valores Médios dos metais analisados no período seco nas amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA.- Água superficial.	58
Tabela 09-	Valores Médios dos metais analisados no período chuvoso nas amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA- Água superficial.	59
Tabela 10-	Valores Médios dos metais analisados no período seco nas amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA.– Sedimento.	59
Tabela 11-	Valores Médios dos metais analisados no período chuvoso nas amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA.– Sedimento.	59
Tabela 12-	Valores de correlação ( $r^2 > 0,7$ ; $p < 0,05$ ) entre a atividade EROD em água superficial das campanhas de período seco e resultados de análises químicas, em cada ponto amostral (MINITAB).	66
Tabela 13-	Valores de correlação ( $r^2 > 0,7$ ; $p < 0,05$ ) entre a atividade EROD em sedimento das campanhas de período seco e resultados de análises químicas, em cada ponto amostral (MINITAB).	67
Tabela 14-	Valores de correlação ( $r^2 > 0,7$ ; $p < 0,05$ ) entre a atividade EROD em água superficial das campanhas de período chuvoso e resultados de análises químicas, em cada ponto amostral (MINITAB).	67
Tabela 15-	Valores de correlação ( $r^2 > 0,7$ ; $p < 0,05$ ) entre a atividade EROD em sedimento das campanhas de período chuvoso e resultados de análises químicas, em cada ponto amostral (MINITAB).	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATSDR	Agência para substâncias tóxicas e registro da doença
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CETREL	Centro de Proteção Ambiental
CETIND	Centro de Tecnologia Industrial
CHC	Hidrocarbonetos Clorados
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNOCS	Departamento Nacional de Obras contra as Secas
EROD	Etoxiresorufina-O-deetilase
FAPESB	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FTC	Faculdade de Tecnologia e Ciência
GPS	Sistema de Posicionamento Global
HPAs	Hidrocarbonetos Poliaromáticos
LABIOMAR	Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento
MEAU	Mestrado em Engenharia Ambiental Urbana
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
OFM	Oxigenases de Função Mista
PCB	Bifenil Policlorado
PNF	Poluentes Orgânicos Persistentes
POP	Procedimento Operacional Padrão
SENAI	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
TECLIM	Rede de Tecnologias Limpas
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro
UFBA	Universidade Federal da Bahia
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UTM	Projeção Universal Transversal de Mercator
WHO	World Health Organization

## APRESENTAÇÃO

O projeto intitulado “Avaliação ecotoxicológica em corpos d’água utilizando um biomarcador de compostos aromáticos: estudo em receptor de efluentes industriais”, visou aplicar uma metodologia específica para identificar poluição em corpos hídricos, por meio do uso de um biomarcador bioquímico como técnica preventiva capaz de detectar, condições de estresse ambiental. O trabalho considerou a avaliação da indução de citocromos P450 (CYP1A), como biomarcador de contaminação por hidrocarbonetos poliaromáticos utilizando como organismo teste, juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*), provenientes de estações de criação da DNOCS, onde cresceram sob condições controladas.

Estudos sobre a qualidade da água através de métodos físico-químicos envolvendo áreas industriais estão sendo realizadas por algumas empresas do Pólo Petroquímico de Camaçari, através de projetos desenvolvidos em conjunto com a TECLIM/UFBA.

O fortalecimento de técnicas de monitoramento de recursos hídricos na região Nordeste, é uma das muitas contribuições a serem obtidas com o desenvolvimento deste projeto. Como se trata de uma pesquisa nova no Nordeste, o projeto contou com o auxílio de pesquisadores da UFRJ. O projeto foi finalizado em abril de 2007, e contou com auxílio financeiro da FAPESB e CNPq. O MEAU possui linhas de pesquisas que tornam possível o desenvolvimento de trabalhos integrativos entre os diversos setores em meio ambiente, relacionados à temática de saneamento ambiental e recursos hídricos.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2. OBJETIVOS</b>	21
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	22
3.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	23
3.2. Outros poluentes indutores de CYP1A	26
3.3. Acúmulo de indutores de CYP1A1 em tecidos	28
3.4. Biomarcadores Ambientais	29
3.5. Biodisponibilidade e Biotransformação	30
3.6. Enzimas do sistema de OFM como indicadores de poluição.	32
3.7. Citocromos P450-1A	33
3.8. Atividade enzimática EROD	36
<b>4. METODOLOGIA</b>	39
4.1. Organismo teste	39
4.2. Descrição da área de estudo e dos pontos de amostragem	40
4.3. Tratamento dos Dados	42
4.3.1. Água	42
4.3.2. Sedimento	43
4.4. Execução dos testes	43
4.4.1. Preparação dos Organismos	43
4.4.2. Exposição dos Organismos	44
4.4.3. Preparação da fração citosólica (S9)	45
4.4.4. Análise enzimática	46
4.5. Tratamento Estatístico	47
4.6. Controle Positivo	48
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	50
5.1. Resultado do teste de controle positivo	50
5.2. Atividade EROD em água superficial	51
5.3. Atividade EROD em sedimento	53
5.4. Análises físico-químicas	55
5.4.1. Parâmetros físico-químicos analisados “in situ”	56
5.4.2. Parâmetros físico-químicos analisados em laboratório externo	57
5.5. Análises Químicas	58
5.5.1. Metais	58

5.5.2. Hidrocarbonetos Aromáticos	60
5.5.2.1. Benzeno	60
5.5.2.2. Etilbenzeno	61
5.5.2.3. Tolueno	62
5.5.2.4. Xilenos	63
5.5.2.5. C9's Aromáticos	64
5.5.2.6. Aromáticos no Sedimento	65
5.6. Correlação (Parâmetros x EROD)	66
5.7. Análise de Componentes Principais (PCA)	68
<b>6. CONCLUSÃO</b>	70
<b>REFERÊNCIAS</b>	71
<b>APÊNDICES</b>	81
<b>Apêndice 1</b> - Tabela de biometria dos organismos utilizados nos testes.	81
<b>Apêndice 2</b> – Tabela de biometria dos organismos utilizados nos testes de controle positivo.	99
<b>Apêndice 3</b> – Gráficos de parâmetros físico-químicos analisados durante a exposição.	100
<b>Apêndice 4</b> – Bloxplot de valores de atividade EROD, mostrando a variação e comparando as estações.	109

## 1. INTRODUÇÃO

A proteção e a restauração de ecossistemas têm sido itens incorporados a projetos de gerenciamento ambiental e de recursos hídricos em bacias hidrográficas. Quanto mais precisas as estimativas de impactos resultantes de eventos antrópicos, maior a efetividade das decisões de gestores (LUZ, 2004). As empresas da indústria petroquímica, em vista dos sérios danos que poluentes podem causar à saúde e ao meio ambiente, buscam otimizar seus processos com o uso de tecnologias mais limpas.

Os ecossistemas, de uma forma geral, se constituem em grandes receptáculos de efluentes industriais, variáveis em quantidade e origem. A toxicidade de efluentes líquidos pode ser ocasionada por substâncias orgânicas ou inorgânicas, utilizadas nos processos produtivos e auxiliares, nos diversos segmentos das atividades industriais. Alguns aspectos devem ser considerados, tais como biodisponibilidade e interação das várias substâncias (sinergismos e antagonismos), que podem determinar a ocorrência e a intensidade de um efeito tóxico, seja de efluentes tratados ou não. Outro aspecto a ser considerado é a vazão de lançamento do efluente, em relação à do corpo receptor, pois é a partir desta relação ( $\text{Carga Tóxica} = \text{Vazão} \times \text{Toxicidade do efluente}$ ) que se estabelecerão os níveis de toxicidade aceitáveis para lançamento do efluente (CETESB, 1990a; 1990b) em corpos receptores.

Condições ambientais deletérias podem ser aumentadas pelo crescimento industrial. Particularmente, os ecossistemas aquáticos foram os maiores prejudicados pelos impactos causados pelo número crescente de descargas de xenobióticos. Em reservatórios, a exposição de organismos à esses compostos, promove uma interação entre esses sistemas químicos e biológicos, que pode causar distúrbios e/ou respostas adaptativas (BAINY *et al.*, 1996). As concentrações no ambiente marinho de substâncias oriundas das atividades de produção industrial apresentam uma grande variação. Igualmente, as concentrações necessárias para causar efeitos letais e subletais nos organismos diferem de acordo com o local de lançamento das substâncias, devido a grande variabilidade na composição química dos diferentes reservatórios (CRAPEZ, 2001).

Poluição e degradação de qualidade de água restringem na futura utilização deste recurso (PAIVA e PAIVA, 2002). Há duas formas de caracterizar os recursos hídricos: quanto a sua quantidade e a sua qualidade, estando essas características intimamente relacionadas (AZEVEDO *et al.*, 2003). A

busca de ferramentas para incorporar a avaliação de recursos, que visem análises quali-quantitativas de contaminantes em ecossistemas aquáticos, tornou-se um desafio contínuo para cientistas ambientais (CETESB, 1990a). O CONAMA, resolução 357/2005 passou a adotar, em termos legislativos, a exigência do estudo de toxicidade dos efluentes antes destes serem lançados ao corpo hídrico.

Tendo em vista a complexidade causada pela interação dos agentes químicos, os efeitos biológicos dos efluentes não podem ser caracterizados simplesmente por análises químicas tradicionais. Assim, para a caracterização adequada e controle desses efluentes, a estratégia mais eficiente é o uso integrado de análises físicas, químicas e ecotoxicológicas para avaliar o risco ambiental (BERTOLETTI 1990; COSTAN *et al.*, 1993).

Na maioria das vezes, a avaliação da presença de poluentes no ambiente é feita por metodologias que empregam recursos químicos e/ou físicos por meio do uso de equipamentos, em muitos casos, bastante sofisticados e caros. Entretanto, para avaliar o comportamento do poluente no ambiente, ou seja, monitorar a sua ação no meio, é preciso utilizar organismos vivos (ecotoxicologia) para determinar os efeitos deletérios em diversos organismos aquáticos e, muitas vezes, o potencial risco à saúde humana.

O conhecimento das propriedades químicas e físicas dos contaminantes orgânicos e inorgânicos é necessário para prever, por exemplo, onde ocorrerão maiores concentrações desses compostos. Esse conhecimento, aliado aos dados ecotoxicológicos, é importante também para entender o significado das concentrações encontradas em diferentes compartimentos do ecossistema e a razão de, entre os milhares de íons e compostos despejados no ambiente concentrarem em alguns, atenção relativa ao risco ambiental (REIVE *et al.*, 1994).

O aumento da poluição ambiental decorrente das atividades industriais exige o desenvolvimento de novas metodologias, tanto para prevenção e remediação de danos, quanto para o monitoramento de ações corretivas. Análises físico-químicas permitem a identificação e quantificação de poluentes, mas não determinam sua toxicidade. Para uma real compreensão dos seus efeitos em componentes biológicos, faz-se necessária a inclusão de métodos que evidenciem as conseqüências diretas da poluição em organismos vivos (NASCIMENTO, 2000).

Respostas de organismos à poluentes podem ser influenciados ou modificados por fatores físico-químicos, biológicos ou ecológicos existentes no ambiente (ADAMS *et al.*, 1996; WOLKERS *et al.*, 1996).

Através de bioensaios, utilizando organismos sensíveis, se pode atuar de forma proativa e reativa nos impactos causados por xenobióticos no ecossistema receptor (SANTANA *et al.*, 2002). O uso de biomarcadores e de outros ensaios ecotoxicológicos apresentam um grande potencial no sentido de prever danos ecológicos e riscos à saúde, sendo utilizados como ferramentas de avaliação de impacto ambiental e de biomonitoramento por serem considerados instrumentos de grande importância em programas de controle de qualidade da água.

O estudo de caso do presente trabalho foi definido ser realizado em lagoa de retenção de efluentes localizada no Pólo Petroquímico do Nordeste. Este situa-se entre os municípios Camaçari e Dias D'Ávila, na região metropolitana de Salvador, a cerca de 56 km. É composto por diversas indústrias do ramo petrolífero que iniciaram sua operação na década de 70 e vêm aumentando a sua produção (KIPERSTOK *et al.*, 1991). Em decorrência de processos industriais formam-se efluentes e outras correntes oriundas de água de chuva e lavagem de pátios.

Efluentes “não orgânicos” (não originados diretamente dos processos produtivos) são lançados em uma lagoa de retenção, local onde o presente trabalho foi realizado. Como estes efluentes lixiados com a água de chuva provêm da área da empresa, contaminantes tóxicos podem estar presentes; em vista disto é que são retidos na lagoa. Vale ressaltar que a lagoa a ser analisada, apesar de ter placas informativas de proibição de pesca, é utilizada para este fim, podendo acarretar sérios danos a saúde da população pela ingestão de organismos contaminados. O primeiro aspecto a ser considerado quando se avaliam efeitos induzidos por contaminantes químicos à biota (respostas biológicas) é que, em ambientes naturais, o organismo pode estar exposto a uma miríade ou mistura de diferentes contaminantes ao mesmo tempo (efeitos sinérgicos) (RAND *et al.*, 1994).

Os citocromos P450, conhecidos como CYPs, constituem uma larga família de hemoproteínas, encontradas nas membranas do retículo endoplasmático dos hepatócitos (mais susceptível à danos) e outras células corporais (MARCUSSEN e BARRA, 1997; KIM *et al.*, 1998; GODARD *et al.*, 2005; BISTOLAS *et al.*, 2005; AXARLI *et al.*, 2005). São responsáveis pela biotransformação de compostos orgânicos e realizam a catálise de monooxigenação de uma

diversidade de substratos hidrofóbicos (NEBERT, 2000; STEGEMAN, 2000; BAINY *et al.*, 2001; AXARLI *et al.*, 2005; SIROKA *et al.*, 2005).

Em peixes, dentre as diversas famílias, a CYP1A constitui um sistema enzimático da fase I de biotransformação, que é induzido por contaminantes orgânicos, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

Esta indução é freqüentemente associada à atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) que, embora seja uma medida indireta da atividade da proteína CYP4501A, vem sendo comumente utilizada como primeiro sinal para avaliar a indução deste sistema, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade à exposição destes contaminantes (SLEIDERINK *et al.*, 1995; HEUVEL *et al.*, 1995; ADAMS *et al.*, 1996; BURGEOT *et al.*, 1996; PEDROSA *et al.*, 2001; BAINY *et al.*, 2001; REES *et al.*, 2005).

O estudo proposto envolve a avaliação de poluição local, por biodisponibilidade de HPAs, PCBs, Dioxinas e Organoclorados, utilizando metodologia específica para estimar como estes estressores são capazes de modificar a expressão de genes, desencadeando a formação das proteínas, cuja indução a ser quantitativamente determinada pela técnica, será tomada como indicativa de efeitos provocados por estes contaminantes. Por ser preventiva, esta tecnologia visa a preservação ambiental e dos recursos hídricos em nossa região.

## 2. OBJETIVOS

O reaproveitamento da água significa a economia de um recurso natural. Uma contribuição significativa deste trabalho é que, sendo demonstrado que a água do local de estudo é não tóxica e/ou pouco tóxica, pode-se pensar em seu reuso pelas empresas do Pólo diminuindo assim a adição diária de água limpa, cujo volume atinge atualmente 4000m<sup>3</sup>/segundo.

Assim, o trabalho teve como objetivo geral analisar a toxicidade de uma “lagoa” construída (bacia de retenção de efluentes “não orgânicos”) situada em área industrial de Camaçari- BA, com o uso de biomarcadores de contaminação ambiental por Hidrocarbonetos Poliaromáticos – HPAs e Bifenilas Policloradas – PCB’s, cuja presença é evidenciada pelo aumento da atividade EROD, utilizando como organismo-teste a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758).

Os objetivos específicos incluem:

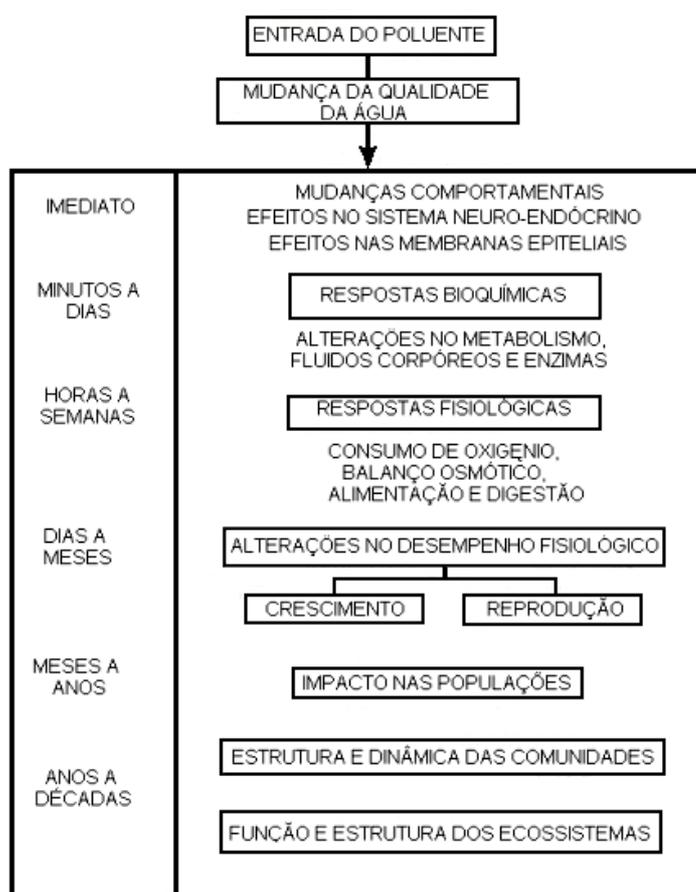
- a) Contribuir para o desenvolvimento e emprego de metodologias preditivas de danos ambientais, testando a aplicação da técnica do Citocromo P450, como biomarcador de efeitos de HPAs no ambiente de “lagoa”.
- b) Realizar ensaios ecotoxicológicos com a água superficial e com o sedimento da área de estudo quanto a presença de HPAs, comparando os resultados ecotoxicológicos com os obtidos com análises químicas da mesma matriz de exposição.
- c) Determinar parâmetros físico-químicos das amostras coletadas na área de estudo com o intuito de verificar uma possível interferência destes parâmetros nos resultados.

Os resultados deste trabalho podem propiciar uma avaliação de qualidade e de preservação de recursos hídricos, e indiretamente possibilitar controle de efluentes industriais; a implantação desta tecnologia na Bahia só foi possível pela parceria entre a UFBA e UFRJ, onde o emprego de técnicas preventivas utilizando biomarcadores enzimáticos já é rotina.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A exposição de organismos aquáticos à poluentes traços pode ser determinada pela mensuração de níveis externos, através do vetor água e sedimento por exemplo, por monitoramento ambiental. Entretanto, isto é geralmente considerado insuficiente para classificar a qualidade ambiental de ecossistemas aquáticos. (OOST *et al.*, 1996).

Os efeitos toxicológicos de poluentes orgânicos persistentes (PNF) em ecossistemas aquáticos conduzem à deterioração da qualidade de água e afetam adversamente organismos aquáticos e a saúde humana (**Figura 01**). A natureza altamente lipofílica destes poluentes pode contaminar peixes através da dieta ou pela exposição à água (WONG *et al.*, 2001). Estes produtos químicos são caracterizados por sua persistência ou longevidade antes da degradação, sendo desse modo uma ameaça como determinantes de toxicidade crônica. A bioacumulação destes compostos em organismos aquáticos poderia resultar em efeitos adversos à saúde, não só para os próprios organismos, como também para seus consumidores tróficos mais elevados, incluindo seres humanos (WONG *et al.*, 2000).



**Figura 01.** Sequência temporal dos efeitos do estresse de poluentes (SINDERMAN, 1996)

Os recursos de água são essenciais à sobrevivência de populações humanas. Entretanto, os resíduos, decorrentes de fontes antropogênicas, têm atuado sobre estes recursos, tendo por resultado sua degradação continuada. Em áreas densamente povoadas e altamente industrializadas, ou em pontos de entrada dos efluentes industriais, podem ocorrer quantidades significativas de produtos químicos, incluindo os bifenilas policlorados (PCBs) ou hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e as dioxinas (WONG *et al.*, 2001).

A Ecotoxicologia, ciência multidisciplinar, é atualmente reconhecida em nível mundial como capaz de fornecer os instrumentos necessários à prevenção de impactos no ambiente. Essa prevenção é baseada, sobretudo, em estimativas de risco de poluição, baseadas nas concentrações de efeito de poluentes, obtidas a partir de resultados de testes ecotoxicológicos, realizados em laboratório, sob condições controladas (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

### **3.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos**

Os hidrocarbonetos aromáticos são constituintes naturais dos combustíveis fósseis, encontrados em pequena quantidade, em uma série de fontes naturais, nas cinzas geradas por incêndios florestais, por exemplo, ou artificiais combustões incompletas de combustíveis, fumaça de cigarro, contaminações industriais. A principal fonte de formação de HPAs são as combustões incompletas à altas temperaturas (660-740 °C), apesar da aromatização ocorrer à temperaturas mais baixas. A temperatura também irá determinar a presença de ramificações alifáticas no anel aromático (OLMSTEAD e LEBLANC., 2005).

A ordem de degradação dos HPA respeita o tamanho da molécula, ou seja, quanto menor for o composto, mais suscetível este será ao ataque microbiano. A família mais tóxica de hidrocarbonetos, os HPAs (**Tabela 01**), é uma larga família de moléculas com anéis benzenicos condensados. Essas moléculas tem preocupado muitos cientistas em relação à sua genotoxicidade. Em linhas gerais, há evidencias de correlação entre altos níveis de certos HPAs no ambiente e um aumento de carcinogênese e mutagênese em organismos expostos (MARSILI *et al.*, 2001).

**Tabela 01.** Alguns HPAs, especificando o peso molecular e carcinogenicidade (ROOS et al., 2004)

Nome do composto (IUPAC)	Abreviação	Forma Molecular	Peso Molecular	Carcinogenicidade*
Naftaleno	Naph	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub>	128,2	0
Acenafteno	Ace	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub>	154,2	0
Fluoreno	Fl	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	166,2	0
Fenantreno	Phen	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,2	0
Antraceno	Ant	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,2	0
Fluoranteno	Plt	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202,2	0
Pireno	Pyr	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202,2	0
Benzoantraceno	B(a)A	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228,3	+
Criseno (93%)	Chry	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228,3	±
Benzo(b)fluoranteno	B(b)F	C <sub>26</sub> H <sub>12</sub>	252,3	++
Benzo(k)fluoranteno	B(k)F	C <sub>26</sub> H <sub>12</sub>	252,3	0
Benzo(a)pireno	B(a)P	C <sub>26</sub> H <sub>12</sub>	252,3	+++
Dibenzo(a,b)antraceno	D(a,h)A	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	278,3	+++
Benzo(g,h,i)pireno	B(g,h,i)Per	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276,3	0

\* 0= não carcinogênico; ± = incerteza como carcinogênico; ++, +++ = fortemente carcinogênico (NRC,1983)

Apesar do grande volume de hidrocarbonetos liberados pela ação do homem, o fitoplâncton produz e libera no oceano, uma quantidade algumas ordens de grandeza maior que as fontes antropogênicas. O óleo cru possui grandes quantidades de benzeno, tolueno, xileno, fenol, ácidos carboxílicos, compostos sulfurosos e poliaromáticos (HPAs), que são altamente tóxicos a uma grande quantidade de organismos aquáticos. Apesar da sua maior toxicidade os aromáticos de menor cadeia de carbono são altamente voláteis, e a evaporação desses compostos nas 24 - 48 h que se seguem a um vazamento é a principal via de descontaminação que reduz o perigo para os estuários e outros corpos d'água (KENNISH, 1992).

A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e a Organização Mundial de Saúde (WHO) identificam 16 HPAs como poluentes prioritários. Eles são introduzidos no meio ambiente por processos naturais (biosínteses, pirólises, diagêneses, descargas naturais) e por meio de interferência de processos humanos (industriais, combustão e queima de combustíveis fósseis, veículos motores, incinerações, óleos de refinaria) (MARSILI *et al.*, 2001). Os HPAs, prioritários para a avaliação de impactos ambientais, em função de sua toxicidade, segundo a USEPA são: naftaleno, acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(a)pireno, criseno, di-benzo(a,h)antraceno, fluoranteno, fluoreno, fenantreno e pireno. Benzo[a]pireno é conhecido como composto carcinogênico, visto que, animais expostos a este contaminante em laboratório desenvolvem (LEAVER e GEORGE, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2000 apud PEDROSA *et al.*, 2001; VENCES-MEJIA *et al.*, 2005; HARRIGAN *et al.*, 2006).

Apesar dos danos causados pelos ocasionais vazamentos devastadores de óleo, centenas de milhões de litros alcançam os mares todos os anos, a maior parte oriundo de fontes não acidentais (FELDMAN *et al.*, 2001). São elas, com seus respectivos volumes estimados:

- a) Óleo motor usado – O óleo de uma troca é suficiente para contaminar quase 5 milhões de litros de água doce. A lixiviação das estradas sujas de óleo de uma cidade com 5 milhões de habitantes por um ano, pode conter tanto óleo quanto grandes vazamentos de petroleiros – (1.700.000.000 L/ano)
- b) Operações de manutenção – Lavagem dos tanques de petroleiros podem liberar milhões de litros em águas navegáveis, em milhares de operações de descarga de apenas poucos litros – (630.000.000 L/ano)
- c) Descargas atmosféricas – Escapamentos de automóveis e chaminés industriais liberam milhares de toneladas de hidrocarbonetos no ar todos os anos. As partículas se depositam ou são lavadas pelas chuvas para dentro dos oceanos. (432.000.000 L/ano).
- d) Fontes naturais – representados pela liberação de HPA do fundo do mar e de erosão de rochas sedimentares – (285.000.000 L/ano).
- e) Grandes vazamentos – Apenas 5% da quantidade de óleo que alcança os oceanos, atinge áreas costeiras; mas pela sua natureza aguda podem prejudicar a vida no mar e na costa por muitos anos - (170.000.000 L/ano).
- f) Exploração Offshore – De vazamentos e descargas operacionais – (69.000.000 L/ano).

Segundo Crapez (2001), sedimentos de estuários e de sistemas costeiros marinhos, localizados próximos a centros urbanos e industriais, são os maiores depositários de HPAs. Estes compostos podem ser remobilizados para a coluna d'água, onde serão oxidados fotoquimicamente. Entretanto, eles persistem nos sedimentos e excedem 1000 vezes ou mais a concentração encontrada na água, que é menor que  $1\mu\text{g.L}^{-1}$ , em áreas não sujeitas à poluição antropogênica.

Uma das razões que justificam o objetivo deste trabalho é o fato de haver pressão considerável para reduzir a utilização de HPAs, pois existem provas conclusivas de que muitos destes compostos têm efeitos mutagênicos e carcinogênicos (CHALOUPKA *et al.*, 1993 apud SHAILAJA *et al.*, 2006). Com o aumento do desenvolvimento industrial, esse

balanço natural foi perturbado e a razão entre a produção e a degradação de HPAs tem aumentado constantemente. Em geral, todos os compostos orgânicos contendo carbono e hidrogênio, podem servir como precursores de HPAs. Segundo a legislação escocesa as concentrações máximas toleradas de HPAs em alimentos são de 1µg/L para naftaleno; e de 2µg/L para antraceno e fenantreno.

Níveis de metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em fígado de peixes, em geral, são significativamente altos (YUAN *et al.*, 2006). A toxicidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e contaminantes similares, para várias espécies, é largamente dependente da forma química, rota e exposição, e estágio do ciclo de vida dos organismos. Exposições em níveis crônicos ou em alto níveis de HPAs, ou de óleo cru estão contribuindo como fatores causais de problemas de saúde e de reprodução em muitas espécies (METER *et al.*, 2006).

Efeitos tóxicos de contaminantes podem ser usualmente utilizados como marcadores no biomonitoramento ambiental se esses efeitos são de leitura detectável e mensurável no organismo em níveis letais e subletais. O fígado de peixe tem sido largamente utilizado por ser o órgão principal em processos de detoxificação (SMEETS *et al.*, 2002; MALMSTROM *et al.*, 2004; GARRICK *et al.*, 2006).

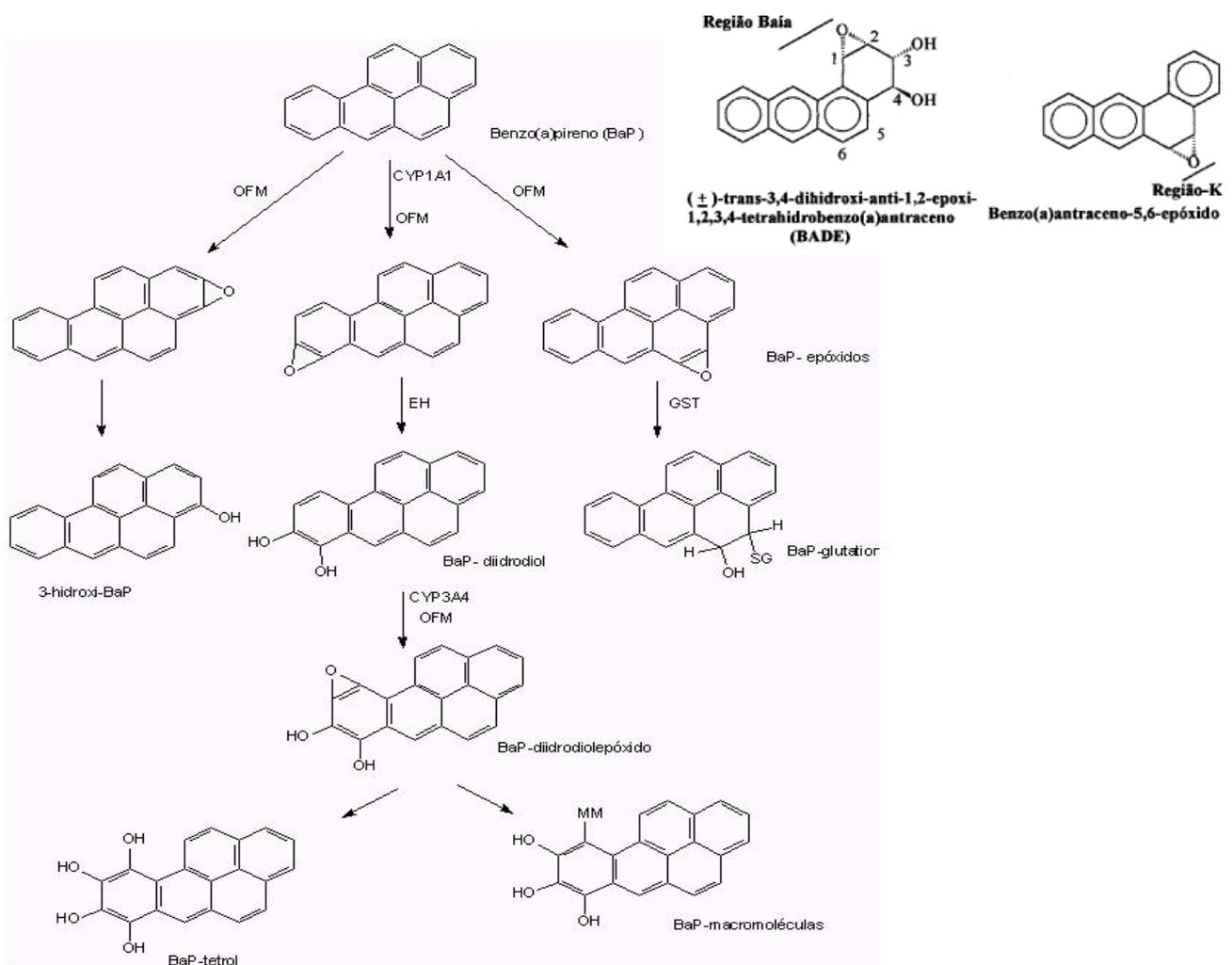
### **3.2. Outros Poluentes indutores de CYP1A**

A maioria dos xenobióticos é lipossolúvel, pois atravessam membranas biológicas muito facilmente e se acumulam em tecido adiposo e podem em quantidade suficiente (o que depende da concentração da substância química específica) interferir com os processos metabólicos normais, na forma de respostas toxicológicas ou farmacológicas (PETERS *et al.*, 1994; MARCUSSEN e BARRA, 1997; BOGNI, *et al.*, 2005).

Peixes são usualmente utilizados como modelos experimentais em estudos relacionados à avaliação da qualidade e monitoramento ambiental. Tilápias tem sido utilizadas para avaliação na qualidade de lagos e lagoas, por serem amplamente encontrados em várias partes do mundo (UENG e UENG, 1995).

Peixes marinhos reagem a contaminantes orgânicos lipofílicos no ambiente e possuem uma variedade de mecanismos moleculares, dentre os quais se incluem a biotransformação enzimática com a conversão de contaminantes orgânicos, em metabólitos excretáveis. Exposição a contaminantes específicos incluindo certos HPAs, resultam em indução do CYP1A e a formação de DNA aductos, que podem levar a carcinogênese em peixes (STIEN *et al.*, 1997; STEGMAN e HAHN, 1994 apud PETERS, *et al.*, 1997).

Muitos hidrocarbonetos clorados (CHCs) e seus metabólitos são indutores das enzimas citocromo P450 (CYP), incluindo membros da subfamília 1A e 2B. Eles são hidrofóbicos e resistentes à degradação biológica. Assim eles têm uma tendência à acumulação nos tecidos, devido a ligação de diol epóxidos, resultantes da ativação metabólica dos CHCs com o DNA (Figura 02).



**Figura 02.** Ativação do BaP e formação de aductos com macromoléculas; em foco a representação esquemática na região de baía (COSTA, 2001).

A exposição persistente de animais marinhos ao CHCs e outros metabólitos, pode implicar em diversos problemas, por serem compostos: carcinogênicos, teratogênicos, que causam esterilidade, retardo de crescimento, disfunção imunológica e anormalidades reprodutivas (LETCHER *et al.*, 1996).

Organoclorados são uma classe de contaminantes que exibe potencial para bioacumulação na biota aquática (PCBs, Dioxinas). Além destes, os bifenis policlorados (PCBs) e dioxinas/dibenzofuranas (PCDDs/PCDFs) são persistentes poluentes ambientais que biomagnificam através da cadeia alimentar nos ecossistemas e também se comportam como indutores de CYP1A. (AMCOFF *et al.*, 1998; PERKINS e SCHLENK, 1998; CHANG *et al.*, 2005).

As Bifenilas Policloradas – PCBs são compostos constituídos de dois anéis benzeno (fenil) conectados por uma ligação simples carbono-carbono, contendo de um à vários átomos de cloro. Devido à sua grande estabilidade química, baixa inflamabilidade, boas propriedades condutoras de calor e baixa condutibilidade elétrica, têm sido largamente utilizadas em transformadores, capacitores e catalisadores (indústria química), destacando-se uma mistura de PCBs comerciais, conhecido como ascarel (NYMAN *et al.*, 2000; JONSSON *et al.*, 2006).

Globalmente, os PCB's são encontrados no ar, em concentrações variando entre 0,002 até 15 ng/m<sup>3</sup>. Em áreas industriais, os níveis podem alcançar valores na ordem de 9g/m<sup>3</sup>. Em ambiente ocupacional, na manufatura de transformadores e capacitores, foram encontrados níveis de até 1000 mg/m<sup>3</sup>.

Os PCB's são lipofílicos e por isso entram facilmente na cadeia alimentar, acumulando-se nos tecidos adiposos e induzem uma gama de patologias no fígado. O grau de carcinogenicidade induzida pelos PCB's é relativamente menor do que os organoclorados. Também são mutagênicos e teratogênicos.

### **3.3. Acúmulo de indutores de CYP1A1 em tecidos**

Contaminantes hidrofóbicos como os HPAs tendem rapidamente a ser adsorvidas às partículas orgânicas. A solubilidade de compostos aromáticos diminui com o aumento do coeficiente octanol-água (Kow), e para os HPAs, de acordo com o aumento do número de anéis

aromáticos. Dessa forma, os HPAs de baixo peso molecular estão dissolvidos na água, enquanto os de alto peso são adsorvidos ou associados à partículas. A captação do contaminante é condicionada pela sua biodisponibilidade e os organismos tendem a apresentar um enriquecimento de compostos de baixo peso molecular em relação àqueles presentes no sedimento (BAUMARD *et al.*, 1999).

A diferença significativa na indução de CYP1A1 é extensiva a tecidos extra-hepáticos e sugere que a base do mecanismo de resistência é genético e não fisiológico. Futuras investigações da variação da estrutura em componentes do caminho AHR podem ser buscadas na base do mecanismo de resistência para a indução do CYP1A na população (YUAN *et al.*, 2006).

A expressão de CYP1A é considerado um biomarcador de exposição para compostos orgânicos, como HPA e bifenis policlorados (PCBs) entre outros (VENTURA *et al.*, 2002). A indução do citocromo P450 1A em peixes, que reflete a exposição dos organismos à estes poluentes de origem industrial, é amplamente empregada em estudos de monitoramento ambiental, para avaliar rotas e mecanismos de exposição.

### **3.4 – Biomarcadores Ambientais**

A vigilância biológica torna-se, nos dias atuais, importante corrente na proteção à saúde humana e no equilíbrio do ecossistema. Para sua execução é necessária a eleição de parâmetros biológicos que reflitam o comportamento e as interações ocorridas entre toxicante e sistema biológico. Esses parâmetros são biomarcadores (AZEVEDO *et al.*, 2003). Segundo definição, biomarcadores são respostas de sistemas vivos a agentes estressores, mensurados em nível bioquímico, celular, fisiológico ou comportamental (NASCIMENTO, 2002; 2006). Dentre os vários tipos de biomarcadores, os de exposição correlacionam-se à concentração do xenobiótico no meio ambiente ou na atmosfera do ambiente de trabalho.

Biomarcadores comumente definidos como biomoleculares, bioquímicos e celulares para poluentes químicos, podem ser mensurados em células, tecidos e fluidos corporais, provando ser uma fácil indicação da saúde do organismo. Estudos recentes sugerem que biomarcadores

e resíduos químicos analisados devem ser usados em combinação para a avaliação de riscos toxicológicos para mamíferos marinhos expostos à poluentes ambientais (FOSSI *et al.*, 1997).

A importância no uso destes biomarcadores como parâmetros biológicos de exposição às substâncias químicas deve-se ao fato deles estarem mais diretamente relacionados aos efeitos na saúde do que os parâmetros ambientais, podendo oferecer uma melhor estimativa do risco, necessárias para aplicação de medidas de prevenção e controle da exposição aos agentes químicos ambientais, no âmbito das políticas públicas.

Os biomarcadores de exposição são utilizados em programas de biomonitoramento, para indicar efeitos que são ecologicamente mais relevantes e para avaliação inicial de leitura do primeiro nível, ou seja, o nível biológico inicial a ser afetado - proteínas (LAM e WU, 1999; LEPESHEVA e WATERMAN, 1998 apud PARENTE *et al.*, 2004).

Uma grande vantagem no uso de biomarcadores, em relação à tradicional quantificação dos poluentes nos compartimentos ambientais, é que a abordagem com biomarcadores leva em consideração a biodisponibilidade dos contaminantes para a biota. A fração biodisponível dos poluentes é um parâmetro crítico para os efeitos desses poluentes na biota (WHILE *et al.*, 1993; FENK *et al.*, 2004 apud PARENTE, 2006).

### **3.5 – Biodisponibilidade e Biotransformação**

Metabolismo ou biotransformação através da fase I (enzimas do sistema monooxigenase P-450) e da fase II (enzimas de conjugação) são requisitos para detoxificação e excreção de compostos lipofílicos em animais aquáticos. Esses sistemas enzimáticos são predominantes no fígado e, com menor atividade, em outros tecidos como pulmão, rim e intestino (BAINY *et al.*, 1996; PERKINS e SCHLENK, 1998; MCKINNEY *et al.*, 2004).

A capacidade metabólica é um determinante importante para o processo de bioacumulação, biomagnificação, toxicinética e potencial toxicológico de contaminantes lipofílicos organogênicos (MCKINNEY *et al.*, 2004).

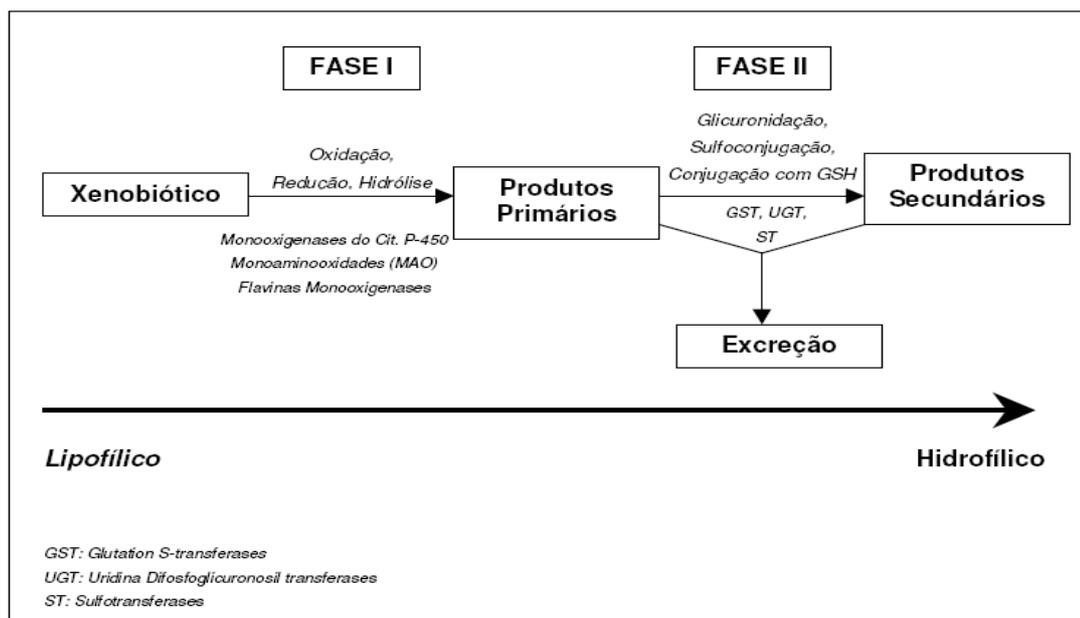
A bioacumulação de contaminantes pode ser vista como resultado de competição de rotas de entradas e eliminações. O metabolismo é um fator importante para a acumulação de poluentes

no organismo. Reações de biotransformação divididos em fase I e II envolvem a formação de metabólitos de HPAs (PIKKARAINEN , 2006) (**Figura 03**). O primeiro passo para o processo de biotransformação, chamado de fase I é usualmente a oxidação, quando o CYP1A1 assume uma posição central para a catálise. Durante a fase II, contaminantes interagem com o P450 e possibilitam a adição de outros substratos para a biotransformação, A forma de CYP1A é geralmente induzida por hidrocarbonetos planares, entre outros (RUUS *et al.*, 2002).



**Figura 03.** Esquema de biotransformação de xenobióticos (RAND et al, 1994).

As transformações metabólicas (biotransformação) de xenobióticos lipofílicos em ecossistemas aquáticos são catalisadas por um complexo de famílias multienzimáticas comumente referido como um sistema enzimático de biotransformação. Os processos de transformação de xenobióticos podem ser descritos em duas fases (**Figura 04**): a primeira é conhecida como fase oxidativa e a segunda, fase conjugação dos xenobióticos (GADAGBUI *et al.*, 1996; PANDEY *et al.*, 2006).



**Figura 04.** Fases da biotransformação de xenobióticos (COSTA, 2001).

Exposição de peixes a certos contaminantes, como os HPAs, pode ser detectada por mensuração desses metabólitos excretados para a bile. Organismos com capacidade de bioacumulação podem ser utilizados como monitores de contaminação ambiental, por exemplo, na cadeia alimentar, como resultado do consumo de altas dosagens de tóxicos. Como resposta, determina-se a quantidade da substância-foco concentrada no órgão ou tecido destes organismos (MACKAY e FRASER, 2000).

Os contaminantes ambientais podem tornar-se perigosos quando entram em contato com organismos vivos pela interação das estruturas bioquímicas específicas do organismo. Os efeitos são elucidados em funções bioquímicas e fisiológicas. As proteínas induzidas ou suprimidas podem servir como biomarcadores de efeito ou exposição. Em alguns casos, a expressão aumentada de uma proteína é conectada a riscos de saúde mais elevados. Isto é verdadeiro, por exemplo, para o enzima CYP1A1 do citocromo P450, que catalisa a geração de metabólitos reativos dos HPAs dando subseqüentemente, por resultado, a formação dos aductos DNA (DELL'OMO e LAUWERYS, 1993; MARCZYNSKI *et al.*, 2002 apud ROOS *et al.*, 2004).

### **3.6 – Enzimas do sistema OFM como indicadores de poluição.**

As Oxidases de Função Mista (OFMs), compõem um sistema universalmente distribuído de enzimas indutíveis, que catalisam a mono-oxigenação (hidroxilação) de hormônios esteróides, vitaminas e ácidos biliáticos. Além das substâncias endógenas, as enzimas podem utilizar como substrato drogas, pesticidas e hidrocarbonetos entre outros xenobióticos. Dessa forma, elas têm um papel importantíssimo nos processos de desintoxicação, realizando uma série de reações de oxidação, onde compostos orgânicos relativamente insolúveis são convertidos em metabólitos solúveis em água, que podem ser conjugados e excretados pela urina ou pela bile (PAYNE *et al.*, 1987).

CYP1A1 é um componente terminal do sistema OFM, e possui uma importância primordial na detoxificação de certos contaminantes orgânicos, como os HPAs. A atividade EROD é dependente do CYP1A1 e é mensurado, como um marcador na indução de OFM. (KIRBY *et al.*, 2007)

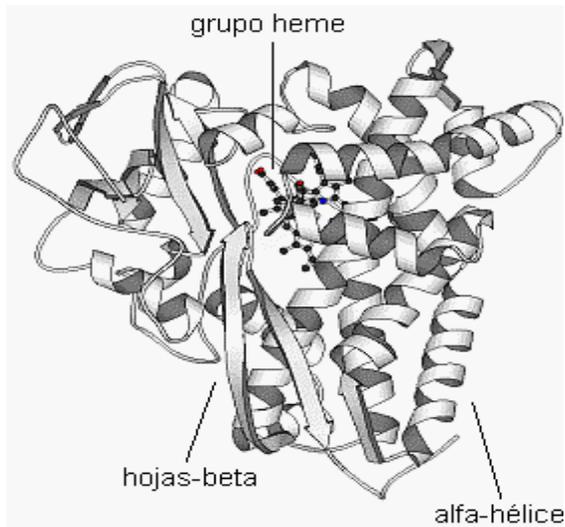
As primeiras avaliações no campo da indução da OFM por hidrocarbonetos foram feitas no começo dos anos 70, em Newfoundland no Canadá, em trutas (*Salmo trout*) retiradas de um lago com histórico de contaminação por HPAs, que apresentaram altos níveis de hidroxilases no fígado (PAYNE, 1975). Esse e outros estudos levaram a sugerir que a indução de enzimas OFM no fígado de peixes seria um indicador sensível para ser usado no monitoramento biológico (PAYNE *et al.*, 1987).

Trabalhos mais recentes mostram que trutas com 3mg de compostos HPAs no fígado, rim e coração podem induzir enzimas do sistema OFM como a 7-etoxiresofurina O-deetilase (EROD), aumentando sua atividade em até 14 vezes (UPSHALL *et al.*, 1993). Em outro trabalho, PCBs acumulados no fígado de peixes foram responsáveis pela indução de benzo[*a*]pireno, hidroxilase hepática e do citocromo P-450, independentemente da forma como o PCB foi disponibilizado (emulsão na água ou alimentação) (CARLSSON e PART, 2001; NASSEL, 1996 apud REBELO, 2003).

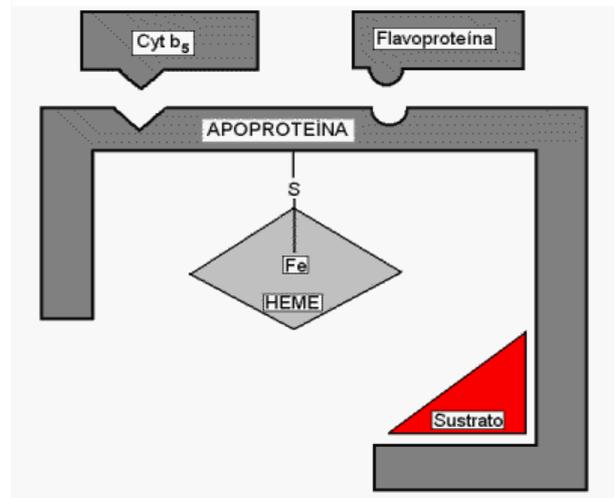
### 3.7 – Citocromos P450-1A

As enzimas CYP, conhecidas como mooxigenases de função mista (OFMs) são as maiores drogas-metabólitos enzimáticos no fígado e funcionam na biotransformação de uma grande variedade de xenobióticos lipofílicos e compostos endógenos (GUENGERICH, 1991 apud LETCHER *et al.*, 1996). Consequentemente, CYP hepático promove a eliminação de muitos poluentes orgânicos hidrofóbicos pela facilidade na introdução de um grupo funcional polar, para subsequente excreção. Indução de CYP pode, significativamente, afetar o metabolismo, bioacumulação e toxicocinética de xenobióticos, indicando a susceptibilidade do animal à exposição (LETCHER *et al.*, 1996).

Os citocromos (**Figura 05**) são hemoproteínas pois possuem uma parte protéica (apoproteína) e um grupo heme prostético (**Figura 06**) (FOSSI *et al.*, 1997), localizadas nas membranas do retículo endoplasmático dos hepatócitos e de outras células corporais. O método de ação principal é a adição de um grupo funcional à compostos lipofílicos, de modo a fazê-los mais hidrosolúveis, e portanto, mais facilmente excretáveis para a eliminação de substâncias exógenas. (MARCUSSEN e BARRA, 1997; YUAN *et al.*, 2001).



**Figura 05.** P450 (MARCUSSEN e BARRA, 1997)



**Figura 06.** Estrutura de hemoproteína (MARCUSSEN e BARRA, 1997).

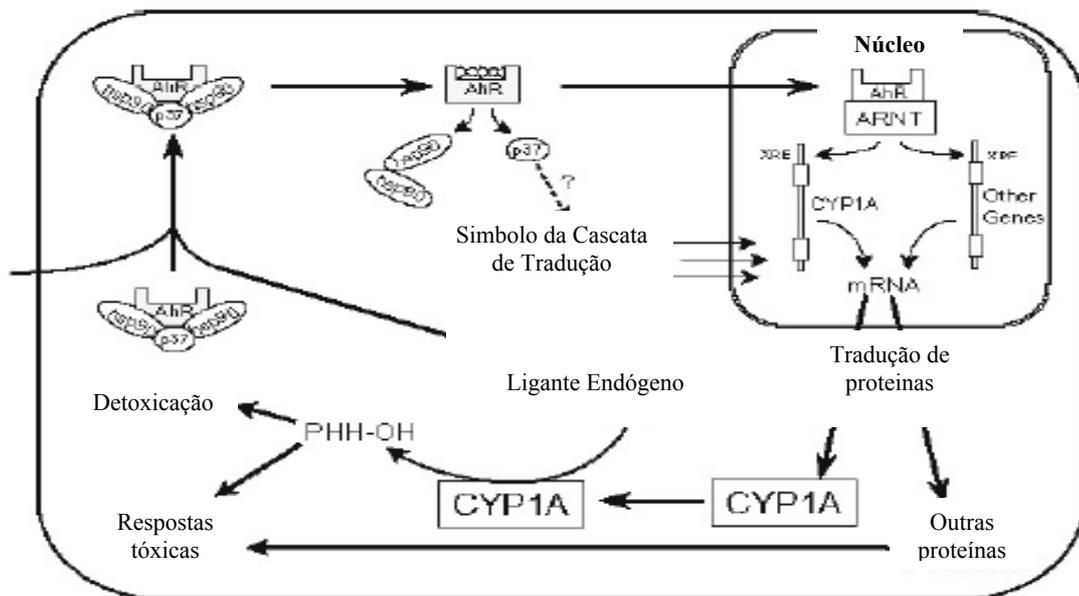
A família de citocromos P450 mais bem estudada é a dos P450-1A (**Tabela 02**). A expressão das proteínas dessa família pode ser induzida por substâncias como o 2,3,7,8-Tetra-cloro-dibenzeno-*p*-dioxina (TCDD) e Hidrocarbonetos aromáticos halogenados (CAO *et al.*, 2000). Em trutas, CYP1A1 e CYP1A3 foram identificados e apresentam homologia de 96% na seqüência de aminoácidos (BERNDTSON e CHEN, 2004). O mecanismo de indução do CYP1A1 por dioxinas já foi extensamente estudado e acredita-se que requer a ligação ao receptor citoplasmático Aril hidrocarônico (AhR), com subsequente modulação da transcrição do gene (**Figura 05**) (WHITLOCK, 1991).

**Tabela 02.** Utilização da família dos Citocromos P450 em biomonitoramento (WHITLOCK, 1991)

Enzima	Controle da expressão	Contaminantes indutores	Referência
CYP1A1	AhR	HPA, dioxinas	Nobert <i>et al.</i> , 1993
CYP1B1	AhR	HPA, dioxinas	Shon <i>et al.</i> , 1994
CYP2B1	CAR	DDT, Hexaclorobenzeno	Li <i>et al.</i> , 1986
CYP2B2	mRNA	Benzeno, tolueno, xileno	Kim and Kim, 1996
CYP3A	PXR	Nanyfenol	Loo <i>et al.</i> , 1996
CYP4	PPAR	PCBs	Okim <i>et al.</i> , 1993

Existe uma vasta literatura demonstrando a indução do CYP1A1 por HPAs em diversos organismos, especialmente mamíferos. Diversos trabalhos mostram que a exposição de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) a TCDD, b-naftoflaveno ou indole-3-carbinol, induz a expressão genica de CYP1A, além de aumentar a atividade enzimática da EROD no fígado desses animais (CAO *et al.*, 2000)

Estudos mais completos mostrando a correlação entre a indução do YP1A com HPAs foram feitos por Anderson *et al.* (1999); Koh *et al.* (2001). Os autores utilizaram sistemas relatores de genes (GRS) para identificação em células de linhagens laboratoriais que foram modificadas geneticamente para apresentar o gene da luciferase, acoplado ao promotor do gene do CYP1A, como mostra a **figura 07**. Dessa forma os indutores do gene são identificados através da produção de luz pela linhagem de células (BILLIARD *et al.*, 2000; NYMAN *et al.*, 2000).



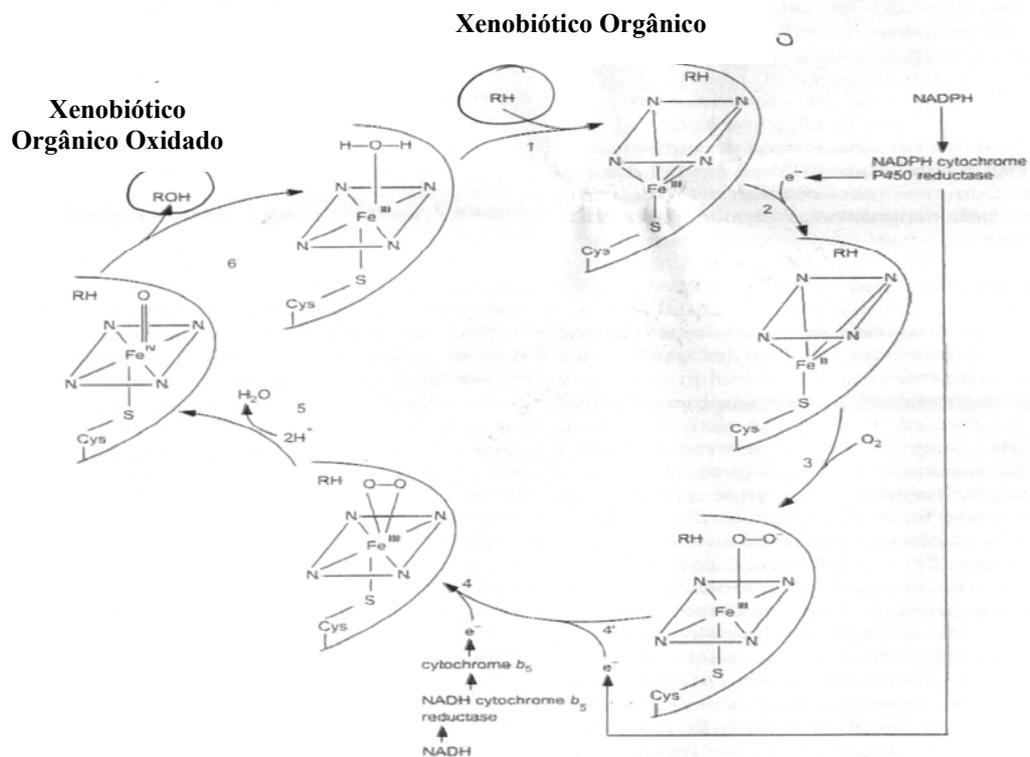
**Figura 07.** Mecanismos de ação da CYP1A. Fonte: REBELO, 2002.

Segundo Kelsey (2005), o grau de exposição de peixes a contaminantes, pode ser mensurado através de respostas biológicas (um biomarcador), pela indução das enzimas do sistema P4501A (CYP1A). Esta indução é provavelmente a mais frequentemente utilizada como biomarcador de exposição de organoclorados em vertebrados, sendo específica para um grupo de químicos – Hidrocarbonetos Poliaromáticos, e com mecanismos de respostas de exposição a contaminantes relativamente alta. Sinais clínicos à exposição relativa incluem o aumento na mortalidade, a indução do citocromo P450 (CYP1A), edema, hemorragia, anormalidades craniofaciais e outros efeitos patológicos (BURKER *et al.*, 1985; GUENGERICH e SHIMADA, 1998 apud CHEN *et al.*, 2000; GENTER *et al.*, 2006).

### 3.8. Atividade enzimática EROD

A mensuração da atividade da EROD realizada espectrofotometricamente descreve o efeito de exposição por xenobióticos, além de ser muito utilizada em ambientes aquáticos, devido a sua alta sensibilidade (KLOZ *et al.*, 1984 apud LINDSTROM-SEPPA e STEGEMAN, 1995; HAHN, *et al.*, 1996; BRUSCHWEILER *et al.*, 1996). Na presença de NADPH, a atividade enzimática da EROD converte o substrato etoxiresorufina em resorufina, com produção de um composto fluorescente (SIROKA *et al.*, 2005) que é lido em ensaio espectrofluométrico por 1,5min. A atividade enzimática da EROD é subsequentemente calculada, com base na comparação com a fluorescência obtida no ensaio (resorufina formada) com uma concentração conhecida.

A seqüência da reação metabólica envolve 6 passos distintos: 1. Adição do substrato à enzima; 2. doação de elétrons; 3. adição de oxigênio e rearranjo das moléculas; 4. doação do segundo elétron; 5. formação de água; 6. formação do substrato oxidado, conforme descrito na figura 08 (STEGMAN *et al.*, 1997).



**Figura 08.** Sistema de ação do citocromo P450 (STEGMAN *et al.*, 1997).

Peixes são receptores de químicos oriundos de fontes antropogênicas que são incorporados pelo organismo, através de processos fisiológicos e metabólicos e respondem à presença de contaminação por diversas formas. Uma das respostas mais consistentes é o aumento da atividade das enzimas oxigenases de função mista (OFM), particularmente a da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), que tem sido amplamente demonstrada em laboratório (SLEIDERINK *et al.*, 1995; COLLIER *et al.*, 1995; EGGENS *et al.*, 1995; LEVINE *et al.*, 1995; RATTNER *et al.*, 1996; CUSTER *et al.*, 1997; HODSON *et al.*, 1997; KOH *et al.*, 2001; REES *et al.*, 2005). Interpretar a significância desta indução, dependerá em parte da identificação e concentração de contaminantes aquáticos, aos quais estes peixes são expostos e, de outra parte, a identificação de variáveis abióticas e bióticas naturais, como temperatura da água, idade e maturidade sexual, que influenciam na expressão e, conseqüentemente, na resposta indutiva da EROD (SLEIDERINK *et al.*, 1995; CARLSSON e PART, 2001).

A atividade da EROD pode ser influenciada por um largo número de fatores bióticos e abióticos como: temperatura e pH da água, idade e fase reprodutiva. Além disso, a interação de orgânicos com metais traços (como exemplo o cobre), pode levar a uma massiva produção de metabólitos reativos que podem ser muito tóxicos aos organismos marinhos (STIEN *et al.*, 1997). Esta relação parece ter dependência do tempo, administração e dose do metal. Autores têm demonstrado em estudos “in vivo” e “in vitro” a indução por alguns metais e sugerem um estudo complementar de metalotioneínas para demonstrar a presença de metais na mistura de poluentes (STIEN *et al.*, 1997; HOLDWAY *et al.*, 1997; STANLEY *et al.*, 2005; GORBI *et al.*, 2005; GUNTHER *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 2000).

Metais pesados incluindo cádmio, níquel e mercúrio têm demonstrado uma forte toxicidade à organismos marinhos. Na presença destes metais, reduz-se em cerca de 50% a atividade do controle mensurada pela atividade EROD e expressão da CYP1A. Em muitas espécies de peixes, a inibição da atividade catalítica da P450 por certos poluentes é bastante observada (BOZCAARMUTLU e ARINÇ, 2004).

A indução de CYP1A pode ser reconhecida como um biomarcador valioso de exposição para xenobióticos, ativadores dos receptores Ah. EROD e hidroxilase aril hidrocarbono (AHH) são marcadores relativamente específicos de mediadores de atividade CYP1A e podem ser usados para mensurar a indução de CYP1A em peixes, pássaros e mamíferos (LETCHER *et al.*, 1996; TIMME-LARAGY *et al.*, 2006).

A indução de CYP1A por vários xenobióticos foi usada como biomarcador em diversas espécies de peixes teleósteos, mostrando uma diferença na mensuração pela atividade enzimática, quantificação imunológica protéica e níveis de mRNA (WILLIAMS *et al.*, 2000). Nestes trabalhos, a atividade da CYP1A foi avaliada via modificação da atividade EROD. As amostras foram analisadas fluorometricamente e baseadas na determinação da concentração da resorufina em comparação à curva padrão da mesma (ESTABROOK *et al.*, 1996; WALL e CRIVELLO, 1999; VERBRUGGE *et al.*, 2001).

A atividade da CYP1A1 EROD mede a atividade do grupo 1A1, através de uma reação de deetilação da Etoxiresorufina. Nesta reação, o substrato etoxiresorufina é hidrolizado a resorufina, um composto fluorescente e estável. A cinética enzimática pode ser seguida de 10 a 20 minutos com o uso de fluorímetro. Concentrações do substrato otimizado exógeno  $\beta$ -NADPH, juntamente com o uso de um tampão específico contendo inibidores de Diaforase e outras enzimas consumidoras de NADPH, permitem um bom desempenho da atividade da CYP1A1 EROD mesmo com baixas quantidades de homogenizado cru ou sobrenadante, por centrifugação a 9000g (fração pos-mitocondrial). Este procedimento é bastante rápido como também confiável e de fácil repetibilidade. O uso da indução do CYP1A como biomarcador de exposição é considerado um método de biotecnologia ambiental (O'HARE *et al.*, 1995; PARENTE, 2006; SCHLEZINGER *et al.*, 2006).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Organismos-teste

A Tilápia é originária da África, Jordânia e Israel, tendo sido introduzida no Brasil na década de 70. Os tipos mais cultivados são: tilápia do Nilo, tilápia vermelha e a chitralada ou tailandesa. As formas de cultivo utilizadas são a extensiva: realizada em açudes, onde o crescimento dos peixes depende, exclusivamente do alimento natural disponível; a semi-intensiva: conduzida em viveiros escavados em terreno natural.

No Brasil, a tilápia do Nilo (**Figura 09**), proveniente da Costa do Marfim no Oeste africano, foi introduzida no nordeste em 1971 e, então distribuída pelo país. A tilápia do Nilo é cultivada desde a bacia do rio Amazonas até o Rio Grande do Sul. O interesse pelo cultivo desta espécie, no sul e sudoeste do país, cresceu rapidamente nos últimos oito anos pela introdução da tecnologia da reversão sexual e a pesca esportiva, representado pelos “pesques-pagues”. A tilápia é criada em diversos sistemas, desde a cultura semi-intensiva em tanques que recebem dejetos animais, como em cultivo intensivos em tanques-rede. Acredita-se que, no Brasil, metade da produção anual de peixes cultivados seja de tilápias (LOVSHIN *et al.*, 1998 apud RAMOS, 2005).

#### **Taxonomia:**

Reino Animalia

Filo Chordata

Subfilos Pisces

Classe: Actinopterygii

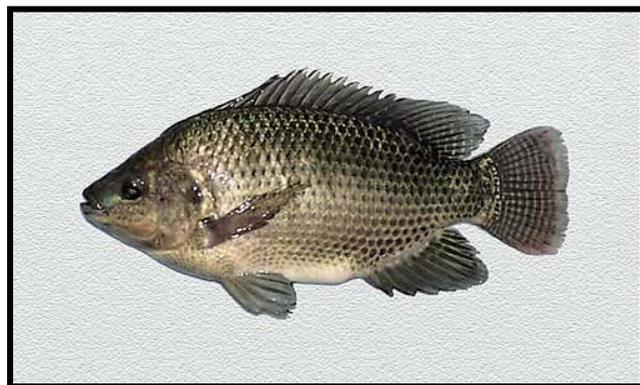
Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

Gênero: *Oreochromis*

Espécie: *Oreochromis niloticus*

Nome popular: Tilápia do Nilo



**Figura 09.** *Oreochromis niloticus*

**Biologia da Tilápia (RETEC, 2006);**

Tilápia (*Oreochromis niloticus niloticus*)

Tamanho do aquário: Mínimo de 120 litros

Tamanho máximo: 60cm

pH: Entre 6,8 e 7,2

Iluminação: forte

Dificuldade de criação e reprodução: fácil

Temperatura: Entre 22° e 26°C

Sociabilidade: Convive bem com outras espécies.

Modo de reprodução: Ovíparo e cuida da prole

Alimentação: Onívoro; se alimenta de pedaços de camarão, alimento floculado, larvas e minhocas.

A cadeia produtiva da tilápia é considerada uma das mais importantes da aquicultura brasileira. *O. niloticus* têm sido utilizados em estudos por serem peixes onívoros. Possuem uma ampla distribuição geográfica e abundância nos trópicos, e uma vantagem adicional que contempla seu uso em estudos de biomonitoramento é o fato de serem altamente resistentes a poluentes ambientais.

**4.2. Descrição da área de estudo e dos pontos de amostragem**

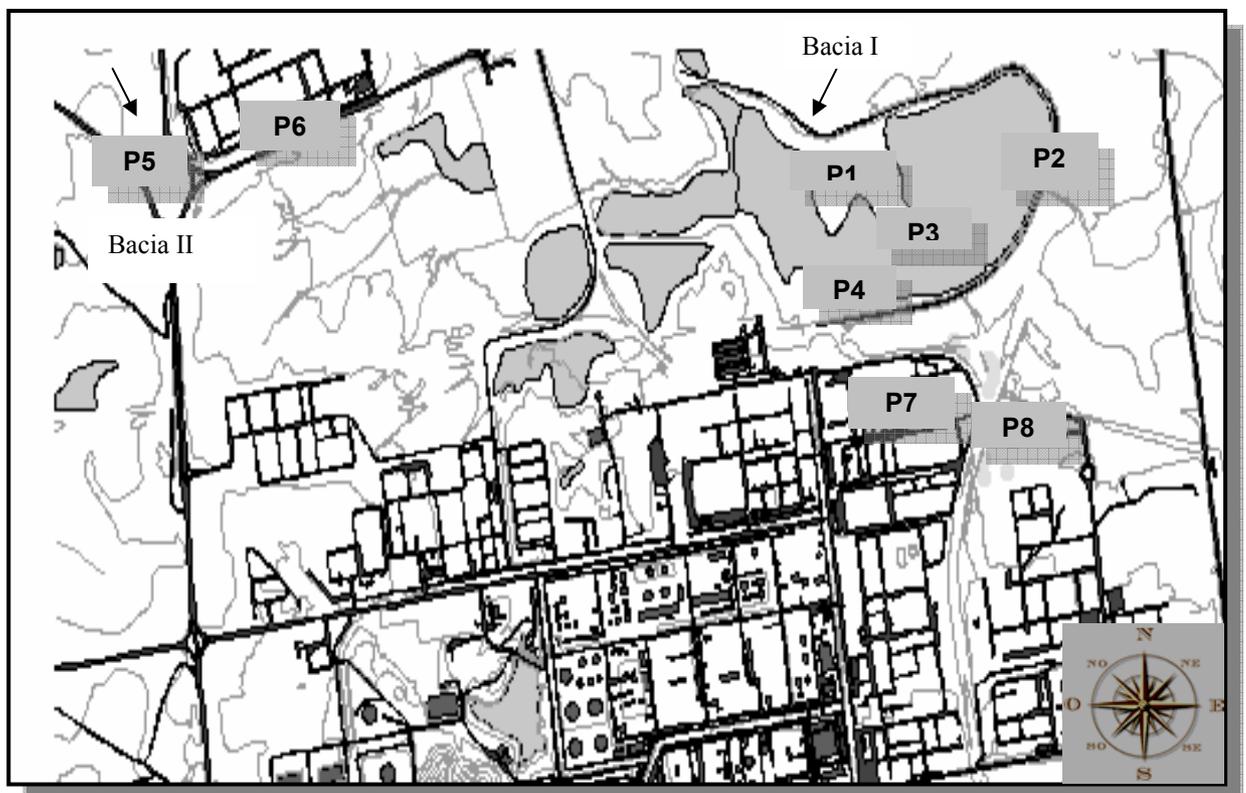
A área de estudo vem recebendo efluentes do sistema “não-orgânico” (oriundos de água de chuva e lixiviação de pátios), há vários anos que podem estar carreando poluentes prioritários, de longa meia vida, que entram em contato com a bacia, podendo causar poluição

Os pontos de amostragem foram definidos (**Figura 10**) em função da localização e importância para análise, devido à contribuições dos efluentes das empresas. Foram determinados oito pontos amostrais, indicados como P01 a P08 (**Figura 11**). Nos pontos P01 a P05 foram coletadas, amostras líquidas e sedimento. Nos pontos P06 a P08 foram coletadas apenas as correntes líquidas retiradas diretamente das canaletas de transporte do efluente não orgânico para a lagoa de contenção.



**Figura 10.** Foto aérea da área de estudo (Fonte: CETREL).

As coletas foram realizadas em 6 campanhas, sendo 3 durante a estação seca (Agosto, Outubro e Dezembro de 2005) e outras 3, na estação chuvosa (Março, Abril e Maio de 2006).



**Figura 11.** Mapa de localização dos pontos de coleta, gerado pelo software Arc View.

O georeferenciamento destes pontos foi realizado com o GPS TRIMBLE GEOEXPLORER 3. A descrição dos pontos amostrais se encontra na **Tabela 03**.

**Tabela 03.** Coordenadas Geográficas dos pontos amostrais.

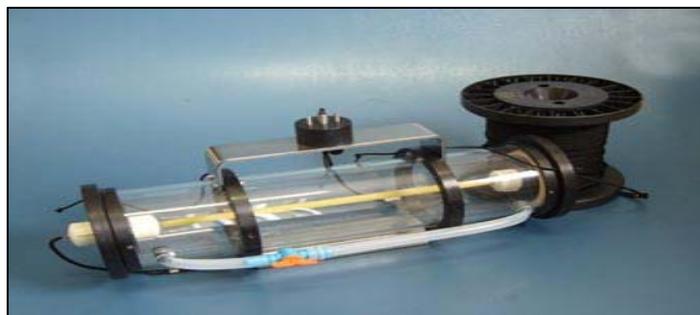
<b>Ponto</b>	<b>Descrição</b>	<b>Amostragem</b>
P1	Borda oeste da bacia I	Água e Sedimento
P2	Borda leste da bacia I	Água e Sedimento
P3	Parte profunda da bacia I	Água e Sedimento
P4	Interior da bacia I	Água e Sedimento
P5	Interior da Bacia II	Água e Sedimento
P6	Canal da bacia II	Água
P7	Canal II - Reversão para bacia I	Água
P8	Canal III - Final	Água

### 4.3. Tratamento das amostras

As amostras coletadas foram levadas ao LABIOMAR, onde o trabalho experimental foi realizado obedecendo a protocolos existentes no laboratório (CETESB, 1990a; CETESB,1990b; NASCIMENTO, 2000; NASCIMENTO, 2002). As amostras tiveram acondicionamento apropriado durante o processo de coleta, transporte, preservação, preparo e análise, segundo as técnicas recomendáveis pela CETESB (1990a;b) e Nascimento (2002).

#### 4.3.1. Água

As amostras líquidas foram coletadas em garrafa de Van Dorn (**Figura 12**), armazenadas em frascos coletores com capacidade de 20L e acondicionadas em freezer 20°, por 48h, até a hora do uso.



**Figura 12.** Garrafa de Van Dorn: coleta de amostras líquidas.

### 4.3.2. Sedimento

As amostras de sedimento foram coletadas com draga de Pettersen (**Figura 13**), armazenadas em sacos plásticos identificados e congeladas no freezer 20°C até posterior uso.



**Figura 13.** Coleta de sedimento através da draga de Pettersen.

Os procedimentos utilizados para efetuar a coleta foram seguidos por POPs (Procedimentos Operacionais Padrão) de “Técnicas de coletas, preservação e preparo de amostras líquidas e de sedimento para Testes de Toxicidade” utilizados frequentemente no LABIOMAR.

## **4.4. Execução dos testes**

### **4.4.1. Preparação dos Organismos**

O teste foi realizado segundo a ABNT-NBR 15088 (ABNT 2004b) – Métodos de ensaios com peixes, com adaptações. Os juvenis foram doados mensalmente pela estação de piscicultura do DNOCs (Departamento Nacional de Obras Contra as Secas), Itiúba-Bahia, onde normalmente são criadas sob condições controladas. Estes foram transportados para o laboratório de Biologia Marinha da UFBA em sacos plásticos com água da piscicultura com oxigênio suficiente, para minimizar o estresse e conservá-los em boas condições de saúde. No laboratório, os juvenis foram aclimatizados por um período de 1 semana, em aquário com capacidade para 100L, com água de diluição (água tratada pela EMBASA, reservada em recipientes plásticos, desclorinizada por 72hs com aeração constante), e alimentados 1 vez/dia. Esse processo ocorreu durante todo o período de aclimatização dos organismos.

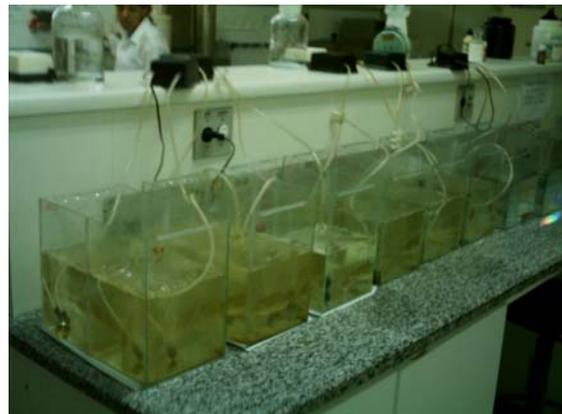
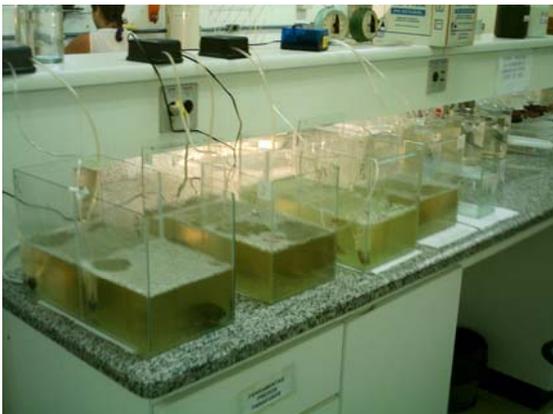
Os peixes foram colocados em aquários com 10L de água de diluição (desclorinizada) e aeração constante por um período de 24 horas antes do teste. Os organismos foram sacrificados por incisão cerebral; foi realizada a biometria e dissecação para retirada dos

figados, que foram acondicionados e identificados. As características físico-químicas da água (pH, dureza, amônia e temperatura) foram avaliadas no início e no final dos testes.

Os animais foram selecionados, com base no tamanho (9 - 13 cm) e peso (30 a 40 g). Esta seleção dá uma idéia aproximada da idade (fase reprodutiva) e maturidade dos animais. Além disso, foram examinados pH, (ótimo em 7,4 a 7,6, segundo Khan *et al.*, (1998)) e temperatura, fatores estes que segundo alguns estudos podem levar a uma interferência na atividade enzimática (DURAND-PERDU e CRAVEDI, 1989; ANDERSSON e KOIVUSAARI, 1985 apud O'HARE *et al.*, 1995; MATTSON *et al.*, 1998).

#### 4.4.2. Exposição dos organismos

As amostras foram colocadas em aquários com capacidade de 10L, distribuídas em 5 réplicas por ponto. Cada aquário continha 4L de água (amostra) e 1 peixe (juvenil de tilápia) exposto por 24 horas sob condições ambientais adequadas, incluindo aeração (**Figuras 14 e 15**). As amostras de sedimento (300g/ aquário ocupando cerca de 1,5cm de altura), ao longo do fundo do aquário, foram cobertas com uma camada de água de diluição (4L de volume total), sob as mesmas condições e número de peixes (**Figuras 16 e 17**). Parâmetros físico-químicos (temperatura, pH, nitrato, amônia, turbidez, sólidos em suspensão, dureza e sulfeto) foram analisados no início e no final do experimento.



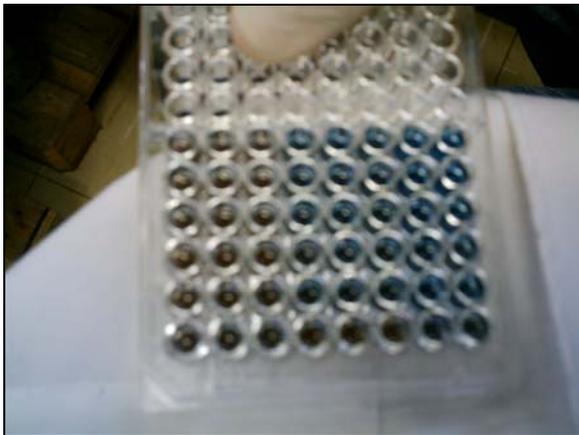
**Figuras 14 e 15.** Montagem dos testes com amostras líquidas



**Figuras 16 e 17.** Montagem dos testes com sedimento

#### 4.4.3. Preparação da fração citosólica (S9)

Após a exposição, todos os peixes foram sacrificados, mensurados e pesados (**Apêndice I**). O fígado de cada animal foi extraído, pesado, lavado em KCl 0,150M para remoção dos resíduos de sangue, mergulhado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até uso posterior. Fígado de 5 peixes, provenientes de cada ponto amostral (P1 a P8), foram homogeneizados com solução tampão A+B do kit CYP1A1 EROD ACTIVITY, inibidora de protease, em uma proporção de 2mL da solução/ 0,5g de tecido, usando um homogeneizador mecânico. Homogeneizados hepáticos foram aliqüotadas em microtubos de 2mL, destinados à quantificação da atividade EROD e determinação de proteínas totais, segundo metodologia de Bradford (1976) (**Figuras 18 e 19**), utilizando o espectrofotômetro de microplaca Molecular Devices – Spectra Max Plus 384, por leitura de absorbância a 595nm.



**Figuras 18 e 19.** Determinação de proteínas totais por espectrometria através da técnica de Bradford.

O material reservado para EROD foi subsequentemente centrifugado a 9000g por 30 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ , para obtenção da fração citosólica (S9) e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior quantificação da atividade (**Figuras 20 a 25**).



**Figuras 20 a 22.** Biometria e sacrifício dos organismos teste.

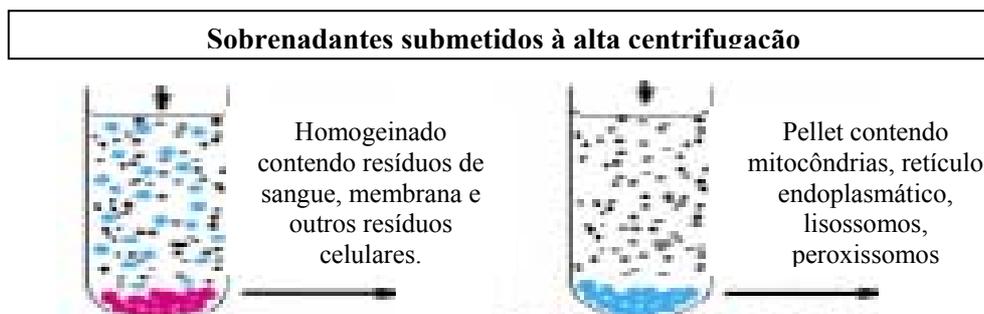


**Figuras 23 a 25.** Retirada do fígado, separação e congelamento em N<sub>2</sub> (liq).

#### 4.4.4. Análise Enzimática

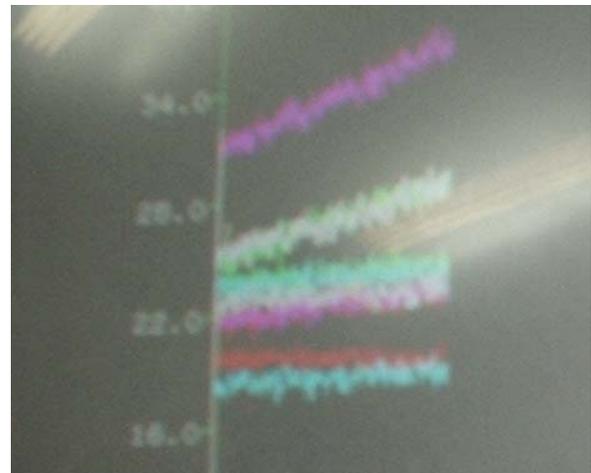
A atividade enzimática da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) foi determinada na fração hepática S9 através de ensaio descrito por Burker *et al.* (1985), modificado posteriormente por Pohl e Fouts (1980) e Klotz *et al.*, (1984), com adaptações para utilização do KIT CYP1A1 EROD ACTIVITY (**Figura 26**). O princípio deste método baseia-se na avaliação da EROD por espectrofluorimetria do metabólito 7-hidroxiresorufina, em presença do cofator NADPH e do citocromo P450 da fração S9 (amostra) em pH=7,8, utilizando a resorufina como padrão interno para cálculo do coeficiente de extinção molar (PROUGH *et al.*, 1978). Na avaliação da deetilação da 7-etoxiresorufina-O-deetilase foi mensurado na reação da cinética enzimática usando como referência a resorufina (OOST *et al.*, 1996; BURKER e MAYER, 1974 apud MALMSTROM *et al.*, 2004).

Enzimas P450 realizam reações de hidrólise e oxidação (Fase I- Biotransformação). A centrifugação de células do fígado a 9000g (fração S9 – obtida após homogeneização e centrifugação) formam precipitados de núcleos, mitocôndrias, lisossomas e fragmentos de membrana.



**Figura 26.** Esquema de obtenção da fração S9 (PARENTE , 2006).

A quantidade de resorufina formada foi mensurada em triplicata, sob temperatura controlada (30°C), (IMBER *et al.*, 1995) em leitura com cubeta de quartzo, utilizando o espectrofluorímetro (Spectrofluorophotometer-Shimadreu RF-5000) (**Figura 27**), com excitação de 550nm, emissão de 582nm e largura de faixa 5nm, no laboratório de Toxicologia Ambiental da FIOCRUZ/RJ. A reação foi iniciada pela transferência 1,850mL da solução C (tampão de reação) e 3µL de etoxiresorufina (Solução E) para a cubeta de quartzo e após 3minutos pela adição de 50µL (ou 100µL a depender da quantidade de proteínas totais obtidas) na fração S9. Após 2minutos, adicionou-se 10µL de β-NADPH, e a fluorescência (FLU) foi medida a cada segundo, por um período total de 1,5minuto, gerando um gráfico linear (**Figura 28**), através do qual foi obtido o ΔFLU (média de fluorescência). A quantidade de resorufina formada foi determinada por meio de uma curva padrão de concentração de resorufina x intensidade da fluorescência. A atividade da EROD foi calculada pela divisão da quantidade de resorufina formada (ΔFLU/min) pela quantidade de proteínas totais calculadas por amostras, pelo tempo de reação (UFL/pmols/mg proteínas/min)<sup>-1</sup>, e expressa em picomoles por minuto e por miligramas de proteínas da fração S9, por mililitro do homogenado (pmoles/min/mg/mL).



**Figuras 27 e 28.** Spectrofluorophotometer-Shimadreu RF-5000 e gráfico gerado por ele, pela leitura das amostras.

#### 4.5. Tratamento estatístico

Os dados foram analisados no programa Grafphad usando-se o teste t de student, afim de comparar médias; One-way Analysis of Variance (ANOVA) e Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test, para comparar as variâncias das médias e comparação de médias múltiplas entre os grupos amostrais e o controle. Estes análises buscaram identificar o índice de

variação das médias, nos diferentes pontos e entre o controle. Diferenças significativas foram determinados com nível de probabilidade de 0,05. Cálculos estatísticos foram realizados utilizando os programas MINITAB, EXCEL e ORIGIN 1.6.

Para enriquecimento e exploração dos dados, foram realizadas análises de componentes principais – PCA, com o intuito de verificar as variáveis mais importantes dentre os resultados. Análises de correlação entre os parâmetros físico-químicos e quantificação da atividade EROD para cada ponto foram realizadas, com o intuito de investigar as possíveis causas do aumento (ou decréscimo da atividade EROD) para fins de complementação do trabalho.

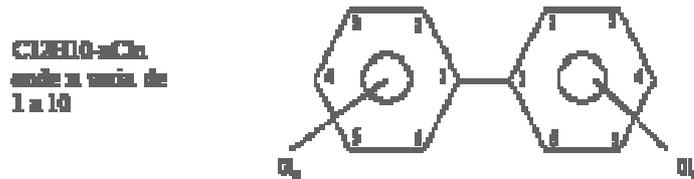
#### **4.6. Controle Positivo**

Em estudos de biomonitoramento usando biomarcadores enzimáticos, um controle negativo é fundamental para comparar as amostras coletadas no ambiente-teste com amostras consideradas padrão – valor da atividade mais próxima do basal. Porém apenas com um controle positivo, utilizando uma substância referência, pode-se verificar a intensidade do efeito causado (MALMSTROM *et al.*, 2004).

O Ascarel, tecnicamente chamado de Alocloro 124, é um óleo resultante da mistura de hidrocarbonetos, derivados de petróleo, utilizado como isolante em equipamentos elétricos, sobretudo transformadores. Seu uso foi proibido, no Brasil em 1981, mas ainda existem muitos equipamentos abandonados, contendo ascarel, em subestações de trem e edifícios industriais (USEPA, 1986).

Por ser um composto formado por uma mistura de indutores de CYP1A1, ascarel foi utilizado no teste de controle positivo, empregando diferentes tratamentos com quantificação da indução de Atividade EROD, obedecendo à mesma metodologia da quantificação da atividade EROD descrita anteriormente, através de exposição (AA4, AAX e AA10), na concentração de 1:5 (1L da fração solúvel de ascarel + 4L de água de diluição). Além disso foi feito um controle negativo com 5L de água de diluição (C1 a C5); o outro tratamento foi por injeção intraperitoneal com 25µg/L (IP1 a IP5) e 100µg/L (IP6 e IP9) de ascarel, como demonstrado na **no Apêndice 2**. Os indivíduos AA1 a AA3; AA5 a AA9; IP7, IP8 e IP10 morreram antes de completar as 24h de exposição e seus fígados não puderam ser utilizados para análise.

O ascarel é uma mistura de PCBs que foi muito utilizado em meio industrial. (VEGA-LOPEZ *et al.*, 2006) (**Figura 29**). Bifenis policlorados (PCBs) são poluentes ambientais altamente tóxicos com modelos específicos de ação e têm si por mais de 70 anos em diversas aplicações industriais. De acordo com os dados da Agência de Substâncias Tóxicas e Registros Perigosos –ATSDR, em 2001 os PCBs atingiram a quinta posição no ranking de poluentes prioritários com base nos riscos para a vida aquática.



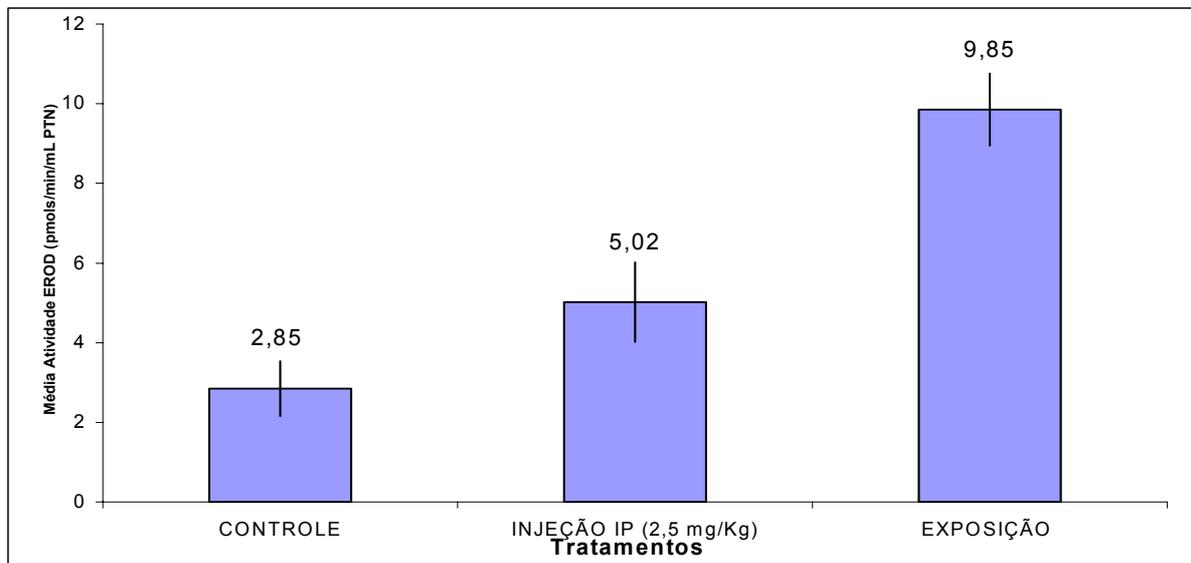
**Figura 29.** Estrutura do ascarel (VEGA-LOPEZ *et al.*, 2006)

Estudos mostram que o mecanismo de ação desses poluentes interferem também no sistema das OFM, envolvendo o metabolismo de esteróides e competindo pelo receptor Ah (CUSTER *et al.*, 1997). Existe uma significância no nível de regulação da EROD com a atividade observada no tratamento intraperitório (HARTL *et al.*, 2004). O tratamento com o PCB 126 induz um aumento no retículo endoplasmático e também no número de lisossomos no corpo celular (LOVSHIN e CYRINO, 1998). Assim, obteve-se um controle positivo em tilápias tratando-as com Ascarel (uma mistura de PCBs, servindo como um potente indutor de CYP1A).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Resultados do teste de Controle Positivo

O resultado do teste de controle positivo (**Figura 30**) demonstrou um aumento da atividade enzimática da EROD, quando comparada a cada bioensaio, indicando que a exposição (a metodologia empregada neste trabalho), indica uma melhor resposta, quando comparada a outros tratamentos como a injeção intraperitoneal, o que nos permite uma maior confiabilidade nos dados encontrados neste trabalho.



#### COMPARAÇÃO DE MÉDIAS MÚLTIPLAS – Controle Positivo

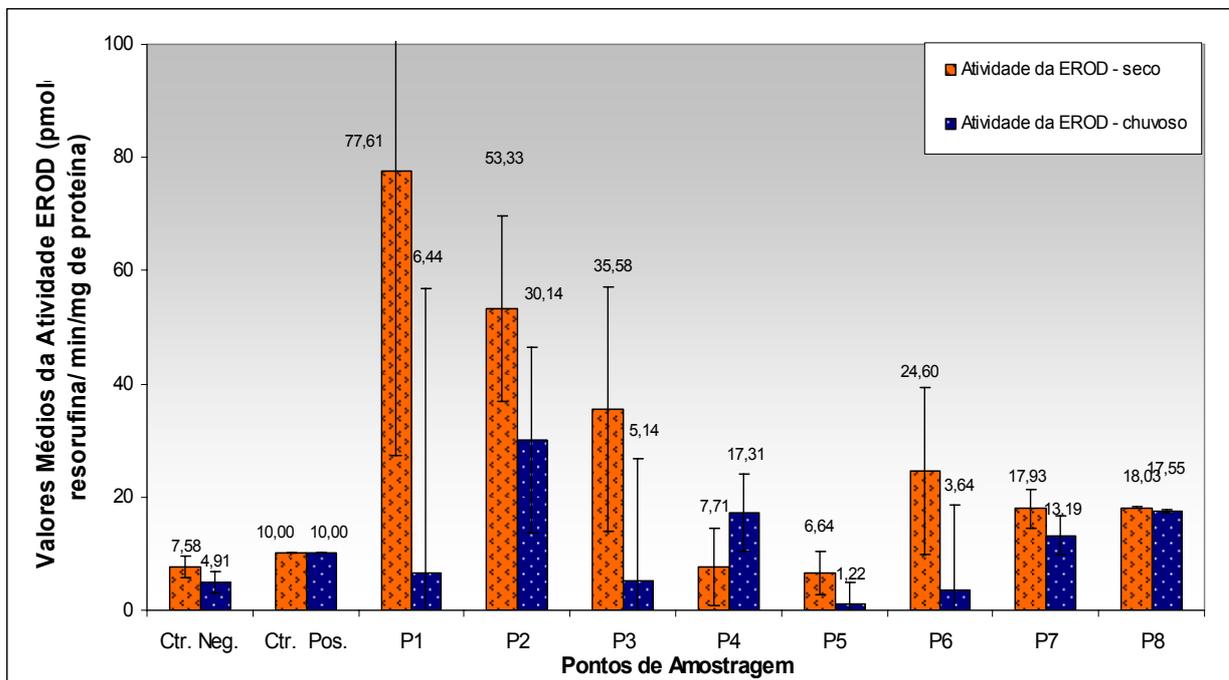
Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

Tratamento	EXPOSIÇÃO	INJEÇÃO	CONTROLE
Teste de Atividade EROD (pmols/mim/ml)	9,85	5,02	2,85
	-----	-----	-----

**Figura 30.** Valores Médios de Atividade EROD em diferentes tratamentos realizados no controle positivo com ascarel.

## 5.2. Atividade EROD em Água superficial

Os resultados dos testes obtidos com água superficial (**Figura 31**) caracterizam o ambiente como moderadamente poluído por indutores de CYP1A1, incluindo HPAs carcinogênicos, o que foi evidenciado pelos diferentes níveis de indução de CYP1A1, observadas pelas concentrações de atividade EROD, em alguns pontos de amostragem, quando comparadas ao controle. Gráficos de variação das atividades encontram-se em anexo (**Apêndice 4**). Através da comparação de médias múltiplas nos dois períodos amostrais observa-se que, no período seco, os pontos que diferiram do controle (P1, P2, P3 e P6) não apresentaram a mesma diferença significativa no período chuvoso, com exceção de P2.



### COMPARAÇÃO DE MÉDIAS MÚLTIPLAS (Período Seco)

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

Pontos de Amostragem	P1	P2	P3	P6	P8	P7	P4	CTR. POS.	CTR. NEG.	P5
Teste de Atividade EROD (pmoles/mim/ml)	77,61	53,33	35,58	24,60	18,03	17,93	7,71	10,00	7,58	6,64
	!.....!				!.....!					

### COMPARAÇÃO DE MÉDIAS MÚLTIPLAS (Período Chuvoso)

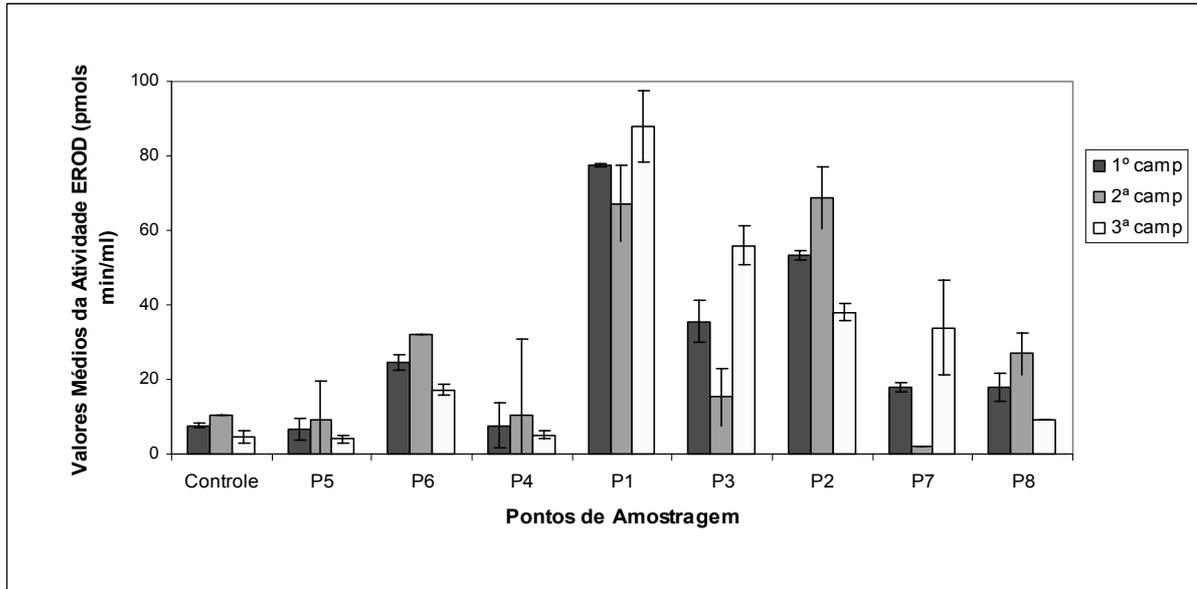
Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

Pontos de Amostragem	P2	P8	P4	P7	CTR. POS.	P1	P3	CTR. NEG.	P6	P5
Teste de Atividade EROD (pmoles/mim/ml)	30,14	17,55	17,31	13,19	10,00	6,44	5,14	4,91	3,64	1,22
	!.....!									

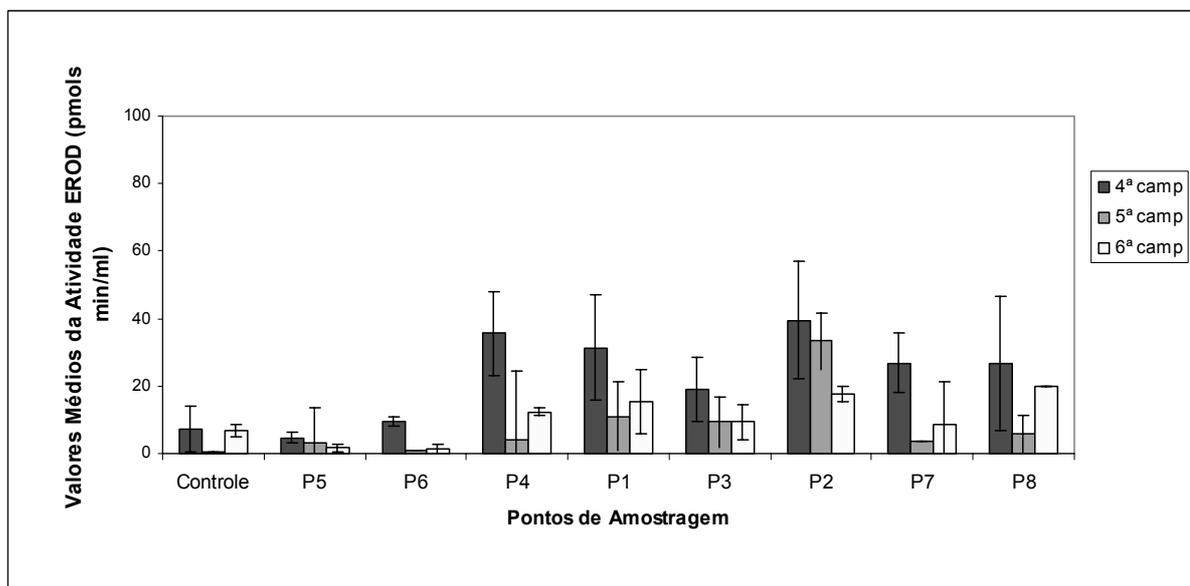
**Figura 31.** Valores médios da indução da atividade EROD (pmoles resorufina/mg proteína/min) em células hepáticas (fração S9) de tilápias (*O. niloticus*) expostas à água superficial da área de estudo Camaçari-BA.

Nos gráficos 32 e 33, estão representadas as médias da atividade EROD obtidas em cada campanha. Nota-se equivalência significativa entre as médias das campanhas a cada período.

Durante o período seco, os pontos no interior da Bacia (P1 a P4) foram os que apresentaram maior atividade EROD, nas 3 campanhas referentes a este período (**Figura 32**). Em se tratando do período chuvoso, os pontos P1 a P4 continuaram a ter uma toxicidade maior (**Figura 33**), porém, estatisticamente menor quando comparada ao período seco.



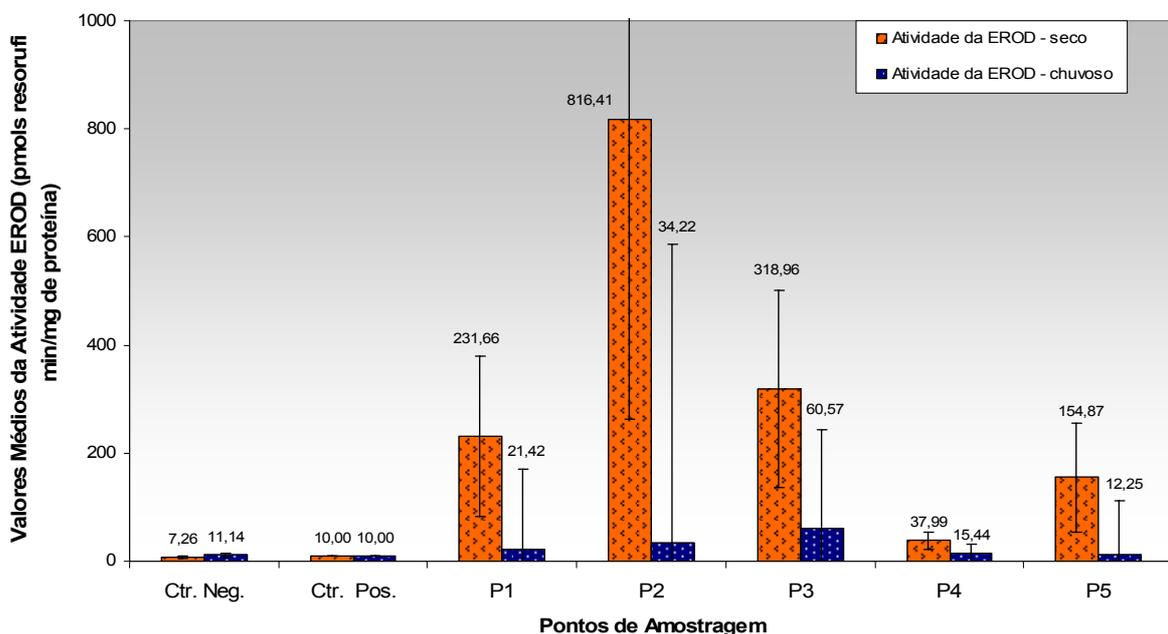
**Figura 32** - Valores Médios da indução da Atividade EROD (pmoles resorufina/mg proteína/min) em fígado de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas à água superficial no **período seco** por ordem de fluxo da área de estudo, Camaçari-BA.



**Figura 33** - Valores Médios da indução da Atividade EROD (pmoles resorufina/mg proteína/min) em fígado de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas a água superficial no **período chuvoso**, por ordem de fluxo, da área de estudo, Camaçari-BA.

### 5.3. Atividade EROD em Sedimento

Os resultados dos testes obtidos com sedimento (**Figura 34**) mostraram uma maior atividade enzimática, quando comparadas ao controle e também quando comparados aos resultados dos testes com água superficial, confirmando a evidência de um ambiente sedimentar poluído por indutores de CYP1A1. Segundo a comparação de médias múltiplas, os pontos P2 e P3 diferiram significativamente do controle, respectivamente nos períodos seco e chuvoso. Valores relativamente altos de HPAs, como benzeno, foram encontrados nos pontos da Bacia, principalmente no P5, onde supostamente a resposta EROD atingiu valores próximo ao controle.



#### COMPARAÇÃO DE MÉDIAS MÚLTIPLAS (Período Seco)

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

Pontos de Amostragem	P2	P3	P1	P5	P4	CTR. POS.	CTR. NEG.
Teste de Atividade EROD (pmoles/mim/ml)	816,41	318,96	231,66	154,87	37,99	10,00	7,26
	!.....!	!.....!	!.....!	!.....!	!.....!	!.....!	!.....!

#### COMPARAÇÃO DE MÉDIAS MÚLTIPLAS (Período Chuvoso)

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

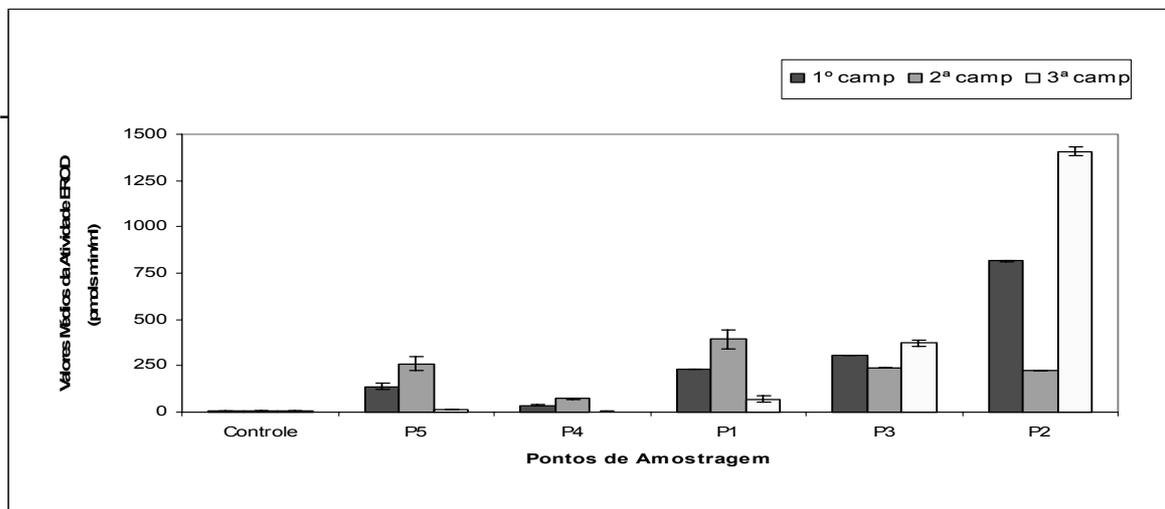
Pontos de Amostragem	P3	P2	P1	P4	P5	CTR. NEG.	CTR. POS.
Teste de Atividade EROD (pmoles/mim/ml)	60,57	34,22	21,42	15,44	12,25	11,14	10,00
	!.....!	!.....!	!.....!	!.....!	!.....!	!.....!	!.....!

**Figura 34.** Valores médios da indução da atividade EROD (pmoles resorufina/mg proteína/min) em células hepáticas (fração S9) de tilápias (*O. niloticus*) expostas ao sedimento da área de estudo Camaçari-BA.

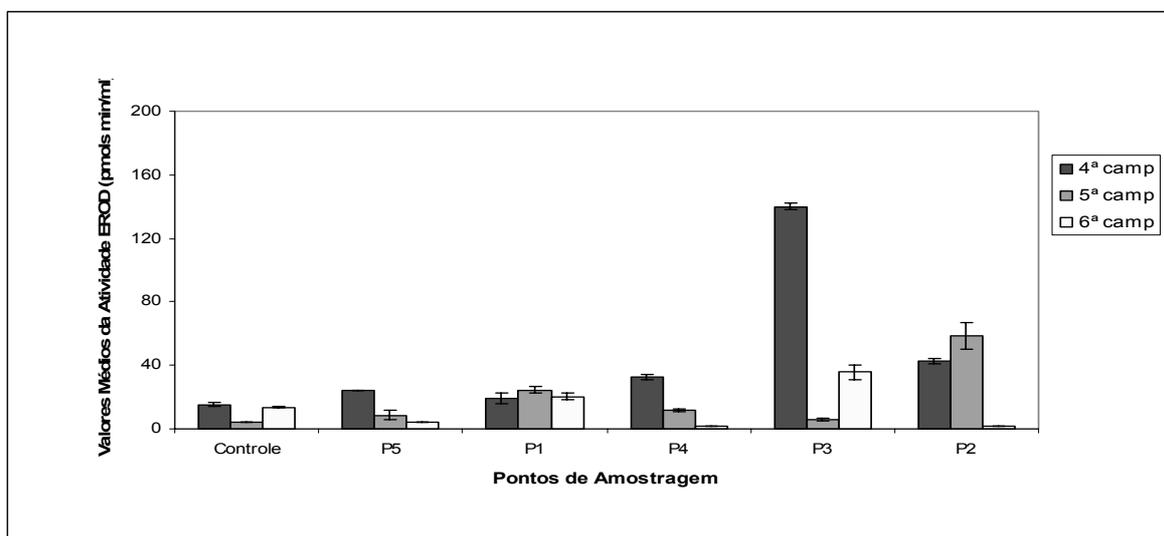
Considerando os altos valores de metais pesados no sedimento e valores também relativamente altos de benzeno na água, detectados por análises químicas, supõe-se que a presença dos metais possa ter inibido a atividade EROD, visto que, os valores de metais obtidos através de análises químicas, foram altos em relação ao limite permissível pela

resolução CONAMA nº 357/2005 e 344/2004; entretanto, pontos que tiveram valores de atividade EROD significativamente altos, quando comparados ao controle, também apresentaram valores altos de metais, não se podendo confirmar assim, se o nível de metal, influenciou diretamente na inibição da atividade EROD.

Os pontos que apresentaram maiores concentrações de poluentes indutores de CYP1A foram as bordas da Bacia do Complexo (P1 e P2 – borda oeste e leste da lagoa, respectivamente). Os valores de atividade EROD no período chuvoso (**Figura 36**), foram mais baixos do que os relacionados ao período seco **figura 35** com exceção do P4 (interior da lagoa – próximo ao ponto de chegada do canal das ruas hidrogênio) (MATIAS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2006a; RODRIGUES *et al.*, 2006b; RODRIGUES *et al.*, 2006c; LACERDA *et al.*, 2006a; LACERDA *et al.*, 2006b)



**Figura 35** - Valores Médios da indução da Atividade EROD (pmoles resorufina/mg proteína/min) em fígado de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas ao sedimento do **período seco**, por ordem de fluxo, da área de estudo, Camaçari-BA.



**Figura 36** - Valores Médios da indução da Atividade EROD (pmoles resorufina/mg proteína/min) em fígado de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas ao sedimento do **período chuvoso**, por ordem de fluxo, da área de estudo, Camaçari-BA.

Esses experimentos demonstraram que contaminantes em efluentes, mesmo em baixa concentração causam aumento da atividade OFM em peixes, como também demonstrado por Hodson *et al.* 1997, que avaliou o aumento da EROD em trutas expostas a diversas concentrações de efluentes (MARIA *et al.*, 2002a; b; JIMENEZ-TENORIO *et al.*, 2006). Além disso, houve um aumento significativo da atividade da EROD durante todo o período de exposição em todos os pontos quando comparados ao controle.

Como toda substância, o aumento na atividade EROD com aumento da concentração até uma resposta máxima está relacionado à concentração do tóxico (LEVINE *et al.*, 1995; CARLSSON e PART, 2001). Como ferramenta de monitoramento a atividade EROD provou ter uma ação relativamente rápida em compostos tóxicos planares em peixes. Assim, a EROD é frequentemente referência a um “sistema de aviso rápido” (BEIRAS, 2006), para predizer riscos ambientais por contaminantes.

#### 5.4. Análises Físico-químicas

A caracterização físico-química e toxicológica de efluentes líquidos, tanto industriais como domésticos, e de agentes químicos é um procedimento de prevenção à poluição e tem por objetivo final estabelecer limites máximos permissíveis para proteção à vida aquática. Esses limites conhecidos como critérios e/ou padrões de emissão de efluentes líquidos e de qualidade das águas, são utilizadas mundialmente como valores de referência para o monitoramento ambiental (ZAGATTO *et al.*, 2006).

Na realização deste trabalho foram realizadas análises físicas e físico-químicas “in situ” (pH, Amônia, Amônio, Nitrito, Turbidez, Oxigênio Dissolvido, Condutividade, Salinidade, Temperatura e Sólidos Totais Dissolvidos) e “ex situ” (Cor, Alcalinidade Total, Dureza-Cálcio, Cloreto, Sílica, DQO, Sulfato, Amônia, Nitrito). Os resultados dessas análises, serviram para conhecer a variação dos parâmetros, nos dois períodos analisados: seco e chuvoso. Os resultados das análises indicam que houve variação significativa entre os períodos em todos os parâmetros.

Os parâmetros em **negrito** são requisitos para lançamento de efluentes em corpos hídricos. Os limites são os indicados pela resolução CONAMA nº 357/2005. A **tabela 04** representa uma matriz, em que as células sombreadas refletem valores muito acima dos limites (considerou-se “muito acima”, valores duas vezes acima do valor limite para cada parâmetro); as células

somente com bordas mais grossas indicam valores não muito significativos em relação ao limite (considerou-se “não significativo”, valores menores de duas vezes o valor limite).

#### 5.4.1. Parâmetros físico-químicos analisados “in situ”

Os parâmetros apresentados na **tabela 04 e 05** são médias dos resultados obtidos nas análises realizadas nos pontos amostrais durante os dois períodos. Em destaque os valores muito acima do padrão estabelecido pela resolução CONAMA nº 357/05 sob o lançamento de efluentes no corpo receptor.

**Tabela 04** - Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados no **período seco** das amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA.

Parâmetro	Limite*	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
pH	6 a 9	5,8	7,8	6,8	5,8	6,8	7,1	6,1	7,2
NH+4 (mg N-NH+4/L)	<10	6,8	8,0	26,7	7,4	2,9	1,8	51,9	27,2
NH+3 (mg N-NH3/L)	<1,0	0,0	9,3	6,7	0,0	0,1	0,0	1,6	0,2
NO-3 (mg N-NO-3/L)	0,5 - 3,7	8,9	7,9	9,2	10,7	0,0	5,7	29,4	5,7
Turbidez (NTU)	<40	36,8	21,2	20,3	52,5	36,1	35,2	27,0	30,7
O.D. (mgO2/L)	> 6	2,3	2,7	4,2	4,6	2,2	2,1	2,1	2,2
Cond (mS/cm)	>100	1497	1783	1693	1246,7	0,7	0,9	9,1	4,1
Salinidade (‰)	< 0,5	0,7	0,8	0,8	0,7	0,4	0,4	4,9	2,1
STD (mg/L)	500	868,7	1080	1023	928,7	0,7	0,5	5,7	1,9
Temperatura (°C)	<20	30,2	28,5	29,4	30,4	31,1	30,8	32,4	29,0

\* Limite Baseado na Resolução CONAMA nº. 357/2005

**Tabela 05** - Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados no **período chuvoso** das amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA.

Parâmetro	Limite*	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
pH	6 a 9	6,5	7,5	8,1	7,1	7,4	6,6	7,6	7,4
Turbidez (NTU)	<40	67,6	35,8	22,3	24,0	7,9	8,2	9,9	27,0
O.D. (mgO2/L)	> 6	6,3	6,6	6,6	6,5	6,6	6,3	6,3	6,7
Cond (mS/cm)	>100	673,3	887	996,7	1256,7	0,2	0,4	5,4	1,4
Salinidade (‰)	< 0,5	0,3	0,4	0,5	0,6	0,1	0,2	2,7	0,7
STD (mg/L)	500	429	576	647,3	808,3	0,2	0,2	3,3	0,9
Temperatura (°C)	<20	27,4	24,2	25,4	25,6	26,5	25,7	28,3	26,0

\* Limite Baseado na Resolução CONAMA nº. 357/2005

OBS: Os parâmetros amônia, amônio e nitrito não puderam ser analisados neste período.

#### 5.4.2. Parâmetros físico-químicos analisados em laboratório externo

Para complementar e comparar os resultados realizados durante o teste, além de conhecer a natureza físico-química das amostras, foram realizadas análises dos parâmetros listados abaixo, em todos os pontos de amostragem (**Tabela 06 e 07**).

**Tabela 06** - Valores Médios dos parâmetros físico-químicos analisados no **período seco** das amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA.

Parâmetro	Limite*	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<b>Cor (Pt/L)</b>	<b>75 Pt/L</b>	55,67	25,33	33,00	43,00	18,00	7,00	9,34	14,00
Alcalinidade Total (mg/L)	-	24,40	31,33	20,83	17,80	26,70	36,73	64,25	122,83
Dureza-Cálcio (mg/L)	-	163,61	166,6	187,2	158,1	121,9	227,33	689,28	167,10
<b>Cloreto (mg/L)</b>	<b>&lt;250</b>	93,37	129,8	114,4	97,55	32,78	34,41	1578,50	670,35
Sílica (mg/L)	< 125	22,80	20,28	22,52	23,55	8,27	6,73	14,85	12,93
<b>DQO (mg/L)</b>	<b>&lt;3</b>	40,00	45,56	39,56	46,06	14,50	16,00	183,70	90,90
Sulfato (mg/L)	-	347,23	447,8	338,8	334,6	475,8	312,51	579,79	421,81
Amônia (mg/L)	-	3,39	2,54	2,70	3,84	1,54	0,73	18,96	6,69
<b>Nitrito (mg/L)</b>	<b>&lt;1,0</b>	0,34	0,13	0,21	0,10	0,17	0,19	0,93	0,58

\* Limite Baseado na Resolução CONAMA nº. 357/2005

**Tabela 07** - Valores Médios dos parâmetros físico-químicos analisados no período chuvoso das amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA.

Parâmetro	Limite*	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<b>Cor (Pt/L)</b>	<b>75 Pt/L</b>	115,33	51,66	33,66	58,00	24,66	26,33	41,67	40,00
Alcalinidade Total (mg/L)	-	10,00	25,53	26,46	25,63	6,20	10,10	198,00	40,83
Dureza-Cálcio (mg/L)	-	50,02	111,4	108,8	202,7	96,65	159,42	816,32	376,39
<b>Cloreto (mg/L)</b>	<b>&lt;250</b>	59,65	98,85	99,81	70,28	9,80	11,02	1130,30	311,95
Sílica (mg/L)	<125	13,89	9,03	7,43	9,87	3,88	4,63	10,73	7,42
<b>DQO (mg/L)</b>	<b>&lt;3</b>	47,03	35,13	37,30	41,75	26,63	38,63	100,13	39,73
Sulfato (mg/L)	-	256,00	236,5	269,8	283,8	76,60	121,81	195,63	290,76
Amônia (mg/L)	-	16,84	18,55	23,92	21,01	9,17	15,58	282,93	26,46
<b>Nitrito (mg/L)</b>	<b>&lt;1,0</b>	0,61	2,30	3,87	2,23	0,18	0,25	0,88	4,12

OBS: Limite Baseado na Resolução CONAMA nº. 357/2005

Uma melhor caracterização dos parâmetros foi feita, durante o período dos testes (inicial e final) realizados no laboratório, com água e sedimento coletados nos pontos de amostragem, melhor correspondendo às condições de exposição dos organismos-testes.

## 5.5. Análises Químicas

Foram realizados também análises químicas de aromáticos (Benzeno, Tolueno, Etil-benzeno, p+m+o xilenos, C9's Aromáticos, Fenol, Naftaleno, Fenantreno e Antaceno) e metais (Mercúrio, Cobre, Chumbo, Zinco, Níquel, Cromo, Ferro, Manganês, Alumínio, Cádmiio e Arsênio), com o intuito de se conhecer a composição das amostras.

A técnica utilizada para determinação química foi a de cromatografia gasosa, para análise de poluentes prioritários voláteis, objetivando análise dos HPAs [MCRO 018 (EPA-8260)]; para análise de metais, foi utilizado a técnica de espectrofotometria de absorção atômica de chama [MESP 110 (ASTM D5258/02)], ambos em efluente e sedimento. A coleta deste material foi realizado em frascos adequados para cada análise.

### 5.5.1. Metais

As análises químicas realizadas nas amostras de água superficial revelaram a presença de metais traços essenciais e não essenciais como: Mercúrio, Zinco, Chumbo, Cromo, Ferro, Manganês e Alumínio (**Tabelas 08 e 09**). Vale ressaltar que a maioria dos metais analisados apresentou valores muito acima dos limites estabelecidos pela resolução CONAMA 357/05.

**Tabela 08** - Valores Médios dos metais analisados no **período seco** nas amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA.- Água superficial.

Parâmetro	Limite*	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<b>Mercúrio (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<0,0002	0,980	0,819	0,390	0,493	0,130	0,066	48,643	5,633
<b>Cobre (<math>\text{mg/L}</math>)</b>	<0,009	0,198	0,042	0,062	0,148	0,188	0,210	0,065	0,073
<b>Chumbo (<math>\text{mg/L}</math>)</b>	<0,01	0,074	0,038	0,028	0,041	0,032	0,017	0,089	0,036
<b>Zinco (<math>\text{mg/L}</math>)</b>	<0,18	0,277	0,065	0,068	0,197	0,058	0,047	0,292	0,245
<b>Níquel (<math>\text{mg/L}</math>)</b>	<0,025	0,068	0,051	0,053	0,049	0,079	0,058	0,058	0,057
<b>Cromo (<math>\text{mg/L}</math>)</b>	<0,05	0,036	0,023	0,017	0,025	0,010	0,010	0,070	0,032
<b>Ferro (<math>\text{mg/L}</math>)</b>	<0,3	1,761	0,508	0,803	1,532	1,069	1,790	1,067	0,746
<b>Manganês (<math>\text{mg/L}</math>)</b>	<0,1	0,361	0,146	0,188	0,342	0,049	0,056	0,072	0,054
<b>Alumínio (<math>\text{mg/L}</math>)</b>	<0,1	4,731	1,306	1,494	2,740	0,886	0,900	3,001	1,145

\* Limite Baseado na Resolução CONAMA nº. 357/2005

**OBS:** Não foram analisados Cd e As neste período.

**Tabela 09** - Valores Médios dos metais analisados no **período chuvoso** nas amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA.- Água superficial.

Parâmetro	Limite*	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<b>Mercúrio (mg/L)</b>	<0,0002	0,523	0,760	0,630	0,257	0,033	0,063	7,297	4,223
<b>Cobre (mg/L)</b>	<0,009	0,040	0,046	0,049	0,024	0,169	0,184	0,023	0,078
<b>Chumbo (mg/L)</b>	<0,01	0,033	0,034	0,024	0,026	0,026	0,027	0,043	0,025
<b>Zinco (mg/L)</b>	<0,18	0,118	0,069	0,052	0,075	0,059	0,066	0,147	0,069
<b>Níquel (mg/L)</b>	<0,025	0,030	0,035	0,039	0,032	0,034	0,041	0,042	0,036
<b>Cromo (mg/L)</b>	<0,05	0,010	0,010	0,010	0,011	0,010	0,010	0,021	0,019
<b>Ferro (mg/L)</b>	<0,3	1,418	0,689	0,446	0,776	0,365	0,345	0,425	0,389
<b>Manganês (mg/L)</b>	<0,1	0,101	0,055	0,047	0,063	0,030	0,029	0,024	0,031
<b>Alumínio (mg/L)</b>	<0,1	6,083	2,478	1,286	2,684	6,792	0,440	1,624	1,372
<b>Cádmio (mg/L)</b>	<0,001	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,008	0,009	0,009
<b>Arsênio (mg/L)</b>	<0,01	11,336	19,33	23,33	5,673	36,33	42,333	0,009	18,670

\* Limite Baseado na Resolução CONAMA nº. 357/2005

Em relação às análises de metais em sedimento, os dados observados nas **Tabelas 10 e 11** comprovam a ocorrência de metais traços no sedimento da bacia de contenção, nos diferentes períodos de amostragem. De acordo com a resolução CONAMA nº 344/2004, que rege as diretrizes de dragagem de sedimentos, foi feito a comparação pelo nível 1 “limiar abaixo do qual se prevê baixa probabilidade de efeitos adversos à biota” para identificar pontos que apresentem algum risco.

**Tabela 10** - Valores Médios dos metais analisados no **período seco** nas amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA.- Sedimento.

Parâmetro	Limite*	P1	P2	P3	P4	P5
<b>Cobre (µg/Kg)</b>	357,00	1135,00	2399,00	4280,33	1525,67	26394,33
<b>Cromo (µg/Kg)</b>	373,00	190,33	206,33	148,67	148,33	169,67
<b>Cádmio (µg/Kg)</b>	60,00	6,07	10,67	22,67	11,03	56,00
<b>Níquel (µg/Kg)</b>	180,00	431,67	449,33	441,67	403,00	1229,67
<b>Chumbo (µg/Kg)</b>	350,00	182,67	185,67	229,00	210,00	617,67
<b>Zinco (µg/Kg)</b>	1230,00	1151,00	2123,00	3271,67	1365,67	2132,33

\* Limite Baseado na Resolução CONAMA nº. 344/2004

**Tabela 11** - Valores Médios dos metais analisados no **período chuvoso** nas amostras oriundas da área de estudo, Camaçari-BA.- Sedimento.

Parâmetro	Limite*	P1	P2	P3	P4	P5
<b>Cobre (ug/Kg)</b>	357,00	949,67	1810,00	2385,87	945,33	6808,07
<b>Cromo (ug/Kg)</b>	373,00	114,33	98,40	104,77	71,33	25,43
<b>Cádmio (ug/Kg)</b>	60,00	9,87	18,20	30,90	9,50	7,50
<b>Níquel (ug/Kg)</b>	180,00	160,33	203,33	347,00	86,43	253,73
<b>Chumbo (ug/Kg)</b>	350,00	186,00	186,33	217,33	15,30	149,20
<b>Zinco (ug/Kg)</b>	1230,00	1054,33	2120,00	3946,67	797,33	474,50

\* Limite Baseado na Resolução CONAMA nº. 344/2004

Nota-se que a grande maioria dos metais estão presentes acima dos limites em todos os pontos de amostragem.

### 5.5.2. Hidrocarbonetos Aromáticos

Devido ao alto poder carcinogênico dos HPAs, é de grande importância a determinação e monitoramento dos níveis desses compostos no meio ambiente (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Neste trabalho, foram analisados os aromáticos: benzeno, tolueno, etil-benzeno, xilenos e C9's aromáticos na matriz água e sedimento. As análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e de Espectrometria do SENAI-CETIND, no município de Lauro de Freitas, BA, utilizando a técnica de cromatografia gasosa, para análise de poluentes prioritários voláteis [MCRO 018 (EPA-8260)].

#### 5.5.2.1. Benzeno

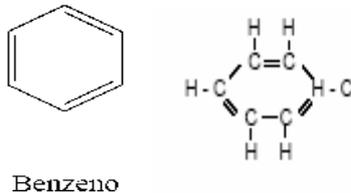
É comprovadamente carcinogênico, teratogênico e tóxico para o sistema reprodutivo, além de provocar deficiências imunológicas e disfunções neurológicas. Devido a sua alta toxicidade e a maior solubilidade, o benzeno tem recebido maior atenção. Possui uma persistência ambiental média, pois tende a evaporar, se a contaminação for superficial. O valor máximo permitido é de 5 µg L<sup>-1</sup> (USEPA, 1996; MAZZUCO *et al.*, 2003)

#### Características do Benzeno (150 - WHO, 1993) (Figura 37)

Fórmula molecular e estrutural: CAS N°: 71-43-2

Fator de Conversão: 1 ppm = 3,2 mg/m<sup>3</sup> a 20°C 1 mg/m<sup>3</sup> = 0,31 ppm

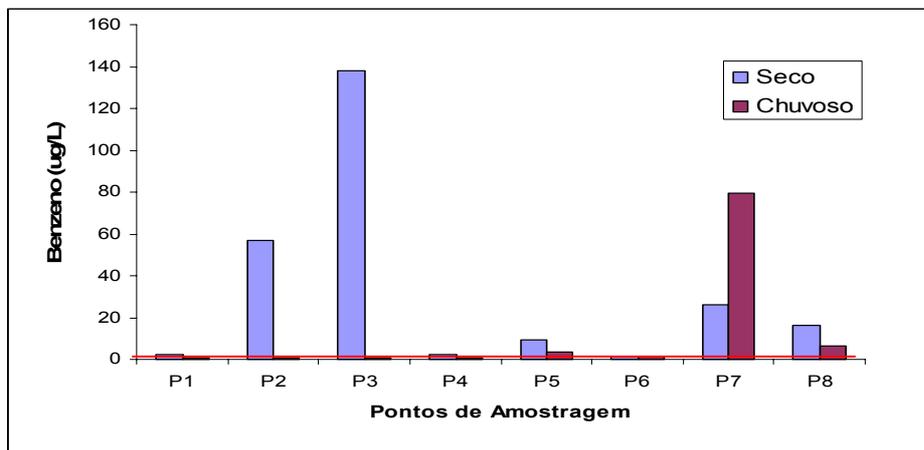
Limite de odor: 4,8 - 15,0 mg/m<sup>3</sup>



**Figura 37.** Estrutura química do benzeno (MAZZUCO et al, 2003)

O benzeno é encontrado no petróleo em concentração de até 4 g/L. Emissões ocorrem durante a produção de derivados de petróleo como tolueno e xileno e outros compostos aromáticos e do seu uso como componente de gasolina ou solvente industrial. É utilizado principalmente como intermediário da síntese de produtos químicos.

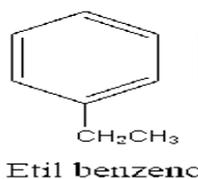
O benzeno geralmente é detectado na atmosfera. O nível varia de  $0,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  em áreas rurais a  $349 \mu\text{g}/\text{m}^3$  em centros industriais. O benzeno é carcinogênico, tendo sido correlacionado a casos de leucemia. Concentrações acima de  $32 \text{ mg}/\text{m}^3$  (10 ppm) devem ser evitadas (CETESB, 1990a). Os resultados químicos (**Figura 38**) revelaram que benzeno esteve presente em pelo menos um período, com volumes muito acima dos limites permissíveis, principalmente nos pontos do centro da lagoa (P2 e P3), que também apresentaram uma alta indução de atividade EROD (**Figuras 31 e 32**).



**Figura 38** – Média dos valores de Benzeno ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) analisados em água superficial da área de estudo, Camaçari - Ba. A linha horizontal vermelha indica o padrão segundo CONAMA nº 357/05.

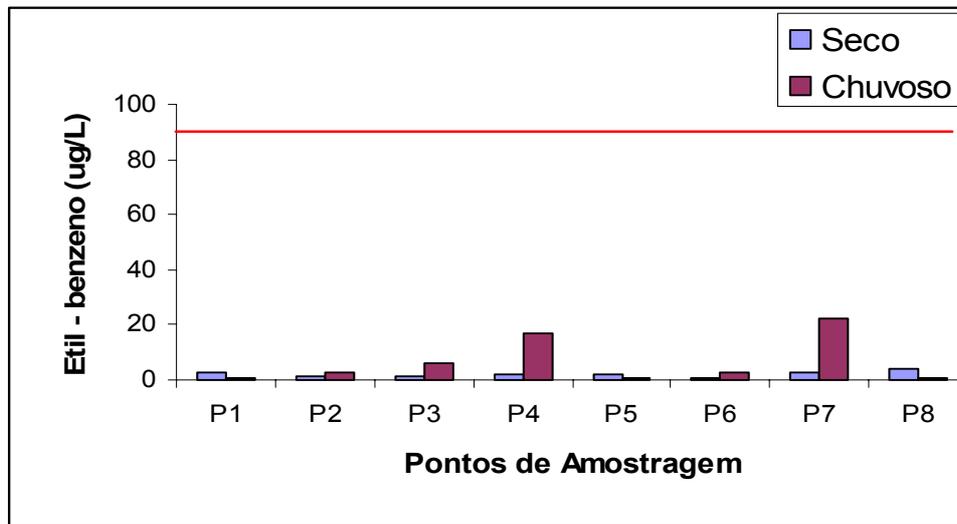
### 5.5.2.2. Etil-benzeno

O Etil-benzeno é encontrado nas indústrias como solvente e, principalmente como intermediário na manufatura do estireno, porém efeitos sinérgicos com alcoois, intensificam sua ação, principalmente no fígado. Penetra nas diferentes camadas do solo, sendo importante sua mensuração para fins de biomonitoramento (**Figura 39**). Segundo a Resolução CONAMA, valores de etil-benzeno toleráveis são de  $90 \mu\text{g}/\text{L}$ .



**Figura 39.** Estrutura química do etil-benzeno (MAZZULO et al., 2003)

Os resultados encontrados podem ser observados na **figura 40** e demonstram que as amostras oriundas da área não sofrem influência deste tipo de químico de forma significativa.



**Figura 40** – Média dos valores de Etil-benzeno ( $\mu\text{g/L}$ ) analisados em água superficial da área de estudo, Camaçari - Ba. A linha horizontal vermelha indica o padrão segundo CONAMA nº 357/05.

### 5.5.2.3. Tolueno

O tolueno é um solvente importante e um dos componentes da gasolina; é componente comum na atmosfera urbana, devido primariamente a emissão veicular e por indústrias que usam solventes. Encontra-se no solo, adsorvido a minerais de argila (bentonita e caolinita) e a capacidade de adsorção cresce quando o pH diminui. Após a Segunda Guerra Mundial a quantidade de tolueno obtida a partir do petróleo aumentou drasticamente, com relação àquela produzida a partir do carvão e alcatrão. A passagem do tolueno da água para o ar é bastante rápida (MOORE, 1984).

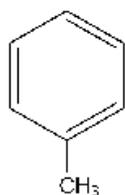
#### Características do Tolueno (52 – WHO, 1985)

Fórmula molecular e estrutural:  $\text{CH}_3\text{C}_7\text{H}_8$  CAS Nº: 108-88-3 (**Figura 41**)

Sinônimo: metilbenzeno

Fator de Conversão:  $1 \text{ ppm} = 3,75 \text{ mg/m}^3$

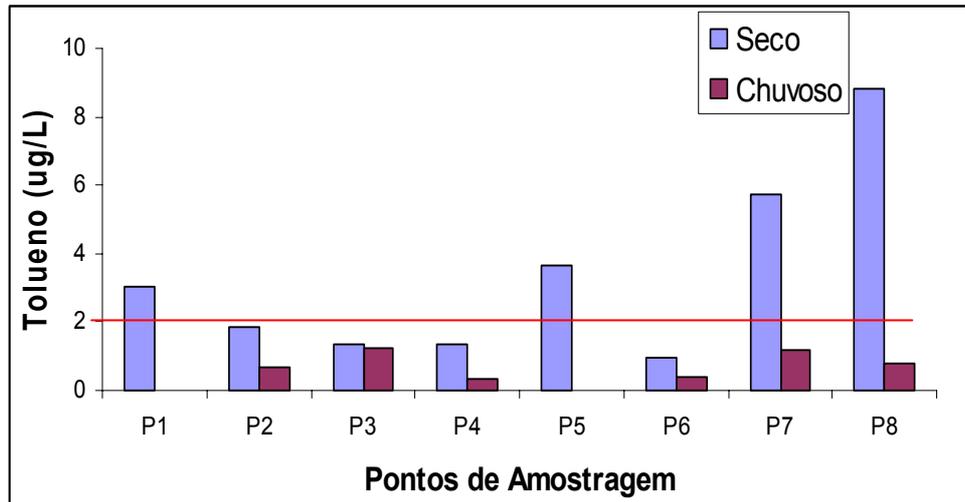
Limite de odor:  $9,4 \text{ mg/m}^3$



Tolueno

**Figura 41.** Estrutura química do tolueno (MAZZULO et al., 2003)

Segundo a Resolução CONAMA nº357/2005 o limite para o tolueno é de 2µg/L em água. Os resultados obtidos no período seco apenas podem ser observados na **figura 42**, revelam que existem pontos com valores aumentados acima do limite. Entretanto, quando comparados à atividade EROD, não há indicativo que a indução seja causada somente por esse tipo de contaminante.



**Figura 42** – Média dos valores de Tolueno (µg/L) analisados em água superficial na área de estudo Camaçari - Ba. A linha horizontal vermelha indica o padrão segundo CONAMA nº 357/05.

#### 5.5.2.4. Xilenos

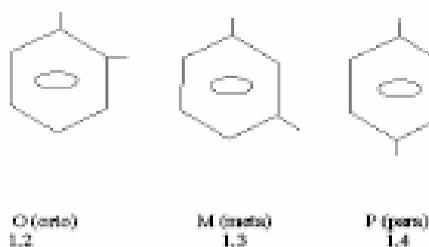
O xileno é um composto formado quase totalmente de hidrocarbonetos aromáticos, com faixa de destilação compreendida entre 137 e 140,2°C. É essencialmente uma mistura de três isômeros: para-xileno, orto-xileno, meta-xileno e pequena quantidade de etilbenzeno. É muito utilizado na área industrial por sua grande capacidade de dissolver altas concentrações de princípios ativos e sua alta volatilidade, que possui meia vida menor do que 4 horas (LAITY *et al.* 1993 apud MOORE, 1984).

#### Características dos Xilenos (190 – WHO, 1997)

Fórmula Molecular e Estrutural: CAS N°:1330-20-7

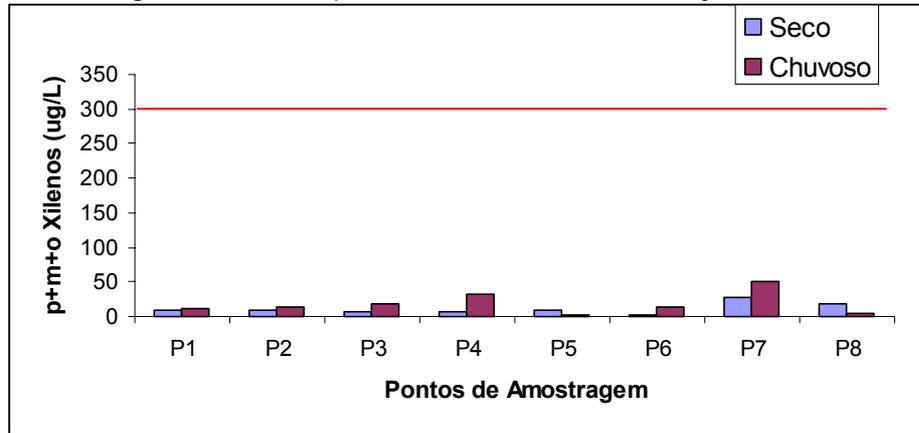
Sinônimo: dimetilbenzeno; “mistura”

Fator de Conversão: 1ppm = 4,35 mg/m<sup>3</sup> a 25°C, 101 a 3KPa.



**Figura 43.** Estrutura química das três classes de xilenos (MAZZULO *et al.*, 2003)

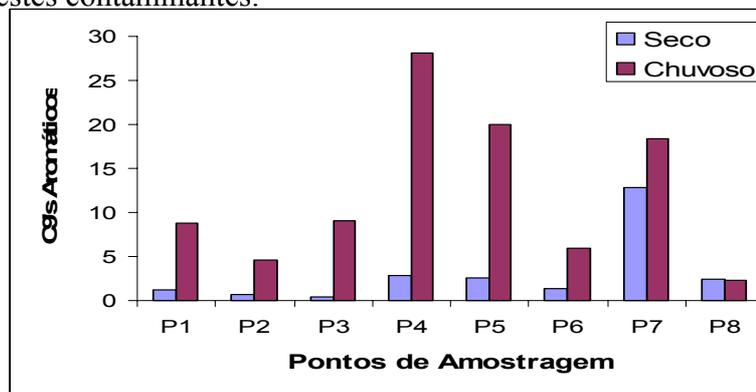
É um composto altamente volátil e seus vapores são inflamáveis; é considerado um produto que altera o comportamento de organismos em concentrações maiores que 100ppm. Os resultados médios (**Figura 44**) revelam que a possível contaminação atualmente verificada não oferece riscos segundo a Resolução CONAMA nº 357/05, cujo limite é de 300µg/L.



**Figura 44**– Média dos valores p+m+o Xilenos (µg/L) analisados em água superficial na área de estudo Camaçari - BA. A linha horizontal vermelha indica o padrão segundo CONAMA nº 357/05.

#### 5.5.2.5. C9's Aromáticos (µg/L)

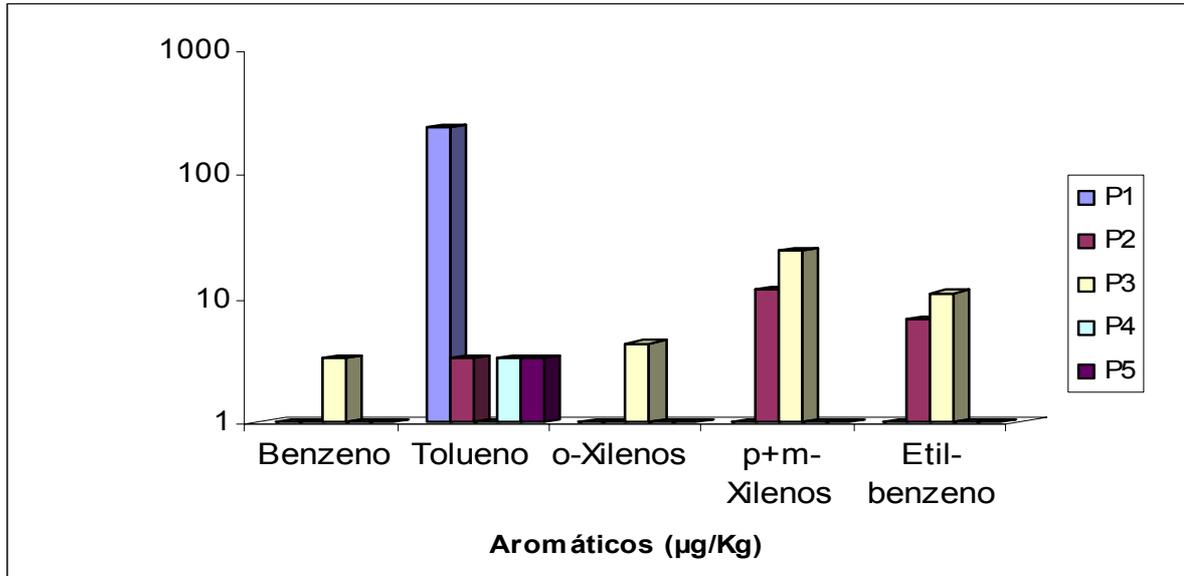
Os C9s aromáticos são normalmente subprodutos da pirólise de nafta e outros combustíveis fósseis. Possuem baixa reatividade, porém boa inflamabilidade. São líquidos a temperatura ambiente e possuem odor semelhante ao da gasolina. Estes compostos apresentaram os maiores valores de registro nas análises realizadas no período chuvoso (**Figura 45**), porém, seria prematuro afirmar que este parâmetro não está diretamente associado à atividade EROD, já que os valores de EROD foram significativamente menores para o período chuvoso. Todavia, o P4 foi a exceção, visto que, apresentou valores mais altos de EROD no período chuvoso. Este fato pode ser explicado pela maior ressuspensão desses aromáticos no período chuvoso, mensurado quimicamente. Não existe na resolução CONAMA nº357/05 um valor de referência para estes contaminantes.



**Figura 45**– Média dos valores de C9's Aromáticos (µg/L) analisados em água superficial na área de estudo Camaçari - BA.

### 5.5.2.6 Aromáticos no Sedimento

A quantificação de aromáticos em sedimento foi feita segundo procedimentos do SENAI, sendo as amostras levadas em recipientes apropriados para a quantificação. Entretanto, só foi possível realizar essas amostragens no período chuvoso. As análises foram realizadas por cromatografia gasosa e os resultados são apresentados de forma gráfica na **Figura 46**. Os resultados confirmam a presença dos aromáticos, entretanto, o tolueno, se sobressaiu no P1, o que ratifica a maior presença de aromáticos no solo.



**Figura.46**– Média dos valores de Aromáticos (µg/Kg) analisados em sedimentos na área de estudo (Camaçari-BA) OBS: Escala na base logarítmica.

### 5.6. Correlação (Parâmetros x EROD)

Teste de correlação de valores da atividade EROD e dados de análises químicas, mostrou toxicidade associada à presença metais como Hg, Zn, Cr, Cu, Ni, Pb, Fe, Mn e Al. Além da influência desses metais, houve também correlação positiva ( $r^2 > 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) com os aromáticos benzeno, tolueno, xilenos e etil-benzeno na água, principalmente na chamada bacia do cobre e no canal de reversão dos efluentes. Através da técnica que mede a atividade enzimática da EROD ficou evidenciada toxicidade em alguns pontos amostrais, devido a presença de indutores de CYP1A1, no local de estudo.

No sedimento, houve correlação positiva de atividade EROD à presença de metais Cr, Cd, Cu, Ni, Pb e Zn, em todos os pontos da lagoa do Complexo Básico, e na Bacia do Cobre (P5), apenas com o Cu. Em relação aos aromáticos, houve correlação positiva com Etilbenzeno, m+p xilenos e o+xileno, principalmente na borda oeste e parte mais profunda da lagoa, apenas no período chuvoso, visto que não foram realizados os testes com aromáticos no período seco.

Os valores de correlação entre a indução de EROD nas amostras líquidas e em sedimento e a concentração de metais e hidrocarbonetos aromáticos das campanhas nos períodos seco e chuvoso, em cada ponto amostral, encontram-se nas **Tabelas 12 a 15**. Os valores de correlação foram gerados por análises de correlação realizadas no programa MINITAB 1.4.

**Tabela 12.** Valores de correlação ( $r^2 > 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) entre a atividade EROD em água superficial das campanhas de **período seco** e resultados de análises químicas, em cada ponto amostral.

Matriz	Pontos	Correlação ( $r^2 > 0,7$ ; $p < 0,05$ )
Água Superficial	P1	*
	P2	<b>DQO (0,997), Hg (0,994), Zn (0,730), Cr (0,999)</b>
	P3	<b>Benzeno (0,869), Al (0,821)</b>
	P4	Hg (0,999), Zn (0,881), Ni (0,756), Cr (0,941), Al (0,800)
	P5	DQO (0,800), Benzeno (0,911), Tolueno (0,952), Xilenos (0,959), Cr (0,866), Fe (0,872)
	P6	<b>Hg (0,817), Cr (0,866)</b>
	P7	DQO (0,891), EtilBenz (0,710), Xilenos (0,920), Aromáticos (0,804), Hg (0,798)
	P8	Xilenos (0,758), Cu (0,794), Ni (0,713), Cr (0,950), Fe (0,948), Mn (0,971)

(\*) Não apresentou correlação significativa ( $r^2 < 0,7$ ).

Os valores de correlação em negrito indicam os pontos onde houve toxicidade significativa em relação ao controle.

**Tabela 13.** Valores de correlação ( $r^2 > 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) entre a atividade EROD em sedimento das campanhas de período seco e resultados de análises químicas, em cada ponto amostral.

Matriz	Pontos	Correlação ( $r^2 > 0,7$ ; $p < 0,05$ )
Sedimento	P1	Cd (0,876), Zn (0,907)
	<b>P2</b>	<b>Cr (0,861), Cu (0,866), Ni (0,773), Pb (0,911)</b>
	P3	Cr (0,868), Cu (0,829), Ni (0,734), Pb (0,911)
	P4	Cd (0,866), Zn (0,998)
	P5	Cu (0,962)

(\*) Não apresentou correlação significativa ( $r^2 < 0,7$ ).

Os valores de correlação em negrito indicam os pontos onde houve toxicidade significativa em relação ao controle.

**Tabela 14.** Valores de correlação ( $r^2 > 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) entre a atividade EROD em água superficial das campanhas de período chuvoso e resultados de análises químicas, em cada ponto amostral (MINITAB).

Matriz	Pontos	Correlação ( $r^2 > 0,7$ ; $p < 0,05$ )
Água Superficial	P1	Pb (0,793), Cr (0,976)
	<b>P2</b>	<b>DQO (935), Cr (0,719) Mn (0,719)</b>
	P3	Pb (1,000), Zn (1,000), Cr (1,000), Mn (0,756)
	P4	Benzeno (0,967), Hg (0,812), Pb (0,967), Cr (0,967), Zn (0,924)
	P5	Benzeno (0,944), Hg (0,867), Cr (0,867)
	P6	Mn (0,785), Al (0,989)
	P7	Pb (0,705), Zn (0,957)
	P8	Tolueno (0,754), Xilenos (0,963), Arom (0,886), Pb (0,754), Ni (0,934)

(\*) Não apresentou correlação significativa ( $r^2 < 0,7$ ).

Os valores de correlação em negrito indicam os pontos onde houve toxicidade significativa em relação ao controle.

**Tabela 15.** Valores de correlação ( $r^2 > 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) entre a atividade EROD em sedimento das campanhas de período chuvoso e resultados de análises químicas, em cada ponto amostral (MINITAB).

Matriz	Pontos	Correlação ( $r^2 > 0,7$ ; $p < 0,05$ )
Sedimento	P1	Cd (0,992), Cu (0,790), Ni (0,740), Pb (0,854), Zn (0,935)
	<b>P2</b>	<b>Etilbenz (0,720), m+p xileno (0,970)</b>
	<b>P3</b>	<b>Etilbenz (0,977), m+p xileno (0,823), o-xileno (0,977)</b>
	P4	Cu (0,868)
	P5	*

(\*) Não apresentou correlação significativa ( $r^2 < 0,7$ ).

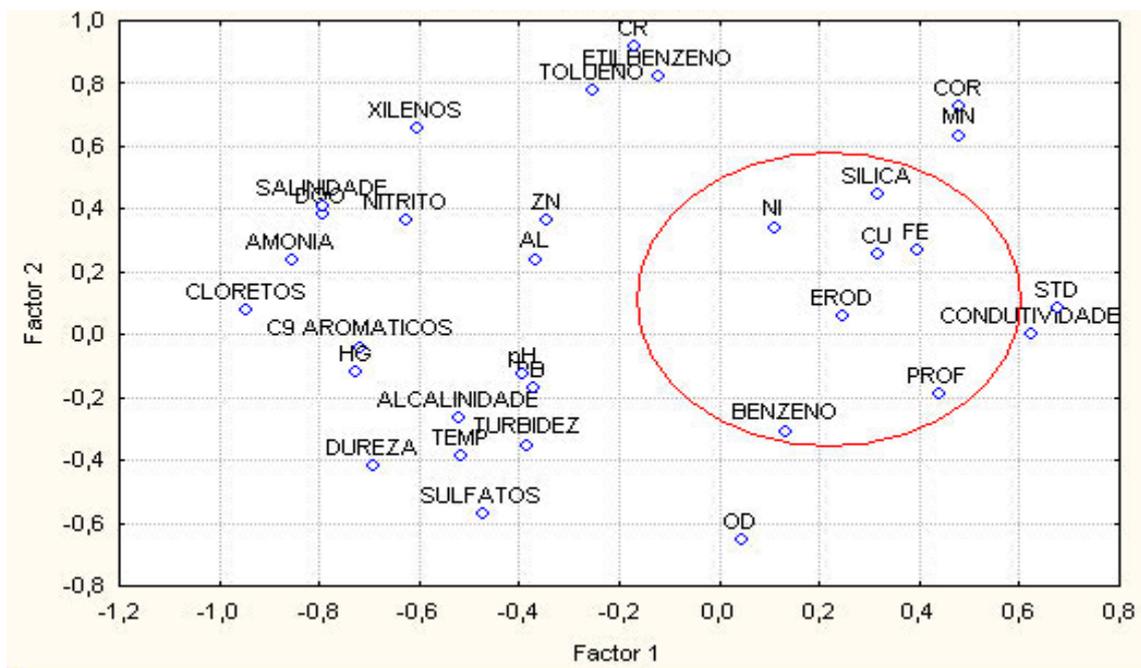
Os valores de correlação em negrito indicam os pontos onde houve toxicidade significativa em relação ao controle.

Com base nos resultados de correlação, a toxicidade desses pontos, para a água superficial, está associada principalmente à presença de benzeno, naftaleno, fenantreno e de ferro, na borda oeste (P1) e parte profunda da lagoa (P3); no ponto P2 houve uma forte associação da toxicidade com DQO ( $r^2 = 0,997$ ;  $p < 0,05$ ). Para sedimento, de modo geral, a toxicidade esteve associada à presença de metais e os aromáticos etilbenzeno e xilenos.

### 5.7. Análise de Componentes Principais (PCA)

O PCA é uma técnica que é utilizada para reduzir o número de variáveis e fornecer uma visão estatisticamente privilegiada do conjunto de dados; ele consiste em reescrever as variáveis originais em novas variáveis denominadas componentes principal, através de uma transformação de coordenadas, utilizando matrizes.

De acordo com a análise das **figuras 47 e 48**, as principais variáveis para explicar a variabilidade do efluente são cloreto, sulfato e dureza no eixo positivo e condutividade e sólidos totais dissolvidos no negativo; as variáveis que melhor se agrupam com a atividade EROD são cor e turbidez.



**Figura 47.** Análise de componentes principais em *Oreochromis niloticus* através dos testes relacionados a indução da atividade EROD com parâmetros ambientais analisados, durante o Período seco.



## 6.CONCLUSÃO

Os resultados dos testes realizados com água superficial e sedimento caracterizam o ambiente como contaminado por indutores de CYP1A1, incluindo HPAs, o que foi evidenciado pelas concentrações de atividade EROD, em alguns pontos de amostragem, quando comparadas ao controle. As determinações da atividade de Citocromo P-450 mostraram evidências de exposição a HPAs, principalmente nos pontos de coleta P1, P2 e P3 (respectivamente borda oeste, borda leste e centro da Bacia de contenção I).

Neste estudo, as análises químicas revelaram a presença de hidrocarbonetos poliaromáticos em diferentes concentrações entre os períodos de amostragem, embora em poucos casos embasando as respostas biológicas encontradas nos testes. As respostas dos organismos expostos às amostras ambientais foram caracterizadas por diferentes níveis de indução da atividade EROD correlacionadas principalmente com a presença de benzeno nas estações amostrais, possibilitando desta forma, o uso deste biomarcador como uma ferramenta importante de detecção e controle de HPAs em corpos de água.

Estes resultados indicam a necessidade de incorporação de metodologias que minimizem a produção destes contaminantes nas diferentes etapas de produção em complexos industriais e na adoção e seleção de processos adequados de descontaminação da massa hídrica, facilitando, assim, o seu reaproveitamento nos processos. Conseqüentemente, o reuso de águas oriundas da Bacia de contenção I nos processos industriais pode ser viável, desde que seja precedido de uma análise em função dos objetivos de uso, para que se evitem impactos ambientais, todavia, o reuso desta área para fins não industriais (como pesca e contato direto) não seria recomendado, devido à extrapolação dos limites dos parâmetros químicos e físicos baseados nas resoluções CONAMA 357/2005 e 344/2004, e do acentuado valor de atividade enzimática EROD em alguns pontos. Para uma melhor definição e certeza das possibilidades de uso e reuso dessas águas, mais estudos seriam necessários.

A metodologia empregada neste estudo, e conseqüentemente seus resultados, contribuiu para um melhor conhecimento sobre a aplicação no uso de biomarcadores em áreas de reuso industrial, levando à ampliação da aplicabilidade desta metodologia para outras áreas.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, S.M.; JAWORSKA, J.S.; HAM, K.D. Influence of ecological factors on the relationship between MFO induction and fish growth: bridging the gap using neural networks. **Marine Environmental Research**. v. 42, n° 1-4. 197-201pp. 1996.
- AMCOFF, P.; BORJESON, H.; NORRGREN, L.; PESONEN, M. Cytochrome P4501A-activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes after exposure to PCB#126 and Astaxanthin: in vitro and vivo studies. **Marine Environmental Research**. 46: (1-5) 1-5. 1998.
- ANDERSON, R.D.; TAPLITZ, S.J.; OBERBAUER, A.M.; CALAME, K.L.; HERSCHMAN, H.R. Metal-dependent binding of a nuclear factor to the rat metallothionein-I promoter. **Nucleic Acids Res**. 18: 6049-6055. 1999.
- AXARLI, I.; PRIGIPAKI, A.; NIKOLAOS, E. L. Engineering the substrate specificity of cytochrome P450 CYP102A2 by directed evolution: production of an efficient enzyme for bioconversion of line chemicals. **Biomolecular Engineering**, 22:81-88. 2005
- AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos. São Paulo. Intertox. 340p. 2003
- BAINY, A. C.D.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir- São Paulo, Brasil. **Aquatic Toxicology**. 44. 289-305. 1996.
- BAINY, A. C.D; MARQUES, M.R.F. Expressão do complexo citocromo P4501A e das metalotioneínas na avaliação da contaminação aquática. In: **Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos**, R. Moraes *et al.* (Eds.). Arte e Ciência. Villipress. 2001. 269-285pp. 2001
- BEIRAS, R. Respostas celulares e moleculares: Biomarcadores. Biotransformación e eliminación de sustancias tóxicas: alteraciones lisosómicas. **Methods in Aquatic Toxicology**. 2006
- BERTOLETTI, E. Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle da poluição. **Cetesb**, São Paulo, 1990.
- BERNDTSON, A.K.; CHEN, T.T. Two unique CYP genes are expressed in response to 3-methylcholanthrene treatment in rainbow trout. **Arch. Biochem. Biophys**. 310, 187-1995. 2004
- BISTOLAS, N.; WOLLENBERG, U.; JUNG, C.; SCELLER, W. Cytochrome P450 biosensors – a review. **Biosensors and Bioelectronics**. 20: 2408-2423. 2005
- BILLIARD, S.M.; HODSON, P.V.; BOLS, N.C. (2000). **Does the potency of polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs) for inducing CYP1A1 in juvenile trout (*Oncorhynchus mykiss*) predict dioxin-like toxicity in early life stages?**. *Marine Environmental Research*. 50: 307-312. 2000
- BOGNI, A.; MONSHOUWER, M.; MOSCONE, A.; HIDESTRAND, M.; IGELMAN-SUNDBERG, M.; HARTUNG, T.; COECKE, S. Substrate specific metabolism by polymorphic cytochrome P450 2D6 alleles. **Toxicology in Vitro** 19. 621-629. 2005
- BOZCAARMUTLU, A.; ARINÇ, E. Inhibitory effects of divalent metal ions on liver microsomal 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity of leaping mullet. **Marine Environmental Research**. 58: 521-524. 2004
- BURKE, M.D.; THOMPSON, S.; ELCOMBE, C.R. Ethoxy- pentoxy – and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. **Biochemical Pharmacology**. 34 (18): 3337-3345. 1985
- BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 72:248–254. 1976

- BRUSCHWEILER, B.J.; WURGLER, F.E.; FENT, K. Inhibition of cytochrome P4501A by organotins in fish hepatoma cells PLHC-1. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 15. Nº 5. 728-735pp. 1996
- BURGEOT, T.; HIS, E.; GALGANI, F. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. **Mut. Res.**, 343: 125-140. 1995.
- CAMPOS, E.J.D.; IKEDA, Y.; CASTRO, B.M.; GAETA, S.A.; LORENZZETI, J.A.; STEVENSON, M.R. Experiment studies circulation in the western South Atlantic. *Eos*, Transactions **American Geophysical Union**. 77(27): 253-259. 1996.
- CAO, D.; LIN, Y.; CHENG, C.L. Genetic interactions between the chlorate-resistant mutant *cr88* and the photomorphogenic mutants *cop1* and *hy5*. **Plant Cell** 12:199-210. 2000.
- CARLSSON, C.; PART, P. 7-Ethoxyresorufin O-deethylase induction in rainbow trout gill epithelium cultured on permeable supports: asymmetrical distribution of substrate metabolites. **Aquatic Toxicology**. 54: 29-38. 2001
- CHANG, X.; KOBAYASHI, T.; SENTHILKUMARAN, B.; KOBAYASHI-KAJURA, H.; SUDHAKUMARI, C.C.; NAGAHAMA, Y. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **General and Comparative Endocrinology**. 141: 101-115. 2005
- CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL **Procedimento para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo. Setembro. 1990a.
- CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL **Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo. Outubro. 1990b.
- CHEN, R.M.; CHOU, M.W.; UENG, T.H. Induction of cytochrome P450 1A1 in human hepatoma HepG2 cells by 6-nitrochrysene. **Toxicology Letters**. 117: 69-77. 2000
- COLLIER, T.K.; ANULACION, B.F.; STEIN, J.E.; GOKSOYR, A.; VARANASI, U. A field evaluation of cytochrome P4501A as a biomarker of contaminant exposure in three species of flatfish. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Vol. 14. nº 1. 143-152pp. 1995
- CONAMA BRASIL – CONSELHO NACIONAL EM MEIO AMBIENTE. Resolução Nº 344, de 25 de março de 2004. **Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências**. São Paulo 11 p. 2004
- CONAMA BRASIL – CONSELHO NACIONAL EM MEIO AMBIENTE. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. São Paulo 24 p. 2005
- COSTAN, G.; BERMINGHAM, N.; Blaise, G.; FERARD, J.F. Potencial Ecotoxic Effects Probe (PEEP): a Novel Index to Assess and Compare the Toxic Potential of Industrial Effluents, **Environ. Toxicol. Water Qual.**, 8:115-140. 1993
- CRAPEZ, M.A.C. Efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo na biota marinha. In: **Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos**, R. Moraes et al. (Eds.). Arte e Ciência. Villipress. 253-267pp. 2001
- CUSTER, T.W.; HINES, R.K.; MELANCON, M.J.; HOFFMAN, D.J.; WICKLIFFE, J.K.; BICKHAM, J.W.; MARTIN, J.W.; HENSHEL, D.S. Contaminant concentrations and biomarker response in great blue heron eggs from 10 colonies on the upper mississippi river, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 16, Nº 2. 260-271pp. 1997
- DELL'OMO, M.; LAUWERYS, R.R. Adducts to macromolecules in the biological monitoring of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Crit. Rev. Toxicol.**, 23, 111-126, 1993.

- DURAND-PERDU, E.F.; CRAVEDI, J.P. Characterization of xenobiotic metabolizing enzymes in sturgeon (*Acipenser baeri*). **Comp. Biochem. Physiol.** Vol 93B. N° 4. 921-928pp. 1989
- EGGENS, M.; BERGMAN, A.; VETHAAK, D. Seasonal variation of hepatic EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) in the Dutch Wadden Sea. **Marine Environmental Research**. 39. 231-234. 1995
- ESTABROOK, R.W.; SHET, M.S.; FISHER, C.W.; JENKINS, C.M.; WATERMAN, M.R. The interaction of NADPH-P450 reductase with P450: an electrochemical study of the role of the flavin mononucleotide-Binding Domain. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 333: (1)308-315. 1996
- EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY: SW-846. **Test methods for evaluation solid waste physical/chemical methods**, 1996; Portaria 1469 Ministério da Saúde 12-2000
- FELDMAN, N. B.; GATES, M. A.; E S Egan, S T Dougan, G Rennebeck, H I Sirotkin, A F Schier, and W S Talbot. Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals **Archives of Biochemistry and Biophysics**. Sep-10. 395. 6698. 181-5. 2001
- FOZZI, M.C.; RENZONI, A.; MATTEI, N.; LARI, L. **Contaminants in the Environment**. CRC Press, Inc. 286pp. 1997
- GARRICK, R.A.; WOODIN, B.R.; WILSON, J.Y.; MIDDLEBROOKS, B.L.; STEGMAN, J.J. Cytochrome P4501A is induced in endothelial cell lines from the kidney and lung of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. **Aquatic Toxicology**. 76: 295-305. 2006
- GADAGBUI, B.K.M.; ADDY, M.; GOKSOYR, A. Species characteristics of hepatic biotransformation enzymes in two tropical freshwater teleosts, Tilapia (*Oreochromis niloticus*) e Musfish (*Clarias anguillaris*). **Comp. Biochem. Physiol.** 114C(3): 201-211. 1996
- GENTER, M.B.; CLAY, C.D.; DALTON, T.P.; DONG, H.; NEBERT, D.W.; SHERTZER, H.G. Comparison of mouse hepatic mitochondrial versus microsomal cytochromes P450 following TCDD treatment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 342: 1375- 1381. 2006
- GODARD, C.A.J.; GOLDSTONE, J.V.; SAID, M.R.; DICKERSON, R.L.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J. The new vertebrate CYP1C family: Cloning of new subfamily members and phylogenetic analysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 331. 1016-1024pp. 2005
- GORBI, S.; BALDINI, C.; REGOLI, F. Seasonal variability of metallothioneins, cytochrome P450, bile metabolites and oxyradical metabolism in the European Eel *Anguilla Anguilla* L. (Anguillidae) and striped mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 49, 62-70pp. 2005
- GUNTHER, A.J.; SPIES, R.B.; STEGEMAN, J.; WOODIN, B.; CARNEY, D.; OAKDEN, J.; HAIN, L. EROD Activity in fish as an Independent Measure of Contaminant-Induced Mortality of Invertebrates in Sediment Bioassays. **Marine Environmental Research**, Vol. 44. N° 1 41-49. 1997
- HAHN, M.E.; WOODWARD, B.L.; STEGEMAN, J.J.; KENNEDY, S.W. Rapid assessment of induced cytochrome P4501A protein and catalytic activity in fish hepatoma cells grown in multiwell plates: response to TCDD, TCDF and two Planar PCBS. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Vol. 15, n° 4. 582-591pp. 1996
- HART, P.B.S.; RAYNER, J.H. & JENKINSON, D.S. Influence of pool substitution on the interpretation of fertilizer experiments with 15N. **J. Soil Sci.**, 37:389-403, 2007.
- HARRIGAN, J.A.; MCGARRIGLE, B.P.; SUTTER, T.R.; OLSON, J.R. Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. **Toxicology in Vitro**. 20: 426-438. 2006
- HEUVEL, M.R.V.D.; MUNKITTRICK, K.R. Second-round interlaboratory comparison of hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase activity in white sucker (*Catostomus commersoni*) exposed to bleached-kraft pulp mill effluent. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 14. n° 9. 1513-1520pp. 1995

- HODSON, P.V.; MAJ, M.K.; EFLER, S.; BURNISON, B.K.; HEININGEN, A.R.P.V.; GIRARD, R.; CAREY, J.H. MFO induction in fish by spent cooking liquors from kraft pulp mills. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 16. Nº 5. 908-916pp. 1997
- HOLDWAY, D.A.; BRENNAN, S.E.; AHOKAS, J.T. Use of hepatic MFO and blood enzyme biomarkers in sand flathead (*Platycephalus bassesis*) as indicators of pollution in Port Phillip Bay, Australia. **Marine Pollution Bulletin**. Vol 15. 683-695pp. 1997
- IMBER, B.E.; SPENCE, B.; CHAN, A.; AGGELEN, G.V. Temporal Variation in Hepatic Mixed-Function Oxidase (MFO) Induction in Rainbow Trout Exposed to Industrial Effluent. **Marine Pollution Bulletin**, Vol. 30, Nº 8, 558-562 pp. 1995
- JIMÉNEZ-TENORIO, A. N.; MORALES-CASELLES, B. C.; KALMAN, B. C. J.; SALAMANCA, B. M. J.; CANALES, M. G.; SARASQUETE, B. C.; DELVALLSA, T. A. Determining sediment quality for regulatory purposes using fish chronic bioassays. **Environment International** .33: 474-480. 2006
- JONSSON, E.M.; ABRAHAMSON, A.; BRUNSTROM, B.; BRANDT, I. **Cytochrome P4501A** induction in rainbow trout gills and liver following exposure to waterborne indigo, benzo[a]pyrene and 3,3', 4,4', 5-pentachlorobiphenyl. **Aquatic Toxicology**. (in press) 7pp. 2006
- KELSEY, A.; MILLER, M.G.L.; ASSUNÇÃO, N.J.; DANGERFIELD, S.M.; BANDIERA, M.; ROSS, P.S. Assessment of cytochrome P450 1A in harbour seals (*Phoca vitulina*) using a minimally-invasive biopsy approach. **Marine Environmental Research**, 60: 2. 153-169. 2005.
- KENNISH, M.J. **Ecology of Estuaries: anthropogenic effects**. CRC Press: Boca Raton. 1992
- KIM, G. B.; NAKATA, H.; TANEBE, S. In vitro inhibition of hepatic cytochrome P450 and enzyme activity by butyltin compounds in marine mammals. **Environment Pollution** 99. 255-261. 1998
- KHAN, M.U.; SHAHIDULLAH, M.; HAQUE, S.; WASEQUE, U.A. Presence of vibrios in surface water and their relation with cholera in a community. **Tropical and Geographical Medicine**, 36:335-340. 1998
- KIPERSTOK, A.; NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, L.C.B. **Efluentes Líquidos do Pólo Petroquímico de Camaçari, Bahia: considerações sobre tratamento e disposição final**. São Paulo. 1991.
- KOH YH, GRAMATES LS, and BUDNIK V. Drosophila larval neuromuscular junction: molecular components and mechanisms underlying synaptic plasticity. **Micro Res Tech** 1: 14-25, 2001.
- KIRBY, P.C.; LEE, C.; GILES, L.R.; BRYDEN, W.L.; DOWNING, J.L.; OWENS, A.C. Performance and endocrine responses of group housed weaner pigs exposed to the air quality of a commercial environment. **Livestock Production Science**, 9:3, 255-26. 2007
- KLOTZ, A.V.; STEGEMAN, J.J.; WALSH, C. An alternative 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P450 monooxygenase activity. **Anal. Biochem.** 107: 150-155. 1984
- LACERDA, V.C.O.; PEREIRA, S.A.; NASCIMENTO, I.A.; BARROS, D.A.; LEITE, M. B. N. L.; CRUZ, A.C.S.; RODRIGUES, I.L.P.; MATIAS, G.R.A.; SANTOS, D.S.; NASCIMENTO, T. B. Avaliação da qualidade de água da bacia de retenção de efluentes não-orgânicos do Polo Petroquímico de Camaçari-BA: teste ecotoxicológico utilizando a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. In: **IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, São Pedro.: Editora e Gráfica Vida e Consciência, v. 1. p. 133-133, 2006a.
- LACERDA, V.C.O.; NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L.; CRUZ, A.C.S.; BARROS, D. A.; RODRIGUES, I.L.P.; MATIAS, G.R.A.; SANTOS, D.S. Importância de parâmetros físico-químicos para avaliação da qualidade da água das bacias receptoras de efluentes das empresas do Pólo Petroquímico de Camaçari-BA. **IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, São Pedro: Editora e Gráfica Vida e Consciência, v. 1. p. 188-188. 2006b

LAM, P.K.S.; WU, R.S.S. **Use of Biomarkers in environmental monitoring. Scientific and Technical Advisory Panel and Global Environment Facility.** 1999.

LEVINE, S.L.; ORIS, J.T.; WISSING, T.E. Influence of environmental factors on the physiological condition and hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity of gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 14. n° 1. 123-128pp. 1995

LEAVER, M.; GEORGE, S.G. A cytochrome P4501B gene from a fish, *Pleuronectes platessa*. **Gene**. 256: 83-91. 2000

LETCHER, R.J.; NORSTROM, R.J.; LIN, S.; RAMSAY, M.A.; BANDIERA, S.M. Immunoquantitation and microsomal monooxygenase activities of hepatic cytochromes P4501A and P4502B and chlorinated hydrocarbon contaminant levels in Polar bear (*Ursus maritimus*). **Toxicology and Applied Pharmacology**. 137:127-140. 1996

LINDSTROM-SEPPA, P.; STEGEMAN, J.J. Sex differences in cytochrome P4501A induction by environmental exposure and  $\beta$ -Naphthoflavone in liver and extrahepatic organs of recrudescing winter flounder. **Marine Environmental research** 39:219-223. 1995

LOVSHIN, L.L.; CYRINO, J.E.P. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. In: Simpósio sobre manejo e nutrição de peixes, (2). **Piracicaba. Anais. Piracicaba**: CBNA, 1:1-20p 1998

LUZ, L.D. **Índices de desempenho aplicados à condição de habitat aquáticos – um procedimento de apoio ao planejamento ambiental e de recursos hídricos.** XV SNRH, ABRH, Curitiba, 2003.

MACKAY, D.; FRASER, A. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. **Environmental Pollution** 110: 375-391. 2000

MALMSTROM, C.M.; KOPONEN, K.; LINDSTROM-SEPPA, P.; BYLUND, G. Induction and localization of hepatic CYP4501A in flounder and rainbow trout exposed to benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 58: 365-372. 2004

MARCUSSEN, M.G.E.; BARRA, R. **Enzimas Citocromo P450.** Universidad de Concepción. Centro EULA-Chile. 1997

MARIA, V. L., Correia A. C., Santos M. A. *Anquilla anquilla* L. biochemical and genotoxic response to benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 53: 86–92. 2002b

MARIA, V. L.; CORREIA, A. C.; SANTOS, M. A. Benzo[a]pyrene and  $\beta$ -naphthoflavone mutagenic activation by European eel (*Anquilla anquilla* L.) S9 liver fraction. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 53: 81–85. 2002a

MATTSON, M.; RAUNIO, H.; PELKONEN, O.; HELLE, E. Elevated levels of cytochrome P4501A (CYP1A) in ringed seals from the Baltic Sea. **Aquatic Toxicology**. 43: 41-50. 1998

MARSILI, L.; CARUSO, A.; FOSSI, M.C.; ZANARDELLI, M.; POLITI, E.; FOCARDI, S. Polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs) in subcutaneous biopsies of Mediterranean cetaceans. **Chemosphere**. 44: 147-154. 2001

MATIAS, G.R.A.; NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L.; CRUZ, A.C.S.; BARROS, D.A.; RODRIGUES, I.L.P.; LACERDA, V.C.O.; SANTOS, D.S. Utilização de Citocromo P450 como biomarcadores de contaminação por hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) em Corpos de Água. In: **IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, São Paulo : Editora e Gráfica Vida e Consciência, v. 1. p. 147-147. 2006

MAZZUCO, L. M.; NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 19-28, 2003.

MCKINNEY, M.A.; ARUKWE, A.; DE GUISE, S.; MARTINEAU, D.; BELAND, P.; DALLAIRE, A.; LAIR, S.; LEBEUF, M.; LETCHER, R. Characterization and profiling of hepatic cytochromes P450 and phase II xenobiotic-metabolizing enzymes in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence River Estuary and the Canadian Arctic. **Aquatic Toxicology**. 69: 35-49. 2004

- METER, R.J.V.; SPOTILA, J.R.; AVERY, H.W. Polycyclic aromatic hydrocarbons affect survival and development of common snapping turtle (*Chelydra serpentina*) embryos and hatchlings. **Environmental Pollution**. 142: 466-475. 2006
- MOORE, J. On behaviorism, knowledge and causal explanation. **The Psychological Record**, 34, 73-97. 1984
- NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: **Ecotoxicologia Aquática, Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos, SP. Capítulo 17. 412-432.2006.
- NASCIMENTO, I.A. Novos paradigmas da ecotoxicologia: resultados de testes ecotoxicológicos requerem validação em campo? **Revista Brasileira de Toxicologia**. 13(2), 23-28. 2000
- NASCIMENTO, I.A. Técnicas de coleta, preservação e preparo de amostras líquidas e de sedimentos para testes de toxicidade. In: **Métodos em Ecotoxicologia Marinha: aplicações no Brasil**. Cap. II. São Paulo. Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda. 262p. 2002
- NEBERT, M.; THOMTON, R.D.; STUEBING, E. W.; HARLOW, P. Clinical importance of the cytochromes P450. **J. Biol. Chem**, 266 *Lancet* **360**:1155-1162. 2000
- NRC (National Research Council), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Evaluation and Effects, Committee on Pyrene and Selected Analogues, Board on Toxicology and Environmental Health Hazards, Commission on Life Sciences, **National Academy Press**, Washington, DC. 1983.
- NYMAN, M.; RAUNIO, H.; PELKONEN, O. Expression and inducibility of members in the cytochrome P450 (CYP1) family in ringed and grey seals from polluted and less polluted waters. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 8: 217-225. 2000
- OSMSTEAD, A.W.; LeBLANC, G.A. Joint action of polycyclic aromatic hydrocarbons: Predictive modeling of sublethal toxicity. **Aquatic Toxicology**. 75:253-262. 2005
- OOST, R. V.; GOKSOYR, A.; CELANDER, M.; HEIDA, H.; VERMEULEN, N.P.E. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. **Aquatic Toxicology**. 36: 189- 222. 1996
- O'HARE, D.B.; ROBOTHAM, P.W.J.; GILL, R. EROD measurement using post mitochondrial supernatant (PMS) in roach (*Rutilus rutilus* L.), a possible biomonitor for HPA contamination in the freshwater environment. **Chemosphere**. 30:(2) 257-264. 1995
- OLIVEIRA, A.C.A.X; SILVA, I.B.; ROCHA, D.A.M; PAUMGARTTEN, F.J.R. Induction of liver monooxygenases by annatto and bixin in female rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 36: 113-118. 2003
- PAIVA, J.B.; PAIVA, E.M.C.D. **Hidrologia aplicada à gestão de pequenas Bacias Hidrográficas**. ABRH. 2002
- PANDEY, M.K.; YADAV, S.; PARMAR, D.; DAS, M. Induction of hepatic cytochrome P450 isozymes, benzo(a)pyrene metabolism and DNA binding following exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon residues generated during repeated fish fried oil in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 213: 126-134. 2006
- PARENTE, Thiago Estavam Martins. **Indução do CYP1A em peixes como biomarcador da poluição aquática – o caso do rio Guandu**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ. Instituto de Biologia. Departamento de Genética. RJ. 2006 (Monografia).
- PARENTE, T.E.M.; OLIVEIRA, A.C.A.X.; SILVA, I.B.; ARAUJO, G.A.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Induced alkoxyresorufin-O-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, RJ, Brazil. **Chemosphere**. 54:1613-1614. 2004
- PAYNE, A.J. Effect of amino acids and inducers on the activity of the microsomal mono-oxygenase system in rat liver cell culture. **Chem Biol Interact** 13:307-315. 1975

PAYNE, A.L.; PENROSE, W.R. Induction of aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene in fish by petroleum. **Bull Environ. Contam. Toxicol.** Jul; 14(01):112-116. 1987

PEAKALL, D.B. The role of biomarkers in environmental assessment. **Introduction. Ecotoxicology** 3, 157–60. 1994.

PERKINS, E.J.; SCHLENK, D. Immunochemical characterization of hepatic cytochrome P450 isozymes in the channel catfish: assessment of sexual, developmental and treatment-related effects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C.** 121: 305-310. 1998

PEDROSA, R.C.; GEREMIAS, R.; SILVA, M.H.; FIGNA, V.; LOCATELLI, C.; FILHO, D.W. Biomonitoramento do estuário do rio Itajaí-açu/SC, utilizando a indução do citocromo P4501A e glutatona-S-transferase de bagres como biomarcadores. In: **Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos**, R. Moraes et al. (Eds.). Arte e Ciência. Villipress. 35-48pp. 2001

PETERS, L.D.; PORTE, C.; ALBAIGES, J.; LIVINGSTONE, D.R. 7-ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme activities in larvae of sardine (*Sardina pilchardus*) from the North Coast of Spain. **Marine Pollution Bulletin**, Vol. 28. Nº 5. 299-304pp. 1994

PETERS, L.D.; MORSE, H.R.; WATERS, R.; LIVINGSTONE, D.R. Responses of hepatic cytochrome P450 1A and formation of DNA-adducts in juveniles of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) exposed to water-borne benzo[a]pyrene. **Aquatic Toxicology.** 38:67-82. 1997

PIKKARAINEN, A.L. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity and bile metabolites a contamination indicator Baltic Sea perch: determination by HPLC. **Chemosphere**, 65: 10, 1888-189. 2006.

POHL, R.J.; FOUTS, J.R. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. **Anal Biochem** 107: 150-155. 1980

PRINTES, L.B. **Biomarcadores em Invertebrados Aquáticos para Análise Ambiental.** VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2004.

PROUGH, R.A.; BURKE, M.D.; MAYER, R.T. Direct fluorometric methods for measuring mixed function oxidase activity. **Methods Enzymol.** 352:372–377. 1978

RAMOS, Maria Loreto Nazar Ramos. **Desenvolvimento e aplicações de técnicas para avaliação da Toxicidade de 14 formulações de gasolina, utilizando *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758); Cichlidae, Teleostei, e ovos do Gastrópode *Pomacea lineata* (SPIX, 1827) como organismos testes.** [Tese de Mestrado] Programa em Ecologia e Biomonitoramento, Janeiro 2005. 89f.

RAND, P. S.; LANTRY, B. F.; O’GORMAN, R.; OWENS, R. W.; D.; STEWART, J. Energy density and size of pelagic prey fishes in Lake Ontario, 1978–1990: Implications for *salmonine energetics*. **Trans. Am. Fish. Soc.** 123: 519–534. 1994.

RATTNER, B.A.; MELANCON, M.J.; CUSTER, T.W.; HOTHEM, R.L. Cytochrome P450 and contaminant concentrations in nestling black-crowned night-herons and their interrelation with sibling embryos. **Environmental Toxicology and Chemistry.** Vol. 15. Nº 5. 715-721pp. 1996

REES, B.C.; WU, H.; LI, W. Cloning of CYP1A in Atlantic salmon (*Salmo solar*). **Aquaculture.** 246:11-23pp. 2005

REIVE, R.; WALCZAK, I.; LIBERT, M.; CAMARO, S. Quantitative and qualitative analysis of hydrosoluble organic matter in bitumen leachates. **Chemical Research.** 21: 3, July 1989, 301-323. 1994.

RETEC **Ministério de Ciência e Tecnologia.** Sistema Brasileiro de Respostas Técnicas. Cultura de Tilápias. 2006

- RODRIGUES, I.L.P.; NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L.; CRUZ, A.C.S.; BARROS, D.A.; MATIAS, G.R.A.; LACERDA, V.C.O.; SANTOS, D.S. Utilização de Metalotioneínas como biomarcadores de contaminação por metais traços em bacia de retenção de efluentes petroquímicos utilizando *Oreochromis niloticus* como organismos teste. In: **IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, São Pedro: Editora e Gráfica Vida e Consciência, v. 1. p. 147-147. 2006a
- RODRIGUES, I.L.P.; NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; CRUZ, A.C.S.; LEITE, M.B.N.L.; BARROS, D.A.; MATIAS, G.R.A.; LACERDA, V.C.O.; SANTOS, D.S. Uso de biomarcadores bioquímicos na avaliação da qualidade de efluentes e sedimento da bacia de retenção do Complexo Básico do Polo Petroquímico de Camaçari-BA, utilizando *Oreochromis niloticus* como organismos teste. In: **IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, São Pedro: Editora e Gráfica Vida e Consciência. v. 1. p. 149-149. 2006b
- ROOS, P.H.; TSCHIRBS, S.; PFEIFER, F.; WELGE, P.; HACK, A.; WILHELM, M.; BOLT, H.M. Risk potentials for humans of original and remediated HPA-contaminated soils: applications of biomarkers of effect. **Toxicology**. 205: 181-194. 2004
- RUUS, A.; SANDVIK, M.; UGLAND, K.I.; SKAARE, J.U. Factors influencing activities of biotransformation enzymes, concentrations and compositional patterns of organochlorine contaminants in members of a marine food web. **Aquatic Toxicology**. 61: 73-87. 2002
- SANTANA, S.C.J.; NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L.; FRIST, A.K. Avaliação ecotoxicológica dos efluentes orgânico e inorgânico de uma indústria petroquímica: implementação de produção mais limpa. In: **VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia e V Reunião da SETAC Latino-americana**, Vitória/ES. 2002
- SINDERMAN, C.J. Effects on living resources and humans. **CRC Ocean pollution Press**, Boca Raton, 275 p. 1996.
- SIROKA, Z.; KRIJT, J.; SVOBODAVA, Z.; PESKOVA, G.; FUKSA, J.; HAJŠLOVA, J.; JARKOVSKY, J.; JANSKA, M. Organic pollutant contamination of the river elbe as assessed by biochemical markers. **ACTA Vet. BRNO**. 74:293-303. 2005
- SCHLEZINGER, J.J.; STRNTZ, W.D.; GOLDSTONE, J.V.; STEGEMAN, J.J. Uncoupling of cytochrome P450 and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. **Aquatic Toxicology**. 77: 422-432. 2006
- SLEIDERINK, H.M.; BEYER, J.; EVERAARTS, J.M.; BOON, J.P. Influence of temperature on cytochrome P450 1A in dab (*Limanda limanda*) from the Southern North Sea: results from field surveys and a laboratory study. **Marine Environmental Research**. 39:67-71pp. 1995
- SHAILAJA, M.S.; RAJAMANICKAM, R.; WAHIDULLA, S. Increased formation of carcinogenic HPA metabolites in fish promoted by nitrite. **Environmental Pollution**. 143: 174-177. 2006
- SMEETS, J.M.W.; WAMSTEKER, J.; ROTH, B.; EVERAARTS, J.; VAN DEN BERG, M. Cytochrome P4501A induction and testosterone hydroxylation in cultured hepatocytes of four fish species. **Chemosphere**. 46: 163-172. 2002
- STANLEY, L.A.; SKARE, J.A.; DOYLE, E.; POWRIE, R.; D'ANGELO, D.; ELCOMBE, C.R. Lack of evidence for metabolism of p-phenylenediamine by human hepatic cytochrome P450 enzymes. **Toxicology**. 210:147-157. 2005
- STEGEMAN, J.J. Cytochrome P450 gene diversity and function in marine animals: past, present and future. **Marine Environmental Research**. 50 61-81. 2000.
- STIEN, X.; RISSO, C.; GNASSIA-BARELLI, M.; ROMEO, M.; LAFAURIE, M. Effect of copper chloride in vitro and in vivo on the hepatic EROD activity in the fish *Dicentrarchus labrax*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 16. N° 2. 214-219pp. 1997

- THOMPSON, G.A.; LEYLAND, M.L.; ASHMOLE, I.; SUTCLIFFE, M.J.; STANFIELD, P.R. Residues beyond the selectivity filter of the K1 channel Kir2.1 regulate permeation and block by external Rb1 and Cs1. **J. Physiol.** 526:231–240. 2000
- TIMME-LARAGY, A.R.; LEVIN, E.D.; DI GIULIO, R.T. Developmental and behavioral effects of embryonic exposure to the polybrominated diphenylether mixture DE-71 in the killifish (*Fundulus heteroclitus*). **Chemosphere.** 62: 1097- 1104. 2006
- UENG, Y.; UENG, F. Expression of cytochrome P450 3A5 in Escherichia coli: effects of 5' modification, purification, spectral characterization, reconstitution conditions, and catalytic activities. **Arch Biochem Biophys.** Apr 20;318(2):498. 1995.
- UPSHALL,C; PAYNE, J.F.; HELLOU, J. Induction of MFO enzymes and production of bile metabolites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to waste crankcase oil. **Environ. Toxicol.Chem.** ,v. 12 p.2105-2112, 1993.
- USEPA. Effects of exposure to heavy metals on selected fresh water fish: toxicity of copper, cadmium, chromium, and lead to eggs and fry of seven fish species. **Environmental Research Laboratory**, Office of Research and Development, Duluth, MN. 600/3-76-105. 1976
- USEPA. **Quality Criteria for Water** EPA 440/5-86-001. 1986
- VENCES-MEJIA, A.; CABALLERO-ORTEGA, H.; DORADO-GONZALEZ, V.; GAMBOA-DOMINGUEZ, A.; GÓMEZ-RUIZ, C.; CAMACHO-CARRANZA, R.; ESPINOSA-AGUIRRE, J.J. Cytochrome P450 expression in rat gastric epithelium with intestinal metaplasia induced by high dietary NaCl levels. **Environmental Toxicology and Pharmacology.** 20:57-64pp. 2005
- VERBRUGGE, L.A.; GIESY, J.P.; VERBRUGGE, D.A.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J. Catalytic and immunochemical properties of hepatic cytochrome P4501A in three avian species treated with B-naphthoflavone or isosafrole. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C.** 130: 67-83. 2001
- VEGA-LOPEZ, S.; AUSMAN, L.M.; JALBERT, S.M.; ERKKILA A.T; LICHTENSTEIN, A.H. Palm and partially hydrogenated soybean oils adversely alter lipoprotein profiles compared with soybean and canola oils in moderately hyperlipidemic subjects. **Am. J. Clin. Nutr.** 84:54-62. 2006
- VENTURA, E.C.; GAELZER, L.R.; ZANETTE, L.; MARQUES, M.R.E.; BAINY, A.C.D. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research.** 54: 775-779. 2002
- YUAN, Z.; WIRGIN, M.; COURTENAY, S.; IKONOMOU, M.; WIRGIN, I. Is hepatic cytochrome P4501A1 expression predictive of hepatic burdens of dioxins, furans, and PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson River estuary? **Aquatic Toxicology.** 54: 217-230. 2001
- YUAN, Z.; COURTENAY, S.; WIRGIN, I. Comparison of hepatic and extra hepatic induction of cytochrome P4501A by graded doses of aryl hydrocarbon receptor agonists in Atlantic tomcod from two populations. **Aquatic Toxicology.** 76:306-320. 2006
- WALL, K.L; CRIVELLO, J. Effects of starvation on liver microsomal P450 activity in juvenile *Pleuronectes americanus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C.** 123: 273-277. 1999
- WALKER, C.W.; UNUMA, T.; MCGINN, N.A.; HARRINGTON, L.M.; LESSER, M.P. Reproduction of sea urchins. In: Lawrence JM (ed) *Edible sea urchins: biology and ecology.* **Elsevier Science**, Amsterdam, p 5–26. 2001
- WHILE, R.D.; HANN, M.E.; LOCKHART, W.L.; STEGMAN, J.J. Catalytic and Immunochemical characterization of hepatic microsomal Cytochromes P450 in Beluga Whale (*Delphinapterus leucas*). **Toxicology and Applied Pharmacology.** 126:45-57. 1993

- WOLKERS, J.; JORGENSEN, E.H.; NIJMEIJER, S.M.; WITKAMP, R.F. Time-dependent induction of two distinct hepatic cytochrome P4501A catalytic activities at low temperatures in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) after oral exposure to benzo(a)pyrene. **Aquatic Toxicology**. 35: 127-138. 1996
- WHITLOCK, J.; JORGENSEN, E.H.; NIJMEIJER, S.M.; WITKAMP, R.F. Time-dependent induction of two distinct hepatic Cytochrome P4501A catalytic activities at low temperatures in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) after oral exposure to benzo(a)pyrene. **Aquatic Toxicology**. 35:127-138. 1991
- WILLIAMS, T.D.; LEE, J.S.; SHEADER, D.L.; CHIPMAN, J.K. The cytochrome P450 1A gene (CYP1A) from European flounder (*Platichthys flesus*), analysis of regulatory regions and development of a dual luciferase report gene system. **Marine Environmental Research**. 50: 1-6. 2000
- WONG, C.K.C.; CHEUNG, R.Y.H.; WONG, M.H. Induction of cytochrome P4501A1 genes and metallothionein gene expression in tilapia exposed to coastal sediments in Hong Kong. **Marine Environmental Research**. 50: 545-552. 2000
- WONG, C.K.C.; YEUNG, H.Y.; WOO, P.S.; WONG, M.H. Specific expression of cytochrome P4501A1 gene in gill, intestine and liver of tilapia exposed to coastal sediments. **Aquatic Toxicology**. 54: 69-80. 2001
- ZAGATTO, PEDRO ANTÔNIO; BERTOLETTI, EDUARDO. (Editores). **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. Editora RIMA. São Carlos. 2006

**APÊNDICE 1 – TABELA DE BIOMETRIA DOS ORGANISMOS UTILIZADOS NOS TESTES**

**TESTE COM PEIXES  
CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 1ª

Data da Coleta: 16/08/05

Data da Exposição: 18/08/05

Data da Pesagem: 19/08/05

<b>Origem Peixe</b>	<b>Tamanho Peixe (cm)</b>	<b>Peso Peixe (g)</b>	<b>Peso do Fígado (g)</b>	<b>Observações</b>
PCA	13,0	30,87	0,77	
PCB	12,0	33,14	0,97	
PCC	13,0	38,38	1,10	
PCD	10,0	16,26	0,51	
PCE	-	-	-	-
P1A	10,0	17,97	0,58	Morte após 6h 30' de exposição
P1B	10,0	16,35	0,71	Morte após 6h de exposição
P1C	12,0	23,47	1,01	Morte após 7h de exposição
P1D	12,0	26,84	0,97	Morte após 5h 25' de exposição
P1E	12,0	23,47	0,87	Morte após 7h 30' de exposição
P2A	13,0	39,91	1,05	
P2B	10,0	18,01	0,39	
P2C	12,5	34,45	0,91	
P2D	11,0	25,17	0,97	
P2E	12,5	28,59	0,77	
P3A	13,0	45,51	1,27	
P3B	10,0	18,58	0,67	
P3C	12,0	26,51	1,14	
P3D	10,0	22,82	1,56	
P3E	8,5	22,51	0,47	
P4A	14,0	48,69	1,56	Morte após 4h de exposição
P4B	12,0	35,33	0,86	Morte após 4h de exposição
P4C	14,0	47,78	1,27	Morte após 4h 45' de exposição
P4D	14,0	38,66	1,21	Morte após 4h 15' de exposição
P4E	13,0	36,44	1,28	Morte após 4h 25' de exposição

**TESTE COM PEIXES  
CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 1ª

Data da Coleta: 16/08/05

Data da Exposição: 18/08/05

Data da Pesagem: 19/08/05

<b>Origem Peixe</b>	<b>Tamanho Peixe (cm)</b>	<b>Peso Peixe (g)</b>	<b>Peso do Fígado (g)</b>	<b>Observações</b>
P5A	11,5	22,26	0,73	
P5B	12,5	29,24	0,81	
P5C	10,5	16,20	0,94	
P5D	12,5	26,95	0,56	
P5E	8,5	8,68	0,44	
P6A	8,0	8,5	0,28	
P6B	8,5	7,84	0,27	
P6C	13,5	34,47	0,66	
P6D	9,0	9,56	0,50	
P6E	9,5	12,42	0,44	
P7A	9,5	15,17	0,49	
P7B	7,0	5,82	0,35	
P7C	11,5	24,89	0,81	
P7D	11,0	20,60	0,67	
P7E	10,5	21,04	0,80	
P8A	10,0	17,96	0,63	
P8B	14,0	38,35	1,30	
P8C	8,0	7,79	0,29	
P8D	7,0	6,65	0,31	
P8E	10,5	21,58	0,96	

## TESTE COM PEIXES CONTROLE DE PESAGEM

Nº da Campanha: 1ª

Data da Coleta: 16/08/05

Data da Exposição: 01/09/05

Data da Pesagem: 02/09/05

Origem Peixe	Tamanho Peixe (cm)	Peso Peixe (g)	Peso do Fígado (g)	Observações
PsCA	7,5	7,52	0,22	
PsCB	10,5	18,38	0,47	
PsCC	12,0	33,44	0,90	
PsCD	13,5	38,09	0,92	
PsCE	11,5	30,07	0,82	Não utilizamos esta réplica
Ps1A	11,5	14,98	0,34	
Ps1B	10,6	16,81	0,42	
Ps1C	13,2	32,26	0,66	
Ps1D	9,4	11,91	0,37	
Ps1E	11,0	16,90	0,40	Não utilizamos esta réplica
Ps2A	10,5	17,12	0,55	
Ps2B	12,0	27,41	0,68	
Ps2C	10,5	18,42	0,64	
Ps2D	10,0	15,82	0,34	
Ps2E	11,0	18,20	0,60	Não utilizamos esta réplica
Ps3A	11,0	23,69	0,37	
Ps3B	9,0	10,56	0,40	
Ps3C	9,0	10,16	0,49	
Ps3D	10,0	13,74	0,60	
Ps3E	10,5	17,0	0,50	Não utilizamos esta réplica
Ps4A	9,5	11,38	0,47	
Ps4B	9,5	13,94	0,43	
Ps4C	8,0	8,75	0,37	
Ps4D	8,0	8,01	0,40	
Ps4E	8,0	8,05	0,47	Não utilizamos esta réplica
Ps5A	11,0	21,20	0,51	
Ps5B	9,5	13,63	0,32	
Ps5C	8,0	6,37	0,33	
Ps5D	9,5	11,43	0,38	
Ps5E	10,0	12,02	0,40	Não utilizamos esta réplica

**TESTE COM PEIXES**  
**CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 2ª

Data da Coleta: 04/10/05

Data da Exposição: 05/10/05

Data da Pesagem: 06/10/05 (09:00hrs)

<b>Origem Peixe</b>	<b>Tamanho Peixe (cm)</b>	<b>Peso Peixe (g)</b>	<b>Peso do Fígado (g)</b>	<b>Observações</b>
PCA	13,0	38,66	0,77	
PCB	14,0	55,48	1,39	Feito pela tarde
PCC	12,0	34,56	0,50	
PCD	15,4	59,02	1,48	
PCE	13,4	35,69	0,66	
P1A	11,8	29,57	0,66	
P1B	12,7	33,30	0,84	
P1C	14,3	46,38	1,07	
P1D	13,0	35,45	0,65	
P1E	13,0	41,93	1,10	
P2A	15,5	60,75	0,86	
P2B	15,0	58,01	1,32	
P2C	10,5	19,47	0,84	
P2D	13,5	39,70	1,02	
P2E	13,4	42,93	1,10	
P3A	14,4	53,23	0,62	
P3B	14,0	41,17	0,80	
P3C	11,5	26,56	1,03	
P3D	15,5	60,22	0,81	
P3E	8,7	9,99	0,62	
P4A	13,2	36,70	1,03	
P4B	14,2	45,81	1,03	
P4C	14,4	56,86	1,04	
P4D	13,9	50,74	1,36	
P4E	9,0	40,31	0,33	

**TESTE COM PEIXES  
CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 2ª

Data da Coleta: 04/10/05

Data da Exposição: 05/10/05

Data da Pesagem: 06/10/05

<b>Origem Peixe</b>	<b>Tamanho Peixe (cm)</b>	<b>Peso Peixe (g)</b>	<b>Peso do Fígado (g)</b>	<b>Observações</b>
P5A	12,0	48,05	0,82	
P5B	13,0	40,17	0,60	
P5C	13,0	42,33	0,92	
P5D	13,0	35,07	0,65	
P5E	13,5	42,29	0,88	
P6A	15,6	57,71	1,03	
P6B	14,0	46,72	0,57	
P6C	13,0	43,81	0,60	
P6D	12,5	38,78	0,72	
P6E	12,7	34,02	0,44	
P7A	14,5	56,40	1,05	Morto após 6h de exposição
P7B	13,9	48,81	2,31	Morto após 6h de exposição
P7C	15,0	56,02	1,43	Morto após 6h de exposição
P7D	16,0	71,21	3,81	Morto após 6h de exposição
P7E	13,6	47,23	1,87	Morto após 6h de exposição
P8A	14,5	55,31	0,83	
P8B	14,3	50,07	0,63	
P8C	12,3	38,06	1,21	
P8D	13,8	40,98	0,54	
P8E	14,3	47,21	0,70	
				Peixe com fígado de coloração e consistência diferente. (líquido amarelado). A vesícula não foi perfurada.

## TESTE COM PEIXES CONTROLE DE PESAGEM

Nº da Campanha: 2ª

Data da Coleta: 04/10/05

Data da Exposição: 06/10/05

Data da Pesagem: 07/10/05 (13:00hrs)

Origem Peixe	Tamanho Peixe (cm)	Peso Peixe (g)	Peso do Fígado (g)	Observações
PsCA	14,0	52,54	0,66	
PsCB	13,2	37,81	0,63	Descartado
PsCC	13,9	43,73	0,91	
PsCD	15,0	58,16	1,09	
PsCE	14,0	42,89	1,24	
Ps1A	10,3	17,34	0,86	
Ps1B	9,0	13,00	0,52	
Ps1C	13,9	35,20	0,83	
Ps1D	-	-	-	Peixe pulou do aquário à noite
Ps1E	15,7	57,13	1,00	
Ps2A	14,0	49,75	1,05	
Ps2B	13,8	45,42	1,20	
Ps2C	14,9	56,59	1,00	
Ps2D	13,4	38,09	1,24	
Ps2E	14,5	51,78	0,82	
Ps3A	14,0	42,62	1,10	
Ps3B	11,5	34,02	0,91	
Ps3C	-	-	-	Descartado por ser muito pequeno
Ps3D	12,7	39,79	1,00	
Ps3E	17,0	66,25	1,25	
Ps4A	15,3	58,81	1,00	
Ps4B	13,0	40,18	0,86	
Ps4C	12,3	31,17	1,30	
Ps4D	15,0	57,09	0,79	
Ps4E	13,0	39,32	1,00	
Ps5A	9,00 (x3 peixes)	30,50	1,22	
Ps5B	16,00	62,02	1,50	
Ps5C	-	-	-	
Ps5D	-	-	-	
Ps5E	-	-	-	

**TESTE COM PEIXES**  
**CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 3ª

Data da Coleta: 13/12/05

Data da Exposição: 16/12/05

Data da Pesagem: 17/12/05

Origem Peixe	Tamanho Peixe (cm)	Peso Peixe (g)	Peso do Fígado (g)	Sexo	Observações
PCA	13,5	31,77	0,69	F	
PCB	12,5	28,10	0,38	F	
PCC	11,0	25,74	0,41	F	
PCD	14,5	46,70	0,96	F	
PCE	-	-	-	-	-
P1A	10,0	17,16	0,36	F	
P1B	12,5	36,20	0,44	M	
P1C	13,5	35,40	0,73	F	
P1D	13,0	45,81	0,74	M	
P1E	12,5	26,83	0,32	F	
P2A	12,5	30,00	0,50	M	
P2B	13,0	35,92	0,62	M	
P2C	14,0	39,67	0,43	M	
P2D	13,0	27,05	0,43	M	
P2E	12,0	25,50	0,33	M	
P3A	10,5	19,10	0,44	F	
P3B	11,0	18,00	0,29	M	
P3C	12,0	27,10	0,40	F	
P3D	12,4	24,83	0,25	F	
P3E	13,5	34,43	0,66	M	
P4A	13,7	38,15	0,63	M	
P4B	11,5	21,46	0,40	F	
P4C	12,5	27,46	0,35	F	
P4D	-	-	-	-	-
P4E	13,2	37,02	0,43	F	

Sexo: M= Macho e F= Fêmea

**TESTE COM PEIXES  
CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 3ª

Data da Coleta: 13/12/05

Data da Exposição: 16/12/05

Data da Pesagem: 17/12/05

<b>Origem Peixe</b>	<b>Tamanho Peixe (cm)</b>	<b>Peso Peixe (g)</b>	<b>Peso do Fígado (g)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Observações</b>
P5A	12,5	32,83	0,62	M	
P5B	9,4	11,83	0,21	M	
P5C	14,1	45,62	0,51	F	
P5D	12,2	33,63	0,60	F	
P5E	11,50	21,15	0,34	M	
P6A	12,5	30,70	0,52	F	
P6B	11,5	23,60	0,30	F	
P6C	11,5	23,40	0,32	F	
P6D	11,9	28,25	0,47	M	
P6E	11,0	18,62	0,36	F	
P7A	12,0	22,30	0,30	F	
P7B	13,0	29,80	0,34	F	
P7C	12,0	26,47	0,29	M	
P7D	10,5	18,70	0,27	M	
P7E	11,5	21,22	0,37	F	
P8A	12,0	23,20	0,35	F	
P8B	10,5	18,13	0,29	M	
P8C	11,0	19,67	0,39	M	
P8D	11,0	20,54	0,40	F	
P8E	11,2	18,08	0,38	F	

**Sexo: M= Macho e F= Fêmea**

**TESTE COM PEIXES  
CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 3ª

Data da Coleta: 13/12/05

Data da Exposição: 19/12/05

Data da Pesagem: 20/12/05

<b>Origem Peixe</b>	<b>Tamanho Peixe (cm)</b>	<b>Peso Peixe (g)</b>	<b>Peso do Fígado (g)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Observações</b>
PsCA	10,0	17,73	0,60	M	Réplicas fusionadas.
PsCB	10,0	22,80		M	
PsCC	12,5	32,86	0,36	F	
PsCD	12,0	21,59	0,31	F	
PsCE	12,0	25,06	0,35	F	
Ps1A	-	-	-	-	
Ps1B	10,5	19,98	0,37	F	
Ps1C	12,0	22,11	0,56	F	
Ps1D	11,0	19,10	0,72	F	
Ps1E	12,5	29,18	0,46	F	
Ps2A	13,0	30,66	0,43	M	
Ps2B	12,5	30,09	0,60	F	
Ps2C	12,5	29,97	0,57	F	
Ps2D	11,0	18,75	0,30	M	
Ps2E	-	-	-	-	
Ps3A	11,5	21,17	0,64	F	Fusão de A c/ E
Ps3B	13,0	30,97	0,44	F	
Ps3C	11,5	21,52	0,34	F	
Ps3D	11,0	23,90	0,40	M	
Ps3E	10,0	15,98	--	F	Réplica fusion. c/ A
Ps4A	11,5	1306	--	M	Réplica fusion. c/ C
Ps4B	10,5	17,25	0,48	M	
Ps4C	10,0	14,30	0,34	M	Fusão de C c/ A
Ps4D	11,0	18,53	0,38	F	
Ps4E	12,5	24,54	0,46	M	
Ps5A	11,0	21,00	0,50	F	
Ps5B	10,0	14,84	0,40	F	Fusão de B c/ E
Ps5C	11,5	24,55	0,51	F	
Ps5D	11,0	19,34	0,47	F	
Ps5E	10,0	15,93	--	F	Réplica fusion. c/ B

Sexo: M= Macho e F= Fêmea

**TESTE COM PEIXES**  
**CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 4ª

Data da Coleta: 26/04/06

Data da Exposição: 27/04/06

Data da Pesagem: 28/04/06

Origem Peixe	Tamanho Peixe (cm)	Peso Peixe (g)	Peso do Fígado (g)	Sexo	Observações
PCA	13,0	32,01	0,49	M	
PCB	12,0	36,07	0,50	M	
PCC	12,0	37,73	0,16	M	
PCD	12,0	27,23	0,43	M	
PCE	12,0	27,29	0,52	F	
P1A	12,0	27,56	0,62	M	
P1B	-	-	-	-	PULOU
P1C	-	-	-	-	MORREU
P1D	14,0	45,78	0,80	M	
P1E	11,5	32,02	0,70	M	
P2A	11,0	26,67	0,73	M	
P2B	11,0	25,15	0,61	F	
P2C	12,0	36,89	0,44	M	
P2D	12,0	30,27	0,34	M	
P2E	13,0	46,86	0,72	F	
P3A	13,0	38,00	0,55	M	
P3B	12,0	26,40	0,40	M	
P3C	12,0	26,40	0,34	M	
P3D	14,0	50,70	0,80	M	
P3E	12,0	25,60	0,44	M	
P4A	11,0	33,80	0,63	F	
P4B	11,0	29,50	0,75	F	
P4C	14,5	55,70	0,40	M	
P4D	13,0	35,40	0,50	M	-
P4E	15,0	44,10	0,97	M	

Sexo: M= Macho e F= Fêmea

**TESTE COM PEIXES  
CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 4ª

Data da Coleta: 26/04/06

Data da Exposição: 27/04/06

Data da Pesagem: 28/04/06

<b>Origem Peixe</b>	<b>Tamanho Peixe (cm)</b>	<b>Peso Peixe (g)</b>	<b>Peso do Fígado (g)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Observações</b>
P5A	15,0	48,17	0,70	M	
P5B	-	-	-	-	PULOU
P5C	13,5	32,05	0,78	M	
P5D	13,0	37,89	0,50	M	
P5E	12,5	23,03	0,60	M	
P6A	14,0	40,13	0,40	M	
P6B	16,0	56,78	0,80	M	
P6C	13,0	32,60	0,51	M	
P6D	15,0	40,98	0,54	M	
P6E	12,5	33,76	0,50	M	Quase Morto
P7A	-	-	-	-	MORREU
P7B	13,3	35,93	1,03	F	
P7C	11,0	25,0	0,50	M	Quase Morto
P7D	-	-	-	-	MORREU
P7E	-	-	-	-	MORREU
P8A	-	-	-	-	PULOU
P8B	13,0	33,58	0,58	M	
P8C	12,5	39,47	0,55	M	
P8D	11,5	25,30	0,60	M	
P8E	12,5	42,57	0,70	M	

**Sexo: M= Macho e F= Fêmea**

**TESTE COM PEIXES**  
**CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 4ª

Data da Coleta: 26/04/06

Data da Exposição: 02/05/06

Data da Pesagem: 03/05/06

Origem Peixe	Tamanho Peixe (cm)	Peso Peixe (g)	Peso do Fígado (g)	Sexo	Observações
PsCA	12,5	38,62	0,54	M	
PsCB	13,5	37,00	0,74	M	
PsCC	13,0	30,60	0,43	F	
PsCD	15,0	49,28	0,63	F	
PsCE	14,0	43,50	0,60	M	
Ps1A	11,5	24,80	0,46	M	
Ps1B	12,5	23,60	0,32	M	
Ps1C	13,0	25,73	0,25	M	
Ps1D	15,0	37,60	0,60	M	
Ps1E	-	-	-	-	
Ps2A	14,0	35,41	0,61	M	
Ps2B	15,0	47,87	0,55	M	
Ps2C	15,3	43,00	0,68	M	
Ps2D	12,5	24,40	---	M	Dividido entre os 3
Ps2E	-	-	-	-	
Ps3A	13,0	33,09	0,97	F	Fusão de A c/ B
Ps3B	14,5	36,50		F	
Ps3C	14,0	34,25	0,70	M	
Ps3D	13,0	24,33	0,66	M	Fusão de D c/ E
Ps3E	12,0	21,30		M	
Ps4A	12,5	26,91	0,50	M	
Ps4B	12,0	25,10	0,60	F	
Ps4C	13,0	29,55	0,40	M	
Ps4D	13,4	31,71	0,64	F	
Ps4E	-	-	-	-	
Ps5A	-	-	-	-	
Ps5B	15,6	48,39	0,70	M	
Ps5C	13,4	32,64	0,40	M	
Ps5D	14,0	33,88	0,76	F	
Ps5E	-	-	-	-	

Sexo: M= Macho e F= Fêmea

**TESTE COM PEIXES  
CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 5ª

Data da Coleta: 17/05/06

Data da Exposição: 19/05/06

Data da Pesagem: 20/05/06

<b>Origem Peixe</b>	<b>Tamanho Peixe (cm)</b>	<b>Peso Peixe (g)</b>	<b>Peso do Fígado (g)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Observações</b>
PCA	12,5	29,99	0,35	M	
PCB	12,3	29,78	0,75	M	
PCC	12,4	22,11	0,49	M	
PCD	12,9	28,48	0,66	M	
PCE	-	-	-	-	
P1A	12,3	28,71	0,75	M	
P1B	12,9	29,86	0,70	M	
P1C	11,6	23,07	1,00	M	
P1D	12,9	29,05	0,70	M	
P1E	-	-	-	-	
P2A	12,0	27,60	0,50	M	
P2B	12,0	26,38	0,74	M	
P2C	12,5	31,60	0,79	M	
P2D	11,4	19,50	0,70	M	
P2E	-	-	-	-	
P3A	10,5	16,00	0,48	M	
P3B	11,2	26,80	0,78	M	
P3C	12,5	29,60	0,93	M	
P3D	11,5	21,60	0,43	M	
P3E	-	-	-	-	
P4A	10,5	17,65	0,60	M	
P4B	10,7	17,00	0,57	M	
P4C	11,0	18,90	0,40	M	
P4D	12,0	25,80	0,57	M	
P4E	-	-	-	-	

Sexo: M= Macho e F= Fêmea

**TESTE COM PEIXES**  
**CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 5ª

Data da Coleta: 17/05/06

Data da Exposição: 19/05/06

Data da Pesagem: 20/05/06

<b>Origem Peixe</b>	<b>Tamanho Peixe (cm)</b>	<b>Peso Peixe (g)</b>	<b>Peso do Fígado (g)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Observações</b>
P5A	12,0	24,00	0,60	M	
P5B	11,5	22,10	0,60	M	
P5C	13,0	31,57	0,50	M	
P5D	11,0	19,00	0,45	M	
P5E	-	-	-	-	
P6A	10,5	26,90	0,36	F	
P6B	11,3	20,30	0,50	F	
P6C	12,7	28,10	0,61	M	
P6D	12,8	27,30	0,70	M	
P6E	-	-	-	-	
P7A	-	-	-	-	PULOU
P7B	-	-	-	-	MORREU
P7C	11,3	21,30	0,53	M	
P7D	11,5	22,40	0,49	M	
P7E	-	-	-	-	
P8A	13,0	29,73	0,60	M	
P8B	10,3	16,82	0,54	M	
P8C	11,5	24,02	0,80	M	
P8D	13,0	31,05	0,70	M	
P8E	-	-	-	-	

**Sexo: M= Macho e F= Fêmea**

**TESTE COM PEIXES  
CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 5ª

Data da Coleta: 17/05/06

Data da Exposição: 22/05/06

Data da Pesagem: 23/05/06

<b>Origem Peixe</b>	<b>Tamanho Peixe (cm)</b>	<b>Peso Peixe (g)</b>	<b>Peso do Fígado (g)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Observações</b>
PSCA	11,0	21,70	0,40	M	
PsCB	12,0	33,10	0,63	M	
PsCC	11,5	25,10	0,33	M	
PsCD	13,0	39,10	0,45	M	
PsCE	-	-	-	-	
Ps1A	11,0	24,00	0,45	M	
Ps1B	11,0	26,00	0,60	M	
Ps1C	11,0	22,00	0,43	M	
Ps1D	12,0	27,21	0,42	F	
Ps1E	-	-	-	-	
Ps2A	11,0	22,50	0,30	F	
Ps2B	12,0	32,90	0,56	M	
Ps2C	10,0	21,20	0,62	M	
Ps2D	13,0	30,60	0,34	M	
Ps2E	-	-	-	-	
Ps3A	11,5	26,94	0,48	M	
Ps3B	12,0	27,40	0,43	F	
Ps3C	11,0	25,70	0,40	M	
Ps3D	-	-	-	-	MORREU
Ps3E	-	-	-	-	
Ps4A	11,0	24,30	0,32	M	
Ps4B	10,0	16,40	0,50	M	
Ps4C	11,0	21,80	0,50	M	
Ps4D	-	-	-	-	MORREU
Ps4E	-	-	-	-	
Ps5A	10,0	19,50	0,40	M	
Ps5B	11,0	21,70	0,24	M	
Ps5C	12,0	23,00	0,44	M	
Ps5D	11,0	18,90	0,38	M	
Ps5E	-	-	-	-	-

Sexo: M= Macho e F= Fêmea

**TESTE COM PEIXES  
CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 6ª

Data da Coleta: 06/06/06

Data da Exposição: 07/06/06

Data da Pesagem: 08/06/06

<b>Origem Peixe</b>	<b>Tamanho Peixe (cm)</b>	<b>Peso Peixe (g)</b>	<b>Peso do Fígado (g)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Observações</b>
PCA	11,0	23,30	0,42	M	
PCB	12,0	40,20	0,80	M	
PCC	11,0	25,40	0,40	F	
PCD	12,5	39,40	0,50	M	
PCE	-	-	-	-	
P1A	-	-	-	-	MORREU
P1B	12,0	34,30	0,50	M	
P1C	11,0	29,00	0,40	F	
P1D	11,0	28,20	0,50	M	
P1E	-	-	-	-	
P2A	12,0	33,20	0,62	M	
P2B	12,0	31,60	0,48	F	
P2C	12,0	27,40	0,78	M	
P2D	11,0	23,20	0,36	M	
P2E	-	-	-	-	
P3A	11,0	25,30	0,50	M	
P3B	10,0	20,50	0,36	M	
P3C	11,0	27,00	0,80	M	
P3D	11,0	24,40	0,40	M	
P3E	-	-	-	-	
P4A	11,0	24,30	0,50	M	
P4B	11,0	26,90	0,45	M	
P4C	11,5	32,90	0,72	M	
P4D	09,5	19,80	0,40	M	
P4E	-	-	-	-	

Sexo: M= Macho e F= Fêmea

**TESTE COM PEIXES**  
**CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 6ª

Data da Coleta: 06/06/06

Data da Exposição: 07/06/06

Data da Pesagem: 08/06/06

<b>Origem Peixe</b>	<b>Tamanho Peixe (cm)</b>	<b>Peso Peixe (g)</b>	<b>Peso do Fígado (g)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Observações</b>
P5A	10,5	23,56	0,39	M	
P5B	11,5	22,30	0,45	F	
P5C	10,5	16,00	0,25	M	
P5D	10,3	18,50	0,48	M	
P5E	-	-	-	-	
P6A	12,0	26,13	0,47	M	
P6B	13,3	33,37	0,49	M	
P6C	12,5	30,77	0,55	F	
P6D	13,0	31,87	0,59	F	
P6E	-	-	-	-	
P7A	10,7	19,20	0,30	M	
P7B	11,3	24,00	0,42	M	
P7C	12,0	24,60	0,54	M	
P7D	09,6	20,20	0,56	M	
P7E	-	-	-	-	
P8A	10,5	22,85	0,30	M	
P8B	11,5	28,20	0,44	M	
P8C	12,5	26,50	0,54	F	
P8D	12,5	31,70	0,50	M	
P8E	-	-	-	-	

**Sexo: M= Macho e F= Fêmea**

**TESTE COM PEIXES**  
**CONTROLE DE PESAGEM**

Nº da Campanha: 6ª

Data da Coleta: 06/06/06

Data da Exposição: 09/06/06

Data da Pesagem: 10/06/06

Origem Peixe	Tamanho Peixe (cm)	Peso Peixe (g)	Peso do Fígado (g)	Sexo	Observações
PSCA	12,5	25,79	0,47	M	
PsCB	12,0	22,88	0,45	F	
PsCC	12,0	18,47	0,31	F	
PsCD	10,5	15,26	0,25	F	
PsCE	-	-	-	-	
Ps1A	11,0	22,90	0,53	F	
Ps1B	10,5	19,93	0,53	M	
Ps1C	11,0	23,26	0,52	M	
Ps1D	12,5	34,62	0,70	F	
Ps1E	-	-	-	-	
Ps2A	10,5	16,69	0,40	F	
Ps2B	10,2	24,00	0,30	F	
Ps2C	-	-	-	-	
Ps2D	11,2	20,48	0,20	F	
Ps2E	-	-	-	-	
Ps3A	10,2	17,50	0,50	F	
Ps3B	10,8	21,80	0,47	F	
Ps3C	12,0	27,02	0,46	F	
Ps3D	10,7	18,68	0,53	F	
Ps3E	-	-	-	-	
Ps4A	11,0	17,70	0,40	M	
Ps4B	10,4	23,45	0,50	M	
Ps4C	11,6	22,84	0,56	M	
Ps4D	11,8	20,60	0,40	M	
Ps4E	-	-	-	-	
Ps5A	11,0	22,68	0,50	M	
Ps5B	11,4	21,77	0,45	M	
Ps5C	14,0	41,15	0,76	M	
Ps5D	11,6	22,80	0,50	M	
Ps5E	-	-	-	-	-

Sexo: M= Macho e F= Fêmea

**APÊNDICE 2 – TABELA DE BIOMETRIA DOS ORGANISMOS UTILIZADOS NOS TESTES DE CONTROLE POSITIVO**

**TESTE COM PEIXES**

Data da Exposição: 10 e 11/02/07

Data da Pesagem: 11 e 12/02/07

Peixe	Tamanho Peixe (cm)	Peso Peixe (g)	Vol. Injetado* (ul)	Peso do Fígado (g)	Sexo	Vol. Tampão (mL)
C1	11,0	23,00	-	0,56 (0,15)	M	0,6
C2	14,0	50,70	-	0,23 (0,2)	M	0,8
C3	12,5	37,00	-	0,38 (0,1)	F	0,4
C4	13,0	32,70	-	0,56 (0,2)	M	0,8
C5	12,5	32,00	-	0,36 (0,15)	M	0,6
AA4	14,5	45,67	-	0,42 (0,2)	F	0,8
AA10	13,0	26,60	-	0,60 (0,3)	F	1,2
AA X	10,0	16,70	-	0,23 (0,1)	M	0,4
IP1	14,5	39,27	70	0,67 (0,25)	F	1,0
IP2	15,0	45,00	81	0,77 (0,26)	F	1,1
IP3	14,5	34,50	62	0,65 (0,2)	F	0,8
IP4	14,0	41,25	75	0,52 (0,2)	F	0,8
IP5	12,0	26,40	48	0,22 (0,05)	F	0,2
IP6	12,5	27,12	195	0,50 (0,14)	F	0,6
IP9	15,0	40,00	280	0,80 (0,4)	F	1,6

Sexo: M= Macho e F= Fêmea

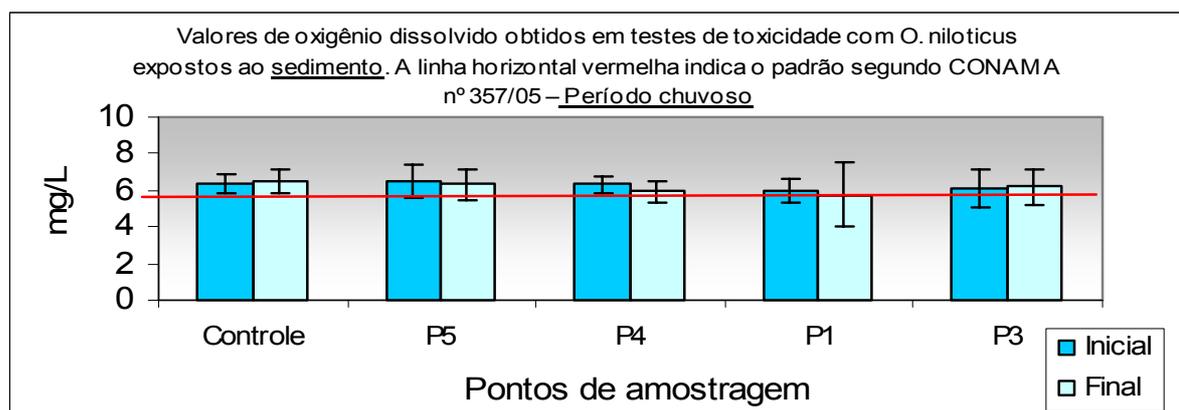
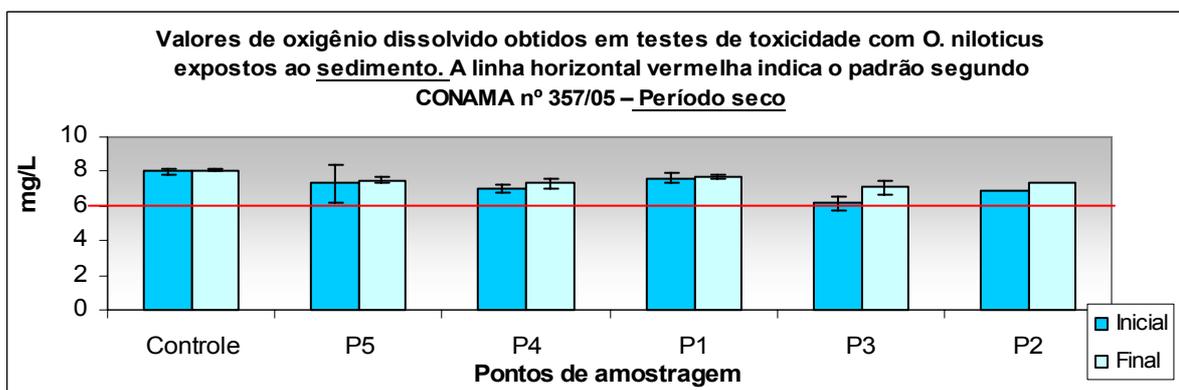
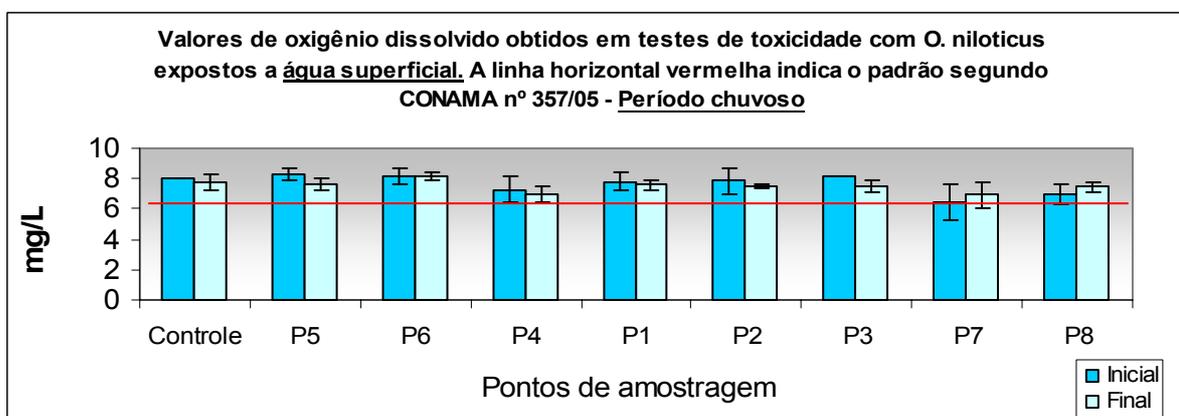
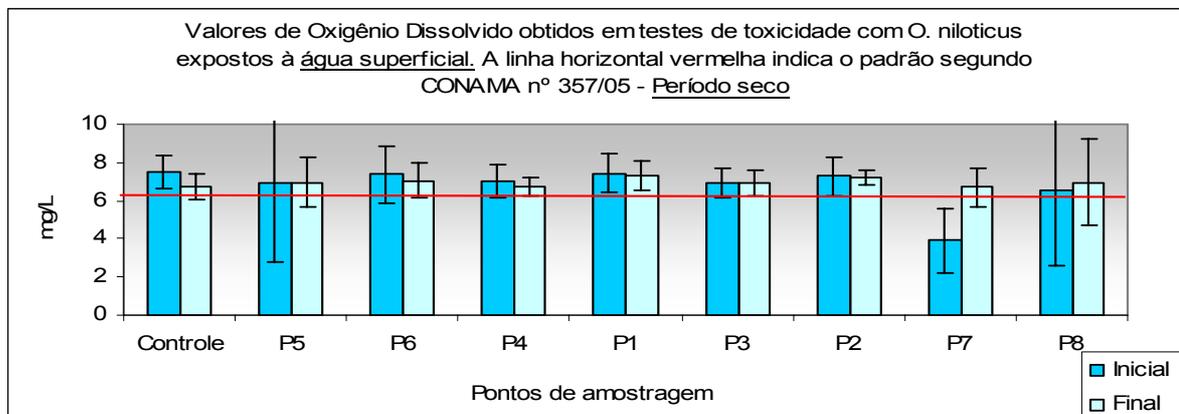
\* Valores de Referência: 2,5 mg/ kg = 1,8 mL/Kg --- 1800uL/1000g (BROWN *et al.*, 1993)

10 mg/Kg = 7,2 mL/Kg ---- 7200uL/1000g (BROWN *et al.*, 1993)

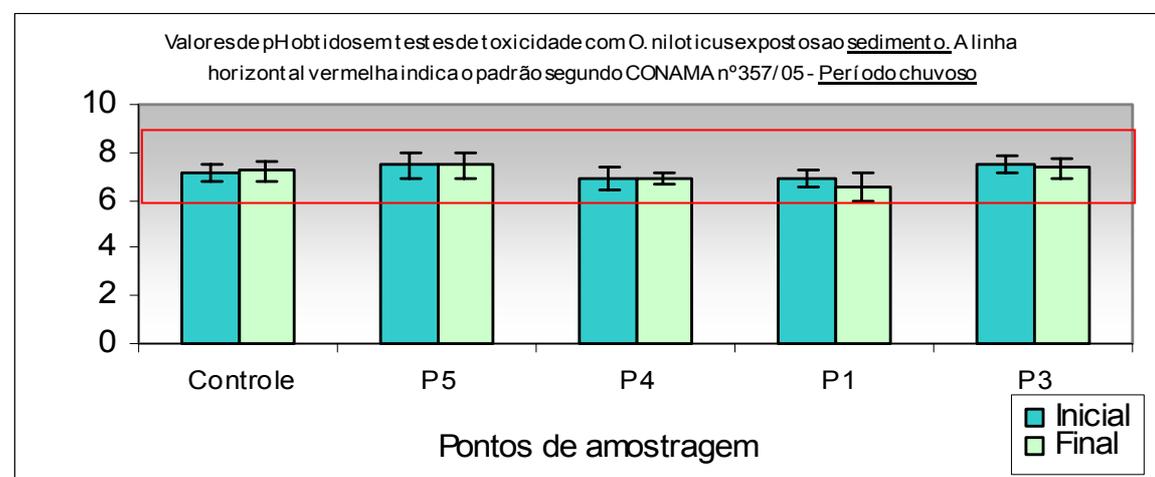
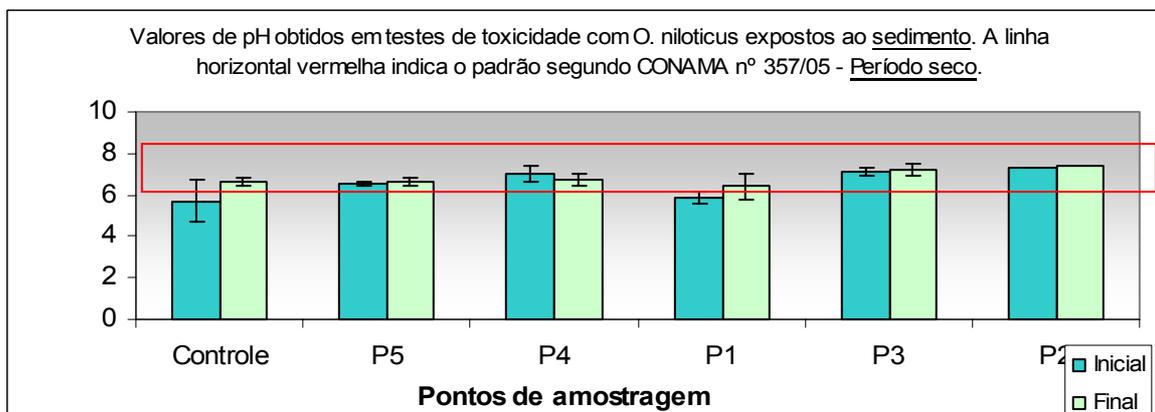
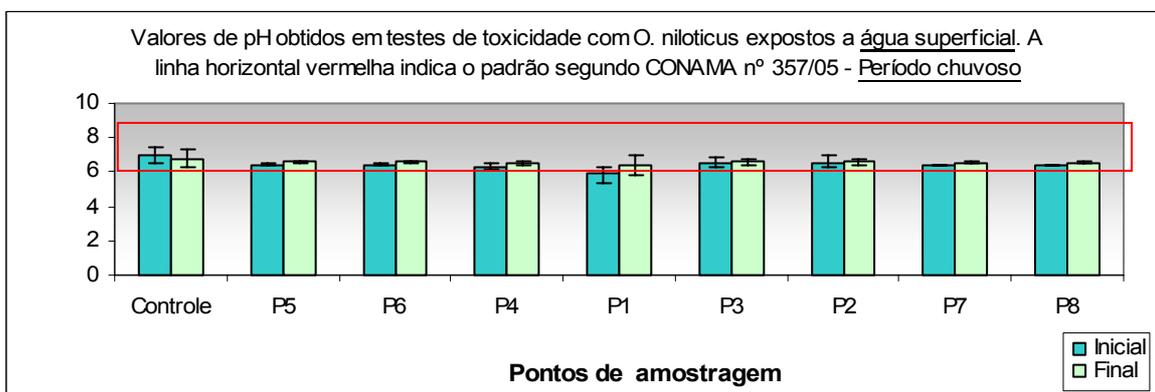
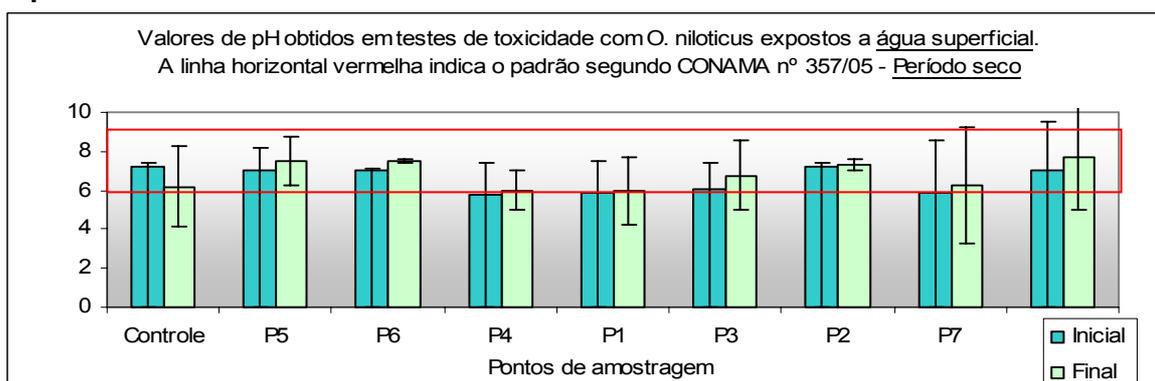
Cálculo do Volume Injetado (uL)=1800uL x peso (g) / 1000g

## APÊNDICE 3 – GRÁFICOS DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ANALISADOS DURANTE A EXPOSIÇÃO

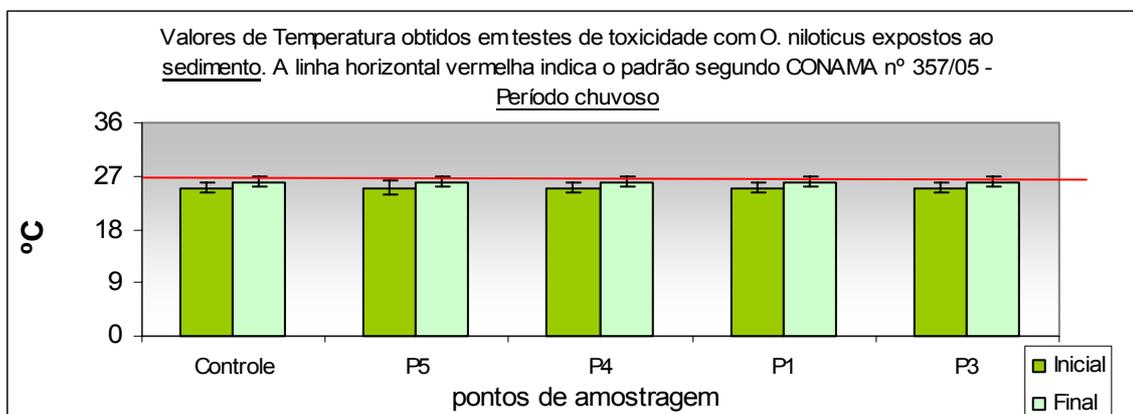
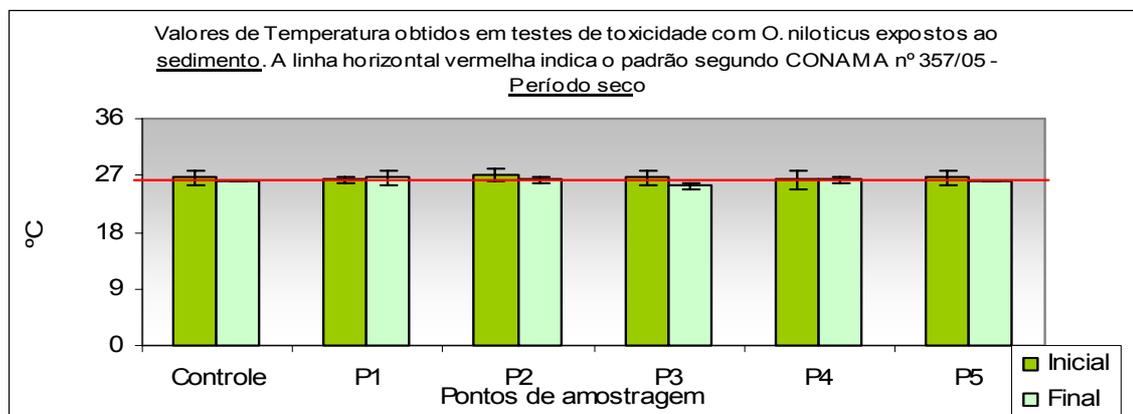
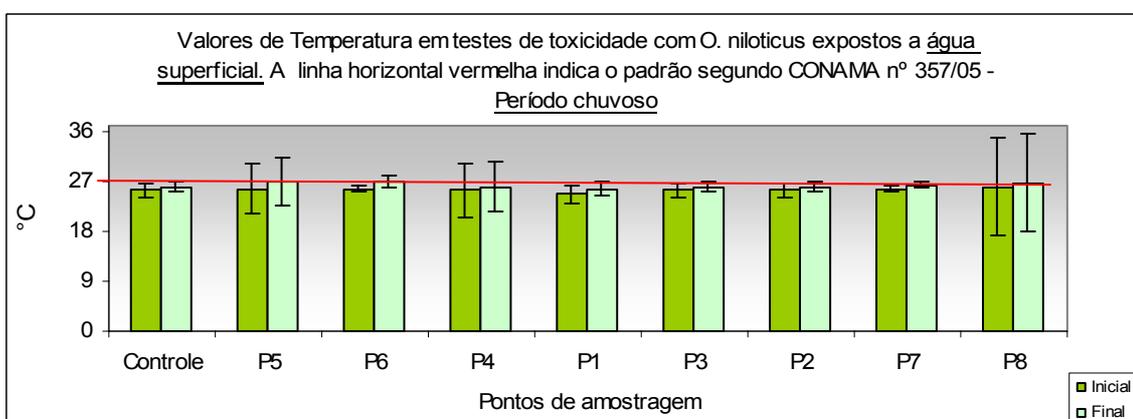
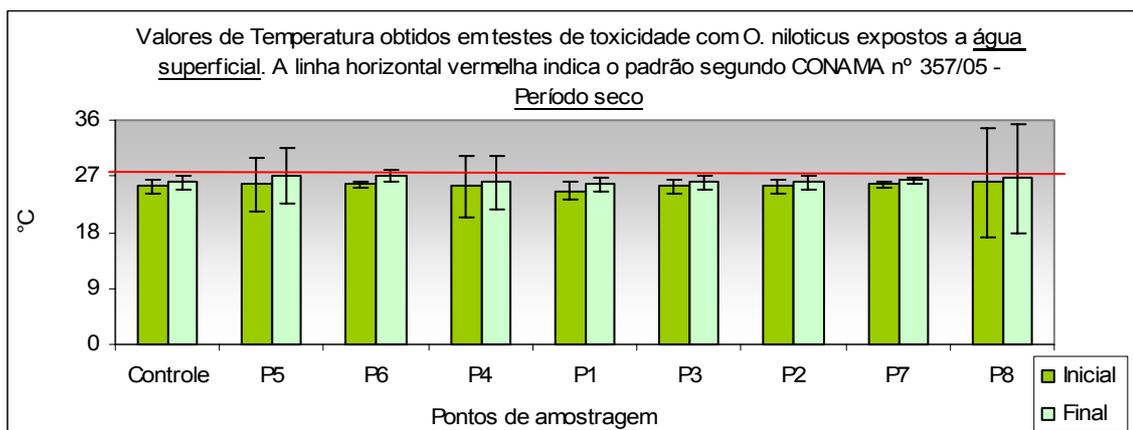
### 1. Oxigênio Dissolvido



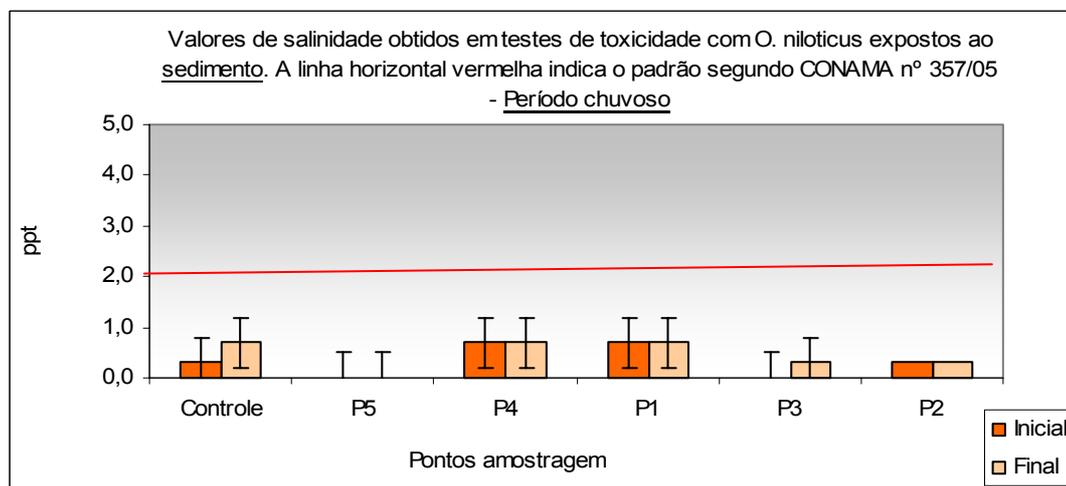
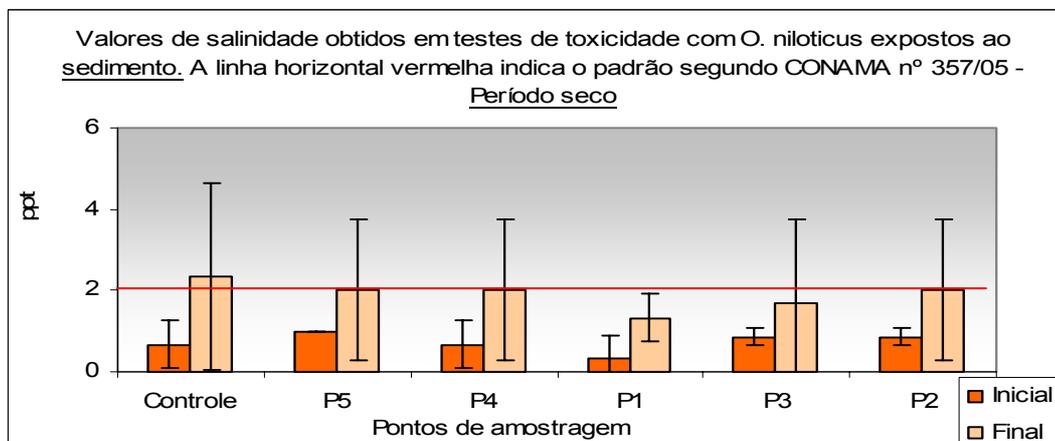
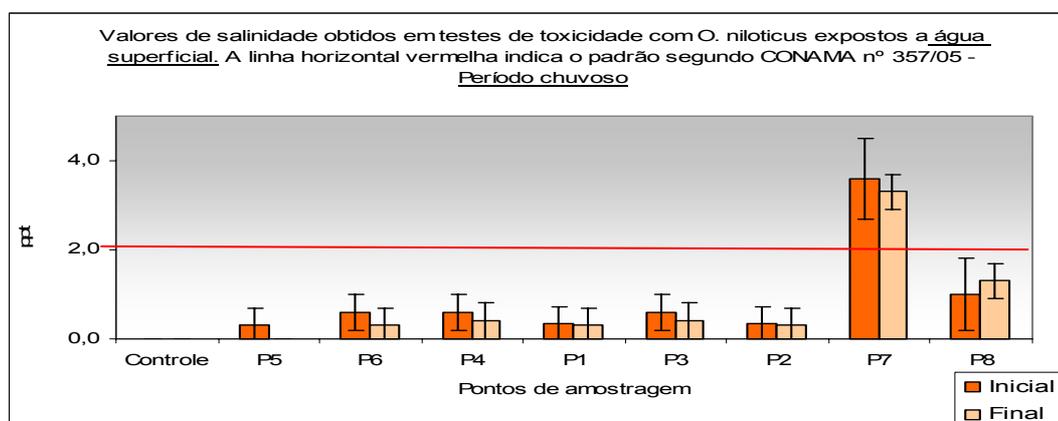
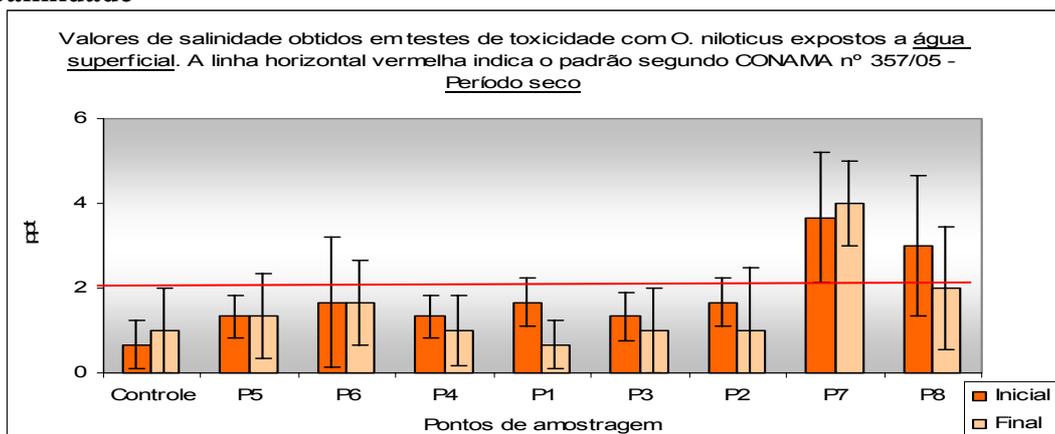
## 2. pH



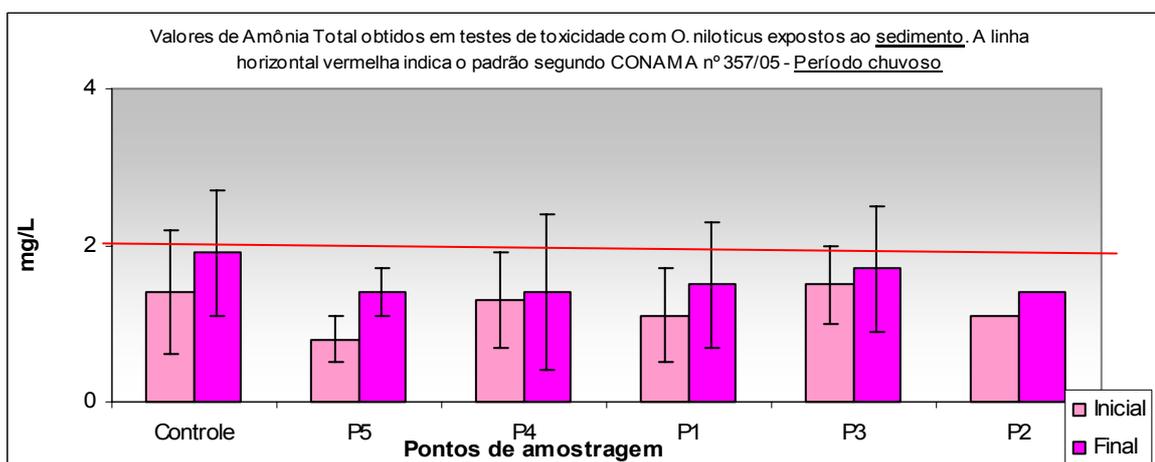
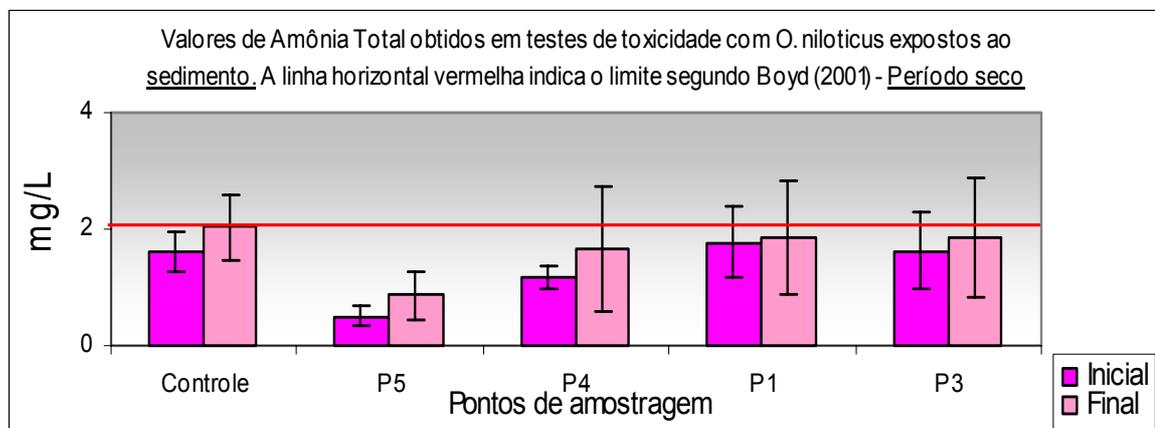
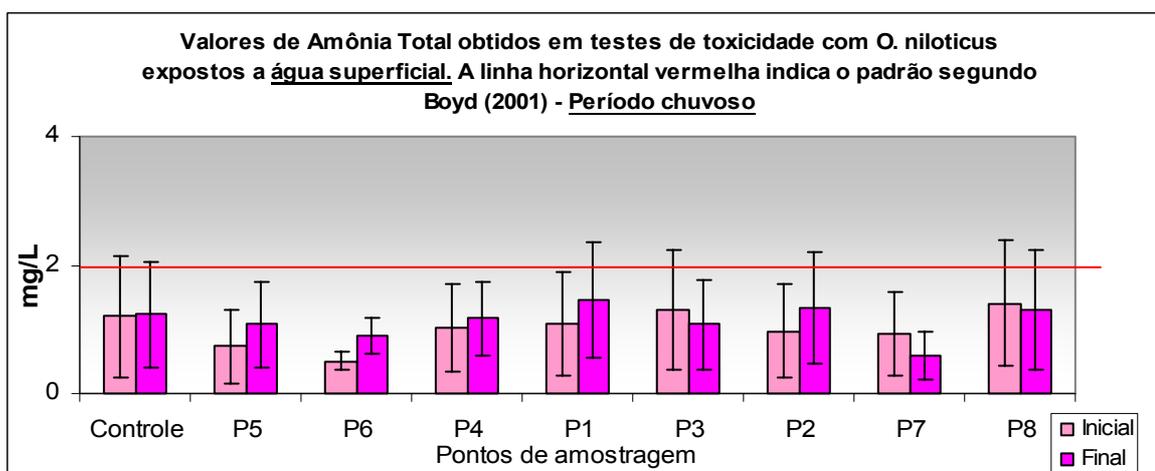
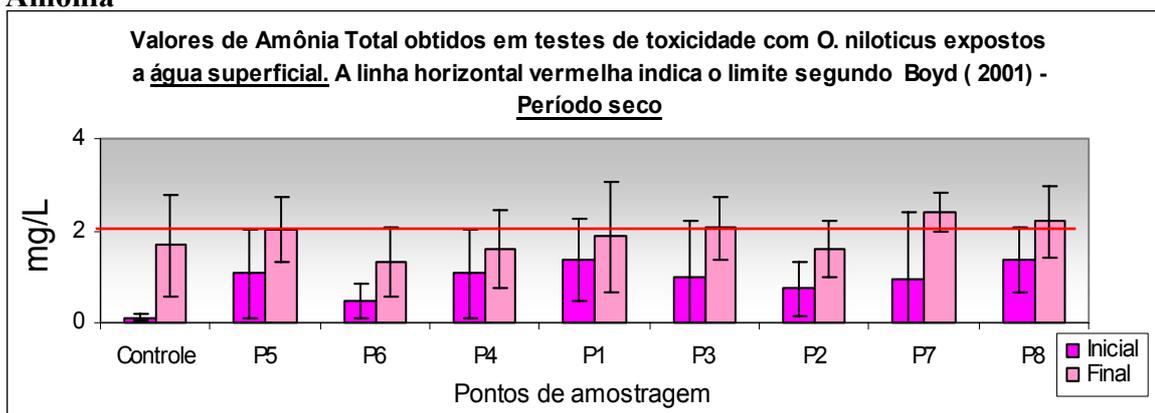
### 3. Temperatura



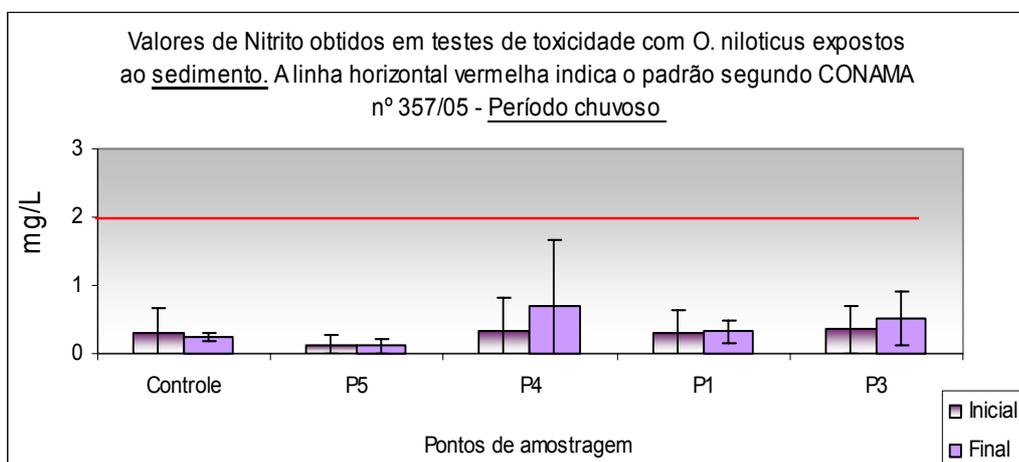
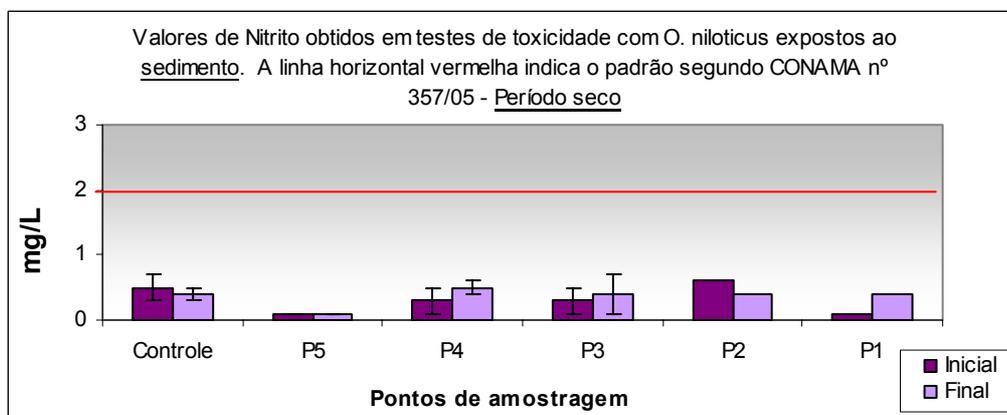
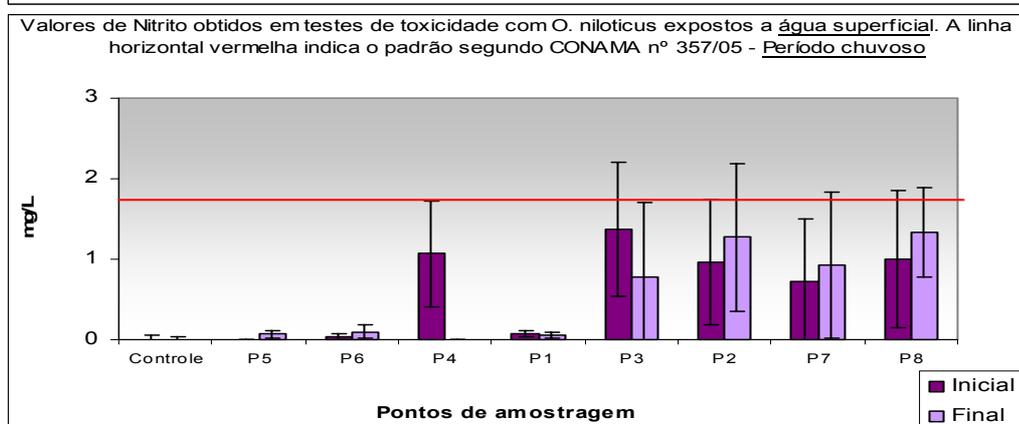
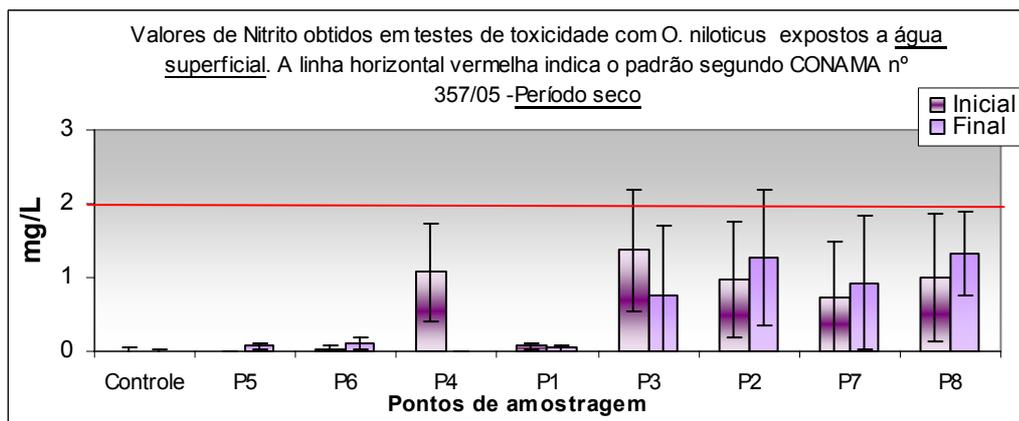
#### 4. Salinidade



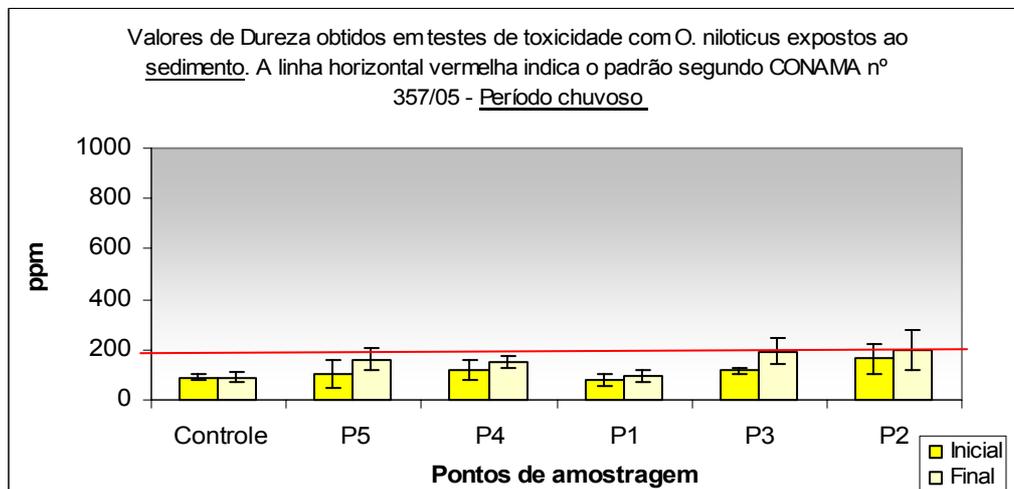
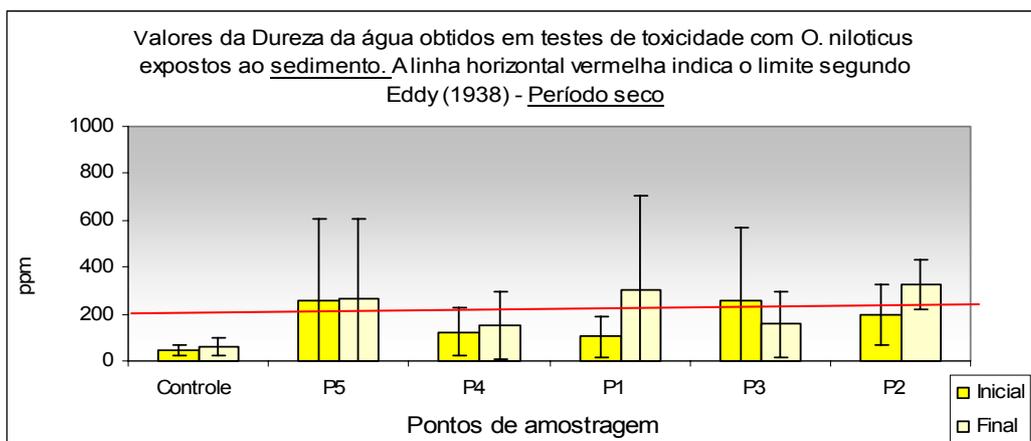
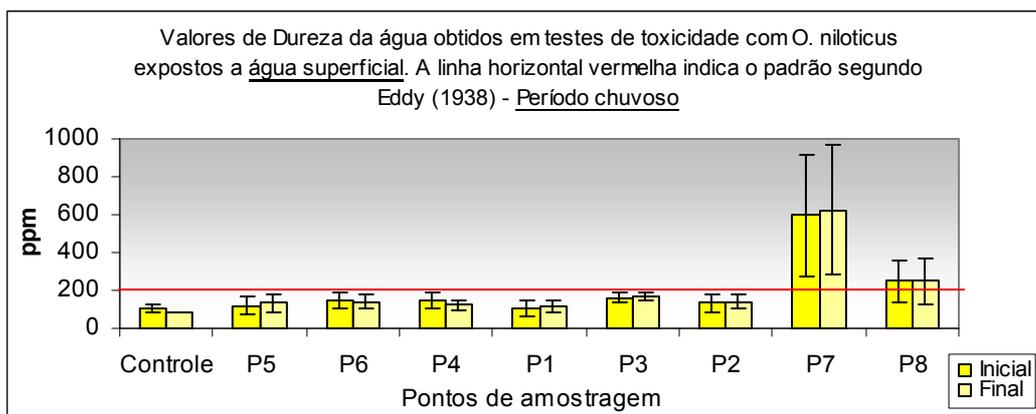
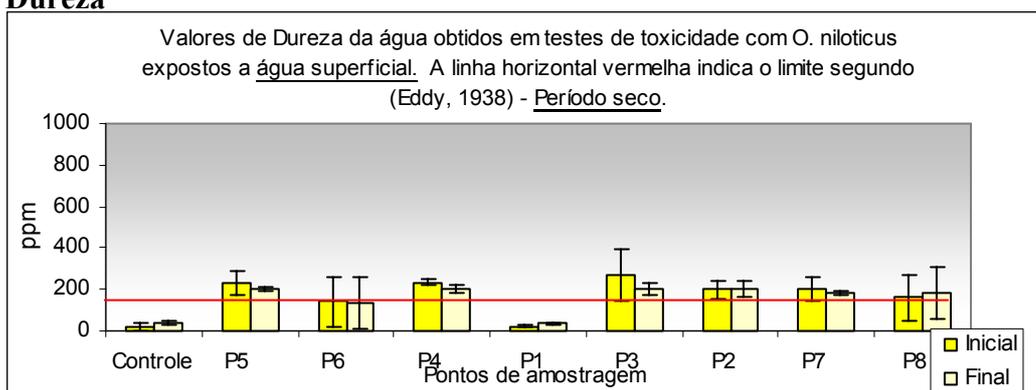
## 5. Amônia



## 6. Nitrito

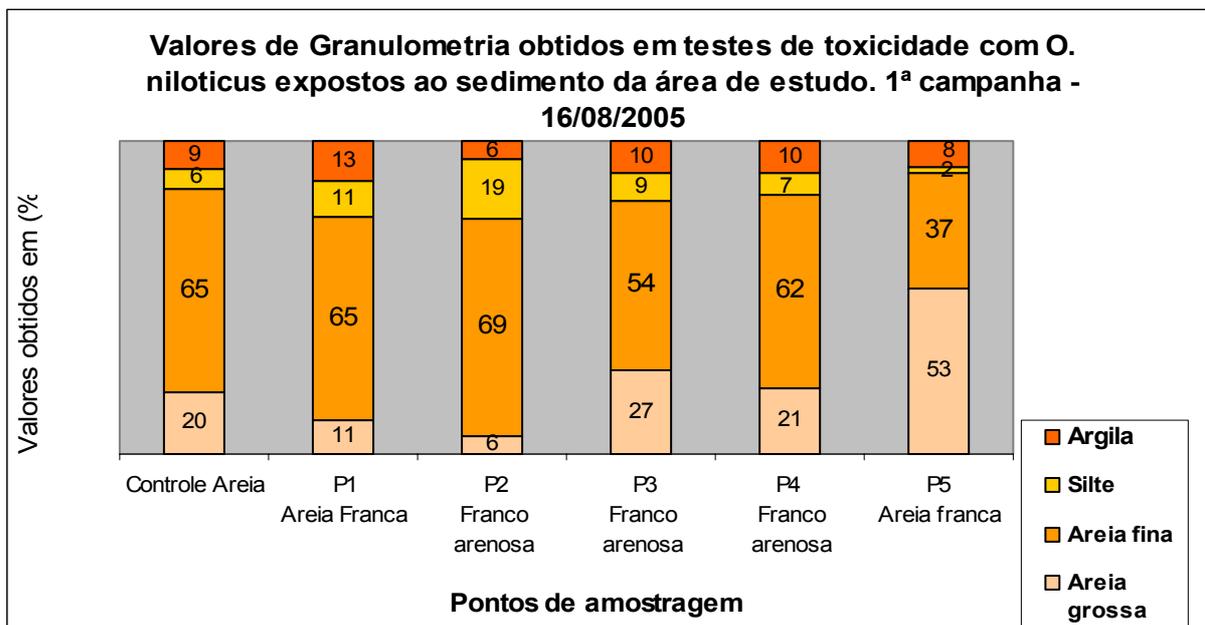


## 7. Dureza





## 9. Granulometria



**APÊNDICE 4 – BLOXPLOT DE VALORES DE ATIVIDADE EROD, MOSTRANDO A VARIÇÃO E COMPARANDO AS ESTAÇÕES**

