

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Genidens genidens*
PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE CONTAMINAÇÃO POR DERIVADOS DE
PETRÓLEO NO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ.**

Juliana Nogueira Berenger

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E
CONSERVAÇÃO

**UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Genidens genidens*
PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE CONTAMINAÇÃO POR DERIVADOS DE
PETRÓLEO NO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ.**

Juliana Nogueira Berenger

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

ORIENTADOR: MAURÍCIO MUSSI MOLISANI

CO-ORIENTADOR: JORGE LUIZ DA CUNHA MORAES

Macaé

Abril de 2013

**UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Genidens genidens*
PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE CONTAMINAÇÃO POR DERIVADOS DE
PETRÓLEO NO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ.**

Juliana Nogueira Berenger

Orientador: Maurício Mussi Molisani

Co-orientador: Jorge Luiz da Cunha Moraes

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovada por:

Dr. Maurício Mussi Molisani - Presidente
(UFRJ campus MACAÉ)

Dr. Manildo Marcião de Oliveira
(IFF Cabo Frio)

Dr. José Roberto da Silva
(UFRJ campus MACAÉ)

Macaé

Abril de 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Maurício Mussi Molisani, pela parceria e pela oportunidade. Obrigada pelos ensinamentos e por acreditar em mim. Agradeço também ao meu co-orientador, Jorge Luiz da Cunha Moraes, por ter me recebido no Laboratório Integrado de Bioquímica – Hatisaburo Masuda (LIBHM) – UFRJ/NUPEM.

Ao meu ex e sempre orientador, Manildo Marcião de Oliveira, pelo apoio e colaboração. Obrigada por estar sempre disposto a me ajudar e por ter me iniciado no mundo da ciência. Serei sempre grata a você.

A CAPES e a FUNEMAC, pela bolsa que possibilitou minha dedicação exclusiva ao trabalho.

A todos os amigos e professores do Laboratório Integrado de Bioquímica – Hatisaburo Masuda, pelos bons momentos juntos, por terem me ajudado em todas as vezes que precisei e pela paciência na espera do espectrofotômetro. Ao Vagner, por me ajudar na elaboração do ensaio e na identificação do sexo dos peixes e a professora Juliana Montani pela colaboração na análise estatísticas dos dados.

A toda a equipe do Departamento de bioquímica da UERJ, aos profs. Jayme da Cunha Bastos Neto por me receber no laboratório e pela fundamental colaboração. Aos profs Lin e Roosevelt pelo treinamento, paciência e disponibilidade. Aos amigos Eduardo, Carlúcio, Santiago, Arthur.

A todos os amigos do curso de ciências ambientais e conservação pelos ótimos momentos de estudos e descontração. A Carolina Clezar que eu tive o prazer de conhecer e que me ajudou a passar por esse período de adaptação longe da minha família.

A toda a minha família, os amores da minha vida, que sempre me apoiou. Minha mãe, Paulina, pela dedicação; ao meu pai, Jorge Roberto, pela força e carinho; a minha irmã Bruna, pela cumplicidade e parceria. Aos meus sogros, Vera e Josias, que me ajudaram nestes anos de ausência. Pelo apoio e compreensão.

Ao meu marido, Leonardo, pela paciência e amor. Obrigada por sempre estar ao meu lado e me dar força para enfrentar estes dois anos longe de casa.

Por fim, a todos os peixes que foram sacrificados para a execução deste trabalho.

FICHA CATALOGRÁFICA

Berenger, Juliana Nogueira

Utilização de biomarcadores bioquímicos em *Genidens genidens* para avaliação do grau de contaminação por derivados do petróleo no estuário do rio Macaé./Juliana Nogueira Berenger. - Macaé: UFRJ/ NUPEM Campus Macaé, 2013.

iv, 57f.: il.; 25cm.

Orientador: Maurício Mussi Molisani; Co-orientador: Jorge Luiz da Cunha Moraes

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Campus Macaé/ Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, 2013.

Referências Bibliográficas: f. 33-38.

1. Ecotoxicologia aquática. 2. Enzimas de Biotransformação. 3. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. I. Molissani, Maurício Mussi & Moraes, Jorge Luiz da Cunha II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação. III. Utilização de marcadores bioquímicos em peixes para avaliação do grau de contaminação por derivados do petróleo no estuário do rio Macaé.

“A natureza achará uma solução para a poluição causada pela civilização. A questão que permanece é se os seres humanos estão incluídos ou não.”

Mikhail Gorbachev

RESUMO

UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Genidens genidens* PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE CONTAMINAÇÃO POR DERIVADOS DE PETRÓLEO NO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ.

Juliana Nogueira Berenger

Orientador(es): Maurício Mussi Molisani e Jorge Luiz da Cunha Moraes

Os estuários vêm sendo amplamente utilizados pela sociedade humana e o aumento populacional vem gerando uma maior pressão nesses ambientes, acarretando uma variedade de impactos ambientais. Muitos poluentes lançados no meio ambiente vêm ocasionando distúrbios ecológicos e causam alterações biológicas em vários níveis. O petróleo e seus derivados, incluindo os HPA's, estão usualmente relacionados à contaminação em ambientes estuarinos. Testes de toxicidade em peixes são empregados para avaliar o grau de contaminação nesses ambientes utilizando enzimas de bitransformação. No presente trabalho foram utilizados enzimas de fase I, a Etoxiresorufina O-desetilase e de fase II, a Glutathione S-transferase, assim como a Catalase, uma enzima do sistema de defesa antioxidante em peixes da espécie *Genidens genidens* na determinação de grau de contaminação do Estuário do Rio Macaé por derivados de petróleo, assim como análises da concentração de HPA's na água do estuário. Também foram realizados ensaios de exposição dos peixes à fração solúvel do óleo diesel em laboratório. As coletas foram realizadas ao longo de um ano e as amostras de água do estuário revelaram a presença de apenas três exemplares de HPA's e em baixas concentrações. Para as análises enzimáticas realizadas nos diferentes meses do ano, a atividade da GST variou de 1,43 a 6,79 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$ entre os indivíduos analisados sendo observado no mês de julho de 2012 uma atividade significativamente superior ($4,64 \pm 0,40 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$; $P < 0,05$) em relação aos outros meses amostrados. A atividade da CAT variou de 8,53 a 109 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$ durante o período amostral, sendo nos meses de maio e junho de 2012 observadas atividades enzimáticas significativamente superiores, com valores de $80,5 \pm 5,74$ e $83,85 \pm 5,48 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$. Já a atividade da EROD variou de 1,14 a 167,20 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$ entre todos os indivíduos analisados tendo uma atividade significativamente superior nos meses de setembro de 2011 e abril de 2012, com valores de $111 \pm 10,4$ e $80,3 \pm 53 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$. Análises comparativas entre as atividades enzimáticas e aspectos biométricos e de gênero dos peixes indicaram uma relação inversa somente para a CAT nos aspectos biométricos. Os ensaios utilizando a fração solúvel do óleo diesel em diferentes tempos mostraram que para a GST e para CAT não houve diferença estatística em relação ao controle entre os tempos de exposição; já para a EROD ocorreu um aumento da atividade no tempo de 24h para os indivíduos expostos. Os resultados indicam que a EROD é um bom biomarcador para derivados de petróleo e a aplicação dessa enzima sugeriu um cenário de contaminação no estuário do rio Macaé.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, Biotransformação, Peixe, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, Estuário do Rio Macaé.

Macaé
Abril de 2013

ABSTRACT

USE OF BIOCHEMICAL BIOMARKERS *Genidens genidens* FOR EVALUATION OF DEGREE OF CONTAMINATION BY OIL PRODUCTS IN MACAÉ RIVER ESTUARY.

Juliana Nogueira Berenger

Orientador(es): Maurício Mussi Molisani e Jorge Luiz da Cunha Moraes

Estuaries have been widely used by human society and the population growth is creating increasing pressure in these environments which results in many environmental impacts. Pollutants released into the environment cause ecological disturbances and biological changes at various levels. Oil and its derivatives, including the PHA's, are usually related to contamination in estuarine environments. Toxicity tests in fish are used to assess the degree of contamination in these environments using enzymatic biotransformation. In the present study we used the phase I enzymes, the Etoxiresorufina O-desetilase and Phase II, glutathione S-transferase, and catalase as an antioxidant defense enzyme in fish species *Genidens genidens* to determine the degree of contamination Macaé River Estuary. Additionally, we analyzes PHA's concentration in water samples from the estuary. Finally, fishes were exposed to soluble fraction of diesel (20%) in the laboratory to induce enzymatic production under control system. During the sampling period, only three PHA's compounds at low concentrations were reported in the estuarine waters. For enzymatic analyzes, GST activity ranged from 1.43 to 6.79 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$ with higher values in July 2012. CAT activity ranged from 8.53 to 109 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$ during the sample period, with higher values observed in May and June 2012. The activity of EROD ranged from 1.14 to 167.20 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg ptn}^{-1}$ with higher activities in September 2011 and April 2012. Enzymatic activity of CAT was statistically correlated to fish biometric aspects such as the weight and size. In the laboratory assay with the soluble fraction of diesel indicated that only EROD activity was induced compared to control organisms at 24 hours. The results indicated tha EROD is a reasonable biomarker for oil products and the enzymatic application suggests a contamination scenario of the Macaé river estuary.

Keywords: Ecotoxicology, Biotransformation, Fish, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Macae River Estuary.

Macaé
Abril de 2013

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OS ESTUÁRIOS: IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA, ECONÔMICA E IMPACTOS AMBIENTAIS.....	1
1.2 ÁREA DE ESTUDO: ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ	2
1.3 DERIVADOS DE PETRÓLEO: FONTE DE EMISSÃO, ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E ECOTOXICOLÓGICOS.....	5
1.4 UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES EM PEIXES COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO EM AMBIENTES AQUÁTICOS.....	8
1.5 ENZIMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO E DE DEFESA ANTIOXIDANTE COMO BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR DERIVADOS DE PETRÓLEO EM ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS.....	9
1.5.1 ENZIMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO.....	9
1.5.2 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	12
1.6 UTILIZAÇÃO DE PEIXES DA ESPÉCIE <i>Genidens genidens</i> NOS ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS.....	13

2. OBJETIVOS	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1. AMOSTRAGEM E PREPARAÇÃO DAS FRAÇÕES HEPÁTICAS.....	15
3.2 DETERMINAÇÕES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	16
3.2.1. ATIVIDADE DA CATALASE (CAT).....	16
3.2.2. ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST).16	
3.2.3. ATIVIDADE DA ETOXIRESORUFINA O-DESETILASE (EROD).....	17
3.3. ENSAIO EM LABORATÓRIO UTILIZANDO A FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL (FSOD).....	17
3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1. ANÁLISE QUANTITATIVA DE HPA'S EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ.....	21
4.2. ANÁLISE DAS VARIAÇÕES MENSAIS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	22
5. CONCLUSÃO.....	34
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

ANEXOS.....	42
ANEXO 1 – LAUDO DA INNOLAB 1º COLETA.....	43
ANEXO 2 - LAUDO DA INNOLAB 2º COLETA.....	49
ANEXO 3 - LAUDO DA INNOLAB 6º COLETA.....	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: IMAGEM AÉREA DO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ.....	3
FIGURA 2: INDICATIVO DA PRESENÇA DE DERIVADO DO PETRÓLEO NAS ÁGUAS DO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ.....	5
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS 16 HPA's PRIORITÁRIOS PARA MONITORAMENTO AMBIENTAL SEGUNDO A AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS ESTADOS UNIDOS (EPA 1987).....	7
FIGURA 4: LOCAL DE COLETA DE PEIXES <i>Genidens genidens</i> NO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ.....	15
FIGURA 5: FOTO DOS AQUÁRIOS COM OS PEIXES <i>Genidens genidens</i> PARA O ENSAIO COM FSOD.....	18
FIGURA 6: PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL.....	19
FIGURA 7: VARIAÇÃO TEMPORAL DAS ATIVIDADES DA GST (a), CAT (b) E EROD (c) EM MICROSSOMOS HEPÁTICOS DE <i>Genidens genidens</i> COLETADOS NO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ.....	23
FIGURA 8: CORRELAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES DA GST (a), EROD (b) E CAT (c) EM MICROSSOMOS HEPÁTICOS DE <i>Genidens genidens</i> E O PESO DOS INDIVÍDUOS.....	26
FIGURA 9: CORRELAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES DA GST (a), EROD (b) E CAT (c) EM MICROSSOMOS HEPÁTICOS DE <i>Genidens genidens</i> E O TAMANHO DOS INDIVÍDUOS.....	27

FIGURA 10: CORRELAÇÃO DA ATIVIDADE DA GST (a), EROD (b) E CAT (c) EM MICROSSOMOS HEPÁTICOS DE *Genidens genidens* E O SEXO DOS INDIVÍDUOS.....28

FIGURA 11: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO DA ATIVIDADE DA EROD (a), CAT (b) E GST (c) EM MICROSSOMOS HEPÁTICOS DE *Genidens genidens* EXPOSTOS A FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL (FSOD 20%) EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (6h, 24h E 72h) E EM PEIXES NÃO EXPOSTOS (CONTROLE).....30

LISTA DE ABREVIATURAS

Ptn – Proteína.....	Resumo
DBO – Débito Biológico de Oxigênio.....	2
N – Nitrogênio.....	3
P – Fósforo.....	3
HPA's – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	4
EPA – Agência de Proteção Ambiental Americana.....	6
UGT – Glicuronosiltransferases.....	10
NAT – N-acetiltransferases.....	10
ST – Sulfotransferases.....	10
GST – Glutathione S-Transferase.....	10
AhR – Receptor aril-hidrocarboneto.....	10
Amt – Proteína AnR translocadora Nuclear.....	10
CYP1A – Citocromo Família 1A.....	10
EROD – Etoxiresorufina O-Desetilase.....	10
ERO's – Espécies Reativa de Oxigênio.....	11
SOD – Superóxido Dismutase.....	11
CAT – Catalase.....	11
GPx – Glutathione Peroxidase.....	11
GSH – Glutathione Reduzida.....	11
DNA – Ácido Desoxirribonucleico.....	11
H ₂ O ₂ – Peróxido de Hidrogênio.....	15
FSOD – Fração Solúvel do Óleo Diesel.....	12
M - Molar.....	14
pH – Potencial Hidrogeniônico.....	14

ml - Mililitro.....	14
g – Gravidade.....	15
mM – Milimolar.....	15
nm – Nanometro.....	15
HCl – Cloreto de Magnésio.....	15
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético.....	15
CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno.....	15
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato.....	16
μM – Micromolar.....	16
MgCl ₂ - Cloreto de Magnésio.....	16
FSOD – Fração Solúvel do Óleo Diesel.....	16
EPM – Erro Padrão da Média.....	19
μg/L – micrograma por litro.....	20

1. INTRODUÇÃO

1.1 OS ESTUÁRIOS: IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA, ECONÔMICA E IMPACTOS AMBIENTAIS

Os estuários são corpos d'água semifechados que têm uma livre ligação com o oceano e no seu interior a água marinha sofre diluição pelo aporte de água fluvial determinando graus de mistura entre essas duas massas de água, embora outras definições de estuários incluam aspectos ecológicos, de circulação de massas de águas, entre outros fatores (Pritchard, 1967, Kjerfve, 1994). A mistura de massas de água continental e marinha e os aspectos geomorfológicos conferem a essas áreas importantes aspectos ecológicos como alta produtividade biológica, locais de reprodução e berçário de espécies, disponibilidade de nutrientes para as cadeias biológicas, além de determinar as características da região costeira.

Segundo Miranda *et al.* (2002), 60% das grandes cidades no mundo estão próximas aos ecossistemas estuarinos exercendo uma pressão sobre estes recursos ambientais. No Brasil cerca de 2/3 dos 190 milhões de pessoas vivem em até 100 km da costa (Lacerda *et al.*, 2002). O motivo da proximidade da sociedade com os estuários está relacionado a essas áreas proverem diversos tipos de alimentos como peixes, moluscos, crustáceos, incluindo a aquicultura; condições para a diluição de dejetos das cidades; acesso ao interior do continente, navegação e portos; turismo (Braga *et al.*, 2005). Porém, Crossland (2005) aponta que o comportamento humano e a função social dos estuários resultam em diversas pressões como poluição, superpopulação, industrialização, desenvolvimento urbano desordenado, desmatamento, produção agrícola em área pouco propícia e pesca predatória. Adicionalmente, por se localizarem na extremidade mais baixa do fluxo de bacias hidrográficas, podem sofrer uma significativa degradação devido ao desenvolvimento humano à montante da bacia, representado pelo aporte fluvial. As emissões de espécies químicas oriundas de atividades humanas ao longo da bacia hidrográfica são importantes indutores de transformações devido à transfêrencia de materiais de interesse ambiental que podem afetar a qualidade desses ambientes. E em muitas bacias hidrográficas, estas emissões são superiores as cargas de fontes naturais de espécies químicas (Lacerda *et al.*, 2008).

Deste modo, pode-se observar um conflito entre os bens e serviços ecológicos e econômicos providos pelos estuários e que região costeira devem ser minimizados através da gestão destes recursos. Porém, atualmente podemos relatar que as intervenções humanas (vetores) como urbanização, navegação, agropecuária, aquicultura, represamento de rios, desmatamento, aumento do nível do mar induzem a pressões nos estuários como aumento da carga de poluentes orgânicos (pesticidas, petróleo e derivados, hormônios) e inorgânicos (nutrientes, metais traço, radiação, compostos organometálicos) e do débito biológico de oxigênio (DBO); aumento da denudação de solos; diminuição da oferta hídrica. Essas pressões geram impactos como eutrofização, anóxia, salinização, alteração e contaminação dos organismos nas cadeias alimentares, diminuição da produtividade pesqueira, alteração do fluxo de sedimentos alterando processos de erosão e assoreamento e exposição humana de poluentes (Lacerda et al., 2002).

1.2. ÁREA DE ESTUDO: ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ

O estuário do rio Macaé é a porção final da bacia hidrográfica do rio Macaé que pertence à Região Hidrográfica VIII do Estado do Rio de Janeiro, de acordo com a Resolução n. 18 do Conselho Estadual de Recursos Hídricos de 2006 (RIO DE JANEIRO, 2006). A bacia que possui 1.765 km², tem 82% de sua área no município de Macaé, além de compreender parte dos municípios de Nova Friburgo, Casimiro de Abreu, Rio das Ostras, Conceição de Macabu e Carapebus. O Rio Macaé, também conhecido como Rio dos Bagres, nasce na Serra de Macaé, próximo ao Pico do Tinguá (1.560m de altitude), em Nova Friburgo. Os principais afluentes são: os rios Bonito, Purgatório e Pedrinhas; os córregos Abacaxi e Carão; o rio Teimoso, os córregos Roça Velha e Belarmino, o Rio Três Pontes, os rios Sana, Atalaia, São Domingos, Santa Bárbara, Ouro Macaé, São Pedro e Jurumirim e os córregos Genipapo, Guanandirana e Sabiá (SEMADS, 2001). Seu curso é de 136 km até desaguar no Oceano Atlântico junto à cidade de Macaé através de seu estuário (Figura 1).



FIGURA 1: IMAGEM AÉREA DO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ. (Fonte: Google Earth).

Na década de 70, a bacia hidrográfica do rio Macaé teve sua vocação modificada com a instalação da base da PETROBRAS. As novas descobertas de poços petrolíferos na Bacia de Campos vêm levando ao aumento populacional e da indústria de serviços no município de Macaé. A partir desse período, com as atividades de exploração de petróleo e gás na Bacia de Campos, a população de Macaé cresceu 4,4 vezes, de 47.220 em 1970 para 206.728 em 2011 (IBGE, 2011). As consequências deste aumento populacional são observadas na ocupação da bacia hidrográfica que é composta por fragmentos florestais (41%), pasto (34%), áreas agrícolas (19%), urbanização (3%) e outros 3% com várias tipologias, tais como áreas inundáveis, corpos d'água, solo exposto, coberturas de manguezais (Pinheiro, 2008). Os principais usos verificados atualmente no rio Macaé são o abastecimento de água, recreação, turismo, diluição de despejos domésticos, industriais e agrícolas, irrigação e geração de energia elétrica.

As emissões de espécies químicas na bacia hidrográfica do rio Macaé foram avaliadas por Molisani et al. (2013a). Esses dados indicaram que as fontes antrópicas de espécies químicas como N, P e metais de interesse ambiental são responsáveis pela maior parte das emissões, enquanto que as fontes naturais (lixiviação de solos e deposição atmosférica) são atualmente irrelevantes. Dentre as atividades humanas a pecuária, a emissão de esgoto e resíduos sólidos sem tratamento são os principais indutores de um possível cenário de contaminação na bacia.

O estuário do rio Macaé é formado por dois canais principais que conectam com o oceano apresentando profundidade máxima de 4 metros. O fluxo fluvial no estuário é em média de $40 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, sendo influenciado por regime de marés que variam de 0,1 a 1,4 metros. Podem-se relatar poucos estudos sobre as condições ambientais do estuário do rio Macaé que indicam os altos níveis de N e P e microrganismos patogênicos oriundos de emissão de esgoto doméstico sem tratamento. Os dados de Molisani et al., (2013b) indicam uma condição inicial de degradação reportada por ensaios ecotoxicológicos, onde foram comparadas as taxas de mortalidade de anfípodos incubados com sedimentos de uma área controle e do estuário do rio Macaé que quase sempre foram superiores. No último estudo, não foi encontrado a(s) espécie(s) química(s) que induziu a mortalidade dos organismos, mas análises químicas sugerem que HPA's nos sedimentos tiveram um aumento das concentrações nos últimos dez anos e estas substâncias podem ser indutores de toxicidade no estuário.

As fontes de derivados de petróleo são diversas, incluindo a crescente frota automotiva do município, o derrame dos barcos que utilizam o estuário, além de todas as atividades antrópicas que utilizam esses derivados e as descartam no ambiente. A Figura 2 mostra as manchas de derivados de petróleo nas águas do estuário do rio Macaé que podem ser visualizadas diariamente.



FIGURA 2: INDICATIVO DA PRESENÇA DE DERIVADOS DE PETRÓLEO NAS ÁGUAS DO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ

1.3. DERIVADOS DE PETRÓLEO: FONTES DE EMISSÃO, ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E ECOTOXICOLÓGICOS

Dentre as espécies químicas de interesse ambiental em estuários podemos citar o petróleo e seus derivados, que são relevantes para a toxicologia aquática e têm causado preocupações pelas frequentes contaminações e pelo elevado potencial poluidor devido a derrames oriundos da exploração e transporte de petróleo, além daquelas devido à queima de combustíveis fósseis em processos industriais e por fontes como navegação, tráfego automotivo, incluindo a exaustão de motores a diesel e gasolina, entre outros (Simonato, 2010). O impacto destas fontes pode ser representado por milhares a milhões de toneladas de petróleo e derivados que foram derramados de forma acidental em ecossistemas aquáticos como; Baía da Guanabara (RJ), de Paraguá (PR), Rios Barigüí e Iguacú (PR) com impactos descritos nestes ecossistemas (Menicom et al., 2002; Filho, 2006). Por outro lado, muitos ecossistemas aquáticos estão submetidos a derrames de reduzidas quantidades, sob um regime de contaminação crônica oriunda do aporte contínuo de efluentes de petróleo e derivados de barcos, carros, vazamentos de postos de combustíveis e indústrias, ou da lixiviação de solos de áreas urbanas.

No Brasil, de acordo com a Resolução no. 273 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2000), toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais.

A composição destes produtos é extremamente complexa, pois o petróleo contém uma mistura de hidrocarbonetos, principalmente parafínicos, naftalênicos e aromáticos; pequenas quantidades de compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio e baixas concentrações de compostos orgânicos metálicos, como níquel e vanádio (Nicodem et al., 1997; Pedrozo et al., 2002). Dentre esses compostos, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) têm sido alvo de estudos, pois são um grupo de poluentes orgânicos formados por dois ou mais anéis benzênicos, constituídos exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio podendo se organizar sob a forma linear, angular ou agrupada. Estas moléculas podem ocasionar ações mutagênicas e tumorais, por isso são considerados poluentes orgânicos prioritários em estudos ambientais (Meire, 2007).

Existem quatro formas de emissões de HPA's no meio ambiente: pirolítica, petrogênica, diagênica e a síntese biogênica. Os HPA's de origem pirolítica são formados durante a combustão incompleta de matéria orgânica sob as condições de elevada temperatura, baixa pressão e curto tempo de formação, como por exemplo, a queima de carvão, óleo diesel e outros derivados do petróleo. Os HPA's de origem petrogênica são formados por processos diagênicos, ou seja, qualquer mudança química, física ou biológica sofrida por um sedimento após sua deposição inicial, sob as condições relativas de baixa temperatura e pressão. Já a síntese biogênica se dá por ação de microrganismos, plantas e animais (Meire et al, 2007).

Os HPA's petrogênicos são constituídos predominantemente por 2 e 3 anéis aromáticos, enquanto HPA's provenientes de queima apresentam uma maior frequência para compostos com 4 a 6 anéis (Meire et al, 2007). Assim, os HPA's petrogênicos são menos hidrofóbicos e mais voláteis, enquanto que os HPA's de origem pirogênica são mais hidrofóbicos e como consequência, mais lipossolúveis. Segundo Froehner e Martins (2008), as maiores fontes antropogênicas de HPA's são a queima de combustíveis fósseis e seus derivados, queima de florestas e atividades agrícolas, como queimada de cana-de-açúcar. Em ambientes urbanos o tráfego veicular é considerado a maior fonte de emissão de HPA's. Segundo a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA – Environment Protection Agency), 16 hidrocarbonetos

poliaromáticos são considerados importantes poluentes orgânicos prioritários para o monitoramento ambiental (EPA 1986) (Figura 3).

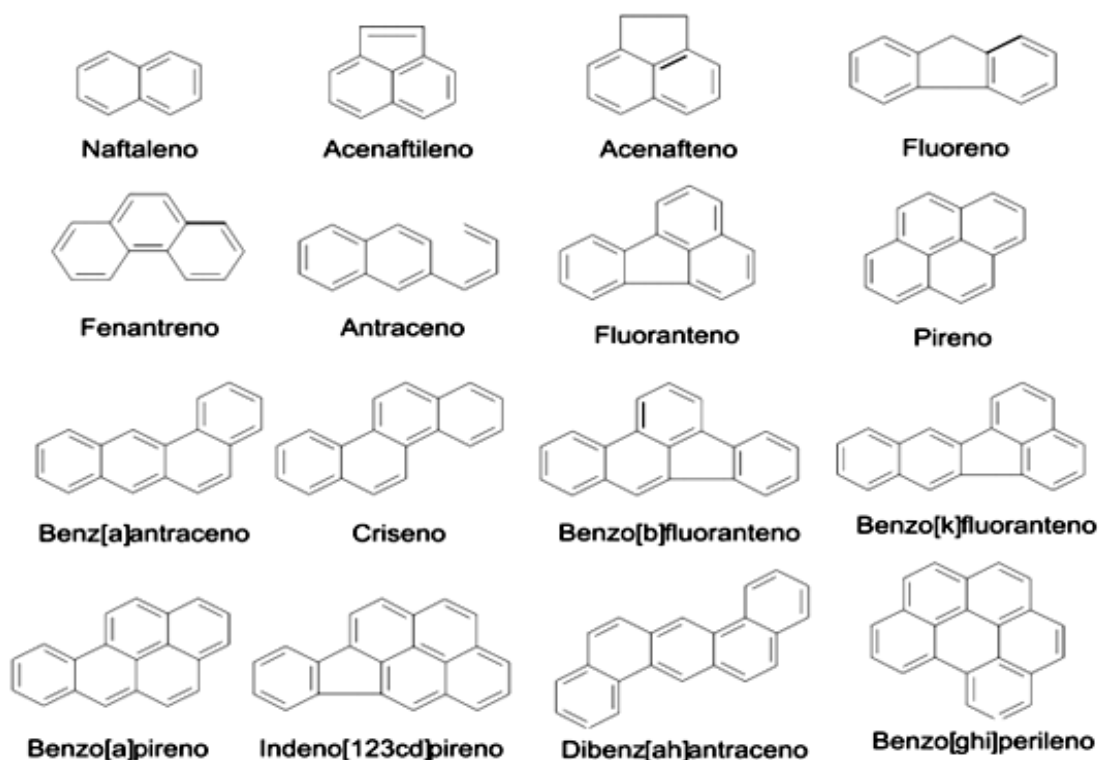


FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS 16 HPA'S PRIORITÁRIOS PARA MONITORAMENTO AMBIENTAL SEGUNDO A AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS ESTADOS UNIDOS (EPA 1987)

O comportamento dos HPA's no meio ambiente depende da pressão de vapor e solubilidade em água. Os HPA's são pouco solúveis e por isso tendem a se acumular em tecidos gordurosos dos organismos. Com relação à volatilidade, quanto menor o número de anéis, mais voláteis, por isso se acumulam menos nos tecidos. Com relação aos HPA's com maiores números de anéis, sua volatilidade diminui, eles são mais hidrofóbicos, logo mais lipofílicos, e por isso a maior tendência de se acumular na biota dos ambientes aquáticos (Meire et al, 2007). Como consequência da bioacumulação, temos amplificada a persistência desses compostos no ambiente com a biomagnificação, que seria a transferência do composto químico através da cadeia alimentar, podendo representar um risco ecológico, causando câncer, interferência na reprodução, dificuldades na fuga e caça etc.

1.4 UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES EM PEIXES COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Os ambientes aquáticos recebem, continuamente, compostos xenobióticos resultantes de atividades antrópicas, como os derivados do petróleo. Os efeitos de um poluente encontram-se no final de uma cadeia de eventos que começa com a emissão do poluente pela fonte emissora, seguida por sua dispersão no meio ambiente que determina as suas concentrações ambientais, e finalmente, termina com os efeitos do poluente sobre organismos (Klumpp, 2001).

O risco potencial que esses compostos representam para os ecossistemas aquáticos pode ser avaliado através de diversos parâmetros utilizados como indicadores biológicos. Esses podem ser arrumados em três grupos: a) biomarcador: qualquer alteração biológica relacionada à presença de um composto químico no ambiente, medida no organismo ou em seus produtos que indicam um desvio do estado normal; b) bioindicador: um organismo que fornece informações sobre as condições ambientais de seu hábitat por sua presença ou ausência ou pelo seu comportamento. Sua utilização permite a avaliação integrada dos efeitos ecológicos causados por múltiplas fontes de poluição; c) indicador ecológico: um parâmetro do ecossistema que descreve sua estrutura e funcionamento (Van Gestel e Van Brummelen, 1996; Callisto e Gonçalves, 2002)

Segundo Queiroz (2000), dentre as vantagens de se utilizarem indicadores biológicos ao invés de parâmetros físico-químicos para avaliar a qualidade da água estão: a rapidez e eficiência na obtenção de resultados, a avaliação da qualidade da água *in situ* através do uso de testes ecotoxicológicos, a relação custo-benefício e a maior susceptibilidade a uma grande variedade de estressores. Pela alta especificidade, os indicadores físico-químicos de qualidade de água representam uma desvantagem quando um estressor não pode ser identificado antecipadamente.

Os testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos não só possibilitam a avaliação das mudanças causadas pelos poluentes, mas também, antecipam possíveis impactos ambientais (Belmejo e Martos, 2008).

Os biomarcadores de peixes são boas ferramentas para monitorar a condição de um ecossistema aquático e vêm sendo incluídos em vários programas de monitoramento ambiental por fornecerem informações sobre os efeitos biológicos dos poluentes e seu

possível mecanismo de ação, diferente da simples quantificação desses poluentes no ambiente (Lima, 2001).

O monitoramento ambiental pode utilizar biomarcadores em vários níveis como: molecular, bioquímico e celular (Jesus, 2008). O uso de biomarcadores bioquímicos oferece algumas vantagens porque esses são normalmente os primeiros a serem detectados, são bastante sensíveis à presença de determinados poluentes, apresentam alta especificidade, possuem baixo custo de análise e fornecem informações a respeito do efeito metabólico causado pelo poluente (Stegeman et al., 1992).

Dentre os diversos marcadores bioquímicos utilizados em programas de monitoramento ambiental encontram-se as enzimas antioxidantes, que atuam protegendo as células dos efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio formadas durante o metabolismo de compostos endógenos como carboidratos e aminoácidos, além de compostos xenobióticos; as colinesterases que são responsáveis pela inativação da acetilcolina durante o mecanismo da neurotransmissão colinérgica; as enzimas de fase I e II de biotransformação que desempenham um papel central no metabolismo de muitos xenobióticos, catalisando reações de detoxificação, bioativação e conjugação e a Na^+K^+ -ATPase, um enzima que regula o balanço iônico em peixes e tem sido utilizada na detecção de alterações osmorregulatórias provocadas por contaminantes ambientais. Os biomarcadores bioquímicos de peixes mais utilizados são as enzimas envolvidas na biotransformação dos xenobióticos e as enzimas do sistema antioxidante.

1.5 ENZIMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO E DE DEFESA ANTIOXIDANTE COMO BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR DERIVADOS DE PETRÓLEO EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

1.5.1 *Enzimas de biotransformação*

O processo de biotransformação de xenobióticos tem como principal objetivo a eliminação destes compostos do organismo e o término de sua atividade biológica. Grande parte dos xenobióticos é lipossolúvel, característica que permite a sua passagem através das membranas biológicas, distribuição para os tecidos e dificulta a sua excreção. Portanto, a metabolização desses compostos em metabólitos mais hidrofílicos

é fundamental para a sua eliminação do organismo. De forma geral, as reações de biotransformação geram metabólitos mais polares e inativos. No entanto, também podem ser gerados metabólitos com atividade biológica e/ou tóxica.

O metabolismo de detoxificação serve, então, para converter químicos hidrofóbicos em derivados hidrofílicos que podem ser facilmente eliminados só organismo pela bile ou pela urina, já que a característica hidrofóbica de alguns xenobióticos dificulta sua eliminação (Huggett et al.,1992).

Porém, a transformação enzimática de alguns xenobióticos pode gerar químicos mais tóxicos e reativos. Isso ocorre quando um metabólito eletrofílico é formado e pode reagir com constituintes celulares como DNA e proteínas (Huggett et al.,1992).

As reações de biotransformação consistem em reações funcionais de fase I e reações de conjugação de fase II. As reações de fase I introduzem ou expõem um grupo funcional no composto parental, sendo principalmente reações de oxidação, redução e hidrólise. Nas reações de fase II ocorre a ligação covalente de um substrato endógeno, como o ácido glicurônico e a glutatona, com um grupo funcional no composto parental ou no metabólito de fase I. Esses conjugados são altamente polares e, em geral, inativos e excretados rapidamente.

Os sistemas enzimáticos envolvidos na biotransformação estão localizados principalmente no fígado, além de outros órgãos como rins, intestino e pulmões (Bucheli e Fent, 1995).

A maior parte das reações de fase I é catalisada pelas enzimas do citocromo P450, uma superfamília de proteínas que contém ferro ligado à cadeia polipeptídica das isoenzimas do citocromo P450 por forças hidrofóbicas e ligações eletrostáticas covalentes. Quatro valências do átomo de ferro ligante estão ligadas ao anel da porfirina, planarmente, a quinta está ligada ao grupo tiolato (S-) da cisteína da cadeia polipeptídica, por uma ligação coordenada e, a sexta, está orientada em direção ao sítio de ligação do oxigênio, durante a fase I da biotransformação (Nicareta, 2004). Essas enzimas estão localizadas no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias das células, principalmente do fígado.

As moléculas de citocromo P450 estão ligadas aos fosfolipídios da membrana e seu seu sítio ativo localiza-se próximo do citoplasma onde a uma parte contendo ferro está exposta para o lado citosólico da membrana e outra parte, com o sítio para a ligação do substrato, fica na face interna da membrana. Essa característica que permite o maior acesso das P450 aos substratos conferindo a habilidade de metabolizar uma variedade

de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (Bucheli e Fent, 1995, GOKSØYR; FÖRLIN, 1992).

As diferenças entre o sistema de monooxigenase de mamíferos e peixes consiste geralmente de baixa atividade da enzima, diferentes isoenzimas e a falta da indução por fenobarbital para peixes (Bucheli e Fent, 1995).

Muitas vezes as reações de fase I formam compostos ainda insolúveis e até mais tóxicos do que os compostos de origem. Por isso essas moléculas precisam continuar o processo de transformação através das enzimas de fase II.

As reações de fase II são catalisadas por diferentes enzimas, como glicuronosiltransferases (UGT), N-acetiltransferases (NAT), sulfotransferases (ST) e glutatona-S-transferases (GST) (Huggett et al.,1992).

As glutatona S-transferases (GST) são uma superfamília de enzimas diméricas, multifuncionais e solúveis. Sua função é catalisar a conjugação da glutatona a um eletrófilo reativo, uma reação de proteção contra o dano celular causado por estas substâncias. Ligando-se covalentemente a compostos eletrofílicos, GSTs reduzem a probabilidade desses compostos se ligarem a outras moléculas celulares, como o DNA (Huggett et al.,1992).

A metabolização dos xenobióticos pode ser alterada por fatores genéticos, ambientais e mórbidos, idade e sexo. A modulação das enzimas envolvidas na biotransformação pode resultar em inibição ou indução metabólica.

Os HPA's derivados de poluentes ambientais produzem acentuada indução da família de enzimas CYP1A através da ativação do receptor aril-hidrocarboneto (AhR) no citosol, que interage com a proteína AhR translocadora nuclear (Arnt). Esse complexo funciona como um fator de transcrição que modula positivamente a expressão de CYP1A. O aumento do conteúdo e/ou da atividade enzimática tem sido relatado em vários estudos sobre contaminação ambiental (Goksøyr e Förlin, 1992; Stegeman e Hahn, 1994; Bucheli e Fent, 1995).

Uma forma de medir a indução do CYP1A é pela atividade catalítica da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD), que tem sido reconhecida como biomarcador em várias espécies de peixes expostos a compostos xenobióticos, como compostos organoclorados e hidrocarbonetos poliaromáticos.

Os HPA's, bifenilas policloradas e organoclorados também podem induzir enzimas de fase II como a GST. Um aumento na atividade hepática da GST já foi reportado em vários estudos com peixes expostos à fração solúvel do óleo diesel ou ao

sedimento coletado em locais poluídos (Simonato et al., 2006). No entanto, também já foi descrita inibição metabólica em peixes devido à exposição à dibenzodioxinas policloradas, pesticidas e HPA's (Van Der Oost et al., 2003).

1.5.2 Sistema de defesa antioxidante

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios e é utilizada tanto na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos como na membrana celular de muitas bactérias e em inúmeras vias metabólicas fundamentais. Apesar da sua importância para o funcionamento dos organismos, seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A maioria do oxigênio molecular consumido pelos animais tem como destino a redução à água ligada à oxidação de alimentos e produção de energia. A redução parcial resulta na liberação de ERO's (espécies reativas de oxigênio).

O processo de biotransformação também é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO's), como o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Stegeman et al. 1992). As ERO's são potentes oxidantes capazes de reagir com macromoléculas celulares, causando efeitos deletérios que podem levar à morte celular.

Os organismos apresentam mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de defesa antioxidante. As enzimas-chave que fazem parte do sistema de defesa antioxidante são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), todas presentes nos tecidos de peixes (Lackner, 1998). Entre as defesas não enzimáticas estão a glutatona reduzida (GSH), ácido ascórbico, ácido úrico, vitaminas C, E, β - caroteno, polifenóis e bilirrubinas (Hermes-Lima et al., 1998; Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002). Quando ocorre aumento da produção de ERO's e/ou redução dos sistemas antioxidantes, caracteriza-se o estado de estresse oxidativo, causando inativação enzimática, peroxidação lipídica, danos ao DNA e até morte celular (Martínez-Álvarez et al., 2002; Cazenave et al., 2006).

A CAT exerce duas funções importantes: a decomposição de H_2O_2 à água e oxigênio e a oxidação de compostos hidrogenados como metanol, etanol, ácido fórmico, fenóis, com o consumo de um mol de peróxido (Aebi, 1984). A CAT é responsável por

reduzir o risco da formação do radical hidroxil a partir do H₂O₂ via reação de Fenton. Em caso de contaminação ambiental que aumente o estresse oxidativo, a catalase pode ser utilizada no monitoramento ambiental (Lehninger et. al., 1995).

1.6 UTILIZAÇÃO DE PEIXES DA ESPÉCIE *Genidens genidens* NOS ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS

Os peixes constituem um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental e são considerados como excelentes modelos biológicos de estudo, pois estão presentes em vários ambientes e apresentam ampla distribuição geográfica, além de participarem de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar.

Os bagres ocorrem nas zonas litorâneas tropicais e subtropicais, em ambientes marinhos, estuarinos e em águas interiores, sendo geralmente mais abundantes em águas costeiras pouco profundas, em fundo lodoso ou arenoso. Os bagres marinhos são muito abundantes nos estuários onde permanecem durante parte de seu ciclo de vida, nos primeiros anos (Araújo, 1988) e apresentam deslocamentos sazonais e relacionados às fases do ciclo de vida. A reprodução ocorre em diferentes épocas, mas principalmente relacionada aos meses mais quentes ou com maior aporte de águas interiores: do final da primavera ao início do verão (Schmidt et al, 2008).

Na área de estudo a espécie utilizada foi *Genidens genidens*, Cuvier, 1829, que pertence a ordem Siluriformes e família Ariidae (Figueiredo e Menezes, 1978). Os membros desta família são caracterizados por realizarem incubação orofaringeana, possuírem um corpo alongado e robusto, coberto por epiderme grossa e maxilas providas de pares de barbilhões. São mais ativos no período noturno. *G. genidens* é diferente de todos os outros bagres por possuir os dentes palatinos situados em duas protuberâncias carnosas, uma de cada lado do palato. Essa espécie também ocorre comumente na zona litorânea, em águas pouco profundas, com fundos arenosos ou lodosos e procuram a desembocadura dos rios e regiões lagunares no período de desova (Rocha et al, 2011).

O estuário do rio Macaé possui com frequência cardumes de bagres, visto que, o nome Macaé, segundo a linguagem indígena da região, significa “Rio dos Bagres,” disponibilizando, portanto, espécimes em número suficiente e com frequência para a realização dos estudos.

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo empregar marcadores bioquímicos em espécie de peixe *Genidens genidens* Cuvier, 1829 (Bagre) do estuário do rio Macaé visando a avaliação do grau de contaminação deste ecossistema por derivados de petróleo.

2.1. Objetivos específicos

- Quantificar sazonalmente a atividade de enzimas (EROD, GST, CAT) em fígado de *Genidens genidens* do estuário do rio Macaé.
- Detectar as concentrações de HPA's como compostos tóxicos dos derivados do petróleo na água do estuário do rio Macaé simultaneamente às determinações relatadas no item anterior.
- Relacionar aspectos como peso, comprimento e sexo visando avaliar a influência de características dos *Genidens genidens* na determinação das atividades.
- Quantificar a atividade das enzimas hepáticas (EROD, GST, CAT) em peixes da espécie *Genidens genidens*, como controle positivo, submetida a fração solúvel do óleo diesel (FSOD) com concentração de 20% em diferentes tempos 6, 24 e 72h, visando a comparação com as atividades enzimáticas dos peixes observadas no ambiente.
- Contribuir para o desenvolvimento e emprego de metodologias preditivas de danos ambientais do estuário do rio Macaé.
- Criar um banco de dados relativos às atividades enzimáticas da EROD, GST e CAT da espécie local estudada.

3. METODOLOGIA

3.1. AMOSTRAGEM E PREPARAÇÃO DAS FRAÇÕES HEPÁTICAS

Na porção inferior do estuário próximo a desembocadura (Figura 4) foram coletados durante sete eventos, em torno de 12 indivíduos de peixes da espécie *Genidens genidens* (Bagre) por coleta, que foram medidos, pesados e sacrificados por decapitação. As coletas foram realizadas utilizando linha e anzol. O fígado de cada indivíduo foi retirado e colocado imediatamente em gelo seco e posteriormente armazenados em freezer -80°C .



FIGURA 4: LOCAL DE COLETA DE PEIXES *Genidens genidens* NO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ.

As amostras de água para as análises do HPA's foram coletadas na superfície e fundo da coluna d'água (profundidade variando de 2,5 a 4,0 metros) no período de enchente, intermediário e vazante. As análises foram determinadas por cromatografia gasosa no laboratório INNOLAB do Brasil segundo a metodologia proposta pela EPA (EPA 8270 (D):2007 / EPA 3510 (C):1996) (Laudos em anexo).

Para preparar as frações, os fígados foram secos em papel de filtro e depois pesados. Em seguida, foram homogeneizados separadamente em solução tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo sacarose 0,25 M na proporção 1 g de fígado para 4

mL de tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 4°C três vezes para a preparação das diferentes frações correspondentes às enzimas: catalase (CAT), Glutathione S-Transferase (GST) e 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD). A primeira centrifugação foi realizada a 800 x g por 6 min, onde o sobrenadante foi retirado e reservado a metade em tubos de plástico tipo eppendorff para a análise da CAT e a outra metade foi para uma segunda centrifugação. O depósito da primeira centrifugação foi descartado. A segunda centrifugação foi realizada a 20.000 x g por 33 min onde o sobrenadante obtido foi novamente centrifugado a 105.000 x g por 90 min. O depósito da terceira centrifugação é a fração microsomal (utilizada para a análise da EROD) que foi ressuspendido no mesmo tampão usado para homogeneizar os fígados, na proporção 1 g de fígado para 1 mL de tampão. Os microsomos foram, então, armazenados em tubos de plástico tipo eppendorffs a -70 °C. A fração solúvel dessa terceira centrifugação (fração citosólica) foi também armazenada a -70 para a análise da GST.

3.2 DETERMINAÇÕES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.2.1 Atividade da Catalase (CAT)

A alta velocidade de reação desta enzima, associada a uma baixa “afinidade”, permite a determinação de sua atividade com concentrações elevadas de H₂O₂ (10 mM). A atividade foi determinada pela velocidade de consumo do H₂O₂ no primeiro minuto da reação, a 240nm (Aebi, 1984). O ensaio enzimático de 60 segundos é realizado em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0; EDTA 1 mM. Como substrato iniciador utiliza-se 8,8M de H₂O₂. A absorbância basal é descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra, sendo o coeficiente de extinção molar 0,2. As análises foram realizadas em duplicata.

3.2.2 Atividade da Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi mensurada através do aumento da absorbância resultante da formação de um tioéter pelos substratos GSH (molécula endobiótica) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, substrato sintético não específico utilizado para determinar

praticamente todas as isoformas de GST já identificadas em mamíferos) (Filipak Neto, 2007). Para tanto, o sobrenadante resultante da centrifugação foi diluído 5% em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,8. Para as análises foram utilizadas a solução reação CDNB 2,5 mM, GSH 2 mM em tampão fosfato 0,1 M pH 6,8 (preparado imediatamente antes da leitura) e o tampão fosfato 0,1 M pH 6,5. A atividade da GST foi feita em duplicata, nos primeiros 3 minutos de reação a 340nm sendo descontada a reação entre a GSH e o CDNB sem a presença da amostra onde o coeficiente de extinção molar é 0,5.

3.2.3 Atividade etoxiresorufina-O-desetilase (EROD)

A atividade de EROD foi mensurada em microsomos de células hepáticas dos peixes pelo método de Burke e colaboradores (1985) modificado. O método se baseia na desetilização da 7-etoxiresorufina, reação catalisada por CYP na presença de NADPH, produzindo 7-hidroxiresorufina, que emite fluorescência de 582nm quando excitada com luz de comprimento de onda de 550nm. Foi utilizado neste ensaio então, NADPH 25 mM, tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,8, resorufina a 100 µM e etoxiresorufina a 1 mM, MgCl₂ 1 M.

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados teciduais foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando solução de soro albumina bovina como padrão. Esse método baseia-se na mudança de coloração do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, que passa do vermelho ao azul ao ligar-se a proteínas. As dosagens foram realizadas em duplicatas utilizando um espectrofotômetro em 592nm.

3.3 ENSAIO EM LABORATÓRIO UTILIZANDO A FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL (FSOD)

A escolha de se realizar o ensaio com FSOD está relacionada à presença constante deste derivado de petróleo nas águas do estuário do rio Macaé devido à emissão por embarcações. A toxicidade do petróleo varia de acordo com sua composição. Dentre os derivados do petróleo, o óleo diesel merece uma atenção por ser continuamente lançado nos ambientes costeiros pelas embarcações. O óleo diesel é

composto basicamente por hidrocarbonetos alifáticos e uma pequena porcentagem de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Mattos, 2010). No entanto, como um grupo químico, hidrocarbonetos aromáticos são geralmente mais tóxicos que outros hidrocarbonetos (Connell, 1997) e estão ligados a processos carcinogênicos. Isto porque as cadeias aromáticas desencadeiam processos de biotransformação; ou seja, a tentativa do organismo de processar e eliminar esses compostos que geram radicais livres que podem atacar moléculas orgânicas como o DNA.

No mês de setembro de 2012 foi realizada uma coleta de 48 peixes no estuário do Rio Macaé para a realização dos ensaios em laboratório de exposição à fração solúvel de óleo diesel (FSOD). Os peixes coletados foram transportados para o biotério aquático em tanques com aerador. No biotério foram preparados 4 aquários, 2 para os controles e 2 para os expostos à fração solúvel do óleo diesel. Em cada um foram colocados 100L de água previamente filtrada por 20 minutos, passadas por luz ultravioleta e reservadas por 12 horas para a neutralização do cloro. Cada aquário possuía um filtro referente à capacidade de água existente nele e um aerador. No biotério os peixes foram transferidos para os aquários, 10 indivíduos em cada. Os peixes foram aclimatados por 15 dias, sendo a água do aquário trocada e os bagres alimentados com camarão a cada dois dias.



FIGURA 5: FOTO DOS AQUÁRIOS COM PEIXES *Genidens genidens* PARA O ENSAIO COM FSOD

Amostras de óleo diesel foram obtidas em postos de combustíveis. A Fração Solúvel do óleo diesel (FSOD) foi obtida conforme metodologia descrita por Singer et al. (2000) e a metodologia de derrame de combustível proposta por Nicodem et al. (1998) modificada. Em dois aquários de vidro com capacidade para 30 litros cada, foi preparada uma solução óleo diesel/água filtrada na proporção de 1:9. Essa mistura foi mantida por 24 horas, sendo as 12 horas iniciais homogeneizada com bastão de vidro a cada duas horas e expostas a fotodegradação pela insolação com radiação solar direta simulando às condições observadas no estuário. Nas 12 horas seguintes, a mistura permaneceu em repouso e ao abrigo da luz. A FSOD foi separada e diluída até 20% e assim utilizada nos testes de exposição.



FIGURA 6: PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DE ÓLEO DIESEL

Em dois aquários com 10 peixes em cada, os peixes foram expostos à fração solúvel do óleo diesel diluída 20%. Um grupo controle também foi utilizado, no qual os animais foram expostos somente à água filtrada. Durante o período de exposição eles não foram alimentados e a água dos aquários não foi trocada. Os peixes foram coletados com 6h, 24h e 72h de exposição, sendo três de cada aquário por período exposto.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS

Todos os resultados de atividade enzimática foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para comparação da variação mensal das atividades enzimáticas foi utilizada a análise de variância one-way ANOVA seguida do post test Newman-Keuls. Nos ensaios laboratoriais, para comparação das atividades enzimáticas nos diferentes tempos com seus respectivos controles, foi utilizado one-way ANOVA seguido do post test Bonferroni. A correlação entre a atividade enzimática e o peso, tamanho e sexo foi feita utilizando o teste de correlação de Pearson. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad prism versão 5.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE QUANTITATIVA DE HPA'S EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ

As amostras de água foram coletadas em três eventos (Setembro 2011, Abril de 2012, Agosto de 2012) na superfície e fundo da coluna d'água em diferentes regimes de maré para a determinação da concentração de HPA's. Os resultados indicaram concentrações detectadas somente na primeira e segunda amostragem, sendo a terceira apresentando concentrações abaixo do limite de detecção do método ($0,01\mu\text{g/L}$) (Laudos em anexo).

Na coleta de Setembro de 2011 foram encontradas concentrações apenas de Naftaleno no fundo da coluna d'água na maré baixa ($0,05\mu\text{g/L}$); na água de superfície de meia maré ($0,04\mu\text{g/L}$); na água de superfície ($0,1\mu\text{g/L}$) e na água de fundo na maré cheia ($0,12\mu\text{g/L}$). Na coleta de Abril de 2012 foi encontrado somente Fenantreno no fundo da coluna d'água na maré cheia ($0,02\mu\text{g/L}$).

Os valores de HPA's no Estuário do Rio Macaé sugerem um ambiente pouco impactado por fontes desse contaminante. Porém as concentrações totais máximas ($0,12\mu\text{g/L}$) podem ser observadas em ambientes aquáticos impactados por derivados de petróleo, como a Baía de Guanabara (RJ) ($0,12$ a $1,75\mu\text{g/L}$) (Meniconi et al., 2002). A variabilidade de concentrações durante o período amostral pode ser fruto da condição hidrodinâmica inerente de um estuário que pode efetivamente diluir e remover os derivados de petróleo, e das características de uma importante fonte de emissão de derivados de petróleo no estuário, representadas pelas embarcações que esvaziam combustíveis, como óleo diesel, do motor diretamente no estuário em eventos esporádicos e de difícil detecção e previsibilidade.

O trabalho de Molisani et al. (2013b) determinou as concentrações de HPA's em sedimentos do estuário do rio Macaé visando relacionar estes compostos com a indução de toxicidade em anfípodos incubados com estes sedimentos. As concentrações totais desses compostos variaram entre valores abaixo do limite de detecção e $70\mu\text{g/kg}$, com a presença de espécies como Fenantreno, Fluoranteno, Pireno, Criseno, Benzo(b), fluoranteno e Benzo(a)pireno. Essas concentrações podem ser consideradas como típicas de ambientes não contaminados, embora comparados com um trabalho de

Taniguchi (2001) realizado no mesmo local, as concentrações atuais indicam um aumento de HPA's nos sedimentos do estuário do rio Macaé. Como já discutido anteriormente, os HPA's petrogênicos são constituídos predominantemente por 2 e 3 anéis aromáticos, enquanto que o de mais de 3 anéis podem estar relacionados a formas pirolíticas (MEIRE et al, 2007). Os HPA's nas águas do estuário do rio Macaé como naftaleno e fenantreno podem sugerir a ocorrência de fontes como o vazamento de derivados de petróleo.

4.2. ANÁLISE DAS VARIAÇÕES MENSAS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Os peixes foram coletados no estuário do rio Macaé, em sete eventos, visando avaliar a variação temporal das atividades enzimáticas de GST, CAT e EROD nos fígados dos peixes. Em cada amostragem foram coletados de 10 a 12 indivíduos da espécie *Genidens genidens*.

Os resultados apresentados na Figura 7 mostram a variabilidade das atividades das enzimas analisadas durante o período amostral. A atividade da GST variou de 1,43 a 6,79 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgp}^{-1}$ entre todos os indivíduos analisados. No mês de junho e julho de 2012 foram observadas atividades enzimáticas de GST significativamente superiores ($P<0,05$) aos outros meses amostrados (Figura 7A). A atividade da CAT variou de 8,53 a 109 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgp}^{-1}$ durante o período amostral. Nos meses de maio e junho de 2012 foram observadas atividades enzimáticas de CAT significativamente superiores ($P<0,05$) àquelas dos outros meses amostrados (Figura 7B). A atividade da EROD variou de 1,14 a 167,20 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgp}^{-1}$ entre todos os indivíduos analisados. A atividade enzimática de EROD foi significativamente superior nos meses de setembro de 2011 e abril de 2012 ($P<0,05$) (Figura 7C).

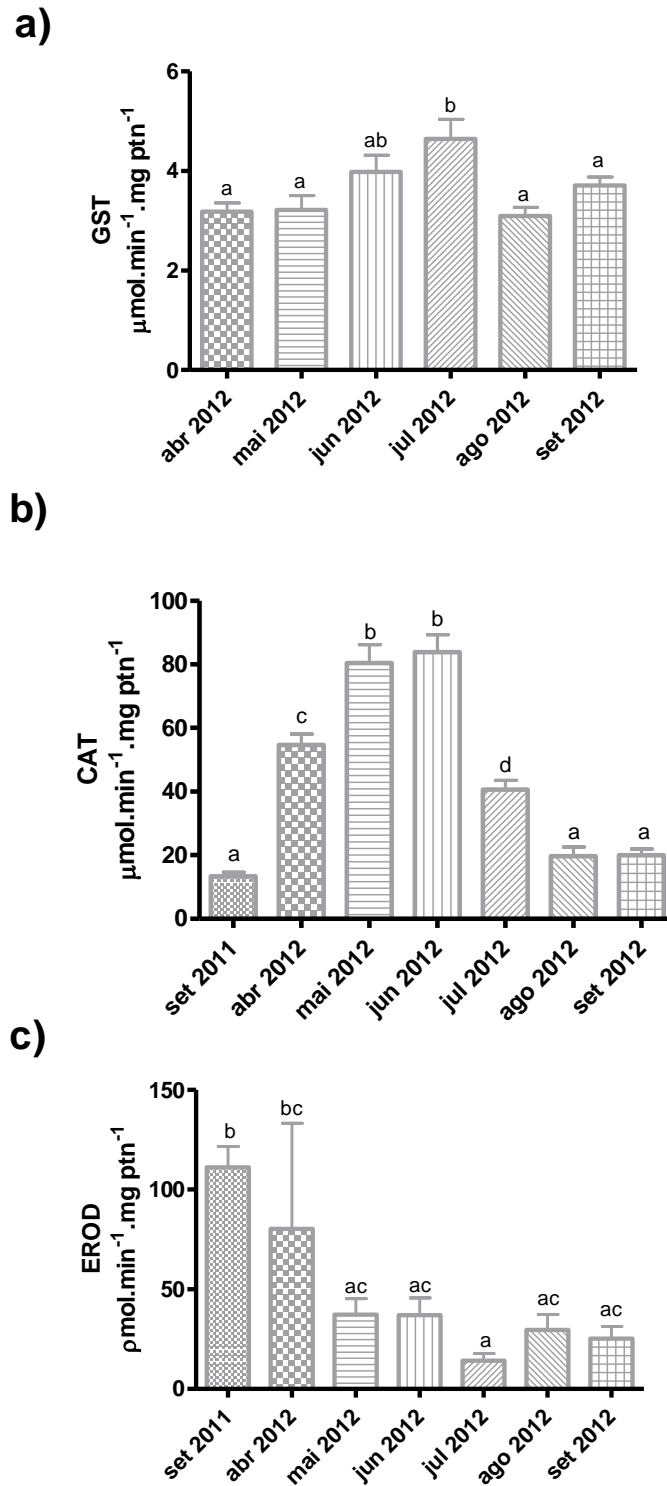


FIGURA 7: VARIAÇÃO TEMPORAL DAS ATIVIDADES DE GST (A), CATALASE (B) E EROD (C) EM MICROSSOMOS HEPÁTICOS DE *Genidens genidens* COLETADOS NO ESTUÁRIO DO RIO MACAÉ. OS VALORES ESTÃO REPRESENTADOS COM MÉDIA \pm EPM. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS MÉDIAS

As variabilidades sazonais de atividades enzimáticas em peixes são descritas na literatura. Os dados de Azevedo et al. (2012) mostram variações sazonais nas atividades de enzimas da CYP450 no bagre *Cathorops spixii* em ambientes estuarinos do litoral paulista com histórico de contaminação por derivados de petróleo. Estes resultados podem estar associados à influência da contaminação orgânica, principalmente nos meses de chuvas onde o carreamento de material continental podem aumentar a entrada de derivados de petróleo nos estuários ou em alguns casos pode-se observar a diluição destes contaminantes pelas chuvas reduzindo a atividade da CYP450 nos peixes.

O trabalho de Pedrosa et al. (2001) da mesma forma demonstra a sazonalidade da atividade de enzimas como a EROD e GST em *Genidens genidens* no estuário do rio Itagaí-Açu (SC), com maiores valores observados no período do inverno e secundariamente, no outono. Essa sazonalidade pode ser explicada principalmente por fatores hormonais, pluviosidade, temperatura da água, maior contaminação sazonal, entre outros fatores.

As maiores atividades de CAT e GST nos bagres do estuário do rio Macaé no período de seca (Junho e Julho de 2102) podem sugerir a influência de contaminação por derivados de petróleo devido à diminuição do fluxo fluvial e da redução na capacidade de diluição e dispersão (aumento no tempo de residência) de materiais no estuário, embora não se possa descartar a influência de outros fatores ambientais e fisiológicos na sazonalidade das atividades enzimáticas. O aumento da atividade da catalase nesses meses demonstrou estresse oxidativo que foi seguido pela indução da atividade da GST. Segundo Hayes et al (2005), algumas classes de GSTs, como a α e μ , tem sido induzidas por estresse oxidativo, corroborando os resultados encontrados.

Segundo Morel e Barouki (1998), as espécies reativas de oxigênio produzem um efeito inibitório na expressão das CYPs, o que explica a baixa atividade da EROD nos meses onde a CAT e a GST apresentaram uma maior indução, indicando novamente estresse oxidativo. Já os maiores valores de EROD reportados para o mês de setembro de 2011 coincidem com as maiores concentrações de HPA's medidas nas águas do estuário do rio Macaé, sugerindo influência da contaminação dos derivados de petróleo nas atividades desta enzima.

Como demonstrado também por Pedrosa et al. (2001), a menor sazonalidade da GST em relação a CAT e EROD no presente estudo, indica uma menor susceptibilidade desta enzima ao efeito sazonalidade, embora fatores como síntese hormonal, variações

na concentração de oxigênio dissolvido na água e hábitos alimentares possam determinar sua atividade (Paula et al., 2008; Bastos, 2013).

Como descrito na literatura, a sazonalidade das atividades enzimáticas podem ser relacionadas a fatores ambientais e as características fisiológicas dos peixes analisados. Visando avaliar se características dos peixes podem estar influenciando a atividade enzimática, foi realizada uma análise de correlação entre aspectos biométricos (comprimento e peso) e sexo com as atividades enzimáticas dos peixes.

O peso dos indivíduos coletados variou de 35,5 a 277 g, enquanto o comprimento de 13,5 a 31 cm (n=80). As Figuras 8 e 9 mostram a correlação entre as variáveis. Estes resultados mostram uma correlação significativa somente entre a atividade da CAT e os fatores biométricos analisados ($P < 0,0001$), onde a atividade da CAT diminui com o aumento do peso e do comprimento dos peixes. Durante a fase de seu crescimento, assim como qualquer organismo, há um grande gasto energético, sendo necessário maior consumo de alimentos e conseqüentemente possíveis contaminantes que induzam a maior formação de radicais livres e maior atuação da enzima CAT.

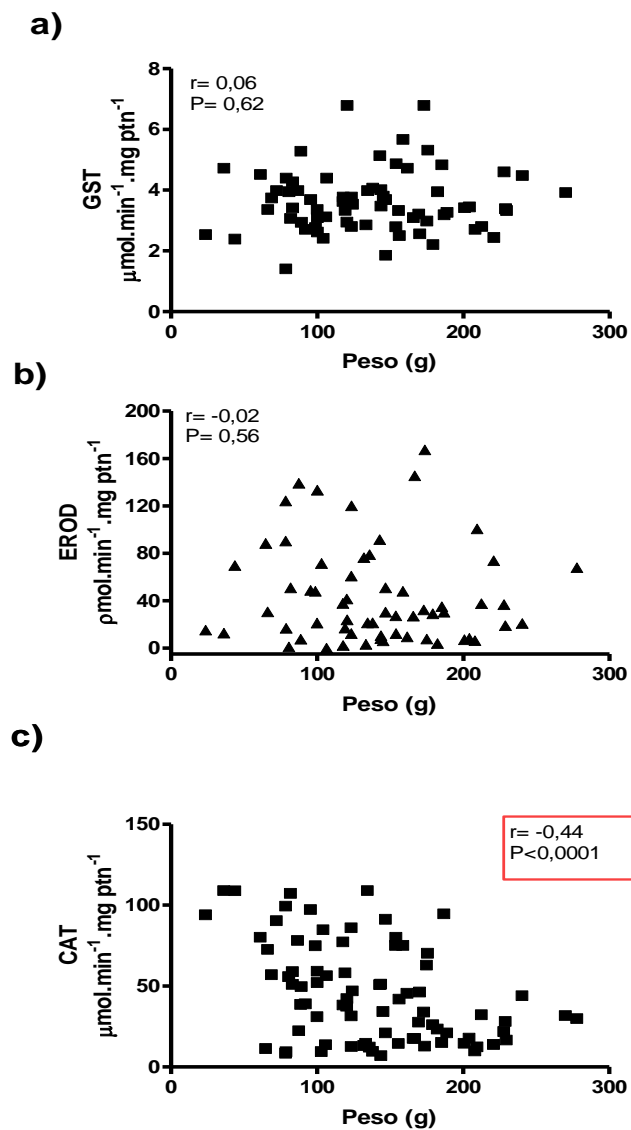
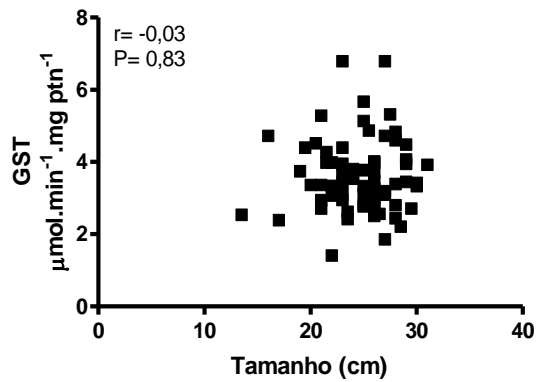
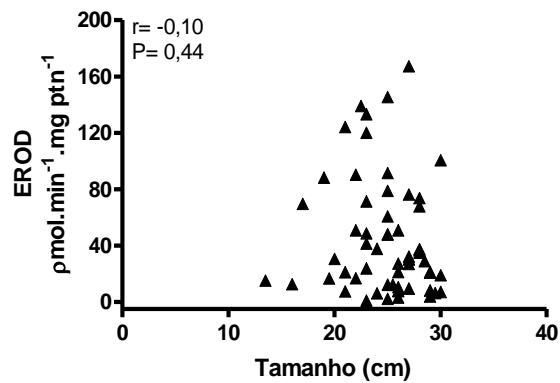


FIGURA 8: CORRELAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES DA GST (A), EROD (B) E CAT (C) EM MICROSSOMOS HEPÁTICOS DE *Genidens genidens* E O PESO DOS INDIVÍDUOS

a)



b)



c)

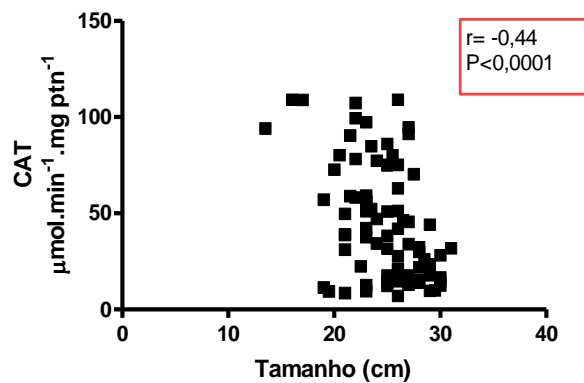


FIGURA 9: CORRELAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES DA GST (A), EROD (B) E CAT (C) EM MICROSSOMOS HEPÁTICOS DE *Genidens genidens* E O TAMANHO DOS INDIVÍDUOS

A figura 10 mostra a correlação entre as atividades enzimáticas e o gênero dos indivíduos que foram identificados visualmente através das gônadas classificando entre machos, fêmeas e imaturos. Segundo esta análise, não foram observadas correlações

significativas entre estes parâmetros ($P > 0.05$). O trabalho de Pedrosa et al. (2001) com bagres (*Genidens genidens*) no estuário do rio Itagaí-Açu (SC) não observou diferenças significativas entre a atividade de EROD e GST entre machos e fêmeas. Esses dados foram em desacordo com o trabalhos de Goksoyr e Forlin (1992) que observaram uma maior atividade da EROD nos machos em relação às fêmeas de peixes em ambientes de clima frio. Em relação a expressão de GST, os dados da literatura indicam não haver diferenças com relação ao sexo (Fitzpatrick et al., 1997).

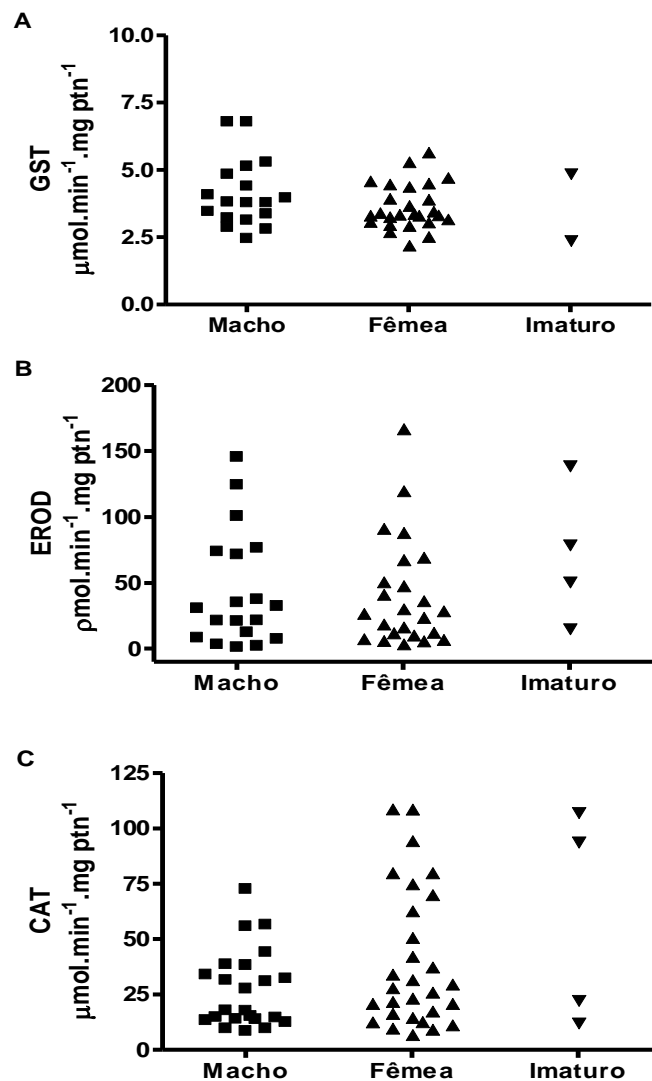


FIGURA 10: CORRELAÇÃO DA ATIVIDADE DA GST (A), EROD (B) E CAT (C) EM MICROSSOMOS HEPÁTICOS DE *Genidens genidens* E O SEXO DOS INDIVÍDUOS

As correlações entre atividades das enzimas e aspectos biométricos e de gênero indicam que os valores sazonais de CAT possam ter influência de aspectos fisiológicos dos peixes, enquanto que a EROD e GST possam estar sendo influenciados por outros fatores incluindo os ambientais. Embora a análise seja limitada a poucos fatores fisiológicos, dados da literatura indicam que outros fatores relativos aos organismos determinam as atividades enzimáticas de peixes. Deve-se ressaltar que o CYP450 está envolvido na síntese de hormônios e outros esteroides, o que pode resultar no direcionamento deste sistema enzimático nos períodos reprodutivos ou de preparação para a reprodução da espécie que ocorrem durante a primavera e verão (Lopes et al., 1997).

Os peixes do estuário do rio Macaé foram utilizados em um experimento, onde foram expostos a FSOD visando avaliar qual o efeito desse derivado do petróleo, usualmente observado no estuário, nas atividades das enzimas estudadas em diferentes períodos de tempo. A Figura 11 mostra os resultados dos grupos controle e expostos à FSOD. Entre as enzimas estudadas foram observadas somente atividades estatisticamente superiores ($P < 0,05$) no grupo de peixes exposto a FSOD comparados ao controle para EROD depois de 24 horas de exposição. Essa resposta bioquímica da EROD foi observada em fígados de *Poecilia vivipara* exposta a FSOD de concentração de 20% por 96h (Mattos, 2010). Como já descritos em outros estudos, o aumento na atividade EROD possivelmente está relacionado com a modulação transcricional do gene CYP1A pelo receptor AhR (Timme-Laragy et al., 2007) e pode indicar uma maior capacidade de biotransformação das células contra os HPA's presentes no tecido dos peixes expostos à FSOD, uma vez que esses compostos são potenciais substratos dessas enzimas.

Para GST e CAT em todos os tempos de exposição não foram observadas diferenças estatísticas sendo consideradas iguais as atividades de GST e CAT dos peixes expostos a FSOD e os não expostos. Os dados de Oliveira et al. (2008) mostram que espécies de tainha expostas a fenantreno (0,1 a 2,7 μM) não apresentavam indução de atividades de GST e CAT quando comparadas ao grupo controle. Os experimentos de Mattos (2010) mostraram alterações significativas na atividade enzimática de GST em *P. vivipara* expostas a FSOD (20%) por 96h, mas não observou o mesmo para CAT. No estudo realizado com robalos expostos ao petróleo bruto (Kerambrun et. al., 2012), não foi verificado uma diferença na atividade da Catalase. Para a espécie curimbá

exposta à fração solúvel de óleo diesel para 24 e 96 horas também não houve diferença na atividade da catalase (Simonato et al., 2008).

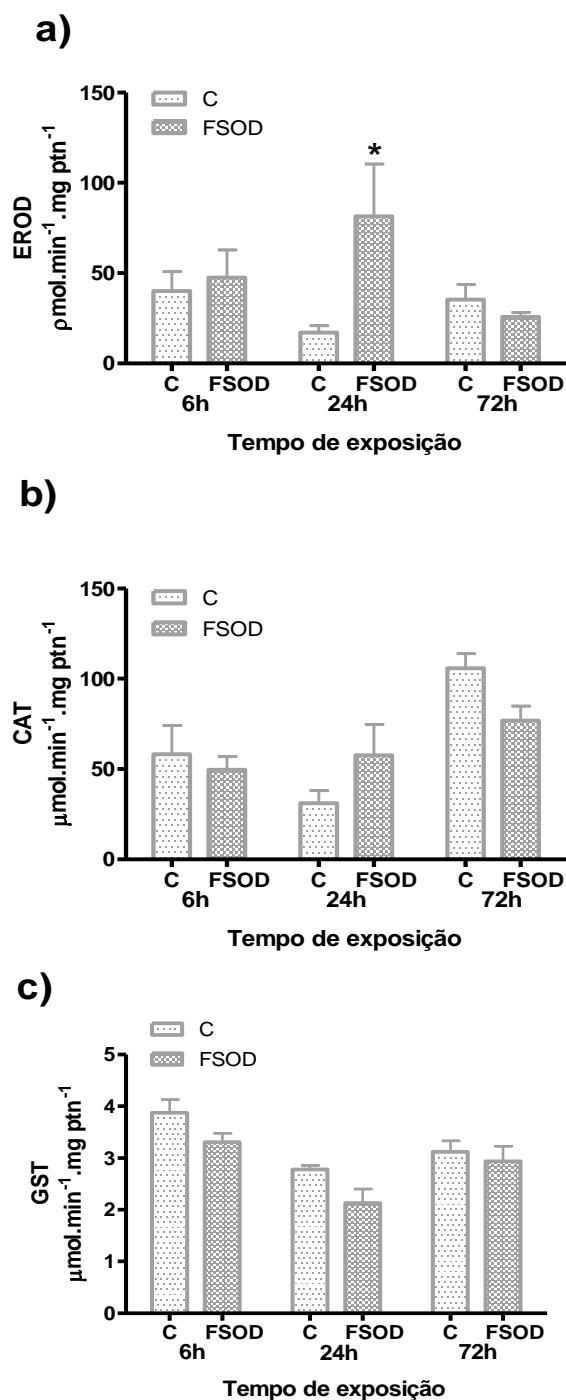


FIGURA 11: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO DA ATIVIDADE DE EROD (A), CAT (B) E GST (C) EM MICROSSOMOS HEPÁTICO DE *Genidens Genidens* EXPOSTOS À FRAÇÃO SOLÚVEL DE ÓLEO DIESEL (FSOD 20%) EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (6h, 24h, 72h) E EM PEIXES NÃO EXPOSTOS (CONTROLE). * VALORES ESTATISTICAMENTE DIFERENTES

Enzimas antioxidantes são geralmente menos sensíveis aos poluentes do que as enzimas de fase I e II de biotransformação. No entanto, o fato da atividade da catalase não ter sido induzida não exclui a possibilidade de formação de ERO'S, pois em certos estudos peróxidos são metabolizados por enzimas como glutathione peroxidase e raramente pela CAT (Van Der Oost et al., 2003). Mattos (2010) também mostra o mesmo padrão de similaridade de atividade de CAT na espécie estuarina como *P. vivipara* expostos e não expostos a FSOD. Segundo esse autor, as diferenças observadas na literatura estão associadas a experimentos utilizando espécies dulcícolas e diferentes concentrações de FSOD que induzem a ativação de CAT em relação ao grupo controle.

Comparando as atividades dos peixes coletados no estuário do rio Macaé e os utilizados nos ensaios podemos observar que os valores induzidos em laboratório para todas as enzimas também foram detectados no ambiente. Os ensaios mostraram que não foram observadas induções significativas de CAT e GST pela FSOD e as atividades similares nos peixes do estuário sugerem duas hipóteses mutualmente não excludentes: 1) ausência de contaminação por derivados de petróleo podem indicar ausência de contaminação por derivados de petróleo, 2) que essas enzimas não sejam bons marcadores de contaminação.

Porém, os resultados de campo também podem mostrar a influência de outros fatores ambientais e fisiológicos dos peixes. Um dos maiores problemas de estudos realizados em campo é avaliar os efeitos causados por uma combinação de substâncias sobre a biota de uma área impactada, pois os organismos são expostos a uma complexa mistura de poluentes dificultando a avaliação dos resultados observados nos animais (Walker, 1996). Até mesmo para os derivados de petróleo, este estudo observou que as concentrações de HPA's na água podem ser variáveis devido, por exemplo, a ação de fontes como o lançamento crônico de pequenos volumes de óleo diesel das embarcações no estuário do rio Macaé. A literatura carece de informações a respeito dos efeitos biológicos da fração do óleo diesel acomodada em água em espécies nativas nos ambientes estuarino e marinho (Mattos, 2010). Tendo em vista o potencial do óleo diesel em causar danos ao ambiente aquático e a necessidade de estudos com organismos nativos, é imprescindível o desenvolvimento de metodologias que possibilitem a avaliação e previsão dos efeitos biológicos nos organismos aquáticos expostos ao óleo diesel e outros derivados do petróleo.

Por outro lado, os ensaios revelaram a indução de atividade da EROD em 24h nos peixes expostos a FSOD, sendo que esses valores de atividade foram observados

nos peixes do estuário indicando que eles possam estar sob efeito de stress químico por derivados de petróleo. Diversos estudos têm mostrado que os HAP's que possuem massa molecular elevada, como os de 4 a 6 anéis, são os indutores mais potentes da atividade da EROD (Gonzalez-Doncel et al., 2008). No entanto, o óleo bruto que foi utilizado em nosso estudo, é composto principalmente de HPA's de baixo peso molecular, o que sugere uma capacidade de aumentar a atividade da EROD.

Vários estudos têm mostrado indução da atividade da EROD em locais contaminados por HPA's sugerindo que essa enzima possa ser utilizada como biomarcador adequado para detectar exposição de derivados de petróleo. Os estudo de Pedrosa et al. (2001) que determinou as atividades enzimáticas de EROD e GST em bagres da mesma espécie coletados no estuário do rio Itajaí-Açu (SC) observaram valores de GST ($1,5$ a $3,0 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgptn}^{-1}$) semelhantes aos valores mínimos encontrados no estuário do rio Macaé, enquanto que os valores de EROD ($2,5$ a $23 \text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgptn}^{-1}$) foram menores que os do presente estudo. Outro estudo de Pedrosa et al. (2001) analisando três locais distintos no litoral de Santa Catarina (Baía Sul da Ilha de Santa Catarina como referência de local pouco impactado por fontes antrópicas; Baía Norte da Ilha de Santa Catarina e a Foz do Rio Itajaí Açu como locais impactados) mostrou que para a EROD as atividades aumentam de acordo com a intensidade de impacto do local ($30 \text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgptn}^{-1}$ para a Baía Sul; $50 \text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgptn}^{-1}$ e $110 \text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgptn}^{-1}$ para o Itajaí Açu e Baía Norte respectivamente. Para a GST houve uma inibição na atividade nos locais impactados (23 e $26 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgptn}^{-1}$ para Itajaí Açu e Baía Norte respectivamente. Para a Baía Sul o valor de atividade da GST encontrado foi de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgptn}^{-1}$. Para a Catalase parece ter havido também uma inibição de sua atividade nos locais mais impactados, $0,15$ para Itajaí Açu e Baía Norte e $0,2$ para a Baía Sul.

Sendo assim, acreditamos que há evidências que demonstram um início de contaminação no estuário do rio Macaé. Essas evidências foram apontadas ao longo desse trabalho como, por exemplo, a detecção de concentrações de HPA's na água similares a encontradas em ambientes impactados como a Baía de Guanabara (RJ) (Meniconi et al., 2002); o aumento nos últimos dez anos das concentrações de HPA's no sedimento do estuário do rio Macaé, incluindo HPA's com potencial carcinogênico (Costa, 2010; Taniguchi, 2001; Who, 1983), podendo estas concentrações de HPA's nos sedimentos de fundo tornarem-se disponíveis a uma espécie de peixe tipicamente bentônica como o bagre; a maior presença de HPA's na água do estuário quando a

atividade da EROD foi mais alta; períodos nos quais a atividade da EROD nos *Genidens genidens* do estuário do rio Macaé foi similar à atividade de EROD induzida nos peixes expostos a FSOD nos aquários; atividades da EROD dos peixes do estuário similares a mesma espécie de bagre de estuários impactados de Santa Catarina e a variabilidade sazonal de CAT nos peixes do estuário sugerindo stress oxidativo.

5. CONCLUSÃO

- Os valores totais de HPA's encontrados na água do estuário do Rio Macaé são típicos de áreas não contaminadas, embora em algumas ocasiões possam ser similares a ambientes que sofrem impactos por derivados de petróleo. A variabilidade de concentrações durante o período amostral pode resultar da condição hidrodinâmica do estuário (alta diluição e baixo tempo de residência das águas) e da característica de emissão da principal fonte (barcos) que indica uma condição de contaminação episódica.
- A variação sazonal das atividades enzimáticas nos peixes indicou eventos de maior atividades da GST, CAT e EROD durante o período de estiagem e menor fluxo fluvial no estuário. As maiores variações foram observadas para a CAT e EROD podendo sugerir a influência de contaminação por derivados de petróleo e outros contaminantes devido a diminuição do fluxo fluvial e da redução da capacidade de diluição e dispersão de materiais no estuário, embora não se possa descartar a influência de outros fatores ambientais e fisiológicos na sazonalidade das atividades enzimáticas.
- As correlações realizadas entre as atividades enzimáticas e os aspectos biométricos e de gênero dos peixes indicaram que as atividades da catalase tem relação negativa somente com o peso e o tamanho dos indivíduos, embora não se possa inferir uma relação causal, outros fatores intrínsecos dos peixes podem influenciar as atividades das enzimas e a interpretação dos dados.
- Os ensaios mostraram que não foram observadas induções significativas de CAT e GST pela FSOD e as atividades similares nos peixes do estuário podem indicar ou ausência de contaminação ou estas enzimas não sejam marcadores adequados de contaminação por derivados de petróleo.
- Para a EROD foi observado uma indução da atividade no tempo de 24h de exposição sendo estas atividades similares às atividades nos peixes coletados no estuário durante alguns eventos, sugerindo que estes peixes possam refletir stress químico por derivados de petróleo no estuário do Rio Macaé. Esta enzima se mostrou um bom biomarcador à exposição deste contaminante na espécie *Genidens genidens*.

- Os valores das atividades das enzimas estudadas no *Genidens genidens* representam o início da construção de um banco de dados ecotoxicológicos dessa espécie no estuário do rio Macaé.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymol.*, v. 105, p. 121-126, 1984.

AÏACHE, J. M., DEVISSAGUET, S., GUYOT-HERMANN, A. M. *Biofarmácia. El Manual Moderno*, México, 1983.

ARAÚJO, F.G. Distribuição, abundância relativa e movimentos sazonais de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) no estuário da lagoa dos Patos (RS), Brasil. *Rev. Bras. Zool.*, v. 5(4), p. 509-543, 1988.

AZEVEDO, J. S., LOPES, B., KATSUMITI, A., BRAGA, E. S., ROCHE, H., RIBEIRO, C. A. O., BEBIANNO, M. J. Evidence of contamination by oil and oil products in the Santos-São Vicente estuary, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 60(2), p. 117-126, 2012.

BELMEJO, L.; MARTOS, H. L. Utilização de *Xiphophorus helleri* como bioindicador de poluição hídrica de derivados de petróleo em condições tropicais. *Revista Eletrônica de Biologia*, v. 1, n. 2, p. 1-17, 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid e sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, B., Hespanhol, I., Conejo, J. G. L., *Introdução à engenharia ambiental*. 2.ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005. 336p.

BUCELLI, T. D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 25, p. 201-268, 1995.

BURKE, M.D., THOMPSON, S., ELCOMBE, C.R., HALPERT, J., HAAPARANTA, T., MAYER, R.T. Ethoxy-, penthoxy-, and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P450. *Biochemical Pharmacology*. v. 34, p. 3337-3345, 1985.

CALLISTO, M., GONCALVES, J. A vida nas águas das montanhas. *Ciência Hoje*. v. 31(182), p. 68 – 71, 2002.

CAZENAVE, J., BISTONI, M.L.A., PESCE, S.F., WUNDERLIN, D.A. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat. Toxicol.* v. 76, p. 1-12, 2006.

CONNELL, D. W. *Basic concepts of environmental chemistry*. New York: Lewis Publishers. 1997. 506p.

COSTA, R. N. Ecotoxicologia como ferramenta para análise da qualidade ambiental do estuário do Rio Macaé. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, Macaé. 2010.

CROSSLAND, C.L. at al. The Coastal Zone - A Domain of Global Interactions , in: CROSSLAND, C.L. at al. Costal Fluxes in the Anthropocene: The Land-Ocean Interactions in the Coastal Zone Project of the International Geosphere-Biosphere Programme. Springer, NY. 2005.

EPA. Environmental Protection Agency USA - Standard US EPA Classification : Carcinogenic Classification. 1986.

FIGUEIREDO, J. L. & MENEZES, N. A. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. II Teleostei (1). São Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo. 110p, 1978

FILHO, A.M.S. Planos Nacionais de Contingencia para Atendimento a Derramamento de Óleo: Analse de Países Representativos das Américas para Implantação no Caso do Brasil. 2006. 217 f. Dissertacao (Mestrado em Ciências em Planejamento Ambiental) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

FILIPAK NETO, F. Avaliação citotóxica em hepatócitos de *Holipias malbaricus* expostos a misturas complexas de pesticidas, MeHg e DDT. 2007. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná. 2007.

FITZPATRICK, PJ, et. al. Assessment of glutathione S-transferase and related proteins in the gills and digestive glands of *Mytilus edulis* (L.) as potential organic pollution biomarkers. Biomarkers, p. 51-56 (2), 1997.

FROEHNER, S., MARTINS E., FERNANDES R. Avaliação do destino e bioacumulação de benzo(a)pireno através de simulação computacional. Quim. Nova, v. 31, n. 5, p. 1089-1093, 2008.

GONZALEZ-DONCEL, M., GONZALEZ, L., FERNANDEZ-TORIJA, C., NAVAS, J.M., TARAZONA, V. Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). Aquat.Toxicol. v. 87, p. 280–288. 2008.

GOKSÖYR, A.; FÖRLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. Aquatic Toxicology, v. 22, p. 287, 1992.

HAYES J.D., FLANAGAN, J. U., JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2005;45:51-88.

HERMES-LIMA, M. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snail. Comp. Biochem. Physiol. 120B: p. 437-448, 1998.

HERMES-LIMA, M., ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C: p. 537-556, 2002.

HUGGETT, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE Jr., P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- Cidades – Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidadesat>. Acesso em 20/ 11/2012.

JESUS, T.B., CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecol. Bras.*, v. 12 (4), p. 680-693, 2008.

KERAMBRUN, E., LE FLOCH S., SANCHEZ W., GUYON T. H., MEZIANE T., HENRY F., AMARA R. Responses of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to acute concentrations of crude oil, as assessed by molecular and physiological biomarkers. *Chemosphere*, v. 87, p. 692–702, 2012.

KJERFVE, B. 1994. Coastal Lagoon Processes. Elsevier Oceanography Series. Lacerda LD, Kremer HH, Kjerfve B, Salomons W, Crossland JIM, Crossland CJ (2002) South American Basins: LOICZ global change assessment and synthesis of river catchment-coastal sea interaction and human dimension. LOICZ Reports and Studies, n. 21. ISBN: 1383–4304.

KLUMPP, A. Utilização de bioindicadores de poluição em condições temperadas e tropicais. MAIA, N. B.; MARTOS, H. L.; BARELLA, W. (orgs.). *Indicadores Ambientais: conceitos e aplicações*. São Paulo: EDUC. p. 77-94, 2001.

LACERDA, L.D.; MOLISANI, M.M.; SENA, D. & MAIA, L.P. Estimating the importance of natural and anthropogenic sources on N and P emission to estuaries along the Ceará State Coast NE Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, v.14, p. 149-164, 2008.

LACKNER, R. “Oxidative stress” in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (eds.) *Fish ecotoxicology*. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, p. 203-224, 1998.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. 2. ed. São Paulo: SARVIER, 1995. 839p.

LIMA, J. S. Processos biológicas e o biomonitoramento: aspectos bioquímicos e morfológicos. MAIA, N. B.; MARTOS, H. L.; BARELLA, W. (orgs.) *Indicadores Ambientais: conceitos e aplicações*. São Paulo: EDUC. p. 94-115, 2001.

LOPES, F.R.A., HOSTIN-SILVA, M., INEZ, V.M., MACHADO, C., CAFFÉ, A., STORI, F.T. Desova de bagres (Siluriformes – Ariidae) na foz do rio Itajaí-Açú, SC, Brasil. *XII Encontro Brasileiro de Ictiologia*, SP, p.68. 1997.

MARTINEZ-ÁLVAREZ, R.M.; HIDALGO, M.C.; DOMEZAIN, A.; MORALES, A.E.; GARCIA- GALLEGO, M.; SANZ, A. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *J. Exp. Biol.*, v. 205, p. 3699-3706, 2002.

MATTOS, J.J. Respostas bioquímicas e moleculares no peixe *Poecilia vivipara* exposto a fração de óleo diesel acomodada em água. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 120p. 2010.

MEIRE, R.O.; AZEREDO, A.; TORRES, J.P.M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecol. Brás.*, v. 11, n. 2, 2007.

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

MIRANDA, L. B. DE; CASTRO, B. M. DE; KJERFVE, B. Princípios de oceanografia física de estuários. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002. 411p.

MOLISSANI, M. M.; ESTEVES F. A.; LACERDA, L. D.; REZENDE C. E. R., 2013. Emissões naturais e antrópicas de nitrogênio, fósforo e metais para a bacia do Rio Macaé (Macaé, RJ, Brasil) sob influência das atividades de exploração de petróleo e gás na bacia de Campos. *Quim. Nova*, v. 36, n. 1, p. 27-33, 2013. a)

MOLISANI, M. M., COSTA, R. N., CUNHA P., REZENDE, C. E., FERREIRA, M. I. P., ESTEVES, F. A. Acute Toxicity Bioassay with the Amphipod, *Grandidierella bonnieroides* S. After Exposure to Sediments from an Urban Estuary (Macaé River Estuary, RJ, Brazil). *Bull Environ Contam Toxicol*, v. 90, p. 79-84, 2013. b)

MOREL, Y., BAROUKI, R. Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. Critical contribution of nuclear factor 1. *J Biol Chem.* 1998 Oct 9;273(41):26969-76.

NICARETA, L. Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis* / Lilian Nicareta. – Curitiba, 2004. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

NICODEM, D. E., FERNADES, M. C. Z., GUEDES, C. L. B., CORREA, R. J. Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills. *Biogeochemistry*, v. 39, p. 121-138, 1997.

NICODEM, D.E., GUEDES, C.L.B., CORREA, R.J. Photochemistry of petroleum I. Systematic study of a Brazilian intermediate crude oil. *Mar. Chem.*, v. 63, p. 93-104, 1998.

OLIVEIRA, M., PACHECO, M. SANTOS, M. A. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. *Science of The Total Environment*, v. 396, p. 70-78, 2008.

PAULA C. H., WANDA P. A., ÂNGELO F. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim. Nova*, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

PEDROSA, R., GEREMIAS, R., SILVA, M., FIGNA, V., LOCATELLI, C., FILHO, D. (2001) Biomonitoramento do estuário do rio Itagaí-Açu (SC) utilizando a indução do citocromo P4501A e glutathione S-transferase de bagres como biomonitoramento. In: Efeitos de poluentes em organismos marinhos. Moraes, R, Crapez, M, Pfeiffer, W., Farina, M., Bainy, A., Teixeira, V. (eds). Villi Press, 288p.

PEDROZO, M.F.M., BARBOSA, E.M., CORSEUIL, H.X., SCHNEIDER, M.R., LINHARES, M.M. Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo. Centro de Recursos Ambientais, Série Cadernos de Referência Ambiental, Salvador. 2002

PINHEIRO, M.R. Avaliação de usos preponderantes e qualidade da água como subsídios para os instrumentos de gestão dos recursos hídricos aplicada à bacia hidrográfica do Rio Macaé. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) Centro Federal de Educação Tecnológica de Campos. Campos do Goytacazes. 2008.

PRITCHARD, D.W. 1967. What is an estuary: physical standpoint. In: *Estuaries*. pp. 3-5. (G.H. Laa, ed.). American Association for the Advancement of Science. Publication 83. Washington, DC.

QUEIROZ, J. F., TRIVINHO-STRIXINO, S., NASCIMENTO, V. M. C. Organismos bentônicos bioindicadores da qualidade de água da bacia do médio São Francisco. Série Comunicado Técnico da Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p. 1-4, 2000.

RIO DE JANEIRO. Conselho Estadual de Recursos Hídricos (CERHI) Resolução nº 18, de 08 de novembro de 2006. Aprova a definição das Regiões Hidrográficas do Estado do Rio de Janeiro.

ROCHA, A. R. M. ; SILVA, L. B. Q. ; ROCHA, D. F. ; BELIENE, G. H. ; SOUZA, C. M. M. . Relação Alimentação/Reprodução de *Genidens genidens* (Valenciennes, 1839) na Lagoa da Praia, Norte do Estado do Rio de Janeiro.. In: XIV Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar XIV COLACMAR, 2011, Balneário Camboriú / SC. XIV Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar XIV COLACMAR, 2011.

SCHMIDT, T. C. S. et al. Taxocenose de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) da região estuarina de São Vicente, SP, Brasil. *Biota Neotrop.* Dez 2008, v.8, n.4, ISSN 1676-0603, 2008.

SEMADS. Bacias Hidrográficas e Rios Fluminenses - Síntese Informativa por Macrorregião Ambiental 3. Rio de Janeiro: SEMADS (Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável): 2001. 73 p, 2001.

SIMONATO, J.D.; Efeitos da exposição à fração solúvel da gasolina em parâmetros bioquímicos e fisiológicos de *Prochilodus lineatus*. 2010 (Tese de doutorado em ciências) Universidade Federal de São Carlos, 2010.

SIMONATO, J.D., ALBINATI, A.C., MARTINEZ, C.B.R., Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater

fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. Bull. Environ. Contam. Toxicol., v.76, p. 505-51, 2006.

SIMONATO, J.D., GUEDES, C.L.B., MARTINEZ, C.B.R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. Ecotoxicol. Environ. Saf., v. 69, p. 112–120, 2008.

SINGER, M.M. et al. Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. Marine Pollution Bulletin, v. 40, p. 1007-1016, 2000.

STEGEMAN J.J., BROUWER M., DI GIULIO R.T., FORLIN L., FOWLER B.A., SANDERS B.M., VAN VELD P.A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein synthesis as indicators of chemical exposure and effect. In: *Biomarkers: Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle Jr PM and Bergman HL (Eds), pp 235-335, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA.

STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. Biochemistry and Molecular Biology of Monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. OSTRANDER, G. K.; MALINS, D. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 1994.

TIMME-LARAGY, A.R. et al. Synergistic induction of AHR regulated genes in developmental toxicity from co-exposure to two model PAHs in zebrafish. Aquatic Toxicology, v. 85, p. 241-250, 2007.

TANIGUCHI, S. Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos e organoclorados em diferentes compartimentos do ambiente marinho do estado do Rio de Janeiro. 2001. (Tese de doutorado do Instituto de Química). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.

VAN DER OOST, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 13, p. 57–149, 2003.

VAN GESTEL, C.A.M., VAN BRUMMELEN, T.C., Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. Ecotoxicology, v. 5, Issue 4, p. 217-225, 1996.

WALKER, C.H. et al. **Principles of ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis, 1996. 321 p.

WHO – World Health Organization, Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Polynuclear Aromatic Compounds Part 1. Chemical environmental and experimental data, 32, International Agency for Research on Cancer, p. 477, 1983.

ANEXOS

ANEXO 1 – LAUDO DA INNOLAB 1º COLETA



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

Pág. 1 de 6

Resp. Téc.: **Carina Casal**

Emitido em: **28/10/2011**

Lab-nº: **11/5316**

Análise em amostras líquidas

Cliente : MAURICIO MUSSI MOLISANI
Endereço : Rua São José do Barreto, n° 764
Macaé - RJ
Localização do Projeto : Macaé - RJ
Data da Coleta : 13/10/2011
Entrega das amostras : 14/10/2011
Início dos ensaios/extração : 20/10/2011
Término dos ensaios : 28/10/2011

INNOLAB do Brasil Ltda.
Rua Sacadura Cabral - 236
Saúde - Rio de Janeiro - RJ
Cep. 20221-161
CNPJ. 04.183.043/0001-00
Tel. (21) 3509-1750
Fax (21) 2233-4621

Projeto : Não fornecido
Gerente do Projeto : Mauricio Mussi Molisane

Parâmetro	P1 SUP (µg/L)	D*	L.Q (µg/L)	P1 FUNDO (µg/L)	D*	L.Q (µg/L)	P3 SUP (µg/L)	D*	L.Q (µg/L)	L.D. (µg/L)
PAH										
Naftaleno	nd	-	0,03	0,05	-	0,03	0,04	-	0,03	0,01
Acenafileno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Acenafteno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Fluoreno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Fenantreno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Antraceno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Fluoranteno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Pireno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Benzo(a)antraceno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Criseno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Benzo(b)fluoranteno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Benzo(k)fluoranteno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Benzo(a)pireno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Indeno(123-cd)pireno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Dibenzo(a,h)antraceno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Benzo(ghi)perileno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Total	nd			0,05			0,04			
Quantidade de amostra (mL)	1000			1000			1000			
*Diluição (N.º vezes)										

conferido



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

Pág. 2 de 6

Resp. Téc.: **Carina Casal**

Emitido em: **28/10/2011**

Lab-nº: **11/5316**

Parâmetro	P4 FUNDO (µg/L)	D*	L.Q (µg/L)	P5 SUP (µg/L)	D*	L.Q (µg/L)	P6 FUNDO (µg/L)	D*	L.Q (µg/L)	L.D. (µg/L)
PAH										
Naftaleno	nd	-	0,03	0,10	-	0,03	0,12	-	0,03	0,01
Acenafileno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Acenafteno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Fluoreno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Fenantreno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Antraceno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Fluoranteno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Pireno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Benzo(a)antraceno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Criseno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Benzo(b)fluoranteno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Benzo(k)fluoranteno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Benzo(a)pireno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Indeno(123-cd)pireno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Dibenzo(a,h)antraceno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Benzo(ghi)perileno	nd	-	0,03	nd	-	0,03	nd	-	0,03	0,01
Total	nd			0,10			0,12			
Quantidade de amostra (mL)	1000			1000			1000			
*Diluição (N.º vezes)										

conferido



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

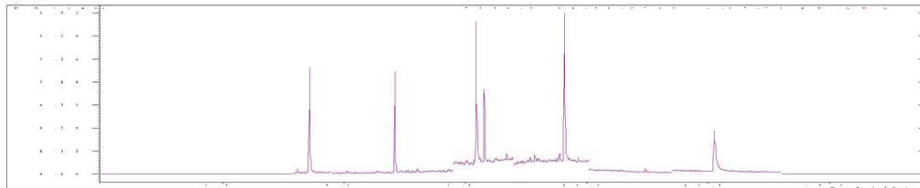
Pág. 3 de 6

Resp. Téc.: Carina Casal

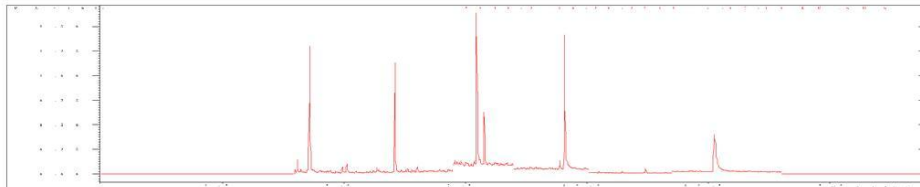
Emitido em: 28/10/2011

Lab-nº: 11/5316

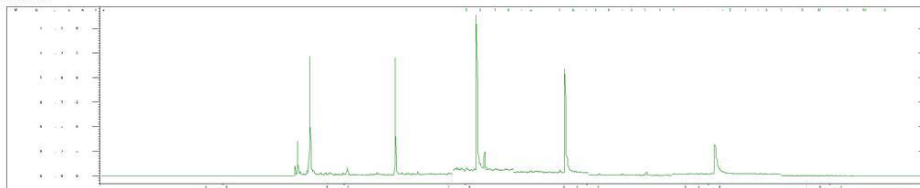
P1 SUP



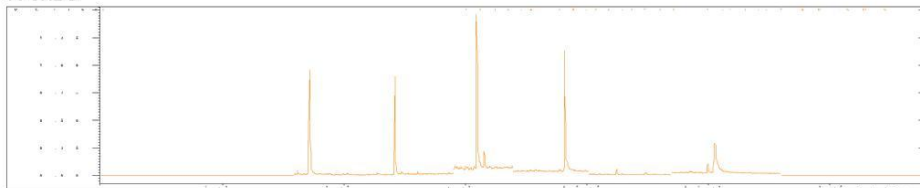
P1 FUNDO



P3 SUP



P4 FUNDO



conferido



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

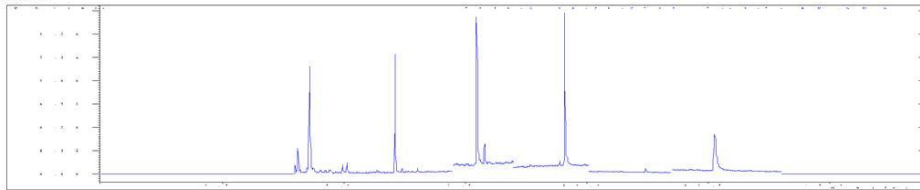
Pág. 4 de 6

Resp. Téc.: Carina Casal

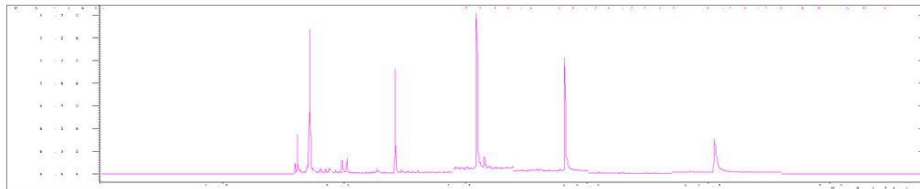
Emitido em: 28/10/2011

Lab-nº: 11/5316

P5 SUP



P6 FUNDO



conferido



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

Pág. 5 de 6

Resp. Téc.: **Carina Casal**

Emitido em: **28/10/2011**

Lab-nº: **11/5316**

Padrões de Controle Analítico – PCA (Surrogate)

Taxa de Recuperação (Faixa de Aceitação: 70-130%)
(%)

Terfenil D14	72
Perileno D12	75

conferido



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

Pág. 6 de 6

Resp. Téc.: **Carina Casal**

Emitido em: **28/10/2011**


Lab-nº: **11/5316**

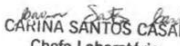
Observações

1. Legenda
 - L.D. – Limite de detecção reportado
 - L.Q. – Limite de Quantificação reportado
 - na – Não analisado
 - nd – Não detectado
2. Ref. Método – EPA 8270 (D):2007 / EPA 3510 (C):1996
3. Foram realizadas duplicatas em 10% das amostras em lotes de 20 amostras e os resultados obtidos estão em conformidade com os critérios de aceitação estabelecidos.
4. Nos ensaios são utilizados padrões rastreáveis ao SI (Sistema Internacional de Medidas).
5. Foram utilizados Brancos de Controle conforme metodologia informada.
6. **O laboratório não é o responsável pela amostragem**, portanto, os resultados contidos neste boletim referem-se exclusivamente às amostras nele descritas, que foram coletadas e enviadas pelo solicitante.
7. Os métodos utilizados neste(s) ensaios(s) apresentam-se conformes em relação ao método referenciado. Caso o(s) ensaio(s) tenha(m) apresentado desvio(s), adições ou exclusões, estes estarão listados no item informações adicionais do relatório.
8. Os valores para amostras sólidas reportados são relativos à massa seca, salvo observações.
9. A Innolab garante que todas as análises foram executadas dentro do prazo de validade de cada parâmetro segundo a norma relativa a cada metodologia.
10. As metodologias utilizadas nos ensaios encontram-se referenciadas ao final de cada parâmetro. As metodologias acreditadas poderão ser localizadas no site do INMETRO sob CRL 03104.
11. Este Boletim de Ensaio só deverá ser reproduzido por completo.
12. Este laudo pode ser acessado on-line no site: <http://www.innolab.com.br/laudos/resultado.asp>
Lab: **11/5316**
Senha: **JXFDUL**

FM-004-L3A – Rev.01 17/03/2011 – Apr. MAR/11

conferido


José Antônio Pires de Mello
Diretor
B. Sc, Eng. Quím. e Quím. Industrial
CRQ – 03311142 / CREA - 791006469


CARINA SANTOS CASAL
Chefe Laboratório
Químico
CRQ - 03251114

ANEXO 2 – LAUDO DA INNOLAB 2º COLETA



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

Pág. 1 de 5

Resp. Téc.: **Carina Casal**

Emitido em: **18.04.2012**

Lab-nº: **12/2007**

Análise em amostras de água

Cliente : MAURICIO MUSSI MOLISANI
Endereço : Rua São José do Barreto, n° 764
Macaé - RJ
Localização do Projeto : Rio Macaé - Macaé
Data da Coleta : 27.03.2012
Entrega das amostras : 28.03.2012
Início dos ensaios/extração : 05.04.2012 16:10
Término dos ensaios : 18.04.2012

INNOLAB do Brasil Ltda.
Rua Sacadura Cabral - 236
Saúde - Rio de Janeiro - RJ
Cep. 20221-161
CNPJ. 04.183.043/0001-00
Tel. (21) 3509-1750
Fax (21) 2233-4621

Projeto : Não fornecido
Gerente do Projeto : Não fornecido

Parâmetro	SECA Sup (µg/L)	D*	L.Q (µg/L)	SECA Fun (µg/L)	D*	L.Q (µg/L)	Cheia Sup (µg/L)	D*	L.Q (µg/L)	L.D. (µg/L)
PAH										
Naftaleno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Acenafileno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Acenafteno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Fluoreno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Fenantreno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Antraceno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Fluoranteno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Pireno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Benzo(a)antraceno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Criseno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Benzo(b)fluoranteno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Benzo(k)fluoranteno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Benzo(a)pireno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Indeno(123-cd)pireno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Dibenzo(a,h)antraceno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Benzo(ghi)perileno	nd	-	0,01	nd	-	0,01	nd	-	0,01	0,003
Total	nd			nd			nd			
Quantidade de amostra (mL)	1000			1000			1000			
*Diluição (N.º vezes)										

conferido



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

Pág. 2 de 5

Resp. Téc.: **Carina Casal**

Emitido em: **18.04.2012**

Lab-nº: **12/2007**

Parâmetro	Cheia Fun (µg/L)	D*	L.Q (µg/L)	L.D. (µg/L)
PAH				
Naftaleno	nd	-	0,01	0,003
Acenaftileno	nd	-	0,01	0,003
Acenafteno	nd	-	0,01	0,003
Fluoreno	<0,01	-	0,01	0,003
Fenantreno	0,02	-	0,01	0,003
Antraceno	nd	-	0,01	0,003
Fluoranteno	nd	-	0,01	0,003
Pireno	nd	-	0,01	0,003
Benzo(a)antraceno	nd	-	0,01	0,003
Criseno	nd	-	0,01	0,003
Benzo(b)fluoranteno	nd	-	0,01	0,003
Benzo(k)fluoranteno	nd	-	0,01	0,003
Benzo(a)pireno	nd	-	0,01	0,003
Indeno(123-cd)pireno	nd	-	0,01	0,003
Dibenzo(a,h)antraceno	nd	-	0,01	0,003
Benzo(ghi)perileno	nd	-	0,01	0,003
Total	0,02			
Quantidade de amostra (mL)	1000			
*Diluição (N.º vezes)				

conferido



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

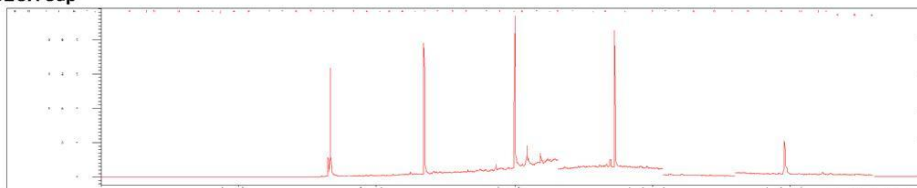
Pág. 3 de 5

Resp. Téc.: **Carina Casal**

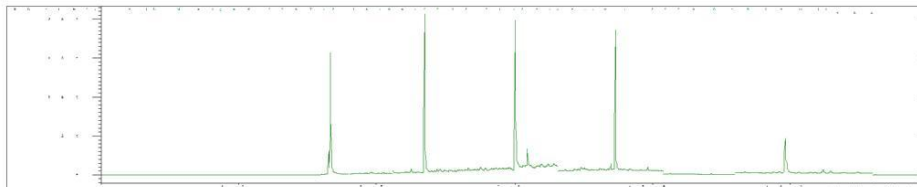
Emitido em: **18.04.2012**

Lab-nº: **12/2007**

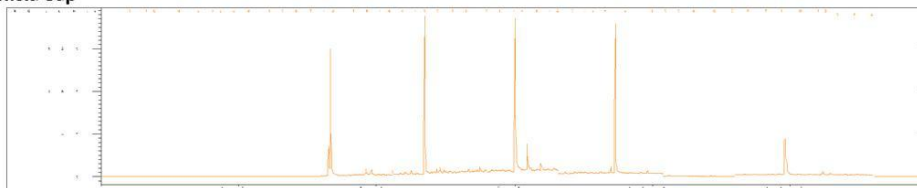
SECA Sup



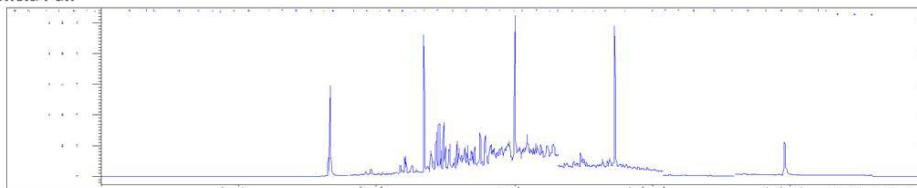
SECA Fun



Cheia Sup



Cheia Fun



conferido



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

Pág. 4 de 5

Resp. Téc.: **Carina Casal**

Emitido em: **18.04.2012**

Lab-nº: **12/2007**

Padrões de Controle Analítico – PCA (Surrogate)

Taxa de Recuperação (Faixa de Aceitação: 70-130%)
(%)

Terfenil D14	77
Perileno D12	42

conferido



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

Pág. 5 de 5

Resp. Téc.: **Carina Casal**

Emitido em: **18.04.2012**

Lab-nº: **12/2007**


Observações

1. Legenda
 - L.D. – Limite de detecção reportado
 - L.Q. – Limite de Quantificação reportado
 - na – Não analisado
 - nd – Não detectado
2. Ref. Método – EPA 8270 (D):2007 / EPA 3510 (C):1996
3. Foram realizadas duplicatas em 10% das amostras em lotes de 20 amostras e os resultados obtidos estão em conformidade com os critérios de aceitação estabelecidos.
4. Nos ensaios são utilizados padrões rastreáveis ao SI (Sistema Internacional de Medidas).
5. Foram utilizados Brancos de Controle conforme metodologia informada.
6. **O laboratório não é o responsável pela amostragem**, portanto, os resultados contidos neste boletim referem-se exclusivamente às amostras nele descritas, que foram coletadas e enviadas pelo solicitante.
7. Os métodos utilizados neste(s) ensaio(s) apresentam-se conformes em relação ao método referenciado. Caso o(s) ensaio(s) tenha(m) apresentado desvio(s), adições ou exclusões, estes estarão listados no item informações adicionais do relatório.
8. Os valores para amostras sólidas reportados são relativos à massa seca, salvo observações.
9. A Innolab garante que todas as análises foram executadas dentro do prazo de validade de cada parâmetro segundo a norma relativa a cada metodologia.
10. As metodologias utilizadas nos ensaios encontram-se referenciadas ao final de cada parâmetro. As metodologias acreditadas poderão ser localizadas no site do INMETRO sob CRL 03104.
11. Este Boletim de Ensaio só deverá ser reproduzido por completo.

FM-004-L3A – Rev.01 17/03/2011– Apr. MAR/11

conferido


José Antônio Pires de Mello
Diretor
B. Sc, Eng. Quím. e Quím. Industrial
CRQ – 03311142 CREA - 791006469


CARINA SANTOS CASAL
Chefe Laboratório
Químico
CRQ - 03251114

ANEXO 3 – LAUDO DA INNOLAB 6º COLETA



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

Pág. 1 de 4

Resp. Téc.: **Carina Casal**

Emitido em: **17.08.2012**

Lab-nº: **12/5358**

Análise em amostras de água

Cliente : MAURICIO MUSSI MOLISANI
Endereço : Rua São José do Barreto, n° 764
Macaé - RJ
Localização do Projeto : Macaé - RJ
Data da Coleta : 01.08.2012
Entrega das amostras : 03.08.2012
Início dos ensaios/extração : 08.08.2012
Término dos ensaios : 17.08.2012

INNOLAB do Brasil Ltda.
Rua Sacadura Cabral - 236
Saúde - Rio de Janeiro - RJ
Cep. 20221-161
CNPJ. 04.183.043/0001-00
Tel. (21) 3509-1750
Fax (21) 2233-4621

Projeto : Não fornecido
Gerente do Projeto : Maurício Mussi Molisani

Parâmetro	Maré Cheia Superfície (µg/L)	D*	L.Q (µg/L)	Maré Cheia Fundo (µg/L)	D*	L.Q (µg/L)	L.D. (µg/L)
PAH							
Naftaleno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Acenaftileno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Acenafteno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Fluoreno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Fenantreno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Antraceno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Fluoranteno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Pireno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Benzo(a)antraceno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Criseno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Benzo(b)fluoranteno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Benzo(k)fluoranteno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Benzo(a)pireno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Indeno(123-cd)pireno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Benzo(ghi)perileno	<0,01	-	0,01	<0,01	-	0,01	0,003
Total	nd			nd			
Quantidade de amostra (mL)	1000			1000			
*Diluição (N.º vezes)							

conferido



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

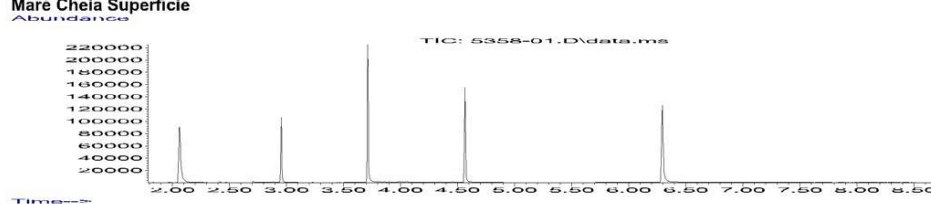
Pág. 2 de 4

Resp. Téc.: Carina Casal

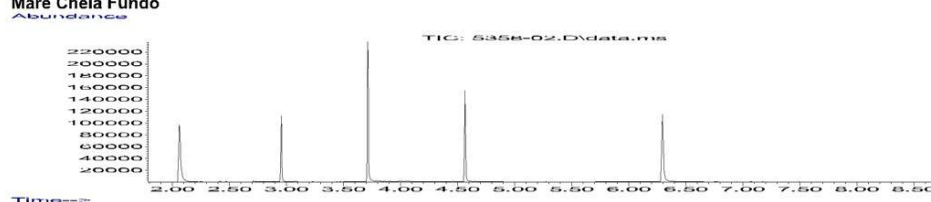
Emitido em: 17.08.2012

Lab-nº: 12/5358

Maré Cheia Superfície



Maré Cheia Fundo



conferido



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

Pág. 3 de 4

Resp. Téc.: **Carina Casal**

Emitido em: **17.08.2012**

Lab-nº: **12/5358**

Padrões de Controle Analítico – PCA (Surrogate)

Taxa de Recuperação (Faixa de Aceitação: 70-130%)
(%)

Terfenil D14	93
Perileno D12	75

conferido



Laboratório de Ensaio acreditado
pela Cgcre/Inmetro de acordo com
a ABNT NBR ISO/IEC 17025.



Innolab

Boletim de Ensaio

Pág. 4 de 4

Resp. Téc.: **Carina Casal**

Emitido em: **17.08.2012**

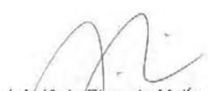
Lab-nº: **12/5358**


Observações

1. Legenda
 - L.D. – Limite de detecção reportado
 - L.Q. – Limite de Quantificação reportado
 - na – Não analisado
 - nd – Não detectado
2. Ref. Método – EPA 8270 (D):2007 / EPA 3510 (C):1996
3. Foram realizadas duplicatas em 10% das amostras em lotes de 20 amostras e os resultados obtidos estão em conformidade com os critérios de aceitação estabelecidos.
4. Nos ensaios são utilizados padrões rastreáveis ao SI (Sistema Internacional de Medidas).
5. Foram utilizados Brancos de Controle conforme metodologia informada.
6. O laboratório não é o responsável pela amostragem, portanto, os resultados contidos neste boletim referem-se exclusivamente às amostras nele descritas, que foram coletadas e enviadas pelo solicitante.
7. Os métodos utilizados neste(s) ensaios(s) apresentam-se conformes em relação ao método referenciado. Caso o(s) ensaio(s) tenha(m) apresentado desvio(s), adições ou exclusões, estes estarão listados no item informações adicionais do relatório.
8. Os valores para amostras sólidas reportados são relativos à massa seca, salvo observações.
9. A Innolab garante que todas as análises foram executadas dentro do prazo de validade de cada parâmetro segundo a norma relativa a cada metodologia.
10. As metodologias utilizadas nos ensaios encontram-se referenciadas ao final de cada parâmetro. As metodologias acreditadas poderão ser localizadas no site do INMETRO sob CRL 03104.
11. Este Boletim de Ensaio só deverá ser reproduzido por completo.
12. Este laudo pode ser acessado on-line no site: <http://www.eurofins.com.br/servicos/ambientais/resultado.aspx>
Lab: **12/5358**
Senha: **A3AT20**

FM-004-L3A – Rev.01 17/03/2011 – Apr. MAR/11

conferido


José Antônio Pires de Mello
Diretor
B. Sc, Eng. Quím. e Quím. Industrial
CRQ – 03311142 CREA - 791006469


CARINA SANTOS CASAL
Chefe Laboratório
Químico
CRQ - 03251114