

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior - BADPI

**Efeitos subletais da poluição por petróleo e derivados
sobre peixes da Amazônia (Amazonas, Brasil)**

Helen Sadauskas Henrique

Manaus, Amazonas

Julho, 2014

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior - BADPI

**Efeitos subletais da poluição por petróleo e derivados
sobre peixes da Amazônia (Amazonas, Brasil)**

Orientadora: Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus, Amazonas

Julho, 2014

Ficha catalográfica

Sadauskas-Henrique, Helen

Efeitos subletais da poluição por petróleo e derivados sobre peixes da Amazônia (Amazonas, Brasil)/Helen Sadauskas Henrique.--- Manaus: [sn], 2014

xv, 177 f.: III.

Tese (doutorado) --- INPA, Manaus, 2014

Orientadora: Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val

Área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior

Sinopse:

As respostas dos biomarcadores de exposição e efeito foram estudadas em peixes da Amazônia em função da contaminação por petróleo e derivados, em condições de laboratório e em condições naturais. Os biomarcadores em potencial, selecionados por meio de estudo realizado em laboratório com a espécie *Colossoma macropomum* (tambaqui), foram utilizados para se avaliar a influência da qualidade da água do Rio Negro (altas concentrações de carbono orgânico dissolvido, COD, e baixa concentração de sais dissolvidos) na toxicidade do óleo cru do Urucu-AM e do mesmo óleo dispersado quimicamente com Corexit 9500[®] para a mesma espécie. Além disso, foi realizado o monitoramento de uma área do Rio Negro-AM, impactada pelo derramamento acidental de um derivado de petróleo (Cimento asfáltico de petróleo - CAP), no qual os biomarcadores avaliados em laboratório foram validados para duas espécies de ciclídeos (*Acarichthys heckelii* e *Satanoperca jurupari*) coletadas em campo.

Palavras chave: 1. Biomarcadores de exposição e efeito. 2. Petróleo e derivados. 3. Rio Negro-AM. 4. Amazônia.

Dedico

Aos meus pais, João e Celeste...

Às minhas irmãs Aline, Laura e Beatriz...

À minha sobrinha Salma...

Ao meu companheiro Rafael ...

...por todo amor

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val, por sua confiança em mim durante todo o decorrer do trabalho, pelo incentivo e apoio incondicionais, por sua compreensão, carinho e amizade nesses quatro anos que foram ricos em aprendizado.

Ao Dr. Adalberto Luis Val, pela possibilidade de trabalhar no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) e pelo apoio, incentivo e amizade.

À mestre Maria de Nazaré Paula (Naza), não apenas por todo suporte nas questões técnicas de laboratório e excursões de campo, mas também pela amizade e convivência nesses quatro anos e por cuidar tão bem de nós (alunos do LEEM).

Às meninas da secretaria do LEEM, Dona Raimunda, Raquel e Claudinha por todo suporte técnico e administrativo e também pela convivência e amizade.

À Dra. Hiléia S. Barroso e Janaína Chaves por terem me auxiliado e me ajudado com as análises dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, particularmente à Dra. Hiléia pelas discussões dos resultados.

Ao Dr. Carlos Edwar C. Freitas, que possibilitou meu estágio Doutoral, por meio do Projeto PIATAM V, na Curtin University/Perth/Austrália, onde aprendi algumas técnicas utilizadas na presente tese.

À Dra. Marthe Monique Gagnon, pelos grandes ensinamentos e lições aprendidas durante estágio doutoral em seu laboratório, as quais também foram lições e ensinamentos para a vida.

À secretaria do Programa de Pós-graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior (PPG-BADPI) do INPA.

Ao CNPq pela concessão da bolsa, e à CAPES, FAPEAM, CNPq e FINEP pelo apoio financeiro ao trabalho por meio do INCT-ADAPTA e do Projeto PIATAM V.

Aos pescadores do INPA (China, Sr. Luis e Chico) por todo apoio nas excursões de campo. Sem eles o trabalho de campo não teria sido possível.

À Susana Braz Mota, meu braço direito durante esses quatro anos, por ter me auxiliado muito no laboratório e excursões de campo. Aprendemos muito uma com a outra.

Aos amigos de excursão, Rafael, Susana, Derek, Daia, Dinho, por terem tornado as excursões pela Amazônia ainda melhores e mais divertidas.

Aos amigos que fiz no LEEM nesses quatro anos. Muito obrigada pela amizade, convivência, discussões científicas, conselhos, palavras de conforto e apoio nos momentos difíceis, risadas, cafés da tarde, cervejas, festas, aniversários, enfim, obrigada pela convivência maravilhosa e por me fazerem sentir acolhida desde o primeiro dia de Manaus. O LEEM realmente é uma família da qual tenho orgulho de fazer parte.

Aos meninos da limpeza que cuidam de nossa bagunça, Dona Sonia (Soninha), Dona Val e Wanderlan (Underline). Muito obrigada pelos cafés que, por muitas vezes, me mantiveram acordada durante as longas jornadas no laboratório. E um muito obrigada especialmente para Dona Val, sem ela meus jalecos e minha mesa nunca permaneceriam limpos!

Às “galácticas” (Vivi; Carlinha; Daia) por terem me acolhido na república e feito me sentir em casa naqueles difíceis meses de adaptação, me mostrando a parte boa e me guiando no desconhecido. Muito obrigada pela amizade.

À “família” Manauara (Carol, Marcelo, Higor, Bebel, Thaia e Cesar) pela convivência, risadas, almoços, churrascos, festas de final de ano e pelos laços de amizade e confiança formados.

Aos meus pais, João e Celeste, por todo amor, carinho, dedicação e por sempre acreditar e apostar nos meus sonhos.

À toda minha família pelo exemplo, amor e por sempre apoiar meus sonhos, me deixando livre pra voar, por mais que sintam o coração apertado. Esses foram anos de muitas saudades.

E ao meu companheiro Rafael Duarte por todo amor, carinho, dedicação, companheirismo, amizade e por toda a paciência e compreensão nos dias difíceis. Obrigada por me mostrar que a vida pode ser mais leve e simples e que a felicidade se encontra nos pequenos momentos e detalhes da vida.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”

Charles Chaplin

Abstract

The present work analyzed the changes in biomarkers of exposure and effects in fishes of the Amazon, especially from Negro river, exposed to the crude oil and derivatives; and verified the responses of these biomarkers according to the physical and chemical characteristics of the water. The set of biomarkers, EROD; GST; SOD and CAT; serum SDH; LPO, erythrocytic DNA damage and HPA bile metabolites, proved to be efficient in demonstrate the Benzo[a]Pyrene (B[a]P) effects in tambaqui, and can be considered a promising set of biomarkers to evaluate the effects of the crude oil and derivatives in Amazon fishes. The chemical dispersion of the Urucu crude oil resulted in the increase of toxicity to tambaqui, as seen by the increased responses of a set of biomarkers: EROD; GST; SOD and CAT; serum SDH; LPO, erythrocytic DNA damage and HPA bile metabolites. However, the magnitude of the responses of these biomarkers was higher in specimens acclimated to natural water from the Negro river (low ion availability and high dissolved organic carbon (DOC) concentration). The accidental oil spill in the Negro river (São Raimundo harbor) caused increase in the biomarkers of exposure and effect in two resident cichlid fish species; this increase was not related with the reduction of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) concentration in the water column. Moreover, the PAH concentration in water along with the DOC concentration were related to responses of these biomarkers, as observed through the multivariate analyzes. Thereby, it is possible to say that the set of studied biomarkers in fishes from the Negro river is of great relevance to evaluate the quality of this environment after the contamination of the Negro river with crude oil and derivatives.

Resumo

A presente tese teve como objetivo geral avaliar as respostas dos biomarcadores de exposição e efeito em peixes da região amazônica, mais especificamente do Rio Negro, expostos ao petróleo e derivados e, ainda, verificar a resposta desses biomarcadores em função da presença do petróleo em águas com diferentes características físico-químicas. O conjunto de biomarcadores, enzimas EROD; GST; SOD e CAT hepáticas, a enzima SDH plasmática, a concentração da LPO hepática, os danos no DNA dos eritrócitos, juntamente com a análise dos metabólitos de HPA na bile, se mostraram eficientes em indicar os efeitos do B[a]P no tabaqui, podendo ser considerado um grupo de biomarcadores promissor para se avaliar os efeitos dos HPA do petróleo em peixes da região amazônica. A dispersão química do óleo cru de Urucu-AM causou um aumento na toxicidade, observada nas respostas dos biomarcadores. No entanto, as respostas foram observadas em maior magnitude nos animais expostos ao óleo cru quimicamente dispersado em água natural do Rio Negro. O derramamento acidental do derivado de petróleo CAP no Rio Negro (porto São Raimundo) causou alterações dos biomarcadores de exposição e efeito analisados em duas espécies de ciclídeos residentes, os quais não apresentaram diminuição das respostas em função da diminuição da concentração dos HPA dissolvidos na água. Além disso, a concentração dos HPA na água juntamente com a concentração de COD foi responsável pelas respostas dos biomarcadores avaliados, como visto na análise multivariada dos dados. Dessa forma, podemos sugerir que o conjunto de biomarcadores estudados nos peixes do Rio Negro é de suma importância para avaliarmos a qualidade desse ambiente em função da contaminação por HPA do petróleo e derivados.

Lista de Tabelas

<i>CAPÍTULO 1. Validation of a Suite of Biomarkers of Fish Health in the Tropical Bioindicator Tambaqui (Colossoma macropomum).....</i>	34
Table 1.	51
<i>CAPÍTULO 3. Monitoramento de área portuária no Rio Negro-AM impactada pelo derramamento acidental do derivado de petróleo CAP: biomarcadores em duas espécies residentes de ciclídeos.</i>	87
Tabela 1.....	96
Tabela 2.....	99
Tabela 3.....	105
Tabela 4.....	119
Tabela 5.....	122

Lista de figuras

<i>Introdução geral</i>	16
Figura 1.	21
Figura 2.	23
Figura 3.	26
<i>CAPÍTULO 1. Validation of a Suite of Biomarkers of Fish Health in the Tropical Bioindicator Tambaqui (Colossoma macropomum)</i>	34
Figure 1.	45
Figure 2.	46
Figure 3.	48
Figure 4.	49
Figure 5.	50
<i>CAPÍTULO 2. Influence of the natural Rio Negro water on the toxicological effects of a crude oil and its chemical dispersion to the Amazonian fish Colossoma macropomum ..</i> 58	
Figure 1.	71
Figure 2.	72
Figure 3.	74
Figure 4.	76
Figure 5.	78
Figure 6.	86
<i>CAPÍTULO 3. Monitoramento de área portuária no Rio Negro-AM impactada pelo derramamento acidental do derivado de petróleo CAP: biomarcadores em duas espécies residentes de ciclídeos.</i>	87
Figura 1.	94
Figura 2.	95
Figura 3.	107

Figura 4.	109
Figura 5.	110
Figura 6.	111
Figura 7.	114
Figura 8.	115
Figura 9.	117
Figura 10.	118
Figura 11.	120
Figura 12.	120
Figura 13.	121
Figura 14.	123
Figura 15.	123

Sumário

<i>Introdução geral</i>	16
<i>Objetivo geral, objetivos específicos e hipóteses de cada capítulo</i>	29
<i>CAPÍTULO 1. Validation of a Suite of Biomarkers of Fish Health in the Tropical Bioindicator Tambaqui (Colossoma macropomum)</i>	34
Abstract.....	35
1. Introduction.....	36
2. Material and Methods.....	39
3. Results.....	44
4. Discussion	51
<i>CAPÍTULO 2. Influence of the natural Rio Negro water on the toxicological effects of a crude oil and its chemical dispersion to the Amazonian fish Colossoma macropomum ..</i>	58
Abstract.....	59
1. Introduction.....	60
2. Materials and methods	63
3. Results.....	70
4. Discussion	78
<i>CAPÍTULO 3. Monitoramento de área portuária no Rio Negro-AM impactada pelo derramamento acidental do derivado de petróleo CAP: biomarcadores em duas espécies residentes de ciclídeos.</i>	87
Resumo	88
1. Introdução	89
2. Material e métodos	92
3. Resultados	104
4. Discussão	127
5. Conclusões	150

<i>Conclusões gerais da tese</i>	<i>152</i>
<i>Perspectivas sobre o biomonitoramento ambiental dos ambientes aquáticos de água preta da Amazônia</i>	<i>155</i>
<i>Referências Bibliográficas.....</i>	<i>157</i>

Introdução geral

A contaminação dos ambientes aquáticos têm sido um dos principais problemas mundiais das últimas décadas. A água é um recurso finito, apesar de renovável, sendo a criação de políticas públicas para o uso consciente desse recurso a única forma de se garantir a manutenção desse bem fornecido pelo ecossistema. A água é o solvente universal, sendo dotada de grande estabilidade. Devido a essas propriedades, quase todos os elementos e compostos químicos lançados nos ecossistemas aquáticos por processos naturais ou por ação do homem acabam sendo incorporados à água, passando a fazer parte da biota aquática. Muitos dos compostos lançados no ambiente podem ser danosos para o consumo humano, além de estarem associados a problemas de saúde pública, degradação visual e perda de funcionalidade desse ambiente. A crescente urbanização e industrialização não planejada dos grandes centros é um dos exemplos que leva a essa degradação dos corpos de água.

A cidade de Manaus, capital do Estado do Amazonas, é um exemplo de centro urbano que sofreu um grande crescimento populacional nos últimos anos (IBGE, 2014). Além disso, Manaus é um caso peculiar devido ao fato de que a cidade dispõe de poucas ligações terrestres com outros estados do país, o que torna os rios as principais vias de comunicação. Em Manaus há um grande complexo portuário e naval, com inúmeras instalações localizadas ao longo da margem esquerda do Rio Negro. De acordo com a ANTAQ (Agência Nacional de Transportes Aquaviários, 2014), além do Porto Público, 12 terminais privados compõem o Complexo Portuário de Manaus. Além disso, no Estado do Amazonas são desenvolvidas atividades de extração e refino do petróleo oriundo da província petrolífera do Urucu, localizada na cidade de Coari/AM. O óleo cru retirado naquela

localidade viaja em balsas pelo rio Solimões/Amazonas, até a refinaria em Manaus (REMAN), localizada as margens do Rio Negro, onde é processado. Dessa forma, em decorrência dessas atividades, existe crescente poluição dos ambientes aquáticos da região, em especial do Rio Negro, onde se concentra toda a atividade portuária da cidade.

Entre os diferentes compostos tóxicos que são lançados no Rio Negro, como consequência da atividade petrolífera, podem ser destacados os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), os quais são constituintes naturais do petróleo bruto, podendo também ser encontrados em seus derivados. Apesar dos HPA representarem a menor porção do petróleo e derivados, eles são considerados a porção mais tóxica. Os HPA podem ser subdivididos, de acordo com sua natureza, em petrogênicos, constituintes diretos dos óleos crus e caracterizados por baixo número de anéis aromáticos derivados da combustão fóssil, ou em pirogênicos, derivados da combustão parcial de compostos orgânicos presentes na biomassa vegetal de áreas florestais. Os principais HPA de origem petrogênica são naftaleno, fenantreno e antraceno, apresentando heteroátomos de oxigênio ou enxofre, além de seus homólogos alquilados. Por outro lado, os pirogênicos apresentam três ou mais anéis aromáticos e baixo grau de alquilação. O petróleo, quando atinge os ambientes aquáticos, passa por diferentes processos como evaporação, dissolução, oxidação, sedimentação e biodegradação que, por sua vez, interferem diretamente nas taxas de absorção dos HPA pela biota e determinam o destino destes produtos e seus impactos sobre os ecossistemas aquáticos naturais.

No caso da região amazônica, onde existem rios com diferentes composições físico-químicas resultantes de diferenças marcantes na geomorfologia das áreas de nascentes e captação (Sioli, 1984), os impactos negativos dos HPA do petróleo irão diferir conforme as

características intrínsecas de cada tipo de ambiente. Os rios amazônicos de água preta, que têm como principal representante o Rio Negro, são caracterizados como pobres em íons dissolvidos, particularmente nas concentrações de Na^+ e Ca^{2+} , além de altas concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) e de substâncias húmicas diluídas (SHA).

Recentemente, estudos têm demonstrado alterações na toxicidade final de compostos orgânicos como os HPA em organismos aquáticos vivendo em condições de altas concentrações de COD e baixa disponibilidade iônica na água, como aquelas preponderantes nos corpos de água da bacia de drenagem do Rio Negro. Diversos autores têm mostrado que a presença de sais dissolvidos na água modula a toxicidade de HPA em espécies de peixes como *Fundulus heteroclitus* e *Oncorhynchus mykiss*, sendo que condições de reduzida disponibilidade iônica tendem a aumentar a disponibilidade de HPA na coluna de água (Ramachandran et al., 2006; Shukla et al., 2007). Nesses estudos, o aumento da disponibilidade de HPA para a biota aquática resulta em maior bioacumulação dos HPA em diferentes órgãos dos peixes, além de promover a ativação de enzimas de biotransformação, como a etoxiresorufina-o-deetilase (EROD) hepática (Ramachandran et al., 2006). Smith et al. (2011) demonstraram que a presença do COD na água, mesmo em baixas concentrações (por volta de 0,023 gC/L), aumenta a taxa de transferência de compostos orgânicos hidrofóbicos (HOC), como os HPA, de uma fase não aquosa (i.e. camada superficial do óleo na água) para uma fase aquosa, o que, por sua vez, leva ao aumento da disponibilidade desses compostos para a biota aquática. Além disso, diversos autores têm sugerido que a presença de SHA, em alguns casos associada à baixa concentração iônica da água, promove a ativação de enzimas de biotransformação de xenobióticos nos organismos, assim como de seu sistema de defesa antioxidante, tal como

visto para anfípodos de água doce, e diversas espécies de peixes (Matsuo et al., 2006; Menzel et al., 2005; Timofeyev et al., 2006).

Assim, de acordo com esses resultados, em caso de contaminação dos ambientes aquáticos da bacia do Rio Negro por HPA do petróleo, a toxicidade final desses compostos à biota local tenderia a ser aumentada, resultando em respostas mais intensas dos animais frente à maior biodisponibilidade dos HPA do petróleo e seus derivados no ambiente.

Nesse contexto, biomarcadores podem ser definidos como alterações mensuráveis que evidenciam a exposição dos organismos a poluentes, assim como os efeitos causados por essa exposição em diferentes níveis biológicos (van der Oost et al., 2003). Essas respostas dos animais vêm sendo amplamente utilizadas para a avaliação dos efeitos dos contaminantes na qualidade dos ecossistemas aquáticos. Dessa forma, os biomarcadores podem ser divididos em biomarcadores de exposição e de efeito. Entre os biomarcadores de exposição mais investigados podemos citar as enzimas de biotransformação (de fase I e II) de xenobióticos, além das enzimas antioxidantes presentes em tecidos dos animais, tais como brânquias e fígado, envolvidas na desintoxicação dos compostos químicos e seus metabólitos.

A fase I da biotransformação consiste na alteração, através da atividade biológica de várias enzimas, dos compostos tóxicos hidrofóbicos em hidrofílicos, que são mais facilmente excretados pelos organismos, impedindo, dessa forma, os danos causados pelo contato com os xenobióticos (van der Oost et al., 2003). No entanto, esse processo de biotransformação pode levar à bioativação desses compostos, ou seja, o composto gerado pela biotransformação é mais tóxico que o original. A fase I envolve reações de oxidação,

redução e hidrólise que são catalisadas por enzimas que compõem o sistema de oxidases de função mista (monooxigenases Citocromo P450; citocromo *b5* e o NADPH-Citocromo P450). O sistema de oxidases de função mista possui a função de biotransformar os compostos lipofílicos, mas também pode formar substratos para a fase II da biotransformação. Para os peixes, as principais enzimas de fase I são da família denominada Citocromo P450 (van der Oost et al., 2003). O Citocromo P450 é constituído por heme proteínas associadas à membrana, predominantemente localizado no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, sendo responsável pela transferência de elétrons do $\text{NADPH} + \text{H}^+$ para o oxigênio e pela transferência do grupamento OH para o substrato (xenobiótico), tornando-o mais hidrossolúvel, podendo também inativá-lo, ou torna-lo mais ou menos reativo do que a molécula precursora (Costa et al., 2004). A figura 1 esquematiza a hidroxilação de um substrato (RH) que inicialmente se liga ao Citocromo P450, em seguida, o átomo de ferro (Fe^{3+}), presente no grupo heme, grupo prostético da enzima, é reduzido pela adição de um elétron proveniente de uma molécula doadora (NADPH citocromo redutase no retículo endoplasmático e ferredoxina na mitocôndria). A redução do átomo de ferro (Fe^{2+}) permite a ligação com o oxigênio molecular e, então, um segundo elétron é introduzido na reação, proporcionando a formação de uma espécie reativa de oxigênio (ROS), com posterior absorção de prótons (H^+) do meio e liberação de água. Isso resulta na formação de um complexo Fe^{3+}O que transfere seu átomo de oxigênio para o substrato. Uma vez oxidado (ROH), o substrato é liberado, e, por sua vez, fica disponível para o ciclo prosseguir.

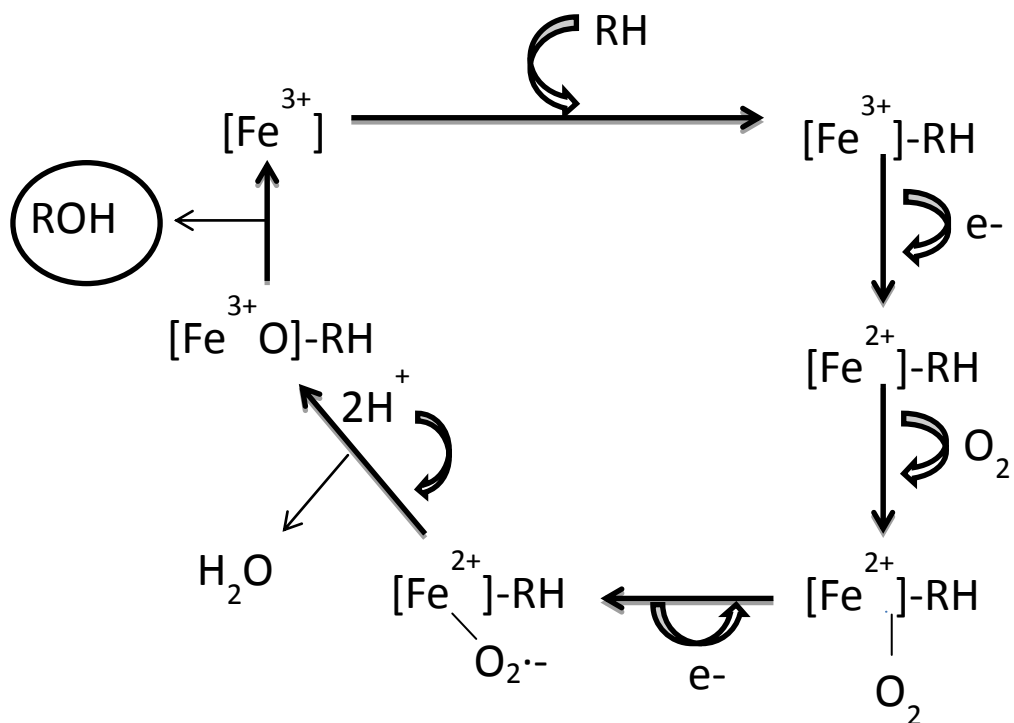


Figura 1. Ciclo simplificado da hidroxilação de um substrato (RH) catalisado por um Citocromo P450. [Fe] representa o heme do grupo prostético catalítico. Fonte: Costa et al. (2004).

Uma forma de se medir a atividade catalítica do Citocromo P450 (ou CYP1A) é através da atividade da enzima 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD). Indução da atividade da EROD hepática em peixes tem sido evidenciada por diversos autores após a exposição aguda a diferentes tipos de contaminantes orgânicos, tais como a fração solúvel do diesel (FSD) (Simonato et al., 2011), óleo cru (Ramachandran et al., 2004) e óleo cru dispersado quimicamente (Ramachandran et al., 2006). Além disso, vários trabalhos já reportaram aumento na atividade da EROD hepática em peixes coletados em locais que sofreram contaminação recente (Jung et al., 2012; Kirby and Law, 2010; Martínez-Gómez et al., 2006) ou possuem histórico de contaminação por petróleo e derivados (Buet et al., 2006;

Damásio et al., 2007; Dévier et al., 2013; Gagnon and Holdway, 2002; Trisciani et al., 2011).

A fase II da biotransformação envolve a conjugação dos xenobióticos ou seus metabólitos, oriundos da fase I, para que ocorra um aumento da solubilidade dos contaminantes em água e, conseqüentemente, aumentos nas taxas de eliminação. A Figura 2 esquematiza como ocorrem as reações na fase I e II da biotransformação. Como observado anteriormente na Figura 1, na fase I ocorrem reações para introduzir um grupo funcional (i.e. -OH) à molécula que está sendo biotransformada. Essa molécula torna-se mais hidrofílica, podendo ser biotransformada, ou apresentar-se menos ou mais reativa que a substância precursora, como, por exemplo, os metabólitos de B[a]P 7,8-dihidrodiol, precursor do 7-8-dihidrodiol-9,10-epóxido, o qual está ligado ao aumento da toxicidade do B[a]P, e pode formar aductos com o DNA. Na fase II podem ocorrer reações de conjugação entre o grupo polar do xenobiótico ou do substrato endógeno (metabólito), o que, geralmente, aumenta a solubilidade desses compostos em água, favorecendo sua eliminação da célula. A enzima glutationa-S-transferase (GST) é uma enzima de papel fundamental na fase II da biotransformação e, através de sua participação na ativação das reações de conjugação dos xenobióticos com o tripeptídeo GSH, ocasiona a eficiente eliminação desses compostos pelo organismo (Rinaldi et al., 2002). Alterações na atividade da GST em órgãos de peixes vêm sendo amplamente descritas em espécies expostas ao petróleo (Gagnon and Holdway, 2000; Jung et al., 2009; Ramachandran et al., 2004) e coletadas em locais contaminados com petróleo e derivados (Tim-Tim et al., 2009).

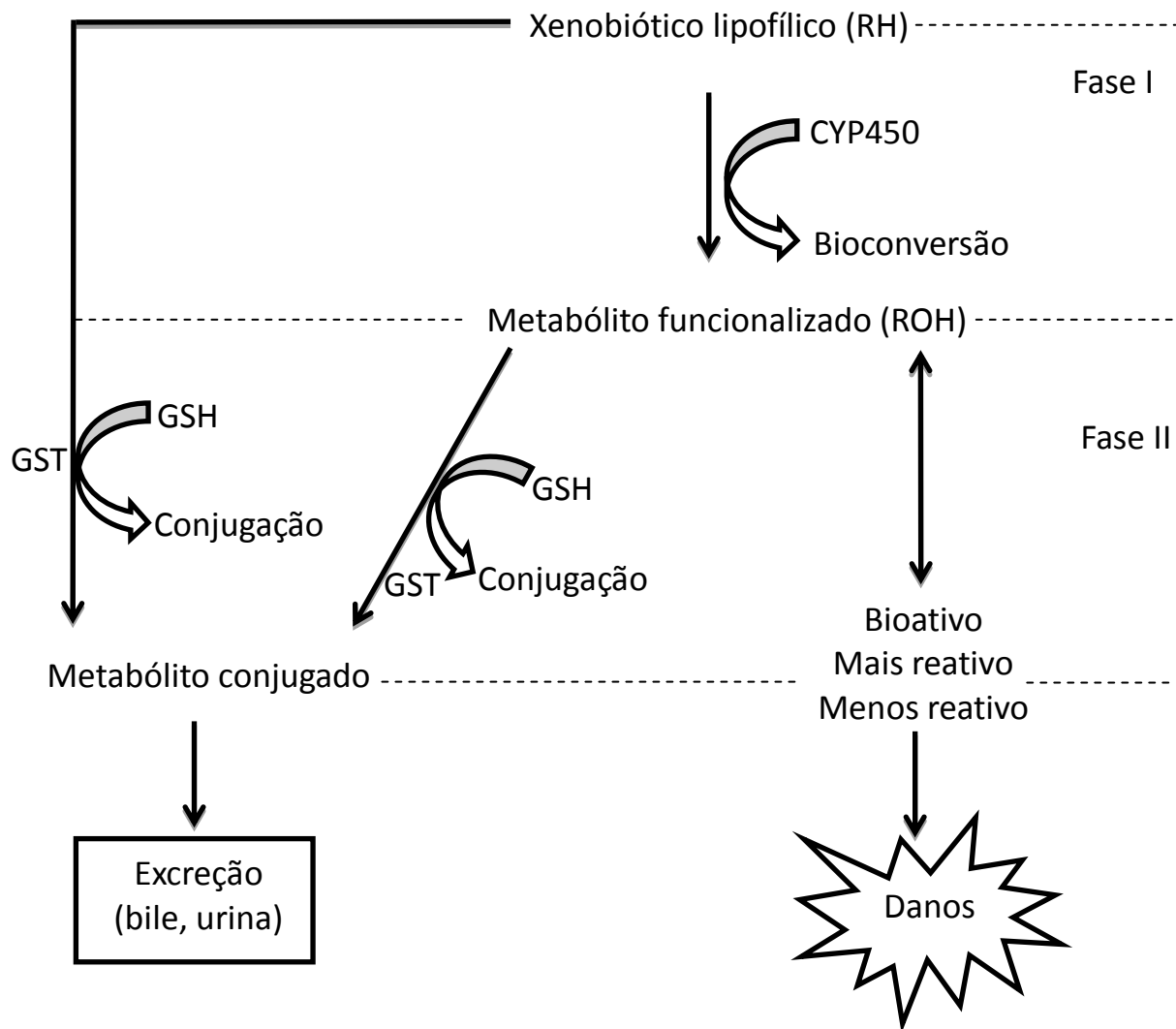


Figura 2. Representação esquemática do metabolismo de xenobióticos durante a fase I e II de biotransformação. Fonte: Modificado de Costa et al. (2004).

Assim, essa cascata de eventos que ocorre durante a biotransformação de xenobióticos nas fases I e II faz com que os metabólitos funcionais e conjugados sejam mais facilmente eliminados, podendo ser então mensurados nos fluidos corpóreos dos animais, como a bile. A excreção dos xenobióticos pelo parênquima hepático depende da absorção dos compostos pelos hepatócitos, da formação e secreção da bile e do transporte desses compostos pela mesma. O transporte de substâncias (como sais biliares, solutos orgânicos e inorgânicos) do sangue para a bile inclui três passos principais. Primeiro, ocorre a absorção

das substâncias presentes no plasma pelos hepatócitos; logo, nos hepatócitos ocorrem os processos de metabolização dessas substâncias, e por fim, os compostos metabolizados ultrapassam a membrana apical dos hepatócitos em direção aos ductos biliares. Nesse processo de excreção, o fígado possui papel fundamental na produção de metabólitos aniônicos polares, os quais são prontamente captados pelos mecanismos de transporte do fígado. Dessa forma, a biotransformação aumenta a eliminação dos xenobióticos pela bile, por meio do aumento de sua solubilidade e sua conjugação com substâncias, como a GSH. Logo, a análise dos metabólitos dos xenobióticos, como os metabólitos de HPA na bile, é considerada um biomarcador eficiente para se demonstrar a exposição recente dos organismos a esses contaminantes, sendo sua utilização amplamente reportada em trabalhos que avaliam a exposição de peixes aos HPAs presentes no ambiente aquático (Aas et al., 2000b; Nongnutch et al., 2012b).

Os mecanismos nos quais os xenobióticos podem aumentar a produção de ROS incluem o ciclo redox, onde um elétron não pareado do metabólito é doado para o oxigênio, formando o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (vide Figura 1). A constante metabolização dos xenobióticos pode gerar várias moléculas de $O_2^{\bullet-}$, as quais podem oxidar lipídios, proteínas e também o DNA. Os organismos aeróbicos, como os peixes, desenvolveram, ao longo da evolução, mecanismos bioquímicos de defesa que minimizam os impactos das ROS. Assim, as enzimas antioxidantes agem no sentido de neutralizar essas ROS geradas durante o metabolismo, tanto inerentes ao funcionamento do organismo, quanto à metabolização de compostos tóxicos exógenos. A enzima superóxido dismutase (SOD) age acelerando a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. Apesar de a SOD reduzir a concentração das moléculas de $O_2^{\bullet-}$ dentro da célula, ela gera, como produto dessa

reação, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 pode ser tóxico sozinho ou na presença de metais de transição como ferro, o qual reage com o H_2O_2 gerando um radical ainda mais reativo, o radical hidroxil ($\bullet OH$), através da reação de Fenton. As peroxidases, como a glutathiona peroxidase (GPx), podem também neutralizar as moléculas de H_2O_2 geradas no processo. No entanto, a GPx pode agir também sobre peróxidos orgânicos (L-OOH), enquanto a enzima catalase (CAT) atua restritamente sobre as moléculas de H_2O_2 . As reações catalisadas pela GPx envolvem a oxidação do substrato (H_2O_2 e peróxidos orgânicos) a seus respectivos álcoois, utilizando a oxidação da GSH (glutathiona reduzida) em GSSG (glutathiona oxidada). Quando o substrato é o H_2O_2 o produto final da reação é a água, e quando o substrato são os peróxidos orgânicos, o produto final é um álcool lipídico (L-OH). A Figura 3 esquematiza a cascata de reações que ocorrem a partir da geração do $O_2^{\bullet -}$ (no ciclo da CYP450 na fase I) até a geração do $\bullet OH$.

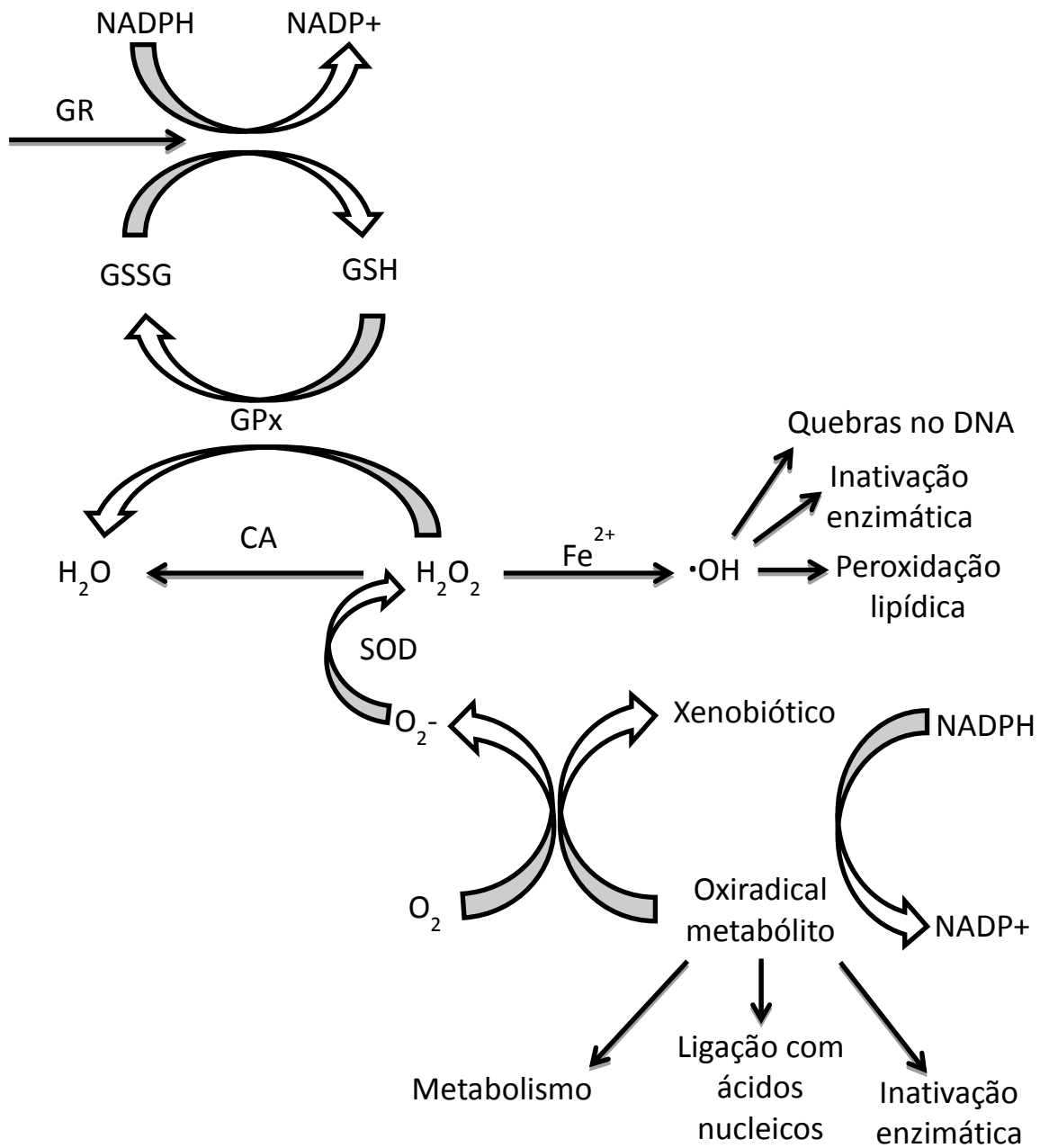


Figura 3. Vias de formação e neutralização das espécies reativas de oxigênio (ROS) na célula. Fonte: Modificado de Di Giulio e Meyer (2008).

Quando existe um desequilíbrio entre a produção de ROS e sua neutralização pelas enzimas antioxidantes, o processo denominado estresse oxidativo acontece. Apesar da geração de ROS ser, até certo ponto, benéfica para os organismos, uma vez que esses compostos podem sinalizar a necessidade do aumento da capacidade antioxidante, quando exacerbada, sua presença pode oxidar lipídios, proteínas e DNA. Nesse contexto, a medida desses danos causados em função do desequilíbrio entre os pró-oxidantes e antioxidantes caracteriza-se como *biomarcadores de efeito*.

Os biomarcadores de efeito, em geral, não são específicos em relação aos estressores, não fornecendo informações sobre a sua natureza, mas são característicos da ocorrência de um estresse que poderá ser reversível tão logo o estressor cesse a atuação. Entretanto, se esse mecanismo falha, ou se sua capacidade de resposta é ultrapassada, poderão ser desencadeadas alterações morfo-fisiológicas nos animais que podem ser irreversíveis, dependendo da capacidade do sistema ou do órgão alvo em conter o efeito tóxico do estressor. Nesse ponto, a peroxidação das membranas plasmáticas pode ser ocasionada pela presença das espécies reativas de oxigênio geradas a partir da absorção dos contaminantes pelos organismos aquáticos. As membranas celulares são formadas pelos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), sendo que esses são muito susceptíveis à oxidação devido à presença de duplas ligações, que geram enfraquecimento do hidrogênio alílico. A reação de peroxidação das membranas se inicia quando existe a subtração do hidrogênio alílico, adjacente ao carbono que faz dupla ligação, pelas ROS como $\bullet\text{OH}$, formando, dessa maneira, um peroxiradical de lipídio (L-OOH). Assim, uma molécula de $\bullet\text{OH}$ pode gerar a propagação da peroxidação lipídica, a qual resulta em alterações na fluidez e permeabilidade das membranas, comprometendo as funções celulares e tissulares dos

animais. Da mesma forma, as ROS podem interagir com o DNA e causar danos oxidativos nessa macromolécula. A oxidação direta das bases do DNA pelas ROS, na maior parte, é realizada através da molécula de $\bullet\text{OH}$, no qual é a ROS mais reativa. Além disso, a metabolização dos xenobióticos pode formar metabólitos altamente reativos com o DNA. Segundo Mídio e Martins (2000), agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando aductos, alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA.

Assim, nesse contexto, vemos que os organismos aquáticos, como é o caso dos peixes, apresentam um complexo sistema de biotransformação e antioxidantes que atuam em cascata na tentativa de amenizar, ou inibir, a ação dos poluentes presentes nesses ambientes. No entanto, a magnitude dessas respostas está diretamente relacionada a diversos fatores como, (i) espécie alvo; (ii) tipo e propriedades químicas do contaminante, (iii) dose, (iv) tempo de exposição e (v) qualidade e dinâmica do ambiente aquático.

A presente tese teve como objetivo geral determinar os efeitos da exposição a diferentes concentrações subletais do petróleo e seus derivados nas respostas de biomarcadores de exposição e efeito em diferentes espécies de peixes da região amazônica, mais especificamente do Rio Negro-AM, avaliando, também, o papel das propriedades físicas e químicas da água sobre a toxicidade destes compostos aos peixes. Assim, no capítulo 1 foram verificadas as respostas dos biomarcadores de exposição e efeito em função da dose injetada intraperitonealmente do HPA B[a]P em uma espécie de peixe de grande importância comercial na Amazônia, o tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818). Os biomarcadores mais relevantes selecionados por este estudo foram utilizados nos estudos apresentados no Capítulo 2, que teve como objetivo avaliar a influência da presença

de altas concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) e baixa concentração de sais dissolvidos na água, características próprias do Rio Negro-AM, nas respostas desses biomarcadores no tambaqui em função da exposição ao óleo cru de Urucu-AM, e também do uso de dispersante químico como ação mitigadora ao derramamento de óleo.

Durante o decorrer deste trabalho, ocorreu um acidente com uma balsa que carregava cerca de 60 mil litros de petróleo asfáltico no porto São Raimundo, localizado na margem esquerda do Rio Negro-AM, em Manaus. Em face desta contaminação do ambiente aquático pelo produto asfáltico, realizamos a validação dos biomarcadores estudados e selecionados no Capítulo 1 e 2 para duas espécies de peixes residentes encontradas na área impactada, utilizando uma situação real onde a entrada acidental de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) do petróleo no Rio Negro pôde ser avaliada. Nesse “estudo de caso” (Capítulo 3) verificamos a aplicabilidade e robustez dos biomarcadores estudados como ferramentas efetivas para se evidenciar efeitos tóxicos dos HPA para as espécies residentes do Rio Negro-AM em função da exposição à HPA do petróleo.

Objetivo geral, objetivos específicos e hipóteses de cada capítulo

Capítulo 1: O primeiro capítulo da tese objetivou avaliar e entender as respostas dos biomarcadores de exposição e efeito em função de diferentes concentrações do HPA modelo, B[a]P, em uma espécie de grande importância biológica e econômica na região amazônica, *Colossoma macropomum* (tambaqui). Uma vez que não existem estudos relacionando as respostas dependentes da dose dos biomarcadores nessa espécie em função da contaminação por HPA, como o B[a]P, tais informações são de suma importância para a

escolha de potenciais biomarcadores para o monitoramento ambiental em ambientes de água doce, como a Amazônia.

Objetivo específico 1: Verificar a existência de diferenças entre as respostas dos biomarcadores de exposição e efeito nos tambaquis em função das doses de B[a]P injetadas intraperitonealmente;

Hipótese 0: Não existe alterações das respostas dos biomarcadores de exposição e efeito em função da dose de B[a]P injetada intraperitonealmente.

Objetivo específico 2: Correlacionar as respostas dos biomarcadores de exposição e efeito entre si objetivando estabelecer potenciais conjuntos de biomarcadores para o monitoramento de áreas potencialmente impactadas com os HPA.

Hipótese 0: Não existe uma correlação entre as respostas dos biomarcadores, independente das doses de B[a]P injetadas.

Capítulo 2: O segundo capítulo da tese buscou avaliar o efeito da qualidade da água na toxicidade aguda do óleo cru de Urucu-AM, e do mesmo óleo em associação com o dispersante químico Corexit 9500[®], em juvenis de tambaqui aclimatados em água com baixa disponibilidade iônica, na ausência de COD (água do poço do INPA), e na presença de COD (água natural do Rio Negro-AM). Para tanto, foram estudadas as respostas de biomarcadores de exposição (metabólitos de HPA na bile; atividade das enzimas de biotransformação EROD, GST e SOD) e de efeito (peroxidação lipídica, enzima sorbitol desidrogenase – SDH no plasma e danos no DNA dos eritrócitos) nos exemplares de tambaqui aclimatados e expostos aos dois tipos de água.

Objetivo específico 3: Avaliar a resposta de biomarcadores de exposição e efeito em função da exposição aguda (24 h) ao dispersante químico Corexit 9500[®], ao óleo cru de Urucu-AM e do mesmo óleo em associação com Corexit 9500[®] em juvenis tambaquis aclimatados em água do poço.

Hipótese 0: Não existe diferença da toxicidade do óleo cru de Urucu-AM e do dispersante químico Corexit 9500[®] sozinhos, ou em associação (óleo cru + Corexit 9500[®]), para os juvenis de tambaquis mantidos em água do poço.

Objetivo específico 4: Avaliar a resposta de biomarcadores de exposição e efeito em função da exposição aguda (24 h) ao dispersante química Corexit 9500[®], ao óleo cru de Urucu-AM e do mesmo óleo em associação com Corexit 9500[®] em juvenis de tambaquis aclimatados em água natural do Rio Negro-AM.

Hipótese 0: Não existe diferença da toxicidade do óleo cru de Urucu-AM e do dispersante químico Corexit 9500[®] sozinhos ou em associação (óleo cru + Corexit 9500[®]) para os juvenis de tambaquis mantidos em água do Rio Negro-AM.

Objetivo específico 5: Comparar as respostas dos biomarcadores de exposição e efeito nos animais em diferentes regimes de aclimação (água do poço x água natural do Rio Negro), em função da exposição aguda ao dispersante químico Corexit 9500[®], ao óleo cru de Urucu-AM e do mesmo óleo em associação com Corexit 9500[®].

Hipótese 0: Não existe diferença da toxicidade do óleo cru de Urucu-AM e do dispersante químico Corexit 9500[®], sozinhos ou em associação (óleo cru + Corexit 9500[®]), em água sem COD (água do poço) e com COD (água natural do Rio Negro), para os juvenis de tambaquis.

Capítulo 3: O terceiro capítulo da tese refere-se ao monitoramento da qualidade de água da área portuária do Rio Negro-Manaus-AM (porto São Raimundo) impactada pelo derramamento acidental do derivado de petróleo CAP. Para tanto, foram feitas análises de biomarcadores de exposição e efeito em duas espécies de peixes pertencentes à família Cichlidae, *Acarichthys heckelii* e *Satanoperca jurupari*, coletados na área impactada, comparando suas respostas com a de exemplares das mesmas espécies residentes em uma área referência não impactada do Rio Negro-AM.

Objetivo específico 6: Avaliar temporalmente a qualidade da água do porto São Raimundo-AM em termos da presença dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) do petróleo após o derramamento de CAP.

Hipótese 0: Não existem alterações na concentração dos HPA da água do porto São Raimundo-AM em função das coletas temporais após o derramamento de CAP.

Objetivo específico 7: Verificar os padrões de resposta dos biomarcadores de exposição e efeito estudados em *A. heckelii* e *S. jurupari* em função de coletas temporais após o derramamento de CAP.

Hipótese 0: Não existem alterações nas respostas dos biomarcadores de exposição e efeito estudados em *A. heckelii* e *S. jurupari* em função de coletas temporais após o derramamento de CAP.

Objetivo específico 8: Realizar uma análise integrada dos dados biológicos e ambientais.

Hipótese 0: Não existe relação estatística entre as respostas dos biomarcadores de exposição e efeito estudados e a concentração dos HPA encontrados na água nas coletas realizadas para ambas as espécies estudadas.

**CAPÍTULO 1. Validation of a Suite of Biomarkers of Fish Health in the
Tropical Bioindicator Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**

- *Artigo submetido à revista Ecological Indicators*

Palavras-chave: Tambaqui; BaP; Biomarkers; CAT; SOD; EROD activity; s-SDH; GST;

LPO

Abstract

This experimental work was designed to explore the dose-dependent responses of the tropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*) intraperitoneally injected with benzo [a] pyrene (BaP). A range of BaP doses included 0 (carrier control), 1, 10, 100 and 1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{kg}^{-1}$. The hepatic ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity showed a bell-shaped dose-dependent response curve, where the highest injected BaP dose caused enzyme inactivation. Activities of hepatic catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) increased at the highest injected dose relative to the carrier control group. Lipid peroxidation (LPO), serum-sorbitol dehydrogenase (s-SDH) and DNA damage in blood cells were higher in all BaP injected doses when compared to the carrier control group. At high dosage, the production of BaP metabolites was paralleled by induced activities of antioxidant enzymes SOD and high DNA damage in blood cells. In a similar way, high LPO was concomitant to elevated s-SDH in the bloodstream, suggesting that lipid peroxidation caused the loss of membrane integrity and leakage of s-SDH from hepatocytes into the bloodstream. Moreover, these biomarkers were positively correlated among themselves. The results demonstrate the potential use of a suite of biomarkers in tambaqui living in contaminated tropical aquatic environments, in particular, the analysis of DNA damage in blood cells which were highly correlated with all other analyzed biomarkers.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are of major concern in contaminated aquatic environments (Abdel-Shafy and Mansour, 2015; Manoli and Samara, 1999). This is especially true for tropical environments which have been the recipients of urban and industrial contamination due to uncontrolled population growth and rapid industrialization (United Nations, 1987). PAHs are highly lipophilic and tend to adsorb suspended particulate material or accumulate in sediment, which facilitates its bioavailability to the fish inhabiting contaminated environments (Hylland, 2006; Paine et al., 1996). While many studies have identified biomarker tools in an array of bioindicators in well-developed countries from temperate regions (Almeida et al., 2012; Dû-Lacoste et al., 2013), very few studies are available for tropical environments. There is a scarcity of bioindicators relevant to tropical ecosystems and, consequently, few biomarkers have been validated to study the impacts of contamination by PAHs in organisms living in these environments.

Among PAHs, benzo[a]pyrene (BaP) is the most extensively studied compound and has been used as a model contaminant for ecotoxicological studies (Almeida et al., 2012). This compound is known for its carcinogenic and mutagenic effects. However, these characteristics become apparent only after its metabolism by the organisms in a process called bioactivation. Epoxide, diol epoxide and hydro metabolites are primary and secondary metabolites generated after BaP oxidation by the cytochrome P450 and monooxygenases are formed in the phase I of the biotransformation processes (Miller and Ramos, 2001; Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004; Shimada, 2006). One way of measuring the catalytic activity of cytochrome P450 is via the ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity. Several authors reported the induction of hepatic EROD activity in fish acutely

exposed to different types of contaminants, such as soluble fraction of diesel fuel (Simonato et al., 2011), crude oil (Ramachandran et al., 2004) and chemically dispersed crude oil (Ramachandran et al., 2006). In addition, several field studies have reported increased activity of hepatic EROD in fish collected in areas that have suffered recent contamination (Jung et al., 2012; Martínez-Gómez et al., 2006) or have a history of contamination by oil and oil products (Buet et al., 2006; Dévier et al., 2013; Gagnon and Holdway, 2002; Trisciani et al., 2011).

Phase II of biotransformation consists in conjugation reactions of the BaP primary and secondary metabolites with polar molecules, such as glutathione, facilitating excretion and elimination of the final product (Timbrell, 2015). The glutathione S-transferase (GST) plays a fundamental role in Phase II of biotransformation participating in the conjugation reactions of the xenobiotic with the exogenous tripeptide reduced glutathione (GSH) and resulting in the efficient elimination of the metabolites from the organism (Rinaldi et al., 2002). GST has been considered a reliable biomarker in a variety of fish species exposed to PAHs in both laboratory studies (Simonato et al., 2011) and field investigations (Tim-Tim et al., 2009).

Glutathione peroxidase (GPx) is another antioxidant enzyme that catalysis the metabolism of oxidizing compounds, a process which involves the oxidation of reduced GSH to its oxidized form (van der Oost et al., 2003). GPx is also involved in reducing lipid hydroxyperoxides to their corresponding alcohols making them more water soluble, as well as reducing free H_2O_2 to water.

A continuous production of reactive oxygen species (ROS) is an inevitable result of NADPH consumption by the cytochrome P450 during the metabolism of BaP (Wiernsperger, 2003). ROS, such as OH, peroxy and hydroxyl radicals can oxidize essential biological molecules, like lipids, proteins, carbohydrates and DNA (Halliwell, 2011). Thus, the interaction of these free radicals with biomembranes induce disturbances in their delicate structure, integrity, fluidity and permeability, as well as loss of functionality as a result of lipid peroxidation (LPO) (Niki, 2009; Wiernsperger, 2003). Damage to the lipid bilayer, i.e. lipoperoxidation, is considered a significant cause of cell injury and death following exposure to contaminants (Modesto and Martinez, 2010). Antioxidant enzymes play an important role in neutralizing the effects of ROS molecules in biological membranes. For example, superoxide dismutase (SOD), the first enzyme in the line of antioxidant defense, acts in neutralizing the superoxide radicals generating hydrogen peroxide which, in turn, is neutralized by the catalase (CAT).

The measurement of biomarkers of exposure such as PAH biliary metabolite levels; activity of the enzymes involved in biotransformation of contaminants (EROD and GST); and neutralization of ROS (SOD, CAT and GPx), along with the analysis of the failures of these systems, such as oxidation of lipids and carbohydrates (which can be measured through LPO), and the oxidation of proteins, such as DNA (which can be measure by DNA damage), are commonly used as biomarkers of water contamination (van der Oost et al., 2003). The responses of these biomarkers can be species-specific and vary depending on the type of contaminant, the dose and the time of exposure. Thus, the validation of biomarkers in a relevant bioindicator species might help the understanding of toxic effects of PAHs on aquatic organisms.

Taking into account the widespread contamination of tropical aquatic environments by petroleum hydrocarbons and the rarity of bioindicator species relevant to tropical waterbodies, the present work aims to (i) validate the dose-dependent responses of the fish tambaqui (*Colossoma macropomum*) intraperitoneally injected (IP) with different doses of BaP, through the correlations between each biomarker and BaP doses; and (ii) correlate biomarker responses to select the most relevant suite of biomarkers for monitoring tropical aquatic environments contaminated with PAHs. The tambaqui was chosen as model fish species due its high economic and scientific importance in tropical regions including South America and Asia (Campos-baca and Kohler, 2005; Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2016; Liao et al., 2001; Val and Almeida-Val, 1995; Val et al., 2005), its widespread availability from aquaculture ventures, and because this fish species is very resistant to environmental challenges (Val and Almeida-Val, 1995; Val et al., 2005).

2. Material and Methods

Fish and experimental protocol

All experimental and holding procedures followed the Brazilian Animal Care Guidelines and were previously approved by INPA's Animal Care Committee (Protocol number: 022/2012). Juveniles of tambaqui (n= 75; weight: 50.73 ± 2.12 g and length: 13.32 ± 0.21 ; mean \pm SD), were purchased from a local fish farm (Fazenda Santo Antônio, Amazonas, Brasil) and brought to LEEM/INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). Fish were kept outdoors for at least 60 days in 3000-L polyethylene tanks with INPA's ground water continuously aerated (average composition: Na^+ : $43\mu\text{mol/L}$; Cl^- : $31\mu\text{mol/L}$; K^+ : $10\mu\text{mol/L}$; Ca^{2+} : $9\mu\text{mol/L}$; Mg^{2+} : $4\mu\text{mol/L}$; pH 6; 28°C ; $6.40\text{ mg of dissolved O}_2/\text{L}$ and temperature of 29°C) with a flow-through rate of 1200 mL/min . Animals were fed with dry

food pellets (26% protein content, Nutripeixe, Purina®) twice a day. Feeding was suspended 2 days prior to the experiments. The animals were anesthetized in aerated water containing neutral MS-222 (0.5 g l⁻¹ MS-222 and 1 g l⁻¹ NaHCO₃, Sigma Aldrich), then intraperitoneally injected (IP) with five BaP concentrations, 0 (carrier controls), 1; 10; 100 and 1000 µmolar BaP·kg⁻¹. Injection solutions were freshly made and prepared so that each fish received the same volume of carrier solution (0.5 ml of corn oil, Sigma Aldrich). After the injection, the animals were held in 2000-L polyethylene tanks, in the same water with continuous aeration for 96 hours. Thereafter, blood samples were drawn from the caudal vein of fish anesthetized in neutral buffered MS-222 (1 g l⁻¹ MS-222 and 2 g l⁻¹ NaHCO₃, Sigma Aldrich). Fish were then killed by severing the spine, measured and weighted. Immediately after that, the spleen and liver were removed and stored at -80°C until analysis.

BaP-type metabolites in fish bile

The term ‘type of metabolites’ is used because the fixed fluorescence technique detects groups of metabolites originating from a common parent compound fluorescing at a common wavelength (Lin et al., 1996). The BaP-type metabolites concentration in fish bile was determined by fixed fluorescence (FF) measurements according to Lin et al. (1996). Bile samples were diluted in 50/50 HPLC-grade methanol-water in the proportion of 1:1000 (bile:methanol) and read at EX 380 nm and EM 430 nm. The reference standard for B[a]P-type was 1-OH pyrene (also known as 1-pyrenol). Samples were read on a spectrofluorimeter with slit width of 10 nm, against a standard curve. The B[a]P-type metabolites are reported in µg BaP-type met mg pr⁻¹.

Biotransformation enzymes

Hepatic EROD activity was assessed by the fluorimetric method described in Webb et al. (2005). The post mitochondrial supernatant (PMS) was obtained through the liver homogenized (1:4 w:v) in HEPES homogenization buffer pH 7.5 (0.02 M HEPES and 0.015 M KCL) and centrifuged at 12,000g for 20 min at 4°C. The PMS (50 µl) was added to the reaction mixture (1250 µl 0.1 M HEPES buffer; 10 µl of 1.28M MgSO₄; 30 µl of 0.5 mM NADPH and 50 µl of 40 mg/ml bovine serum albumin-BSA). The reaction started with the addition of 20 µl of 0.12 mM ethoxyresorufin; after 2 min, the addition of 2500 µl of HPLC-grade methanol stopped the reaction. The protein precipitate resulting from the addition of methanol was spun down and the amount of resorufin produced was measured on a spectrofluorimeter at EX wavelength 530 nm and EM wavelength 585 nm. The amount of resorufin was calculated from a resorufin standard curve varying from 0.000 to 0.085 M, and readings were relative to a blank fluorescence. EROD activity is expressed as picomol of resorufin produced per milligram protein per minute (pmol mg protein⁻¹ min⁻¹).

Hepatic GST activity was determined as described by Keen et al. (1976) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate. Supernatant was obtained homogenizing the liver (1:10 w:v) in a cold buffer solution (20 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 500 mM Sucrose, 150 mM KCL, pH 7.6) and centrifuged at 9000g for 30 min at 4°C. The change in absorbance was recorded on a spectrophotometer at 340 nm. The enzymatic activity was calculated as nmol CDNB conjugate formed per minute per milligram protein (nmol min⁻¹ mg pr⁻¹) using a molar extinction coefficient of 9.6 mM cm⁻¹.

Oxidative stress enzymes

The protocol to obtain the supernatant for CAT, SOD and GPx activities was the same as the one described for GST supernatant.

Hepatic CAT activity was determined as described by Beutler (1975). The rate of enzymatic decomposition of H₂O₂ was measured in a spectrophotometer at the absorbance of 240 nm. Enzyme activity was expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$.

Hepatic Copper–zinc SOD (SOD) activity was determined according to McCord and Fridovich (1969). This method measures the inhibition of the reduction rate of cytochrome c by the superoxide radical, read on a spectrophotometer at 550 nm and 25°C. SOD activity was expressed in units of SOD per mg of protein ($\text{U} \cdot \text{mg pr}^{-1}$), with one U of SOD corresponding to the quantity of enzyme that caused 50% inhibition in the reduction rate of cytochrome c.

Hepatic Selenium-dependent GPx (GPx) activity was determined by the method of Hopkins and Tudhope (1973), based on NADPH oxidation in the presence of GSH (0.95 mM) and H₂O₂ measured in a spectrophotometer at 340 nm. GPx activity was expressed in $\mu\text{mol oxidized NADPH min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ using a molar extinction coefficient of $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Lipid peroxidation (LPO)

The LPO concentration in liver was quantified according to Jiang et al. (1991). This method is based on the oxidation of the Fe⁺² to Fe⁺³ by hydroperoxides in an acid medium in the presence of ferrous oxidation-xylenol orange, read at 560 nm.

Protein determination

Liver supernatant, the same used for the enzymes analysis, was used to measure the total protein content was determined according to Bradford (1976) using a spectrophotometer at 595 nm and bovine serum albumin as standard.

Serum Sorbitol Dehydrogenase (s-SDH) activity

Following blood collection, the serum was isolated after centrifugation at 5000 rpm for 10 min. The serum was kept at -80°C until the s-SDH determination according to Webb and Gagnon (2007). For s-SDH measurements, 50 µl of serum was placed in 450 µl of 0.1 M Tris Buffer pH 7.5 and incubated for 10 min at room temperature, after which 100 µl of 4 M fructose solution was added and the linear rate of the decrease in absorbance over one minute at 340 nm was measured on a spectrophotometer. The enzymatic activity of the s-SDH is expressed as milli-international Units (mIU) of s-SDH activity.

DNA damage in blood cells (comet assay)

The DNA damage in blood cells was assessed by the comet assay (alkali method) described by Singh et al. (1988) for lymphocytes and modified by Da Silva et al. (2000) for peripheral blood cells. Microscope slides were dipped into 1.5% normal melting agarose (NMA) prepared in phosphate-buffered saline (PBS). Each slide was coated with 1.0% NMA in PBS, and then covered with a coverslip. Subsequently, blood (7-10 µl) mixed with 95 µl of 0.75% low melting point agarose (LMA) (Gibco BRL) was spread on the slide and allowed to solidify. After removal of the coverslip, the slides were immersed in freshly prepared cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris; pH 10-10.5; 1% Triton X-100 and 10% DMSO) overnight. Then, the slides were placed in the electrophoresis chamber, filled with freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH

12.6) for 20 min at 300 mA and 25 V in an ice bath. After electrophoresis, the slides were washed with 0.4 M Tris buffer, pH 7.5 and submerged in silver solution (5% sodium carbonate, 0,1% ammonia nitrate, 0,1% silver nitrate 0,25% Silicotungstic acid and 0,15% formaldehyde). Images of 100 randomly selected cells (100 cells from each of two replicate slides) were analyzed in an optical microscope (Leica DM205) at 100x magnification. Cells were scored visually into five classes, according to tail size (from undamaged -0 to maximally damaged -4) and a value was assigned to each comet according to its class. The final overall rating for the slide i.e. the DNA damage score (Genetic Damage Index, GDI), was between 0 (intact) and 400 (maximum damage), and was obtained by summation according Kobayashi et al. (1995).

Statistical Analysis

The data is represented as mean \pm standard error of the mean (mean \pm SEM). Prior the comparative statistical tests, distribution and homogeneity of data were checked. One-Way analysis of variance (ANOVA) followed by the Holm-Sidack post hoc test were applied to verify differences in all analyzed biomarkers between fish intraperitoneally injected with different benzo [a] pyrene doses (0 (corn oil); 1; 10; 100 and 1000 μ Molar Kg⁻¹). When data violated the premises of One-Way ANOVA test, a non-parametric Kruskal–Wallis test was used. Pearson correlation was applied to identify the interactions between all analyzed biomarkers. Statistical significance was accepted at the level of $P \leq 0.05$.

3. Results

BaP-type metabolites in fish bile

The BaP-type metabolites in fish bile vary from 10 to 1850 $\mu\text{g metabolite mg protein}^{-1}$. Significant increases ($P < 0.05$) of 189; 92; 102 and 84 folds were measured in tambaqui IP-injected with 1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{Kg}^{-1}$ relative to the carrier control group; 1; 10 and 100 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{Kg}^{-1}$, respectively (Figure 1).

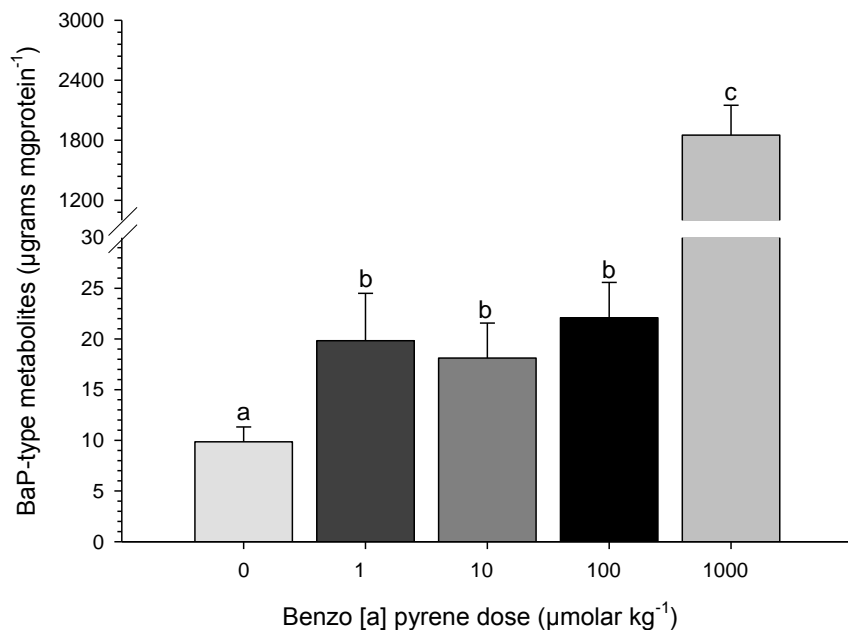


Figure 1. BaP-type metabolites in bile of tambaqui intraperitoneally injected (IP) with five BaP concentrations, 0 (carrier controls), 1; 10; 100 and 1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{kg}^{-1}$. Columns represent means and vertical lines represent SEM (N= 15 for each IP dose). Different letters indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) between the IP doses.

Biotransformation enzymes

Hepatic EROD activity varied from 47 to 75 $\text{picomol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ (Figure 2A).

Increases ($P < 0.05$) of 1.6 fold relative to the carrier control group were measured only in tambaqui treated with 100 $\mu\text{molar BaP Kg}^{-1}$. However, the group injected with the highest

dose of 1000 $\mu\text{molar BaP Kg}^{-1}$ had a similar EROD activity to the carrier control ($P = 0.224$).

Hepatic GST activity varied from 2.9 to 6.2 $\mu\text{mol CDNB min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ (Figure 2B). Increases ($P < 0.05$) of 1.9 fold over the carrier control group were measured only in tambaqui injected with 1000 $\mu\text{molar BaP Kg}^{-1}$.

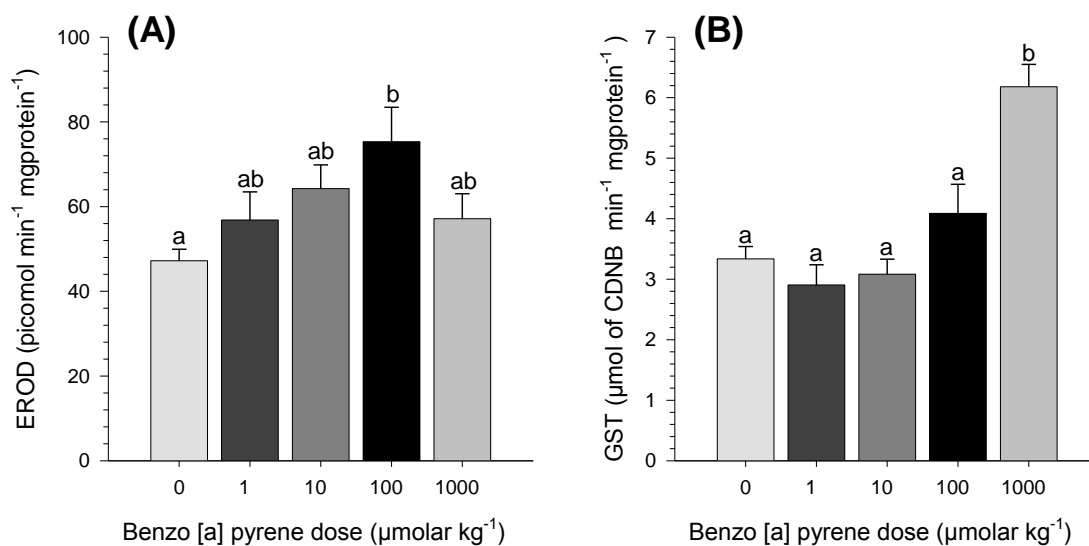


Figure 2. Hepatic (A) ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) and (B) glutathione S-transferase (GST) of tambaqui intraperitoneally injected (IP) with five BaP concentrations, 0 (carrier controls), 1; 10; 100 and 1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{kg}^{-1}$. Columns represent means and vertical lines represent SEM ($N= 15$ for each IP dose). Different letters indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) between the IP doses.

Oxidative stress enzymes

Hepatic SOD activity varied from 333 to 493 $\text{U SOD min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$. Significant increases ($P < 0.05$) of 1.5 and 1.4 fold were observed only in tambaqui injected with 100 $\mu\text{molar BaP Kg}^{-1}$ relative to the carrier control group and to the 10 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{Kg}^{-1}$ injected group, respectively (Figure 3A).

Hepatic GPx activity varied from 4.7 to 6.6 $\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mg pr}^{-1}$. No differences ($P > 0.05$) were observed between the groups that were IP-injected with different doses of BaP (Figure 3B).

Hepatic CAT activity varied from 28.4 to 47.2 $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg pr}^{-1}$. No statistical differences ($P > 0.05$) in CAT activity levels were observed between the treatments (Figure 3C).

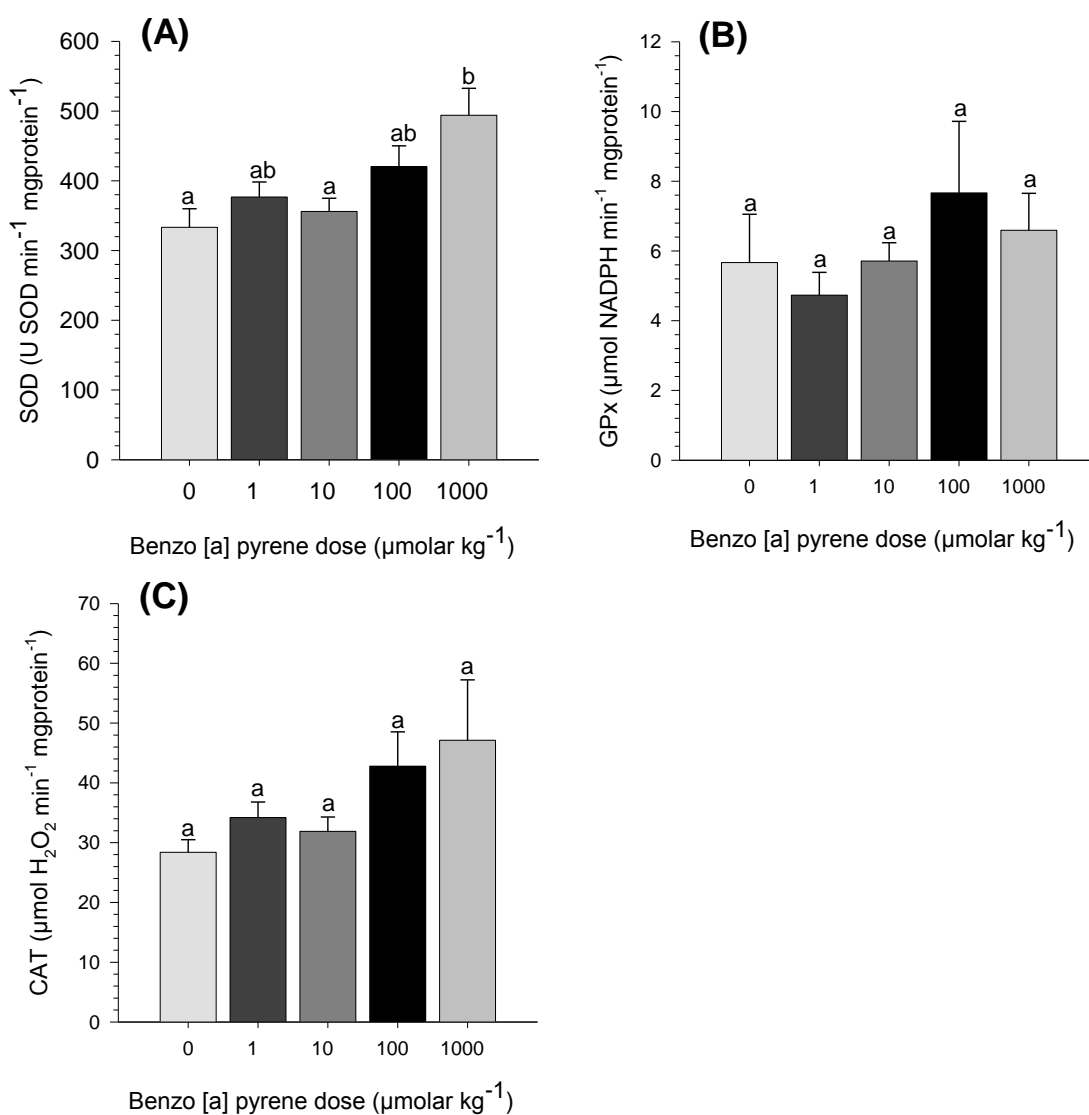


Figure 3. Hepatic (A) superoxide dismutase (SOD), (B) glutathione peroxidase (GPx) and (C) catalase (CAT) of tambaqui intraperitoneally injected (IP) with five BaP concentrations, 0 (carrier controls), 1; 10; 100 and 1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{kg}^{-1}$. Columns represent means and vertical lines represent SEM (N= 15 for each IP dose). Different letters indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) between the IP doses.

Lipid peroxidation (LPO)

LPO concentrations in liver varied from 566 to 802 $\mu\text{mol of CHP mg pr}^{-1}$. Statistically significant increases ($P < 0.05$) were observed in tambaqui IP-injected with 10, 100 and 1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{Kg}^{-1}$ with CHP mg pr^{-1} levels being 1.6, 1.5 and 1.5 fold higher relative to the carrier control group (Figure 4A).

Serum sorbitol dehydrogenase (s-SDH) activity

The s-SDH activity in the plasma varied from 34 to 102 mIU. s-SDH activity seemed to follow a dose-dependent increase with progressively higher s-SDH activities with higher BaP doses. Increases ($P < 0.05$) of 1.2; 2.8 and 3 fold were observed in tambaqui IP-injected with 10; 100; and 1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{Kg}^{-1}$, respectively, relative to the carrier control group (Figure 4B).

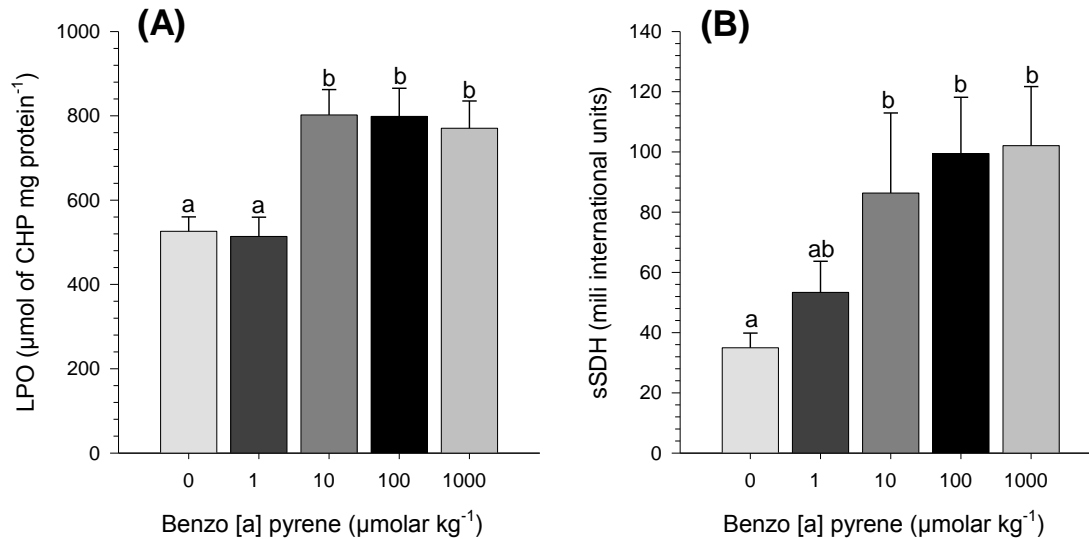


Figure 4. (A) Hepatic lipid peroxidation (LPO) and (B) serum sorbitol dehydrogenase (sSDH) of tambaqui intraperitoneally injected (IP) with five BaP concentrations, 0 (carrier controls), 1; 10; 100 and 1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{kg}^{-1}$. Columns represent means and vertical lines represent SEM (N= 15 for each IP dose). Different letters indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) between the IP doses.

DNA damage in blood cells (comet assay)

DNA damage in blood cells varied from 38 to 300 (comet classes 0-400). Increases ($P < 0.05$) of 5.0; 5.4; 5.5; and 8.0 fold, respectively, were observed in tambaqui treated with 1, 10, 100 and 1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{Kg}^{-1}$ relative to the carrier control group (Figure 5).

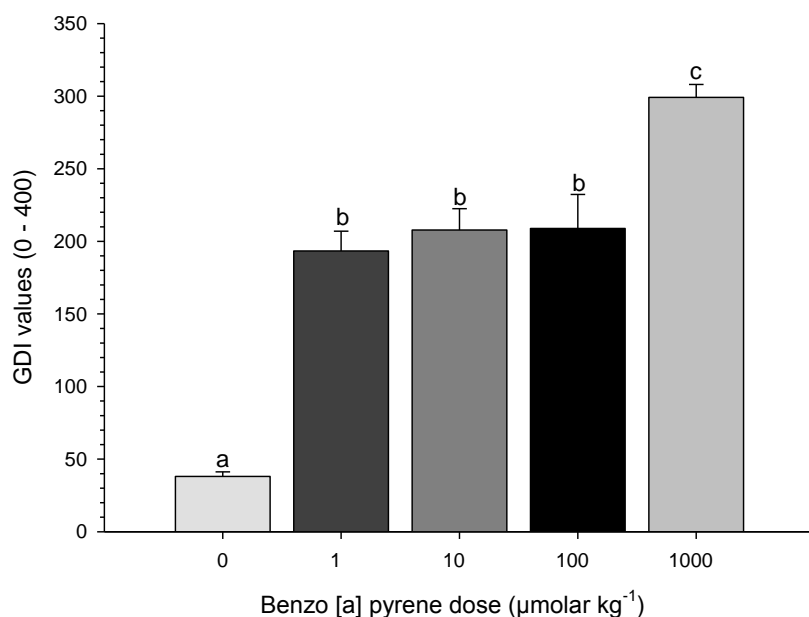


Figure 5. Genetic Damage Index (GDI) in blood cells of tambaqui intraperitoneally injected (IP) with five BaP concentrations, 0 (carrier controls), 1; 10; 100 and 1000 μmolar BaP·kg⁻¹. Columns represent means and vertical lines represent SEM (N= 15 for each IP dose). Different letters indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) between the IP doses.

Correlation analysis

The Pearson correlations performed between the biomarkers showed that some biomarkers were positively correlated ($P < 0.05$). EROD activity was positively correlated with SOD activity. The GST was positively correlated with the enzymatic activities of CAT and SOD, and with blood cell DNA damage and BaP-type metabolites in bile. The CAT activity was positively correlated with SOD activity and DNA damage in blood cells. The SOD activity was positively correlated with s-SDH activity and DNA damage in blood cells. The s-SDH activity was positively correlated with DNA damage in blood cells, and finally the DNA damage in blood cells was positively correlated with BaP-type biliary metabolites (Table I).

Table I. Observed Pearson correlations between the biomarkers of tambaqui intraperitoneally injected (IP) with five BaP concentrations, 0 (carrier controls), 1; 10; 100 and 1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{kg}^{-1}$. Highlighted values represents significant correlations ($P<0,05$).

	EROD	GST	CAT	SOD	GPx	LPO	sSDH	DNA damage
GST	-0.094							
CAT	0.147	0.371						
SOD	0.272	0.410	0.319					
GPx	0.093	-0.003	-0.072	0.271				
LPO	0.167	0.095	0.214	0.148	-0.005			
sSDH	0.066	0.270	0.097	0.260	-0.002	0.315		
DNA damage	0.133	0.491	0.272	0.417	0.096	0.464	0.387	
BaP-type metabolites	-0.126	0.657	0.175	0.320	0.057	0.142	0.190	0.548

4. Discussion

The present work studied a set of biomarkers (biliary BaP-type metabolites, EROD, GST, CAT, SOD, GPx, LPO, s-SDH and DNA damage in blood cells) widely used in the assessment of aquatic pollution in tambaqui, a tropical bioindicator fish species of high economic and scientific importance in South America and Asia (Campos-baca and Kohler, 2005; Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2016; Liao et al., 2001; Val and Almeida-Val, 1995; Val et al., 2005). Intraperitoneal injections of the contaminant BaP were administrated at five different doses to assess if a dose-response can be established 96 h post-injection. Furthermore, a correlation analysis between biomarkers was performed in order to identify which set of biomarkers would be most relevant for environmental monitoring of contaminated aquatic environments.

Fish injected with 100 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{Kg}^{-1}$ had the highest hepatic EROD activity, indicating that Phase I biotransformation enzymes were activated in order to metabolize the BaP, as already reported in other studies (Almeida et al., 2012; Jönsson et al., 2009; Lu et al., 2009). Instead, fish injected with the highest BaP dose (1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{Kg}^{-1}$) presented EROD activity similar to the carrier control group (injected with corn oil). According to Gravato and Santos (2002, 2003), the inhibition of the EROD activity following exposure to high BaP doses can be due the increases in the concentration of the highly reactive BaP metabolites, similar to what is observed in the present work. Some fish species can present a bell-shaped dose-dependent response curve of the EROD activity (Bosveld et al., 2002; Lu et al., 2009), where the high levels of pollutants cause enzyme inactivation or inhibition. This is an important factor to consider for investigations using EROD activity as a biomarker in this species, and stresses the relevance of coupling other biomarkers such as PAH biliary metabolites and s-SDH activity to the measurement of EROD activity.

Amongst treatments, BaP biliary metabolite levels do not follow a similar pattern to the one observed for EROD activity, with the 1000 $\mu\text{mol BaP}$ -treated group producing the highest biliary metabolites levels despite the inhibition of EROD activity at this dose. These results support the concept that EROD is actually not the sole enzyme responsible for metabolizing BaP. In fact, a myriad of P450 isoenzymes is known to be responsible for the biotransformation of a variety of xenobiotic compounds in fish (van der Oost et al., 2003). Despite different responses at higher BaP doses, the detection of the PAHs in fish bile is an extremely sensitive measurement which reflects the absorption and metabolization of these compounds by fish (Aas et al., 2000a; Nongnutch et al., 2012a). In fact, PAH metabolites can be measured in fish bile at levels 1000-times higher than in the surrounding waters

(Gagnon and Holdway, 1998). When IP injected, as in the present study, the biotransformation of BaP is still an extremely efficient process in fish, as demonstrated by all fish injected exhibiting higher BaP biliary metabolite levels relative to the carrier control fish after 96 h of the injection. These findings are in accordance with other studies which found high levels of PAHs biliary metabolites, including BaP metabolites, in fish experimentally exposed to these substances (Dû-Lacoste et al., 2013; Nongnutch et al., 2012; Telli-Karakoç et al., 2002) or collected in contaminated areas (Neves et al., 2007; Ribeiro et al., 2013; Ruddock et al., 2002; Trisciani et al., 2011). Moreover, the highest IP BaP dose ($1000 \mu\text{molar Kg}^{-1}$) was statistically higher than all the other doses which indicate that metabolization activity was not inhibited by the high dose of BaP injected.

GST has an important role in Phase II of biotransformation, since this enzyme, together with GSH, acts in the conjugation with exogenous compounds derived or not from Phase I biotransformation. It has been suggested that an increase in GST activity is indicative of efficient removal of xenobiotics from the body (Rinaldi et al., 2002). In the present work, the inactivation of the hepatic EROD activity in the highest BaP dose seems to be compensated by increases in GST activity. Other studies also related the GST activity with the metabolization of BaP (Banni et al., 2009; Gravato and Guilhermino, 2009; Gravato and Santos, 2003; Vieira et al., 2008) while some authors suggest that the GST has no role in the BaP metabolism in fish (Beyer et al., 1997; Collier and Varanasi, 1990; van Schanke et al., 2001; Willett et al., 2000). In the present study, a positive correlation (Table I) was observed between GST activity and levels of biliary BaP-type metabolites, suggesting the potential involvement of this enzyme in the BaP metabolism in tambaqui, especially when fish were subjected to high BaP doses.

The metabolization processes can lead to the generation of reactive oxygen species (ROS). These ROS has been considered a biochemical challenge for fish exposed to PAHs (Regoli et al., 2011). The antioxidant system consists in enzymes like SOD, CAT, and GPx, which are able to neutralize the ROS. The SOD acts by neutralizing the superoxide radicals, generating hydrogen peroxide molecules, which can be further neutralized by the CAT. In the present study, both SOD and CAT enzymes were measured at higher levels in the highest BaP dose (1000 $\mu\text{molar Kg}^{-1}$) which, together with the GST activity, are highly induced to metabolize the high IP dose of BaP. Positive correlations were found between SOD and CAT and between GST and both enzymes (Table 1), suggesting their co-involvement in the BaP metabolism. SOD was also positively correlated with the biliary BaP-type metabolites, which further suggests that this enzyme contributes to ROS neutralization in tambaqui under PAHs exposure. While the GPx activity is also important in ROS elimination and neutralization of peroxides, its activity was not statistically altered by BaP injection in the present study. However, a positive correlation was found between GPx and SOD (Table I). In fish, enzymatic responses following exposure to organic xenobiotics may have no, little or significant change, with different patterns of responses between the enzymes, studied compounds, and fish species (Lemaire et al., 1996; Livingstone et al., 1993). In the present work, the combined action of these antioxidant enzymes resulted in the metabolism of BaP at all injected doses.

The imbalance between the ROS generated and the antioxidant enzymes activity can lead to a ROS overproduction and, as a consequence, may cause oxidative stress at the cellular level (Wiernsperger, 2003). The interaction of ROS with the biological membranes can induce disturbances in the delicate structure, integrity, fluidity and permeability of the cell

membrane, as well as loss of functionality through the products of lipid peroxidation (LPO) (Niki, 2009; Wiernsperger, 2003). In the present study, LPO was observed in tambaqui at most BaP doses (10 $\mu\text{molar BaP Kg}^{-1}$ and higher), suggesting that direct damage in the biological membrane occurred mainly through the BaP bioactivation. During BaP metabolism, metabolites such as 1,6-quinone and 3,6-quinone, derivatives of 1-hydroxybenzo[a]pyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene are generated following an increase of SOD at higher doses of BaP. Almeida et al. (2012) found increases of LPO in the liver of *Dicentrarchus labrax*, which also paralleled the increasing of BaP exposure concentrations. Our results support the conclusions reached by Almeida et al. (2012), who attributed the LPO increases to the oxidative stress experienced by the fish and to the direct action of the bioactivated BaP metabolites.

Taking into account that the s-SDH enzyme is a cytoplasmic enzyme, found mainly in the hepatocytes (Heath, 1995), its presence in the serum could indicate hepatocellular damage, potentially related by the overproduction of ROS (Webb and Gagnon, 2007a). In the present work, the doses of 10, 100 and 1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{Kg}^{-1}$ caused hepatocellular damage, leading to the release of s-SDH from the cytoplasm of the hepatocyte to the serum. The elevated LPO activity at the three highest doses supports a causative relationship between dysfunctional cellular membrane functions and elevated s-SDH activity in the serum of tambaqui (Morris and Vosloo, 2006). Shailaja and D'Silva (2003) also found hepatocellular damages related to PAHs exposure in the tropical cichlid *Oreochromis mossambicus*, even in fish exposed to the lowest concentration of 0.4 $\mu\text{g phenanthrene}\cdot\text{g}^{-1}$, demonstrating the efficiency of this enzyme in detecting hepatocellular injuries. In the

present work, a positive correlation (Pearson) was found between LPO activity and s-SDH activity, illustrating the complementary nature of these measurements.

BaP bioactivation also can lead to genotoxicity by leading to the formation of 7,8 D [BaP], which is converted into 7,8 D 9,10-epoxide, a highly carcinogenic and mutagenic xenobiotic (Varanasi et al., 1987). In the present work, DNA breaks were observed in blood cells of tambaqui at all BaP doses, where the highest dose resulted in the highest levels of DNA damage. Elevated DNA damage in blood cells was paralleled by elevated biliary BaP-type metabolites, suggesting that the bioactivation of the BaP metabolites lead to DNA damages in blood cells. In addition, positive correlations (Pearson) were found between the DNA damage in blood cells and the BaP-type metabolites (Table I), which confirms that these two biomarkers co-vary with similar trends. Dévier et al. (2013) also found positive correlations between biliary PAHs-type metabolites and DNA damage in the blood cells of European seabass *Dicentrarchus labrax* collected in PAHs contaminated sites, further establishing a relationship between PAH exposure and genotoxic damages. Similar to our results, Mu et al. (2012) observed that in medaka *Oryzias melastigma*, EROD activity inhibition was concomitant to high DNA damages at high BaP exposure concentrations. These authors suggested that when EROD activity was inhibited, other CYP1s enzymes may be more likely to produce adduct forming BaP metabolites than CYP1A. Our results are in accordance with the suggestion of those authors, considering the inhibition of EROD activity, the high BaP-type metabolite bile accumulation, and the high DNA damage found in the blood cells of fish IP injected with the highest BaP dose.

The suite of biomarkers measured in the present study demonstrates the potential of tambaqui as a bioindicator species in tropical environments. The biliary metabolites, GST

and SOD activities, along with the LPO and s-SDH activities, and DNA damage in blood cells were the most sensitive biomarkers in tambaqui IP injected with BaP. At 1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{Kg}^{-1}$, the inhibition of EROD activity co-occurred with maximum BaP-type biliary metabolites, suggesting the involvement of other CYP1A enzymes in the metabolism of BaP or their inefficiency at higher levels of BaP, since IP-injected tambaqui showed increased oxidative stress at 1000 $\mu\text{molar BaP}\cdot\text{Kg}^{-1}$. At this dose, the metabolic production of reactive BaP metabolites was associated with elevated antioxidant SOD activity and elevated LPO activity. Elevated s-SDH activity indicated hepatocellular damage as a consequence of high LPO, causing cellular membrane dysfunctions and release of SDH in the bloodstream. In addition, the production of high levels of BaP metabolites was paralleled with elevated DNA damage in blood cells, suggesting a causal link between BaP metabolites and DNA damage. Finally, considering the important correlations found between various biomarkers demonstrating their complementary nature in the evaluation of the effects of PAHs in fish inhabiting contaminated environments, we conclude that this set of biomarkers are appropriate to detect contaminated sites using tambaqui as a bioindicator species.

CAPÍTULO 2. Influence of the natural Rio Negro water on the toxicological effects of a crude oil and its chemical dispersion to the Amazonian fish *Colossoma macropomum*

- *Artigo submetido à revista Environmental Science and Pollution Research*

Palavras-chave: Urucu crude oil; Corexit 9500; Biomarkers; Hepatotoxicity; Genotoxicity.

Abstract

The increment in crude oil exploitation over the last decades has considerably increased the risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination to Amazonian aquatic environments, especially for the black water environments such as the Rio Negro. The present work was designed to evaluate the acute toxicity of the Urucu crude oil (CO), the chemically dispersed Urucu crude oil (CO+D), and the dispersant alone (D) to the Amazonian fish *Colossoma macropomum*. Acute toxicity tests were performed, using a more realistic approach, where fish were acclimated to both ground water (GW), used as internal control, and natural Rio Negro water (RNW) and exposed to CO; CO+D and D. Then, biomarkers such as ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD), superoxide dismutase (SOD), lipid peroxidation (LPO), serum sorbitol dehydrogenase (s-SDH) in liver, DNA damage in blood cells and the presence of the benzo[a]pyrene-type; pyrene-type and naphthalene-type metabolites in fish bile were assessed. Fish exposed to CO and CO+D, at both water types tested, presented increased biomarker responses and higher PAHs-type metabolites in the bile. However, fish exposed to these treatments after the acclimation to RNW increased the levels of LPO, s-SDH (hepatotoxicity); DNA damage in blood cells (genotoxicity), and benzo[a]pyrene-type metabolites when compared to fish in GW. Our data suggests that some physicochemical properties of Rio Negro water (i.e. presence of natural organic matter-NOM) might cause mild chemical stress responses in fish, which can make it more susceptible to oxidative stress following exposure to crude oil, particularly to those chemically dispersed.

1. Introduction

Toxicity of crude oil and mitigation practices using chemical dispersants are widely discussed issues in the specialized literature (Dave and Ghaly, 2011; Hemmer et al., 2011). Chemical dispersants are mostly used to remediate oil spills and reduce their impacts on aquatic biota (Tiehm, 1994). In general, they are composed of anionic and non-anionic surfactants, which act by breaking the oil surface layer, promoting the formation of micelles of oil plus surfactant (George-Ares and Clark, 2000). This process causes a decrease in the tension of the oil surface layer allowing for easier degradation (National Research Council, 1989). Although their use is often to reduce the impacts of oil spills on aquatic biota increased toxicity of chemically dispersed oil has been previously reported (Milinkovitch et al., 2011; Ramachandran et al., 2006, 2004). This can be directly related to: (i) the inherent toxicity of hydrocarbons and surfactants molecules, and (ii) the physical effects of oil-surfactant droplet size. This last characteristic has been shown to increase the bioavailability and uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by aquatic biota (Anderson et al., 1974; Dû-Lacoste et al., 2013; Ramachandran et al., 2006, 2004).

Amongst the components of crude oils, PAHs are of most concern because of their acute and chronic toxicity to aquatic organisms. Environmental factors affect the solubility of PAHs (National Research Council, 1989), increasing its bioavailability and toxicity to aquatic organisms (Ramachandran et al., 2006; Shukla et al., 2007). For instance, the uptake and accumulation of light PAHs by *Tilapia mossambica* is significantly increased in dechlorinated freshwater when compared to reconstituted saline waters (Shukla et al., 2007). Additionally, the chemical dispersion of crude oil increases the exposure and uptake of PAHs by rainbow trout in freshwater compared to higher salinity waters (Ramachandran

et al., 2006). Natural organic matter (NOM) is another water quality parameter that can interfere in uptake and bioconcentration of organic pollutants by aquatic organisms. NOM is reported to have the ability to bind metals (Mcgeer et al., 2002; Wood et al., 2011), and organic pollutants (Landrum et al., 1984; Moeckel et al., 2014), reducing its bioavailability to aquatic organisms (Haitzer et al. 2002; Akkanen et al. 2012), however, some studies indicate that NOM might increase the solubility of PAHs (Cho et al., 2002; Lippold et al., 2008). Despite several works demonstrating the mobilization of organic pollutants by either NOM or surfactants, studies into its combined action are scarce. Both humic substances (HS), highly present in NOM, and surfactants are considered amphiphilic compounds, and HS have been considered by some authors as “natural surfactants” (Conte et al., 2005; Johnson and John, 1999). In this regard, it seems plausible that some synergistic or antagonistic effects can occur in the solubilization of the organic compounds.

The exploitation of large commercial reserves of crude oil in the Amazon basin has increased the potential risk of PAHs contamination. Crude oil is currently extracted at the Urucu river (4°51'13.88''S and 65°20'36.56''W), and transported by barges from Coari city to Manaus (over 600 km down the Amazon River). A great number of aquatic environments, differing in their physicochemical properties, may be adversely affected by oil spills during the transport of crude oil from Urucu reserve to the refinery in Manaus city (Amazon-Brazil). In fact, this potential risk of contamination is concerning in regards to the extremely unique physical-chemical Amazon "black waters" such as the Rio Negro which is characterized by high NOM concentrations and low ionic composition. These waterways are also extremely rich in biodiversity and house a number of rare and endemic species. Toxicological effects of Urucu crude oil have been previously reported for Amazon fish

species, with negative effects on gill functions such as respiration and osmoregulation (Brauner et al., 1999; Duarte et al., 2010; Val and Almeida-Val, 1999), liver biotransformation enzymes and genotoxic effects on blood cells being reported (Kochhann et al., 2013; Matsuo et al., 2006). Additionally, the chemical dispersant Corexit 9500 significantly increased the toxicity of Urucu crude oil to tambaqui, resulting in severe respiratory and osmoregulatory disturbances (Duarte et al., 2010).

Recent evidence suggests that HS, present at high levels in NOM found in Rio Negro, can induce a non-specific stress response, particularly through the activation of biotransformation enzyme activities and antioxidant defenses in aquatic animals (Matsuo et al., 2006; Steinberg et al., 2006; Timofeyev et al., 2006). For example, the glutathione-S transferase (GST) activity in *Daphnia magna* increased when exposed to different NOM (natural and the synthetic HIS 1500) concentrations (Steinberg et al., 2003). Also, in the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818), the acclimation for 10 days to both commercial HS (Aldrich; AHA) and NOM from Rio Negro induced the hepatic ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) and benzyloxyresorufin-*O*-debenzylase (BROD) activity (Matsuo et al., 2006). These effects might be explained by the uptake of the NOM components directly through the gills and skin of the organisms, as already demonstrate by some authors (Roditi et al., 2000; Steinberg et al., 2006, 2003). Considering that NOM components have been shown to cause mild chemical stress and increase the solubility of PAHs, NOM in the black waters of the Amazon Basin such as the Rio Negro water (RNW) may influence the toxicity of PAHs and the chemical dispersion of crude oil to fish species. Therefore, taking into account the potential risk of oil contamination in natural Amazon “black waters” and the lack of information regarding the toxicological effects of these

components together (the natural Rio Negro water physical-chemical properties (high NOM levels and low ionic composition) PAHs and surfactants) the aims of the present study were (i) to determine if the chemical dispersion of Urucu crude oil with Corexit 9500 increases the hepatotoxic and *blood cells genotoxic* responses of tambaqui, in comparison with fish exposed to the same toxicants alone, and (ii) to evaluate the influence of the natural Rio Negro water on the acute toxicity of the crude oil, the chemical dispersant, and the crude oil chemically dispersed, through the evaluation of hepatic and blood biomarkers in tambaqui. This is the first study, to our knowledge, that has investigated the possible toxicity of these interactions between NOM, surfactants and PAHs to aquatic biota.

2. Materials and methods

Experimental fish

Juveniles of *C. macropomum* (n= 64; 26.3 g \pm 0.47, mean \pm SEM) were purchased from a local fish farm (Fazenda Santo Antônio, Amazonas, Brazil). Tambaqui (Teleostei, Characiformes, Serrasalminidae) naturally inhabits both “white waters” and “black waters” systems, being one of the most important fish species in the Amazon basin once it is intensively exploited by commercial fishing, and is also heavily cultivated in aquaculture. Animals were firstly acclimated for 60 days in ground water (GW) from INPA (National Institute for Amazonian Research) (water composition: Dissolved organic matter (DOC), 0.8 mg C/L; Na⁺, 0.99; K⁺, 0.39; Ca²⁺, 0.36; Mg²⁺, 0.1; Cl⁻, 1.1 mg/L; pH 6 and temperature of 30°C) in outdoor 3000 L polyethylene tanks with continuous water flow. During the acclimation period, fish were fed until satiation with dry food pellets (26% protein content, Nutripeixe- Purina). All experimental and holding procedures followed

Brazilian animal care guidelines and were previously approved by INPA's animal care committee (Protocol number: 022/2012).

Rio Negro water collection and acclimation of tambaqui

After the acclimation period in GW, 32 fish were randomly assigned to acclimate in natural Rio Negro water (RNW) condition, with another 32 left to acclimate in GW. The RNW (water composition: DOC 7.23 mg C/L; Na⁺ 0.72; K⁺ 0.42; Ca²⁺ 1.25; Mg²⁺ 0.20; Cl⁻ 2.62 mg/L; pH 6.53 and temperature 30°C) was collected daily in the main channel (S03°08'14.41" W59°56'10.31") throughout July/2011. To avoid the presence of contaminants in water, RNW was collected in a site upstream the city of Manaus with no historical of domestic waste input and/or industrial effluent discharge. In this area, the water velocity (0.6 m s⁻¹) and water flow (67.53 m³ s⁻¹) is high (Filizola et al., 2010) leading to a consistent water renewing. In addition, RNW was sampled at the high water season, where the increment in water volume in river is recognized to diluting pollutants from downstream tributaries, reducing the anthropogenic effects on water chemistry composition of Rio Negro, as previously reported by Pinto et al (2009). After the collection, RNW was transported to the Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM/ INPA) where the acclimation and experiments were performed. The acclimation in RNW was step-wise; for this, approximately 15% of water in the acclimation tank was daily replaced by fresh RNW until total replacement. After that, fish were kept for three weeks in a semi-static system with RNW (~500 L; 50% replacement daily) to ensure complete fish acclimation.

Experimental set-up

All exposures were performed under static conditions and feeding was suspended two days prior to the exposure. The exposure set-up took in account a more realistic scenario for Amazon “black water” with natural RNW used in the exposure to determine the toxicity of both crude oil (CO) and chemically dispersed crude oil (CO+D) and the Corexit 9500 dispersant alone (D) to tambaqui. GW was used as internal control, as it duplicates the physical-chemical natural Rio Negro water characteristics but, with low NOM content (Wood et al., 2011, 2003). Control groups were maintained at the same exposure conditions of the acclimation regimes (i.e. GW and RNW). Fish were randomly distributed into 64 experimental aquaria (one fish per aquaria with a water volume of 2 L; 8 fish for each treatment, for both GW and RNW) and allowed to settle for 24 h prior to the beginning of the exposure. The Urucu crude oil was selected due the increased risk of aquatic contamination of the Amazon region during its exploitation and transport and due its known toxicity to Amazon fish species (Brauner et al. 1999; Val and Almeida-Val 1999; Matsuo et al. 2006; Duarte et al. 2010; Kochhann et al. 2013). The waterborne Urucu crude oil concentration used was 5.68 ml of crude oil/L which represents 50% of the 96 h, LC_{50} value for this fish species (ALV, unpublished data). The Urucu crude oil was added directly in the aquaria holding the experimental fish, with no previous mixing procedure, resulting in a thin oil layer (~ 2 mm). Analytical quantification of crude oil components in aquaria holding the experimental fish was not feasible. Anyway, the crude oil from Urucu province is composed by 85.7 % of saturates hydrocarbons; 13.2 % of aromatic hydrocarbons and 1.1 % of oleffins (Petrobrás, 1997). Moreover; 7,572 ng g⁻¹ of PAHs is found in this crude, where 811 ng g⁻¹ corresponds to the sum of the 16 priority PAHs according to the USA – EPA (Oliveira, 2007).

Acute exposures (24 h) were performed in accordance with the guidelines of the Brazilian Environmental Council (CONAMA, 2000) for the use of chemical dispersants. The concentration of the Corexit 9500 dispersant used in the present work was 1:1000 (dispersant: crude oil) ratio. This ratio was based on the study of Duarte et al. (2010), where full mortality was found at dispersant: oil ratio below 1:800. Moreover, the 1:1000 ratio is 10 to 12 times more diluted than the highest concentration (1:100) allowed by The Brazilian National Environmental Council (CONAMA). The dispersant solution was prepared by diluting (100-fold) pure stock solution of Corexit 9500 (Nalco, COREXIT[®] EC9500A) in GW and stirred for 1 h prior a final dilution.

After 24 h exposure, fish were anesthetized with neutral buffered MS-222 (0.5 g of MS-222 L⁻¹ and 2.0 g of NaHCO₃ L⁻¹, Sigma Aldrich) for 5 seconds, and blood samples were taken at the caudal vein. After that, pieces of liver and biliary bladder were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. Samples were stored at -80°C until analysis.

Biochemical and physiological analysis

Identification of Bile metabolites through Fixed Fluorescence (FF)

Biliary bladder was carefully removed from fish and the bile was extracted by using a 1 ml syringe. Biliary metabolites were determined through fixed fluorescence (FF) measurements, using specific excitation and emission wavelengths for each hydrocarbon type. Pyrene-type metabolites (EX 340 EM 380 nm) were identified according to Krahn et al. (1986), and naphthalene-type (EX 290 EM 335 nm) and B[a]P-type metabolites (EX 380 EM 430 nm) according to Lin et al. (1996). Bile samples were diluted in 50% methanol-water in the proportion of 1:1000 (bile:methanol) for pyrene-types and B[a]P-

types and in the proportion of 1:2000 to naphthalene-type metabolites. The standard chemicals for B[a]P-type and pyrene-type metabolite were 1-OH pyrene. To quantify naphthalene-type metabolites, 1-naphthol was used as a standard. A Perkin–Elmer LS-5 Luminescence Spectrometer with a slit width at 10 nm for excitation and emission measurements was used.

Hepatic biotransformation and antioxidant enzymes

Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity levels were measured in individual liver samples. Samples were homogenized (4 times dilution) in 0.02M HEPES, pH 7.5, centrifuged (9 000 g for 20 minutes at 4°C), and the S9 postmitochondrial supernatant (PMS) collected for immediate use. EROD activity was measured using a modified method of Webb and Gagnon (2002). The reaction mixture contained 0.1 M HEPES, 0.12 M MgSO₄, 40 mg ml⁻¹ bovine serum albumin, 0.5 M NADPH (pH 7.8) and PMS. The reaction was initiated by adding 0.02 mM ethoxyresorufin, incubated at room temperature for 2 min, and then terminated with the addition of 2.5 ml of methanol HPLC grade. Blanks (methanol HPLC grade) were used for every read. Resorufin standards (0.000 to 0.085 mM) and samples were centrifuged to precipitate proteins. The fluorescence of the supernatant was read on a Spectrometer (SpectraMax M2) at excitation/emission wavelengths of 535/585 nm (slit 10ex/10em).

Liver homogenates were prepared for the analyses of GST, superoxide dismutase (SOD) and lipid peroxidation (LPO). The pieces of liver were thawed on ice and homogenized (10 times dilution) in buffer containing 20 mM Tris Base; 1 mM EDTA; 1 mM dithiothreitol; 50 mM sucrose; 150 mM KCl, pH 7.6. After centrifugation (15 000 g for 20 minutes at

4°C), the crude homogenate was aliquoted in plastic tubes, and used to perform the GST, SOD, and LPO assays.

GST activity was determined as described by Keen et al. (1976) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as the substrate. The change in absorbance was recorded at 340 nm and the enzyme activity was calculated as nmol CDNB conjugate min⁻¹ mg⁻¹ protein, using a molar extinction coefficient of 9.6 mM cm⁻¹.

Copper–zinc SOD (CuZn-SOD) activity was determined according to McCord and Fridovich 1969. This method is based on the measurement of the inhibition of cytochrome c reduction rate by the superoxide radical, at 550 nm and 25°C. SOD activity was expressed in U SOD mg of protein⁻¹, where one U of SOD corresponds to the quantity of enzyme that promoted the inhibition of 50% of cytochrome c.

Liver lipid peroxidation (LPO) and serum-Sorbitol Dehydrogenase (s-SDH) determination

The LPO concentration was quantified according to Jiang et al. (1991). This method is based on the oxidation of the Fe⁺² to Fe⁺³ by hydroperoxides in acid medium in the presence of Ferrous Oxidation-Xylenol Orange, at 560 nm.

The serum-Sorbitol Dehydrogenase (s-SDH) activity was determined according to Webb and Gagnon 2007. For s-SDH measurement, blood serum was separated and 100 µl was mixed in a cuvette with 0.1 M Tris Buffer, pH 7.5, and incubated for 10 min at room temperature. 4 M fructose solution was added to the mixture and the decrease in absorbance over one min at 340 nm was immediately measured in a spectrophotometer (Spectramax M2).

Genotoxicity assay in blood cells

DNA damage was assessed in the fresh blood by the comet assay as described previously by Singh et al. (1988) for lymphocytes and modified by Silva et al. (2000) for peripheral blood cells. Briefly, blood was spread on microscope slides, briefly dipped into 1.5% normal melting agar gel (NMA) prepared in phosphate-buffered saline, and then allowed to solidify. The slides were immersed in lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris; pH 10-10.5; 1% Triton X-100) with 10% DMSO, and then placed in the electrophoresis chamber, with alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 12.6). The slides were then washed with 0.4 M Tris buffer pH 7.5 and submerged in silver solution (5% sodium carbonate, 0.1% ammonia nitrate, 0.1% silver nitrate, 0.25% tungstosilicic acid and 0.15% formaldehyde). Images of 100 randomly selected cells were analyzed from each animal (optical microscope, Leica DM 205, 100 x magnification). Cells were scored visually according to tail size (from undamaged-0, to maximally damaged-4), and a value was assigned to each comet according to its class. The final DNA damage score, between 0 (completely undamaged) and 400 (maximum damage), was obtained by summation according Kobayashi et al. (1995).

Protein determination

Total protein was measured according to Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard at 595 nm.

Statistical analysis

The data is represented as mean \pm standard error of the mean (Mean \pm SEM). Two-way factorial analysis of variance (ANOVA) was applied to verify the influence of the different water quality conditions at different experimental treatments (C; CO; D and CO+D). The Holm-Sidack post hoc test was applied to verify differences between the means (Zar, 1999). Statistical significance was accepted at the level of $P \leq 0.05$.

3. Results

Determination of Bile metabolites

Significantly higher levels of the B[a]P-type, pyrene-type and naphthalene-type metabolites were recorded in the bile of fish acclimated to both GW and RNW exposed to CO+D when compared to Control (B[a]P-type: GW and RNW ($P = 0.009$); pyrene-type: GW and RNW ($P = 0.009$); naphthalene-type: GW and RNW ($P = 0.009$)), and dispersant (D) alone (B[a]P-type: GW and RNW ($P = 0.009$); pyrene-type: GW and RNW ($P = 0.009$); naphthalene-type: GW and RNW ($P = 0.009$)). Significantly higher levels of the B[a]P-type and pyrene-type metabolites were also recorded in the bile of fish acclimated to both GW and RNW exposed to CO+D compared to CO exposed fish (B[a]P-type: GW and RNW ($P = 0.013$); pyrene-type: GW ($P = 0.013$) and RNW ($P = 0.025$)). Additionally, fish acclimated in RNW and exposed to CO+D displayed significantly higher levels (2.0 fold, $P < 0.05$) of B[a]P-type, when compared with fish exposed to the same treatment in GW (Figure 1(a)). The levels of pyrene-type and naphthalene-type metabolites were also significantly higher in CO in both acclimation regimes (GW and RNW), respectively, when compared to Control (pyrene-type: GW ($P = 0.025$), RNW ($P = 0.013$); naphthalene-type: GW ($P = 0.017$) and RNW ($P = 0.013$)), and to D (GW ($P = 0.017$), RNW ($P = 0.017$); naphthalene-type : GW ($P = 0.013$) and RNW ($P = 0.017$)) (Figure 1(b)).

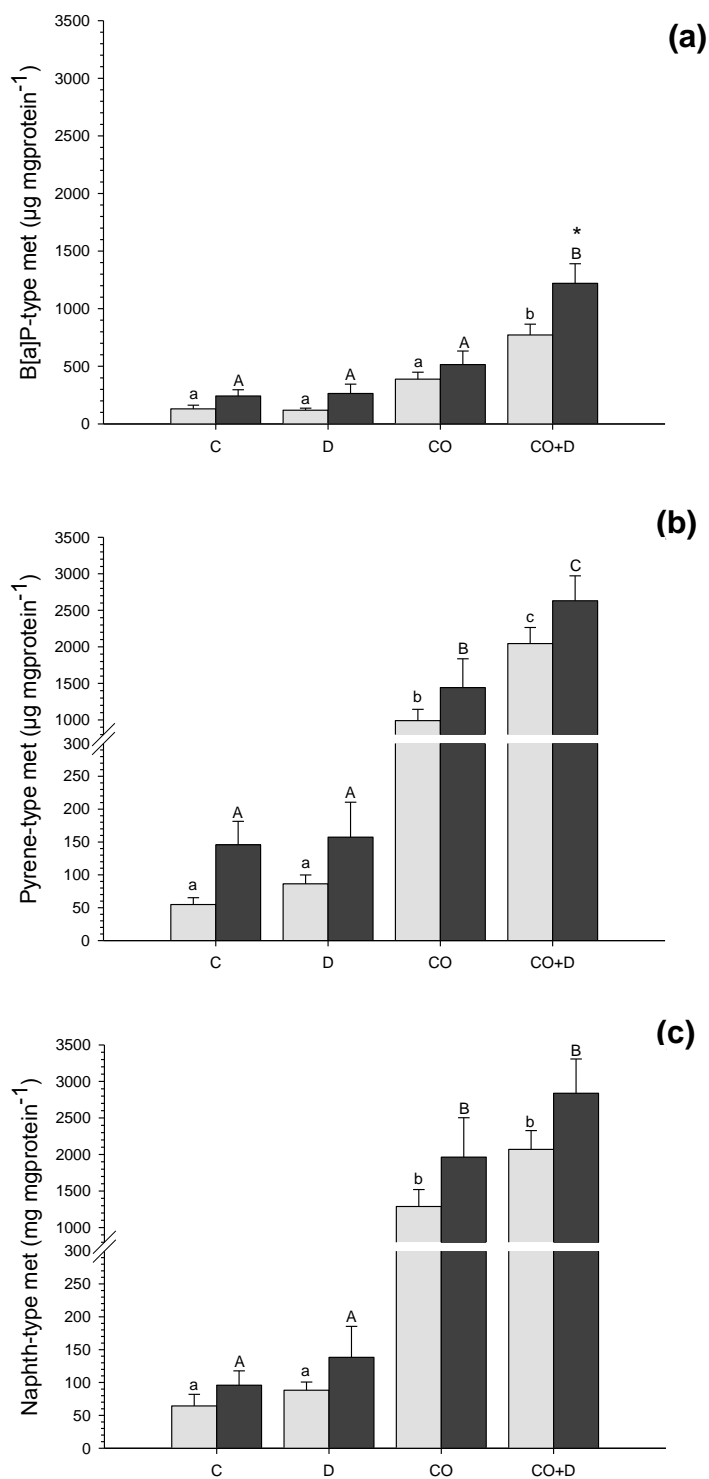


Figure 1. B[a]P-type metabolites (a); Pyrene-type metabolites (b); and Naphthalene-type metabolites (c) in bile of *C. macropomum* exposed 24 h to Corexit 9500 (D); Urucu-AM crude oil (CO); and chemically dispersed crude oil (CO+D), and the Control group,

acclimated in INPA groundwater (grey bars) and natural Rio Negro water (black bars). Columns represent means and vertical lines represent SEM (N= 8 for each treatment). Different letters indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) between the experimental groups in the same acclimation regime (lower case for INPA ground water and upper case for Rio Negro water. Asterisk (*) indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) in the same treatments under different acclimation regime.

Hepatic biotransformation and antioxidant enzymes

The liver EROD levels of fish acclimated in RNW, exposed to CO+D, significantly increased compared to fish exposed to Control (1.9 fold, $P = 0.009$), D (1.4 fold, $P = 0.01$) and CO (1.3 fold, $P = 0.013$) conditions. No differences were seen in EROD activity between any treatments in GW. In addition, EROD activity of fish exposed to Control, D, CO and CO+D in RNW increased by 3.7, 2.7, 2.5 and 2.3 fold ($P < 0.05$), respectively, when compared with fish exposed to the same treatments in GW (Figure 2).

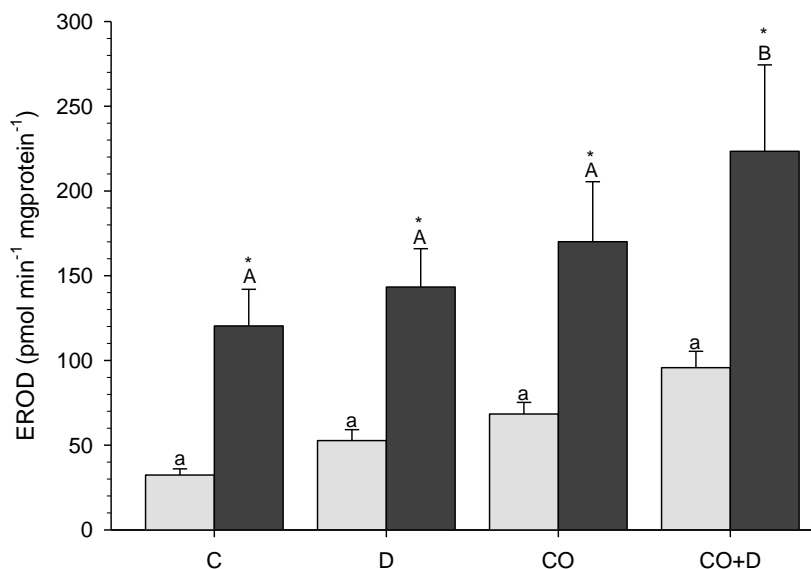


Figure 2. Hepatic ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity of *C. macropomum* exposed 24 h to Corexit 9500 (D); Urucu-AM crude oil (CO); and chemically dispersed

crude oil (CO+D), and the Control group, acclimated in INPA groundwater (grey bars) and natural Rio Negro water (black bars). Columns represent means and vertical lines represent SEM (N= 8 for each treatment). Different letters indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) between the experimental groups in the same acclimation regime (lower case for INPA ground water and upper case for Rio Negro water. Asterisk (*) indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) in the same treatments under different acclimation regime.

In contrast GST and SOD levels in liver of fish acclimated in GW significantly increased after the exposure to CO+D compared to Control fish (GST: 1.8 fold, $P = 0.009$; SOD; 2.2 fold, $P = 0.013$), D (GST: 1.5 fold, $P = 0.01$; SOD: 2.6 fold, $P = 0.009$), and CO (GST: 1.3 fold, $P = 0.013$; SOD: 2.2 fold, $P = 0.01$). No differences were seen in GST and SOD activity between any treatments in RNW. Further, GST activity of RNW control tambaqui, as well as those exposed to D, CO, and CO+D in GW significantly increased by 1.3, 1.6, 2.0, and 2.5 fold ($P < 0.05$), respectively, when compared with fish exposed to the same treatments in RNW (Figure 3(a)). In addition, SOD activity within tambaqui acclimated in GW and exposed to CO+D was 1.6 fold ($P < 0.05$) higher when compared with fish exposed to the same treatment in RNW and this was significant (Figure 3(b)).

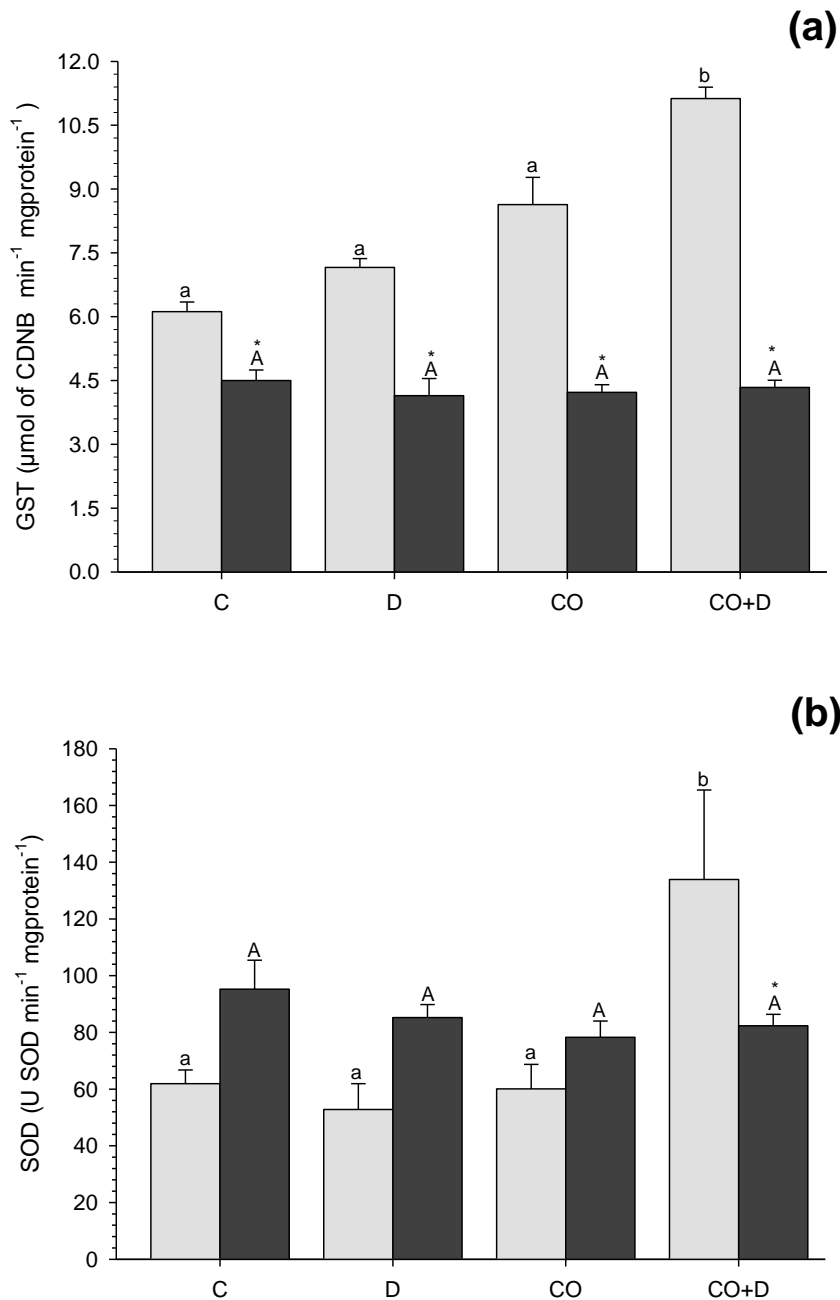


Figure 3. Hepatic glutathione *S*-transferase (GST) activity (a) and, superoxide dismutase (SOD) activity (b) of *C. macropomum* exposed 24 h to Corexit 9500 (D); Urucu-AM crude oil (CO); and chemically dispersed crude oil (CO+D), and the Control group, acclimated in INPA groundwater (grey bars) and natural Rio Negro water (black bars). Columns represent means and vertical lines represent SEM (N= 8 for each treatment). Different letters indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) between the experimental groups in the

same acclimation regime (lower case for INPA ground water and upper case for Rio Negro water. Asterisk (*) indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) in the same treatments under different acclimation regime.

Hepatotoxicity and lipid peroxidation

Significantly higher levels of s-SDH (Figure 4(a)) and LPO (Figure 4(b)) were recorded in tambaqui acclimated to RNW and exposed to CO and CO+D compared with Controls (s-SDH: CO 4.6 fold ($P = 0.01$); CO+D 4.7 fold ($P = 0.009$); LPO: 2.0 fold CO ($P = 0.01$) and CO+D ($P = 0.009$), with significantly higher s-SDH also recorded compared with D exposed fish (s-SDH: 2.7 fold CO ($P = 0.017$) and CO+D ($P = 0.013$)). No significant differences were seen in s-SDH and LPO levels between any treatments in GW. In addition, the s-SDH and LPO levels within the liver of tambaqui acclimated to RNW were significantly higher than those obtained from fish acclimated to GW (s-SDH: CO 4.0 fold and CO+D 3.0 fold; LPO: 2.2 fold CO and CO+D ($P < 0.05$)).

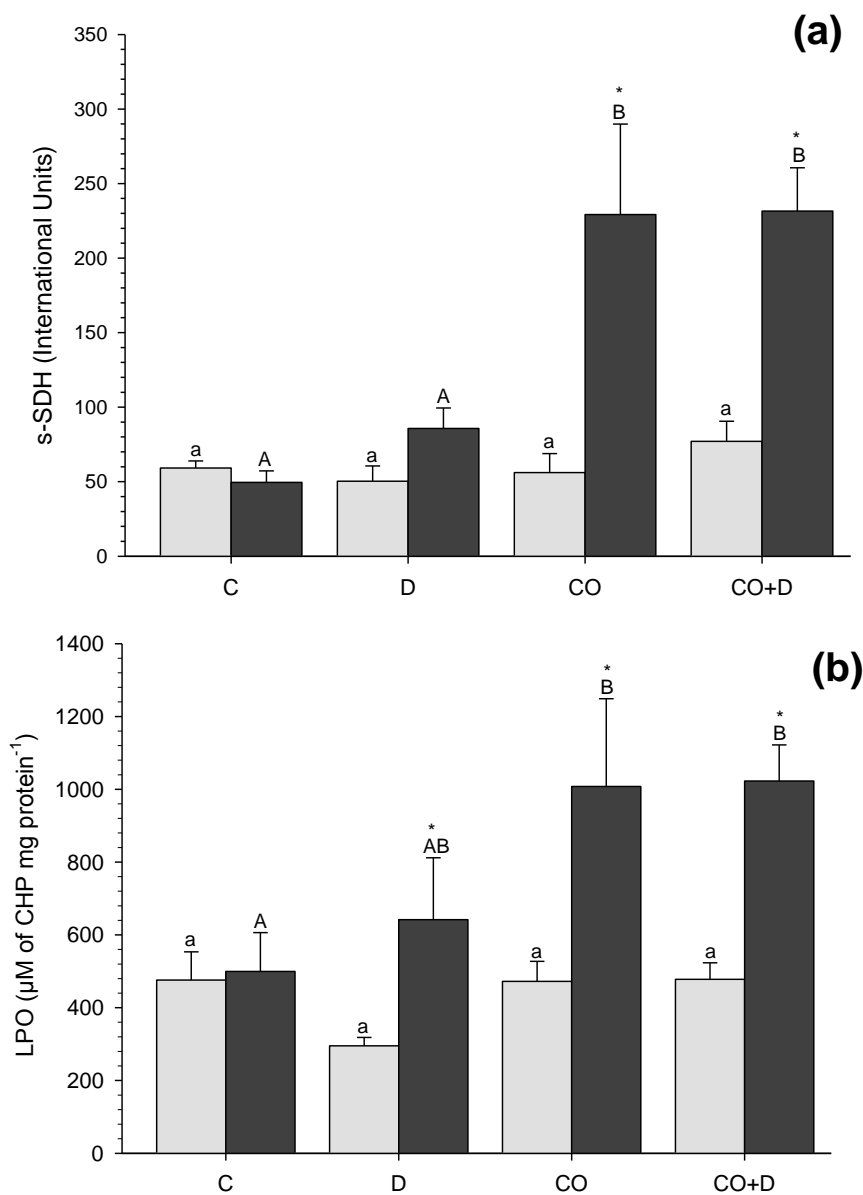


Figure 4. Serum Sorbitol Dehydrogenase (s-SDH) activity (a), and hepatic lipid peroxidation (LPO) (b) of *C. macropomum* 24 h exposed to Corexit 9500 (D); Urucu-AM crude oil (CO); and chemically dispersed crude oil (CO+D), and the Control group, acclimated in INPA groundwater (grey bars) and natural Rio Negro water (black bars). Columns represent means and vertical lines represent SEM (N= 8 for each treatment). Different letters indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) between the experimental groups in the same acclimation regime (lower case for INPA ground water and upper case for Rio

Negro water. Asterisk (*) indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) in the same treatments under different acclimation regime.

Genotoxicity assay (DNA damage)

DNA damage was significantly higher in tambaqui exposed to CO and CO+D, in relation to the Control, in both GW (2.5 fold, $P = 0.009$, and 2.8 fold, $P = 0.01$, respectively), and RNW (5.5 fold, $P = 0.013$ and 9.2 fold, $P = 0.009$, respectively). Also, tambaqui exposed to CO and CO+D in GW presented significantly higher DNA damage when compared to D (2.3 fold, $P = 0.013$, and 2.6 fold, $P = 0.017$, respectively). The CO+D significantly increased the DNA damage in relation to CO (1.7 fold, $P = 0.017$) and D (1.5 fold, $P = 0.025$) in tambaqui acclimated in RNW. Interesting, the DNA damage of tambaqui acclimated in RNW and exposed to D were significantly higher 6.5 fold ($P = 0.01$) when compared to Control. In addition, the DNA damage of tambaqui acclimated in RNW and exposed to D, CO and CO+D where significantly higher in 1.6, 1.5 and 2.0 fold ($P = 0.05$) when compared with fish exposed to the same treatments in GW (Figure 5).

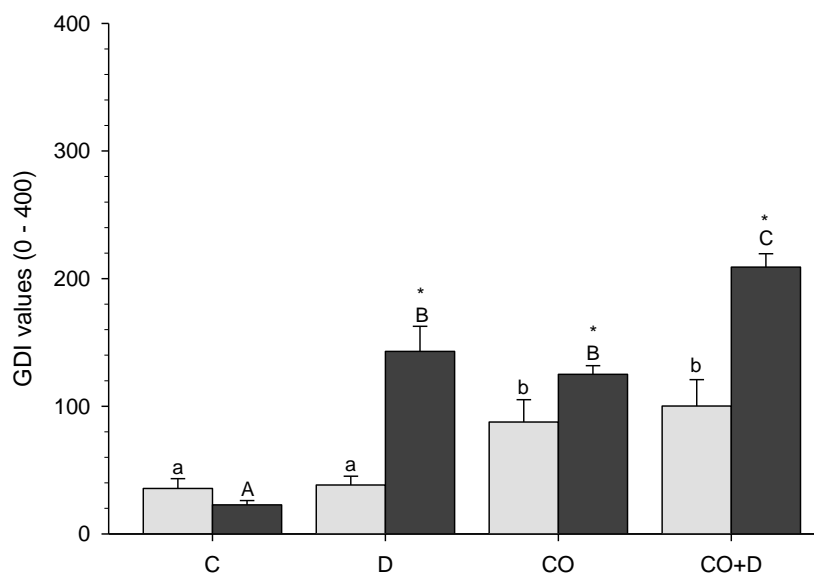


Figure 5. Genetic Damage Index (GDI) in erythrocytes of *C. macropomum* 24 h exposed to Corexit 9500 (D); Urucu-AM crude oil (CO); and chemically dispersed crude oil (CO+D), and the Control group, acclimated to INPA groundwater (grey bars) and natural Rio Negro water (black bars). Columns represent means and vertical lines represent SEM (N= 8 for each treatment). Different letters indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) between the experimental groups in the same acclimation regime (lower case for INPA ground water and upper case for Rio Negro water. Asterisk (*) indicates statistical difference ($P \leq 0.05$) in the same treatments under different acclimation regime.

4. Discussion

By using RNW, the present work assessed the toxicity of both crude oil (CO) and chemically dispersed crude oil (CO+D) and the Corexit 9500 dispersant alone (D) to tambaqui in an environmentally realistic scenario (black water, high in NOM). To our knowledge, no study has focused on the effects of these factors (PAHs, NOM and surfactants) together, while investigating the potential toxicological effects on fishes.

Fixed fluorescence detection of PAHs in fish bile is an efficient technique to monitor the presence of these compounds in aquatic environment (Aas et al., 2000a; Nongnutch et al., 2012b). In the present work, tambaqui exposed to CO in both water conditions tested presented increased levels of pyrene-type and naphthalene-type metabolites in bile, but not B[a]P. The increased levels of pyrene-type and naphthalene-type and lack of B[a]P in the CO treatment bile may be explained by the higher concentrations of these PAHs in relation to B[a]P in the Urucu crude oil composition (Oliveira, 2007). However, the chemical dispersion of the Urucu crude oil increased the concentration of the B[a]P-type and pyrene-type metabolites, but not naphthalene-type metabolites, in bile of tambaqui at both GW and RNW. This can be associated with a higher efficiency of the dispersant to disperse the PAHs from the oil slick, increasing the bioavailability of PAHs to aquatic organisms, as already seen in rainbow-trout (Ramachandran et al., 2004) and Nile-tilapia (Shukla et al., 2007). Moreover, levels of B[a]P-type metabolites were significantly higher in bile of tambaqui exposed to CO+D in RNW, than in fish at GW, indicating that the availability and uptake of some PAHs might be enhanced in Rio Negro water conditions. This is in agreement with Lippold et al. (2008) that found enhancements in ^{14}C -labeled pyrene solubility in the presence of high concentration of humic acid and anionic surfactant (SDS). For Benzo[a]pyrene, the strong affinity of hydrophobic PAHs with five to seven rings to NOM is well established (Moeckel et al., 2014), and enhanced sorption of PAHs have been associated with higher content of aromatic moieties in NOM (Cho et al., 2002). However, Cho et al. (2002) also demonstrated that PAHs sorption to NOM is reduced by cationic surfactants, once surfactant molecules may dissociate into anionic surfactant and sodium ion, which in turn, can bind to the acidic and phenolic groups of NOM, enhancing the bioavailability of PAHs with high molecular weight to fish.

The induction of the hepatic EROD activity (cytochrome P450), which turns hydrophobic molecules into hydrophilic compounds in phase I of biotransformation pathway (van der Oost et al., 2003), is a common response of many freshwater fish to organic contaminants (Braz-Mota et al., 2015; Matsuo et al., 2005; Ramachandran et al., 2004; Simonato et al., 2011). In this study, changes in hepatic EROD activity were not seen in fish acutely exposed to CO and CO+D in GW, besides the high levels of the PAHs-type metabolites in fish bile. Similarly, Milinkovitch *et al.* (2011) did not observe any alterations in hepatic EROD activity, while also recording increased levels of benzo[a]pyrene and pyrene in bile collected from *Liza aurata*, acutely exposed for 48 h to both chemically and mechanically dispersed crude oil. Both time- and dose- dependent responses can explain these apparently contradictory results between EROD induction and PAHs detection in bile, after 48 h of exposure to CO and CO+D in GW the tambaqui presented higher EROD values and high concentration of PAHs-type metabolites in bile (HSH, unpublished data). Therefore, after 24 h of exposure, it appears that the appearance of PAHs metabolites in bile was a more sensitive biomarker than EROD activity for tambaqui under these experimental conditions. Bile metabolites increase rapidly in fish exposed to sublethal concentrations of crude oil, indicating that enzymatic detoxification process occur despite the lack of EROD induction (Camus et al., 1998).

The nature of the EROD induction in fish acclimated in RNW can be complex. The same way that several organic contaminants can induce CYP1A expression (Braz-Mota et al., 2015; Matsuo et al., 2005; Ramachandran et al., 2004; Simonato et al., 2011), NOM might be a strong EROD inducer (Matsuo et al. 2006; Steinberg et al. 2006). In the present work, RNW was collected in a place with no history contamination and high water

flow/renewing. However, high background values were found only for the EROD in tambaqui acclimated in RNW when compared with tambaqui acclimated in GW (i.e. internal control groups). This fact provides more evidence that aromatic moieties of NOM molecules can cause high EROD background values in animals inhabiting such NOM-rich environments, as previously hypothesized by some authors (Matsuo et al. 2006; Steinberg et al. 2006). Further, fish acclimated in RNW showed significantly higher EROD activity following exposure to CO+D. This data is in agreement with the high levels of PAHs-type metabolites in the bile of fish indicating that the chemical dispersion in RNW increases the absorption and metabolization of PAHs from crude oil resulting in a strong activation of phase I biotransformation system in liver of tambaqui. This fact is especially true, as the levels of B[a]P-type metabolites in bile were higher in tambaqui acclimated to RNW than in GW. Although the induction of phase I biotransformation mediated by NOM has been considered beneficial to aquatic organisms dealing with organic xenobiotic exposure (Steinberg et al. 2006; Timofeyev et al. 2006), it is likely that the biotransformation capacity of tambaqui liver is overloaded during the acute exposure to a mixture of xenobiotic (i.e. PAHs and surfactants) in RNW, thereby increasing toxicity.

The GST activity in the liver of tambaqui acclimated in GW increased following exposure to CO+D, but not in fish exposed to CO alone, suggesting an increased requirement for the phase II conjugation reaction in these animals. Such increase was associated with a higher bioavailability and uptake of PAHs after exposure to CO+D in GW, as seen as by the highest levels of PAH metabolite-types in the bile of tambaqui at this experimental condition. Interestingly, the induction of GST was not observed in the liver of fish acclimated in RNW after acute exposure to all treatments. Accordingly many previous

studies, of phase II biotransformation enzymes suggest they might be also upregulated following exposure to NOM (Menzel et al., 2005; Nardi and Pizzeghello, 2002; Steinberg et al., 2006). However, recent studies have demonstrated that natural substances such as phenols (Duarte et al., 2016) and quinones (Johannsson et al., 2016) are highly present in RNW and can act as inhibitors of GST activity (Jancova et al., 2010). This fact can be related with the lower GST values in tambaqui acclimated in RNW compared to fish acclimated in GW (i.e control groups). Indeed, reduced GST activity in tambaqui acclimated in RNW might affect the whole capacity of the hepatic defense system, particularly against the reactive oxygen species (ROS) generated during the phase I biotransformation following acute exposure to PAHs.

Generation of ROS has been considered a challenge for animals exposed to PAHs (Yin et al., 2007). The induction of antioxidant system to avoid oxidative stress has been previously reported in other fish species after exposure to crude oil and its components (Achuba and Osakwe, 2003; Nogueira et al., 2011). SOD enzyme acts as a scavenger of free radicals, neutralizing the anion superoxide (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) which are reactive with biological membranes (Halliwell, 2007). In our study, SOD levels increased in the liver of tambaqui exposed to CO+D in GW, which seems to occur to counteract any pronounced increment in ROS production associated to CO+D. On the other hand, significant changes in SOD levels were not observed in the liver of tambaqui acclimated in RNW exposed to any treatments, this was also the case for GST activity. Moreover, SOD levels in liver of tambaqui acclimated in RNW and exposed to CO+D were reduced in comparison with those seen in fish acclimated in GW. The lowered SOD activity, is also associated with an excess of hydrogen peroxide generated by increased

levels of EROD (Bernhardt, 1995), and this could lead to an accumulation of superoxide and hydrogen peroxide anions. In turn, fish would become more susceptible to oxidative stress following the exposure to PAHs when acclimated in RNW (NOM-enriched conditions).

ROS molecules, such as OH-radical, and peroxy and hydroxyl radicals, oxidize essential molecules such as lipids, proteins, carbohydrates, and DNA (Halliwell, 2007). ROS disturbs the fine structure of the cell, causing alterations of integrity, fluidity, permeability, resulting in functional loss of biomembranes (Niki, 2009). Further, some studies have evidenced that ROS molecules may adversely affect fish exposed to both chemical dispersants and PAHs from crude, resulting in enhanced damage in both cellular membrane and DNA (Achuba and Osakwe, 2003; Milinkovitch et al., 2011). In the present work, the levels of LPO in the liver of tambaqui acutely exposed to all treatments (D; CO and CO+D) were higher in fish acclimated in RNW. These increased LPO could be related with higher EROD, and also to a lack of stimulation in both GST and SOD activities, which could lead to increases in ROS generation. Thus, an imbalance between the ROS generation and antioxidants take place leading to cell toxicity and loss of liver function.

Increased levels of serum sorbitol dehydrogenase (s-SDH) was also seen in serum of tambaqui exposed to CO and CO+D in RNW, suggesting severe alterations in function and morphology of liver cells of these animals. The presence of high levels of s-SDH may be correlated with increases in liver damage and liver somatic index (HSI). In this regard, elevated s-SDH levels have been considered an efficient biomarker of liver damage, even before physiological and histological alterations are observed (Webb and Gagnon 2007). These authors founded a significant increase in s-SDH levels of *Acanthopagrus butcheri* injected with 30 mg Kg⁻¹ of pentachlorophenol after three days, whereas the HSI increased

after six days of injection, with a subsequent increase in hepatic micronucleus after nine days of injection. Similarly, Dixon et al. (1987) also found a significant increase of s-SDH activity before any histological alterations in *Oncorhynchus mykiss* acute exposed to phenol, *p*-chlorophenol, *p*-phenoxyphenol, carbon tetrachloride and copper. Thus, the remarkable increase in levels of s-SDH observed in tambaqui exposed to CO and CO+D in RNW might be the precursor of biological damage such lipid peroxidation and increased hepatotoxicity.

Many authors have shown that PAHs promote DNA strand breaks in organisms as a result of the presence of ROS (e.g. hydroxyl radicals). Thus, taking in account that the chemical dispersion of crude oil increases the bioavailability and uptake of PAHs by fish (Ramachandran et al., 2004), it is expected that the chemical dispersion of Urucu crude oil might increase its genotoxic effects to Amazonian fish. In the present work, the increased DNA damage observed in blood cells of tambaqui exposed to both CO and CO+D in GW reinforces that Urucu crude oil is genotoxic to fish (Kochhann et al., 2013). Interestingly, DNA damage was similar between fish exposed to CO and CO+D in GW, while the biomarkers responses in liver indicated that the chemical dispersion magnified the hepatic toxicity in these fish.

In addition, all treatments tested in this study (D; CO and CO+D) promote increased genotoxicity to the blood cells of tambaqui acclimated in RNW. In fish exposed to CO and CO+D, this could be related with an imbalance between the ROS generation and antioxidant enzymes activity, as seen in the liver of fish exposed to the same treatments in RNW. As seen by the liver biomarkers, interactions between surfactants, NOM and PAHs may affect the cellular membrane permeability of the fish blood cells. Thus, the effects of

such interaction on the permeability of biological membrane may result in increased cellular uptake of xenobiotic molecules that, consequently, would increase the amount of DNA damage in the blood cells of tambaqui. Unexpectedly, the Corexit 9500 alone in RNW increased the DNA damage of tambaqui. It is known that the presence of synthetic surfactants could break down the structure of HS found in NOM (Piccolo and Mbagwu, 1994), making them more hydrophilic. Although hydrophilic molecules are less absorbed by biological membranes, the uptake of these compounds happen through paracellular junctions (He et al., 1998) which might result in higher erythrocytic DNA damage in fish in RNW, as this was not true for tambaqui exposed to Corexit 9500 at GW.

In summary, the chemical dispersion of Urucu crude oil increases the uptake of PAHs by tambaqui at both types of water tested during acute exposure. Thus, fish acclimated to the RNW and exposed to CO+D presented higher B[a]P-type metabolites levels in bile. The hepatic biotransformation pathways and antioxidant defense responses of tambaqui were markedly affected by the acclimation to the RNW, as well as to all treatments tested. Our findings indicate that these hepatic alterations observed in tambaqui acclimated in RNW (i.e. stimulation of EROD and inhibition of GST activities, and lack of SOD induction) would make fish more susceptible to oxidative stress following acute exposure to PAHs, particularly to those chemically dispersed. In agreement with this assumption, the exposure to both CO and CO+D promote severe hepatotoxic responses in tambaqui acclimated to the RNW, which was associated with an increase in the lipid peroxidation of hepatocytes, and consequent release of SDH to the blood. Although the acute exposure to both CO and CO+D promoted slight genotoxic effects to blood cells of tambaqui in ground water, fish exposed to all treatments in RNW (exception the control group) displayed the highest levels

of DNA damage (Figure 6). However, it remains to be seen whether this biomarkers responses in RNW still enhanced in tambaqui under long-term exposures at natural Rio Negro conditions. Thus, the biomarkers responses displayed by tambaqui strongly indicate that in natural water containing high levels of NOM, the chemical dispersion of crude oil promotes additional challenges to aquatic organisms, resulting in increased acute hepatotoxicity and genotoxicity responses in animals.

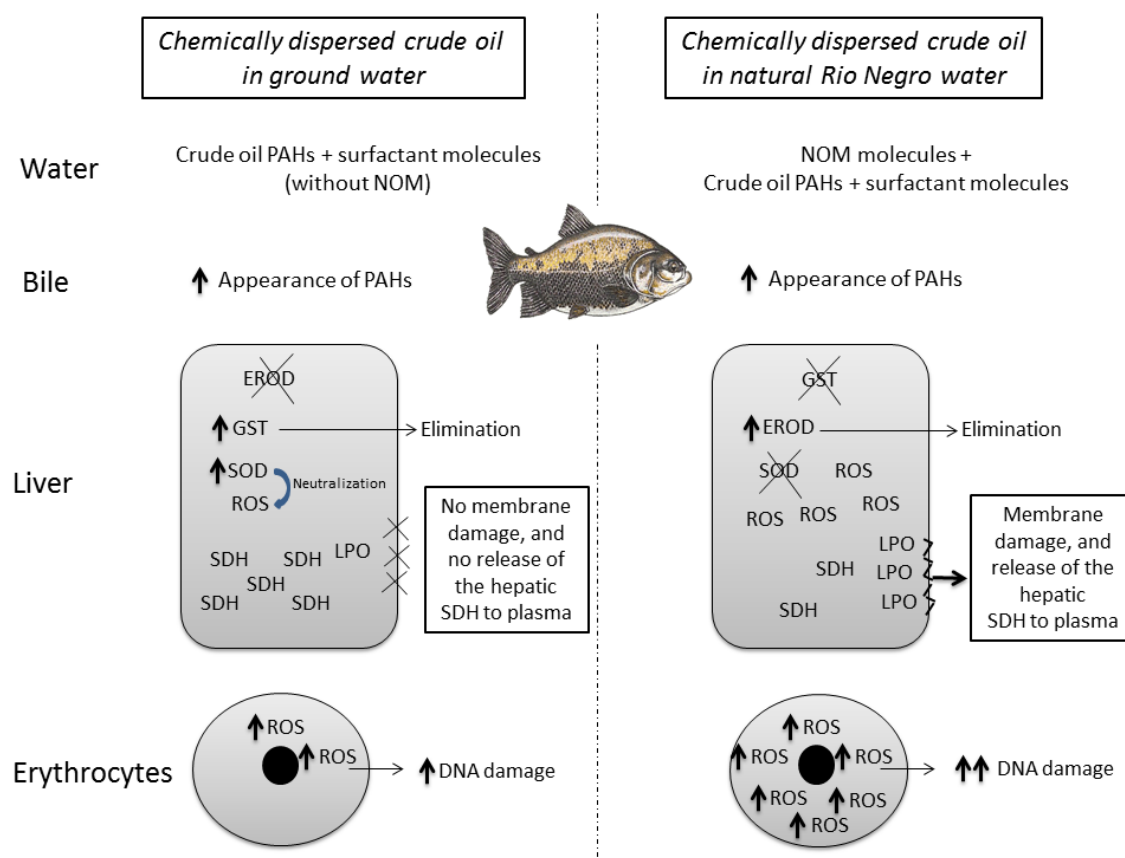


Figure 6. Scheme showing the toxicological effects of the chemically dispersed crude oil to the Amazonian tambaqui (*C. macropomum*) acclimated in ground water and in natural Rio Negro water.

**CAPÍTULO 3. Monitoramento de área portuária no Rio Negro-AM
impactada pelo derramamento acidental do derivado de petróleo CAP:
biomarcadores em duas espécies residentes de ciclídeos.**

Palavras-chave: respostas dependentes do tempo; hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; sensibilidade diferencial de espécies.

Resumo

O derramamento acidental do derivado de petróleo, CAP, na área portuária do São Raimundo (SR), localizado em Manaus/AM, foi monitorado ao longo de três meses (10, 45 e 90 dias após o derramamento) por meio da análise da concentração dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na água e análises dos biomarcadores de exposição e efeito em duas espécies residentes dos ciclídeos, *Satanoperca jurupari* e *Acarichthys heckelii*. O derramamento do CAP causou um aumento significativo na concentração dos HPA na coluna de água nas coletas realizadas após 10 e 45 dias do acidente, sendo que após 90 dias as concentrações desses HPA se encontraram próximas à observada na área utilizada como referência (Reserva do Desenvolvimento Sustentável do Tupé - TP). O índice pirolítico calculado demonstrou que a fonte de contaminação desses HPA foi relacionada tanto com a presença do CAP no ambiente, quanto com HPA oriundos do constante fluxo de embarcações na área do acidente. Foi observado um aumento nas respostas dos biomarcadores de exposição e efeito analisados em ambas as espécies em função das coletas, especialmente da concentração de HPA na bile, atividade da EROD hepática, danos no DNA dos eritrócitos e inibição da AChE cerebral. Verificamos ainda que, as duas espécies estudadas apresentaram diferenças na sensibilidade aos HPA do ambiente, com *A. heckelii* apresentando-se mais sensível em relação à *S. jurupari*. A análise integrada dos dados (PCA-FA) demonstrou importantes relações entre os HPA presentes no ambiente e as respostas dos biomarcadores avaliados em ambas as espécies coletadas após 10, 45 e 90 dias do acidente. O primeiro eixo da PCA-FA, que explicou a maior porcentagem da variabilidade dos dados, demonstrou claramente que a presença dos HPA na água juntamente com o COD do ambiente no SR, influenciaram positivamente as respostas dos biomarcadores em ambas as espécies.

1. Introdução

Os rios das grandes capitais são constantemente impactados por efluentes industriais e domésticos decorrentes da constante urbanização e crescimento industrial. Dentre uma gama de compostos tóxicos presentes nesses efluentes, podem-se destacar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), que possuem fontes tanto pirolíticas quanto petrogênicas. As fontes pirolíticas são consideradas as principais fontes dos HPA no ambiente, podendo decorrer da combustão incompleta da matéria orgânica e de combustíveis fósseis (Budzinski et al., 1997); por sua vez as fontes petrogênicas no ambiente estão relacionadas com pequenos vazamentos de óleo durante o atracamento ou transporte das pequenas ou grandes embarcações. Nesse sentido, os derramamentos acidentais de petróleo e derivados podem agravar o problema da contaminação ambiental já presente na maioria dos ambientes aquáticos dos grandes centros urbanos.

Acidentes devidos à estocagem ou transporte de petróleo e seus derivados já foram amplamente reportados pela literatura especializada nas últimas décadas, tanto em ambientes marinhos (Jung et al., 2011; Martínez-Gómez et al., 2006; Nkpaa et al., 2013), quanto de água doce (Wang et al., 2004, 2001). A poluição resultante da liberação do petróleo e seus derivados nos ambientes aquáticos, devido a grandes ou pequenos derramamentos acidentais, se tornou uma preocupação mundial acerca dos efeitos tóxicos para biota residente.

Embora a composição química do petróleo varie de acordo com sua origem e processamento, geralmente ele é constituído de 75% de hidrocarbonetos lipossolúveis, compostos altamente tóxicos, mutagênicos, e carcinogênicos (Abdel-Shafy and Mansour,

2015; Brauner et al., 1999). A determinação de biomarcadores em organismos aquáticos, que permitam medir as respostas em vários níveis da organização biológica, tem sido considerada uma importante ferramenta para avaliar os efeitos adversos da exposição aos contaminantes ambientais. Esses biomarcadores vêm sendo amplamente utilizados em vários programas de monitoramento e avaliação de risco ambiental de áreas impactadas por petróleo e derivados (Jung et al., 2011; Lushchak, 2011; Neves et al., 2007).

Os corpos de água da região Amazônica vêm sofrendo com frequentes contaminações oriundas do grande crescimento populacional e industrial da região. As regiões portuárias da cidade de Manaus/AM são bons exemplos de locais que sofrem com esse tipo de contaminação, além de receberem diariamente a contaminação constante do grande fluxo de embarcações, o que compromete a qualidade desses ambientes. Recentemente, em março de 2013, ocorreu o tombamento de uma balsa que transportava quatro contêineres carregados com o derivado de petróleo CAP (cimento asfáltico de petróleo) no Porto do São Raimundo, localizado na cidade de Manaus-AM, contaminando as águas do Rio Negro com cerca de 60 mil litros dessa substância.

O CAP é um constituinte natural do petróleo semissólido, de cor negra e viscoso, amplamente utilizado na pavimentação, podendo ser obtido através da destilação do petróleo bruto (EPA, 2003). O CAP é constituído por asfaltenos, que são uma mistura complexa de compostos orgânicos pesados (fração insolúvel) e por maltenos ou betume, que são constituídos de resinas, hidrocarbonetos saturados e aromáticos (fração solúvel) (Wang et al., 2003). Dessa forma, o CAP é um sistema coloidal, constituído por uma fase micelar (micelas de asfaltenos e hidrocarbonetos de alto peso molecular) e uma fase intermicelar (hidrocarbonetos de baixo peso molecular). Uma vez liberado em ambientes

aquáticos o CAP libera sua porção solúvel que facilmente se dispersa em água, enquanto que a porção insolúvel tende a submergir devido à sua alta viscosidade, entrando em contato com o sedimento (Wang et al., 2003). Sendo um óleo mais viscoso, o CAP não se espalha facilmente e tampouco penetra o solo de imediato. Isto dificulta a aplicação de protocolos de mitigação em casos acidentais de derramamentos de óleo, porque a habilidade das bombas a vácuo em manipular óleos viscosos é limitada, dificultando o processo de limpeza. Isto pode implicar em um maior tempo de permanência desses compostos no ambiente (Wang et al., 2003).

Apesar da aplicação de protocolos de mitigação no porto de São Raimundo (SR), após o acidente o ambiente apresentou visíveis pontos de contaminação. O porto SR está localizado à margem direita do Rio Negro, e atende cerca de 10% das embarcações interestaduais de cargas e passageiros da região, sendo que aproximadamente 94 embarcações atracam por dia em suas proximidades (Departamento Nacional de Infraestrutura de Transportes - DNIT, 2014). O porto SR já possui um histórico de contaminação devido ao grande fluxo de embarcações diárias, além de receber altas cargas de poluentes industriais e domésticos provenientes do igarapé do São Raimundo, de maneira que o derramamento acidental do CAP veio agravar a situação desse porto. Além disso, as como altas concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) e baixas concentrações de íons da água do Rio Negro podem impor desafios adicionais à biota residente quando na presença de poluentes orgânicos como os HPA do petróleo.

Diversos trabalhos têm demonstrado a existência de interações entre as moléculas de COD e dos HPA (Landrum et al., 1984; Playle and Dixon, 1993; Richards et al., 2001, 1999), além de aumento de toxicidade de HPA em condições de baixa disponibilidade iônica na

água (Ramachandran et al., 2006; Shukla et al., 2007), o que, por sua vez, traz à luz preocupações adicionais frente a contaminações por HPA no Rio Negro, e seus prováveis efeitos deletérios sobre a ictiofauna local. A ictiofauna do Rio Negro é composta por cerca de 450 espécies de peixes, sendo que cerca de 10% pertencem à família Cichlidae (Lizarazo et al., 2010). Os ciclídeos são peixes de hábito sedentário e territoriais (Ferreira et al., 1998), sendo que, essas características, os tornam bons modelos para programas de monitoramento.

As espécies *Acarichthys heckelii* e *Satanoperca jurupari* pertencentes à família Chichlidae, ordem Perciforme, foram escolhidas para a realização do monitoramento. *A. Heckelii* (Müller e Troschell, 1849) é classificada como espécie onívora, sendo conhecida por se alimentar próximo ao substrato (Tan and Lim, 2008), sendo algas e macroinvertebrados bentônicos seus principais itens alimentares. *S. jurupari* (Heckel, 1840), assim como *A. heckelii*, possui hábito de se alimentar principalmente de plantas e insetos (Hahn and Cunha, 2005) em áreas próximas ao substrato. Assim, exemplares de ambas as espécies foram coletados, temporalmente (10, 45 e 90 dias pós-acidente), tanto no porto SR quanto na reserva de desenvolvimento sustentável (RDS) do Tupé (utilizado como área de referência) para se avaliar os possíveis efeitos negativos causados pelo derramamento acidental do CAP no porto SR por meio da análise de biomarcadores amplamente utilizados em áreas contaminadas por petróleo e derivados. A RDS do Tupé foi escolhida como área de referência, uma vez que se localiza a 24 km à jusante do porto SR, e não possui histórico de contaminação ambiental.

2. Material e métodos

Coleta de água e peixes

Foram realizadas coletas temporais no porto SR e no TP (local de referência) (Figura 1). A primeira coleta foi realizada após 10 dias da ocorrência do acidente (Abril de 2013), a segunda após 45 dias (Maio de 2013) e a última coleta após 90 dias (Julho de 2013). No contexto do pulso de inundação dos grandes rios da Amazônia (Junk et al. 1989), as coletas foram realizadas durante o período de transição enchente–cheia do ciclo sazonal do Rio Negro (Figura 2). Em todas as coletas foram mensurados o pH, oxigênio dissolvido e temperatura da água, por meio de um medidor de multiparâmetros. Água foi coletada 5 cm abaixo da superfície para análise dos HPA e do COD, utilizando dois frascos âmbar de 500 ml em cada ponto; um frasco foi utilizado para análise dos HPA na água e o outro utilizado para realizar as leituras do COD. Após a coleta, os frascos foram identificados, armazenadas em gelo e transportados ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM). Espécimes de *A. hechelii* e *S. jurupari* foram coletados com o auxílio de rede de espera, rede de cerco e puçás (Licença de coleta: SISBIO 29837-4). Após a coleta, os peixes foram pesados, medidos (Tabela 1) e anestesiados em gelo para posterior remoção cirúrgica das brânquias, fígado e vesícula biliar. O material foi mantido em nitrogênio líquido até a chegada ao LEEM onde foi armazenados em freezer -80 até o momento das análises.

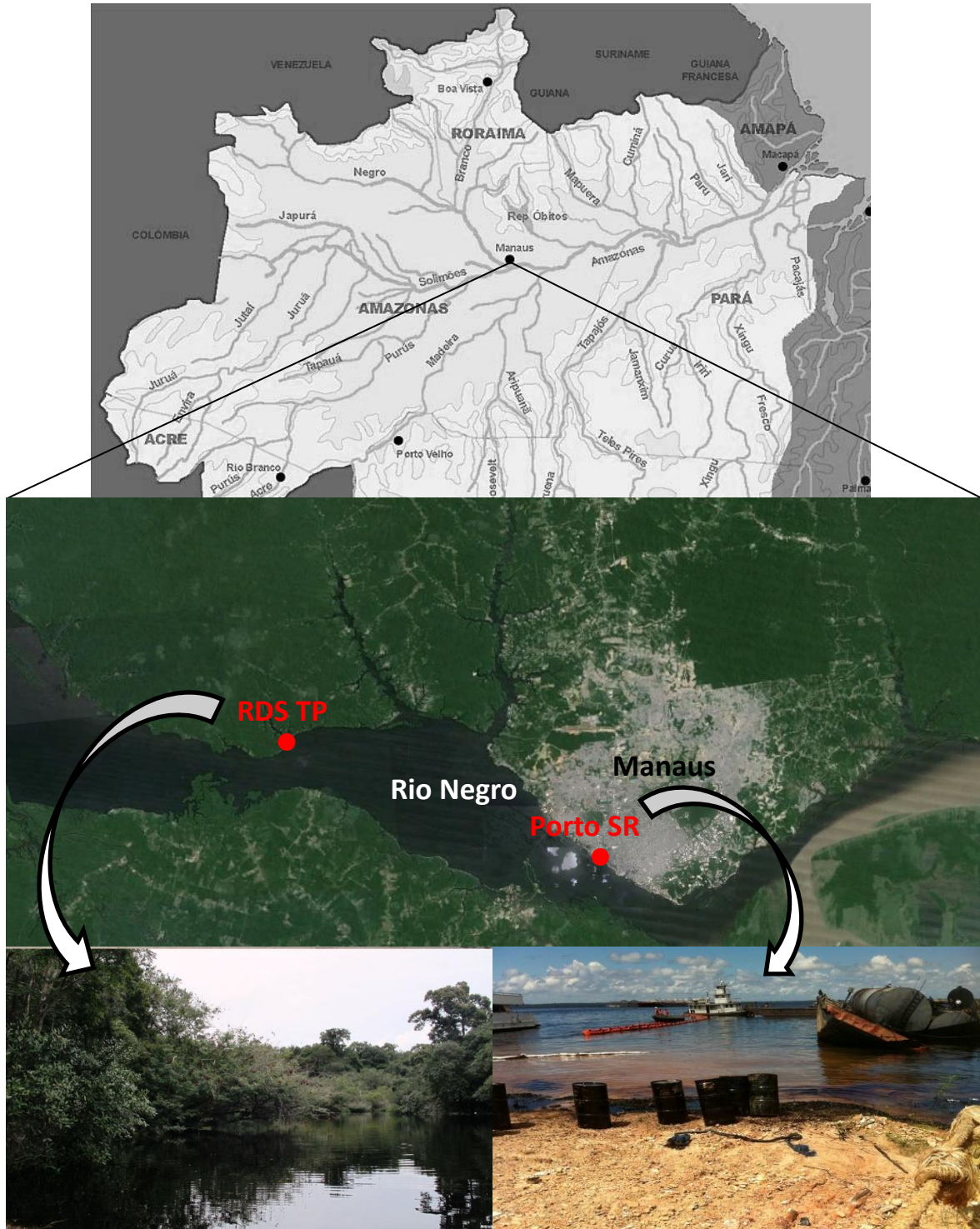


Figura 1. Mapa com os locais de coleta de peixes e água no porto São Raimundo (SR) e na área utilizada como referência (RDS Tupé).

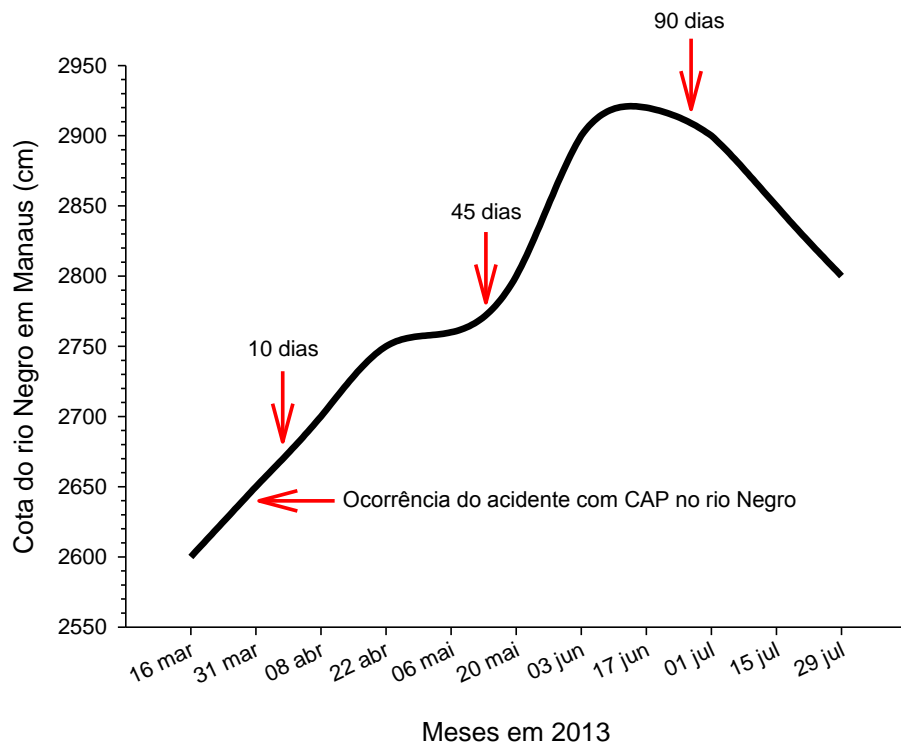


Figura 2. Cota do Rio Negro (cm) nas datas referentes às coletas realizadas (abril, maio e junho de 2013). As setas indicam os períodos das coletas de água e peixes tanto no porto São Raimundo (SR) quanto no Tupé (TP) representados em dias pós-acidente. Fonte: CPRM (serviço geológico do Brasil).

Tabela 1. Número de exemplares (n), peso e comprimento padrão (CP) das espécies *A heckelii* e *S. jurupari* coletados em 10, 45 e 90 dias após derramamento acidental de CAP no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP). Valores de peso e CP estão representados como média \pm erro padrão da média. Letras indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Espécie	n/Peso/CP	Local	Coletas (dias pós-acidente)		
			10	45	90
<i>Acarichthys heckelii</i>	N	TP	6	8	6
		SR	6	7	6
	Peso (g)	TP	37,67 \pm 14,6a	31,51 \pm 12,6a	77,48 \pm 14,6a
		SR	54,2 \pm 14a	60,8 \pm 13a	106 \pm 14,6a
	CP (cm)	TP	10,4 \pm 1,18a	9,75 \pm 1,02a	13 \pm 1,18a
		SR	12,16 \pm 1,5a	12,47 \pm 1,1a	15 \pm 1,18a
<i>Satanoperca jurupari</i>	N	TP	-	8	5
		SR	-	9	5
	Peso (g)	TP	-	43,4 \pm 4a	71,28 \pm 2,3a
		SR	-	63,2 \pm 10,8a	85,9 \pm 12a
	CP (cm)	TP	-	11,4 \pm 0,43a	14,1 \pm 0,3a
		SR	-	12,72 \pm 0,7a	15,4 \pm 0,5a

Procedimento metodológico das análises de HPA na água

As análises foram realizadas no laboratório do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas (MBT-UEA) sob a supervisão da Dra Hiléia S. Barroso.

Reagente e soluções

Os solventes utilizados no processo de extração foram Diclorometano, Hexano e Sulfato de sódio anidro, da marca Sigma Aldrich. Foi preparada uma mistura de Hexano e Diclorometano na proporção 1:1.

A solução padrão dos *surrogates* foi composta por três HPA deuterados, acenafteno d-10, naftaleno d-08 e fenantreno d-10, na concentração de 1000 ug.mL^{-1} ; a solução do padrão interno (PI) foi preparada com Fluoranteno deuterado (Flu-d10) a 500 ug.mL^{-1} . A escolha destes compostos como *surrogate* e PI, foi devido a semelhança entre as suas características estruturais e às dos analitos.

Para a quantificação e identificação dos compostos foi utilizada uma solução padrão de 18 HPA (*Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix - Supelco Analytical, 47543-U/ 2000ug/mL em C₆H₆:CH₂Cl₂*), com 99% de pureza, da marca Sigma Aldrich contendo: Naftaleno; 2-metilnaftaleno; 1-metilnaftaleno; Bifenil, Acenaftileno; Acenafteno; Fluoreno; Fenantreno; Antraceno; Fluoranteno; Pireno; Benzo[a]antraceno; Benzo[b]fluoranteno; Benzo[k]fluoranteno; Benzo[a]pireno; Indeno[1,2,3-c,d]; Dibenzo[a,h]antraceno; Benzo[g,h,i]perileno (Tabela 2).

Extração dos HPA

A extração dos HPA foi realizada pelo método líquido-líquido. Antes de iniciar o processo, foi adicionada na amostra 50 μL do padrão *surrogate* (1 mg mL^{-1}) na amostra. A amostra foi transferida para um erlenmeyer e agitada em Vórtex, para homogeneização com o padrão *surrogate*.

A extração líquido-líquido consistiu na adição de 125 mL da mistura de solventes aos 250 mL do volume de água da amostra em um funil de separação de 500 mL. Após agitação vigorosa da amostra, por três minutos, e a separação das fases, no funil de separação, a fase orgânica foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferida para outro erlenmeyer. O mesmo processo foi repetido mais duas vezes, verificando o final da

extração por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), que consiste em aplicar o extrato em uma placa cromatográfica planar, com auxílio de um capilar e revelar em ultravioleta (UV), observando até a ausência de compostos que indica o final da extração.

O extrato foi seco com a adição de sulfato de sódio anidro em quantidade suficiente para retirar toda água da amostra. O sal secante foi removido da amostra por filtração em papel filtro para um balão de fundo chato de 50 mL. Em seguida o solvente foi evaporado e a amostra concentrada até 900 uL, em um evaporador rotativo, a vácuo por 40°C a 45°C. Após concentrado, o extrato foi transferido para um vial, no qual foi adicionados 100 uL do Padrão Interno (PI) (500 ug/mL), antes de ser analisado por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas (CG/EM).

Análise química por Cromatografia gasosa e Espectrometria de Massa (CG/EM)

Foi injetado 1 µL da amostra em um Cromatógrafo a Gás (Shimadzu 2010) equipado com Autosampler Shimadzu AOC-20i e acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-EM Shimadzu QP 2010 Plus). O equipamento operou no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM – single ion monitoring) (70eV). No CG foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida RESTEK RTX-5MS 30m x 0,25 mm de diâmetro interno e 1 µm de filme interno formada por 5% de difenil e 95% de dimetil-polissiloxano.

A rampa de temperatura utilizada na separação dos compostos iniciou em 40°C mantendo-se em isoterma por um minuto, seguido de uma rampa de aquecimento na taxa de 20 °C/min até 60 °C, depois 5 °C/min até 260°C e 10 °C/min até 280°C com isoterma de um minuto, finalizando com 45 min de tempo de corrida.

A temperatura do injetor foi 270°C no modo *splitless*, com *Sampling Time* ajustado a 1mim. Modo do fluxo ajustado para velocidade linear, com pressão de 101,5 kPa; fluxo total 95,2 ml/mim; fluxo da coluna 1,81ml/mim; velocidade linear a 48,5 m/sec; fluxo de purga com 3,0 ml/min e *Split ratio* 50.

As temperaturas da fonte de íons e da interface do espectrômetro de massas, ambas foram de 250°C, com tempo de corrida do corte do solvente para 3 minutos. A voltagem dos detectores foi definida de acordo com o *tunning* fixado para o método.

Após as análises foram obtidos os cromatogramas, onde foram identificados os HPA pela comparação entre os tempos de retenção obtidos nos cromatogramas dos compostos da amostra e no da injeção, prévia, da mistura de padrões, e/ou pela massa do íon molecular principal (Tabela 2).

Tabela 2. 18 HPA constituintes da mistura de padrões utilizados para identificar e quantificar os HPA, e seu respectivo íon molecular.

HPA	íon	HPA	íon
Naftaleno	128	Fluoranteno	202
2-metilnaftaleno	142	Pireno	202
1-metilnaftaleno	142	benzo(a)antraceno	228
Bifenil	154	benzo(b)fluoranteno	252
Acenaftileno	152	benzo(k)fluoranteno	252
Acenafteno	153	benzo(a)pireno	252
Fluoreno	166	indeno(1,2,3-c,d)pireno	276
Fenantreno	178	dibenzo(a,h)antraceno	278
Antraceno	178	benzo(g,h,i)perileno	276

Quantificação dos HPA

Os HPA foram quantificados pelo método da padronização interna. A quantificação foi realizada pela área do fragmento principal de cada composto e pela curva analítica de padrões. Considerando-se a correção da área do fragmento principal de cada composto, pelo fator de resposta obtido, a partir da área do fragmento principal do *surrogate* e do PI.

Antes de iniciar as injeções, a solução dos padrões foi injetada em CG/EM para o desenvolvimento do método de análise e da rampa de temperatura no CG. Após várias tentativas, o método foi otimizado e os tempos de retenção dos compostos foram estabelecidos. Utilizando o método desenvolvido, foram injetadas as soluções da curva analítica e as amostras, obtendo-se os cromatogramas com as áreas dos compostos.

Inicialmente, foram utilizadas as áreas dos *surrogates* e do PI para determinar a eficiência do método, isto é, verificar o quanto do padrão *surrogate*, que foi submetido ao processo de extração, foi recuperado em relação ao PI adicionado no final da extração. A porcentagem de recuperação foi obtida pela Equação 1.

$$R = \frac{A_s}{A_{pi}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde R é a porcentagem da recuperação do *surrogate*, obtida pela relação entre A_s (área do cromatograma do *surrogate*) e A_{pi} (área do cromatograma do padrão interno). A partir da recuperação, a porcentagem de perda do composto (P) é dada pela Equação 2.

$$P = 100 - R \quad \text{Equação 2}$$

O resultado da porcentagem da perda representa o quanto deve ser adicionado ao resultado obtido do analito para que se tenha a correção que desconsidera os efeitos das perdas de analito para os procedimentos ao longo do tratamento da amostra (Cavalcante et. al, 2007; Taniguchi, 2001; Yogui, 2002).

A partir da porcentagem de recuperação dos *surrogates* foi obtido o fator de correção, a fim de corrigir as áreas dos compostos de possíveis perdas ocorridas durante o processo de extração. Após a correção da área dos compostos, foram determinadas as concentrações finais dos compostos em cada amostra, através da equação da reta gerada pela curva analítica de cada composto. Assim, foram calculadas as concentrações individuais dos HPA e a partir destas foi obtida a somatória dos HPA (Σ HPAs totais) das amostras do SR e do TP.

Curva analítica

A partir da solução padrão do Mix de 18 HPA foi estabelecida uma curva analítica com seis concentrações conhecidas (1, 5, 10, 15, 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As concentrações dos pontos da curva analítica foram escolhidas de acordo com a faixa estimada para as concentrações das amostras. As áreas dos picos obtidos no CG/EM foram integrados por um sistema de aquisição de dados, determinando o fator de resposta, os índices de retenção e as curvas para cada composto. A partir da curva dos analitos, foi obtida a equação da reta ($y=ax+b$) e o valor de R^2 . O índice de correlação linear de Pearson foi igual ou superior a 99% ($r^2 = 0,996$).

Análises dos biomarcadores em *A. heckelii* e *S. Jurupari*

Todas as análises descritas a seguir podem ser encontradas em detalhe no Capítulo 1 do presente trabalho.

Determinação de metabólitos na bile por fluorescência fixa (FF)

A análise dos metabólitos de HPA na bile foi realizado de acordo com Krahn et al. (1986) para metabólitos do tipo pireno, e de acordo com Lin et al. (1996) para metabólitos do tipo naftaleno e do tipo B[a]P.

Enzimas de biotransformação EROD hepática e GST branquial

A indução da CPY1A foi determinada medindo-se a atividade da enzima EROD hepática de acordo com metodologia descrita por Webb et al. (2005) e a atividade da enzima GST foi determinada nas brânquias por meio do método descrito por Keen et al. (1976) utilizando o 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato.

Enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) branquiais

A atividade da CAT foi mensurada pela avaliação contínua do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio em comprimento de onda de 240 nm, segundo a metodologia descrita por Beutler (1975). A atividade da SOD nas brânquias foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo C pelo radical superóxido, segundo a metodologia descrita por McCord e Fridovich (1969). A atividade da GPx selênio-dependente foi determinada pelo método de Hopkins e Tudhope (1973), baseado na oxidação do NADPH + H⁺ em presença do peróxido de hidrogênio em comprimento de onda de 340 nm.

Peroxidação das membranas lipídicas (LPO) branquiais.

A peroxidação lipídica (LPO) foi quantificada pela oxidação do Fe^{+2} (sulfato ferroso amoniacal- FeSO_4) a Fe^{+3} pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de um pigmento complexador de Fe (III), o alaranjado de xilenol (Ferrous Oxidation-Xylenol Orange) de acordo com Jiang et al. (1991).

Atividade da enzima AChE cerebral

A atividade da AChE cerebral foi mensurada por meio do método de Ellman et al. (1961). Amostras de cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato (0,1 M, glicerol 20% e pH 7,5) e centrifugadas por 20 minutos a 12000 g a 4°C para que o sobrenadante fosse removido. Iodeto de acetilcolina 9 mM foi utilizado como substrato e o DTNB foi utilizado como reagente de cor. A atividade da enzima AChE foi medida utilizando um espectrofotômetro no comprimento de onda de 412 nm, sendo expressa em $\text{nmol min}^{-1} \text{mgproteína}^{-1}$.

Danos genotóxicos no DNA dos eritrócitos (Cometa)

O ensaio do cometa alcalino foi realizado segundo metodologia proposta por Silva et al. (2000).

Análise estatística

Os dados obtidos foram representados como média \pm erro padrão da média. Foi utilizada uma análise de variância fatorial (ANOVA fatorial), onde os locais de coleta (Tupé e porto São Raimundo) e o tempo de coleta após o derramamento acidental de CAP (10, 45 e 90 dias) foram considerados como fatores que poderiam influenciar as variáveis-resposta

(Biomarcadores). O teste de Holm-Sidack foi aplicado para identificar as diferenças entre médias das variáveis biológicas, quando existente. Os programas utilizados foram o SigmaStat 3.5 para as análises estatísticas e o programa SigmaPlot 11.0 para a confecção dos gráficos. Para verificar a existência de uma relação entre o peso dos animais e as respostas dos biomarcadores foi realizada uma análise de regressão simples dos animais coletados em 10, 45 e 90 dias (*A. heckelii*) e 45 e 90 dias (*S. jurupari*) pós-acidente tanto no TP quanto no SR. Como não foram observadas relações significativas ($P < 0,05$) entre esses parâmetros, os dados não serão apresentados nos resultados.

Além das análises descritas acima, foi realizada uma análise integrada dos dados via análise fatorial (FA) utilizando-se a análise dos componentes principais (PCA) como método para a extração da matriz. Para tanto, os valores originais das variáveis biológicas (biomarcadores) e a concentração de COD e HPA totais na água foram utilizados. Os dados foram arranjados em três matrizes (10, 45 e 90 dias) para a espécie *A. heckelii* e duas matrizes (45 e 90 dias) para a espécie *S. jurupari*, onde três fatores foram extraídos considerando *eigenvalues* maiores que 1,0 (critério de Kaiser). Para a FA, as variáveis foram auto-escaladas (*varimax normalization*) para que todas as variáveis tivessem o mesmo peso (evitar interferência das escalas de medidas de cada variável). Somente valores maiores que 0,45 dos *loadings* gerados foram considerados como significativos (Tabachnic e Fidell, 1996). Os programas utilizados foram o STATISTICA 6.0 (Stat Soft, Inc., 2001; versão 6.0) para a análise integrada dos dados e o programa SigmaPlot 11.0 para a confecção dos gráficos.

3. Resultados

Parâmetros físico-químicos, COD e HPA na água

A temperatura, o pH, e o oxigênio dissolvido não apresentaram variações entre os pontos TP e SR ao longo das coletas de 10, 45 e 90 dias pós-acidente. O COD variou de 8,59 a 11,8 mgC L⁻¹ sendo que o maior valor de SR foi encontrado na coleta de 10 dias pós-acidente e o menor valor foi encontrado no TP na coleta de 90 dias pós-acidente (Tabela 3).

Tabela 3. Varáveis físico-químicas (temperatura, pH e oxigênio dissolvido) e carbono orgânico dissolvido na água após 10, 45 e 90 dias do derramamento acidental de CAP no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP).

Coletas	Local	T°C	pH	OD (mg L ⁻¹)	COD (mg ml ⁻¹)
10 dias	TP	30,1	4,7	3,8	11,3
	SR	30,1	4,5	3,7	11,7
45 dias	TP	29,7	4,7	3,3	8,8
	SR	30,3	4,5	3,4	10,4
90 dias	TP	30,5	4,7	4,4	8,6
	SR	29,5	4,8	2,9	9,1

A concentração dos HPA totais variou de 1076 a 4412 ng ml⁻¹. As coletas de 10, 45 e 90 dias pós-acidente no SR apresentaram um aumento de 1,62; 2,58 e 1,18 vezes, respectivamente, na concentração dos HPA totais em relação ao TP, indicando uma diminuição temporal na concentração dos HPA totais. As coletas realizadas após 45 e 90 dias do derramamento mostraram uma diminuição de 1,24 e 3,44 vezes, respectivamente, na concentração dos HPA totais em relação à coleta realizada após 10 dias do acidente no SR; a coleta realizada após 90 dias apresentou uma diminuição de 2,76 vezes em relação a coleta de 45 dias pós-acidente no SR. Na área referência (TP) foi observada uma diminuição temporal na concentração dos HPA totais. As coletas realizadas após 45 e 90 dias do acidente apresentaram uma diminuição de 1,97 e 2,5 vezes em relação à coleta de

10 dias pós-acidente no TP. A coleta realizada após 90 dias do acidente apresentou uma diminuição de 2,5 vezes em relação à coleta de 45 dias pós-acidente (Figura 3).

Dentre os HPA totais, os que apresentaram maior contribuição foram o naftaleno, juntamente com os homólogos alquilados do naftaleno e o antraceno. O naftaleno apresentou um aumento de 2,04; 1,96 e 1,37 vezes nas coletas de 10, 45 e 90 dias pós-acidente, respectivamente, em relação ao TP. Além disso, foi observada uma diminuição na concentração do naftaleno dependente do tempo. As coletas realizadas após 45 e 90 dias do acidente apresentaram uma diminuição de 1,7 e 3,8 vezes, respectivamente, na concentração dos HPA totais em relação à coleta realizada após 10 dias do acidente no SR. A coleta realizada após 90 dias apresentou uma diminuição de 2,23 vezes em relação à coleta de 45 dias pós-acidente no SR. Também na área referência (TP) foi observada uma diminuição temporal na concentração do naftaleno. As coletas realizadas após 45 e 90 dias do acidente apresentaram uma diminuição de 1,63 e 1,83 vezes em relação à coleta de 10 dias pós-acidente. A coleta realizada após 90 dias do acidente apresentou uma diminuição de 2,23 vezes em relação em relação à coleta de 45 dias pós-acidente. O antraceno apresentou um aumento de 1,32 e 3,98 vezes nas coletas de 10 e 45 dias pós-acidente, respectivamente, em relação ao TP, tendo mostrado uma diminuição dependente do tempo. As coletas realizadas após 45 dias do acidente apresentaram uma diminuição de 2,62 vezes da concentração dos HPA totais em relação à coleta realizada após 10 dias do acidente no SR, sendo que, na coleta realizada após 90 dias do acidente no SR, não foi detectado antraceno nas amostras de água. Na área referência (TP) foi observada uma diminuição, dependente do tempo, na concentração dos HPA totais. As coletas realizadas após 45 e 90 dias do acidente apresentaram uma diminuição de 1,14 e 2,2 vezes em relação à coleta de

10 dias pós-acidente. A coleta realizada após 90 dias do acidente apresentou uma diminuição de 1,92 vezes em relação à coleta de 45 dias pós-acidente.

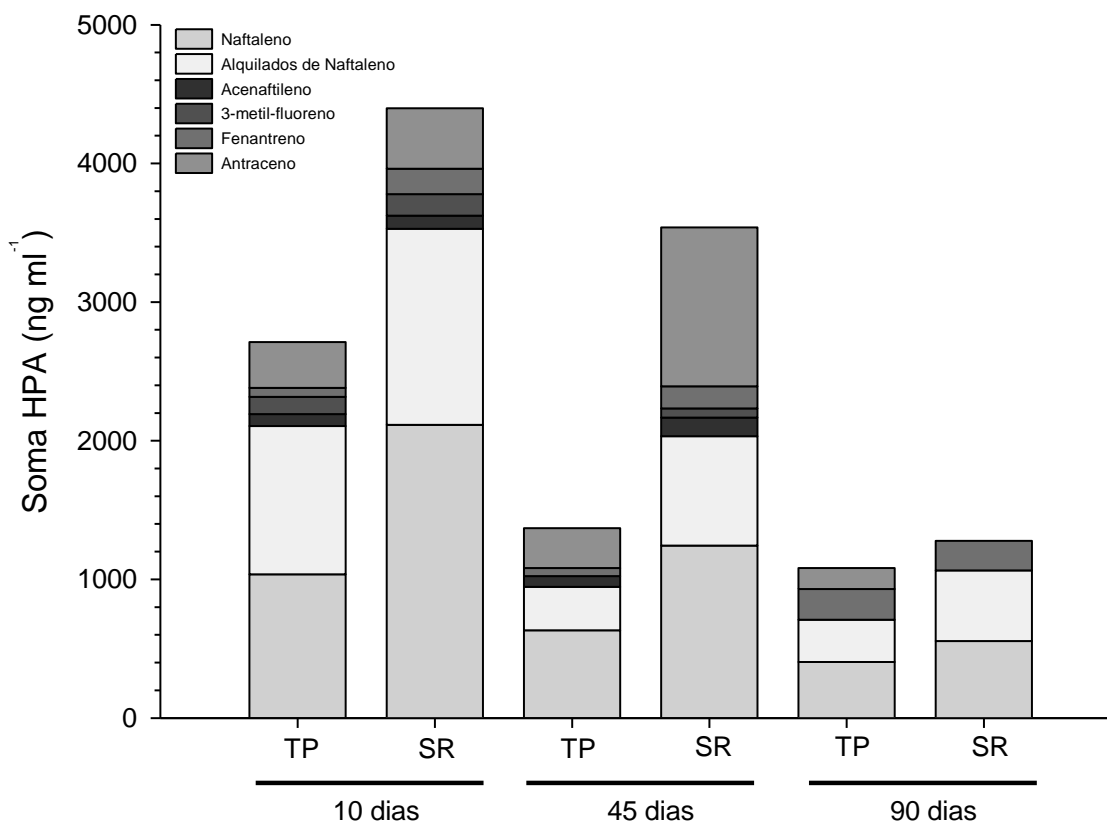


Figura 3. Concentração dos HPA encontrados na água após 10, 45 e 90 dias do derramamento acidental de CAP no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP). Barra fragmentada demonstra os HPA de maior contribuição no SR e TP em todas as coletas realizadas.

Metabólitos de HPA na bile

A concentração dos metabólitos de B[a]P na bile dos exemplares de *A. heckelii* variou de 123 a 1350 μ gramas mg proteína⁻¹, e nos exemplares de *S. jurupari* variou de 230 a 844 μ gramas mg proteína⁻¹. Foi verificado um aumento significativo ($P < 0,05$) dos metabólitos de B[a]P na bile de 4,6 e 2,25 vezes, para os exemplares de *A. heckelii*, e de 3,55 e 1,74

vezes, para os exemplares de *S. jurupari*, coletados no SR após 45 e 90 dias do acidente, respectivamente, em relação ao TP. Exemplares de *A. heckelii* apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) desses metabólitos na bile de 2,37 vezes no SR e de 4,85 vezes no TP na coleta de 90 pós-acidente em relação à coleta de 45 dias pós-acidente, sendo que exemplares de *S. jurupari* não apresentaram alterações significativas nesses metabólitos para a coleta de 90 dias em relação à coleta de 45 dias pós-acidente (Figura 4 A e B).

A concentração dos metabólitos de pireno na bile dos exemplares de *A. heckelii* variou de 57 a 1247 $\mu\text{gramas mg proteina}^{-1}$, e nos exemplares de *S. jurupari* variou de 81 a 1374 $\mu\text{gramas mg proteina}^{-1}$. Foi verificado um aumento significativo ($P < 0,05$) dos metabólitos de pireno na bile de 7,42 e 5,32 vezes, para *A. heckelii*, e de 16 e 7,22 vezes, para *S. jurupari*, coletados no SR após 45 e 90 dias do acidente, respectivamente, em relação ao TP. Foi verificado aumento significativo ($P < 0,05$) de 2,7 vezes desses metabólitos na bile nos exemplares de *A. heckelii* no SR na coleta de 90 dias pós-acidente em relação à coleta de 45 dias pós-acidente, sendo que diminuição significativa ($P < 0,05$) de 1,87 vezes desses metabólitos foi encontrada em *S. jurupari* nessas condições (Figura 4 C e D).

A concentração dos metabólitos de naftaleno na bile dos exemplares de *A. heckelii* variou de 107 a 1604 $\text{mg mg proteina}^{-1}$ e nos exemplares de *S. jurupari* variou de 95 a 1091 $\text{mg mg proteina}^{-1}$. Foi verificado um aumento significativo ($P < 0,05$) dos metabólitos de pireno na bile de 3,84 e 7,5 vezes, para *A. heckelii*, e de 7,66 e 8,34 vezes, para *S. jurupari*, no SR após 45 e 90 dias do acidente, respectivamente, em relação ao TP. Aumento significativo de 3,96 e 1,47 vezes desses metabólitos também foi encontrado para exemplares de *A. heckelii* e *S. jurupari*, respectivamente, no SR após 90 dias do acidente em relação à coleta feita 45 dias após o acidente (Figura 4 E e F).

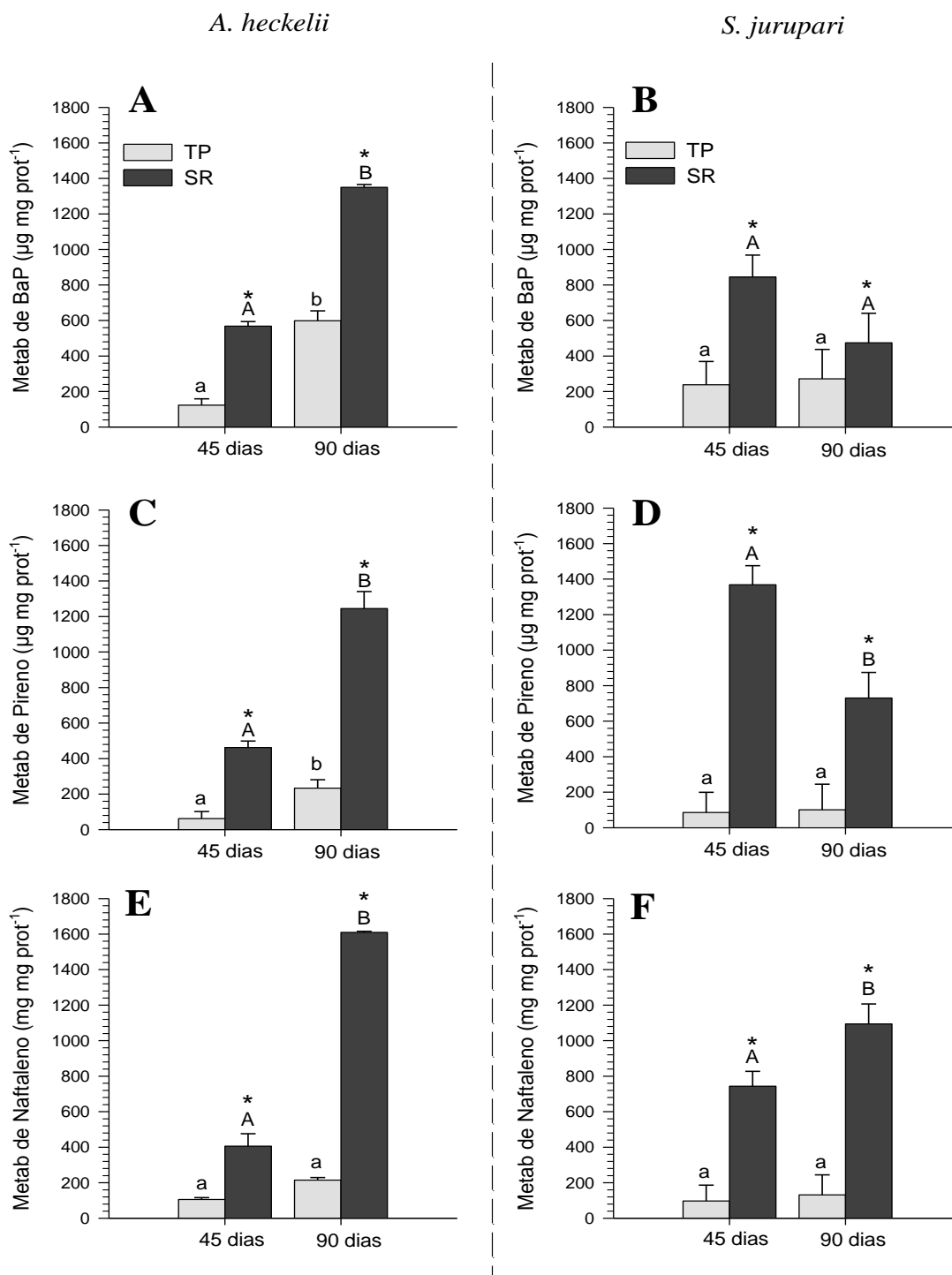


Figura 4. Níveis dos metabólitos de B[a]P (A e B), pireno (C e D) e naftaleno (E e F) na bile de exemplares de *A. heckelii* e *S. jurupari* no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP) após 45 e 90 dias do derramamento acidental de CAP. Letras minúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no TP e letras maiúsculas indicam

diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no SR. Símbolo (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os pontos na mesma coleta.

EROD hepática e GST branquial

A atividade da EROD hepática variou de 14,7 a 112,5 $\text{picomol min}^{-1} \text{mg proteina}^{-1}$ nos exemplares de *A. heckelii* e de 33,8 a 110,8 $\text{picomol min}^{-1} \text{mg proteina}^{-1}$, nos exemplares de *S. jurupari*. Não houve diferenças significativas ($P < 0,05$) na atividade da EROD hepática dos exemplares de ambas as espécies coletas no TP. Por outro lado, aumento significativo ($P < 0,05$) de 2,13 e 4,6 vezes foi observado nos exemplares de *A. heckelii* coletados no SR após 45 e 90 dias do acidente, respectivamente, em relação ao TP. A atividade da EROD hepática dos exemplares de *S. jurupari* foi significativamente maior em 2,12 vezes nos exemplares coletados no SR após 45 dias do acidente em relação ao TP, enquanto que após 90 dias do acidente, a atividade dessa enzima diminuiu significativamente ($P < 0,05$), em 2,25 vezes, quando comparada à coleta realizada 45 dias após o acidente (Figura 5 A e B).

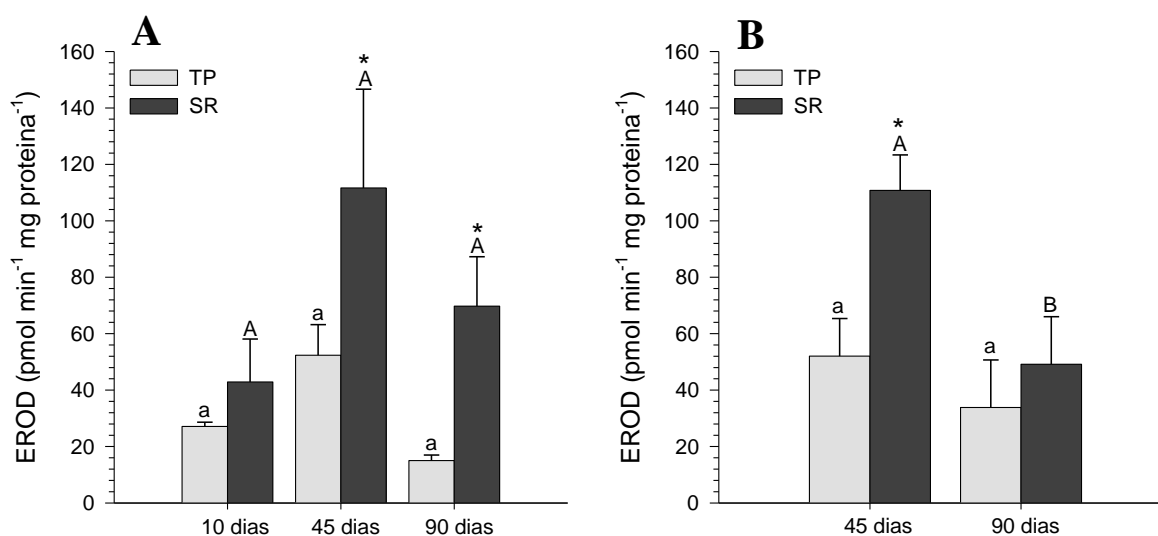


Figura 5. Atividade da enzima EROD hepática em (A) *A. heckelii* e (B) *S. jurupari* coletados no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP). Tupé-AM (TP)

após 10, 45 e 90 dias do derramamento accidental de CAP. Letras minúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no TP e letras maiúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no SR. Símbolo (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os pontos na mesma coleta.

A atividade da enzima GST branquial variou de 1,03 a 2,24 $\mu\text{mol de CDNB min}^{-1} \text{mgproteína}^{-1}$ nos exemplares de *A. heckelii* e de 0,5 a 0,84 $\mu\text{mol de CDNB min}^{-1} \text{mgproteína}^{-1}$ nos exemplares de *S. jurupari* (Figura 6 A e B). Um aumento significativo ($P < 0,05$) na atividade dessa enzima foi observado somente nas brânquias dos exemplares de *A. heckelii* coletados 90 dias após o acidente, com um aumento significativo de 1,9 vezes em relação ao TP, e aumento de 2,17 e 1,64 vezes em relação aos animais coletados após 10 e 45 dias do acidente, respectivamente.

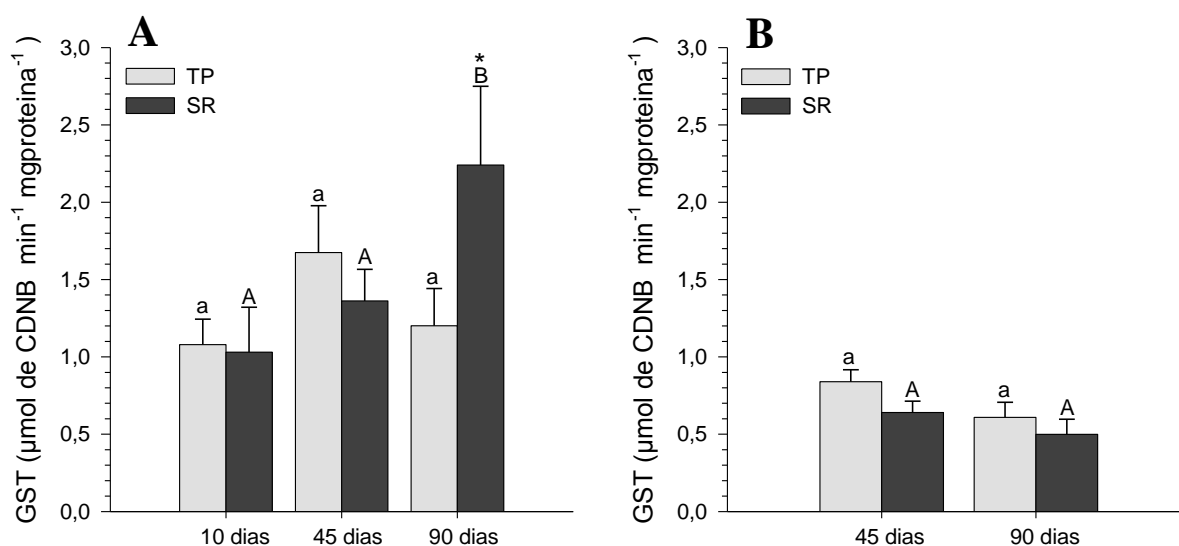


Figura 6. Atividade da enzima GST branquial de (A) *A. heckelii* e (B) *S. jurupari* coletados no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP) após 10, 45 e 90 dias do derramamento accidental de CAP. Letras minúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no TP e letras maiúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no SR. Símbolo (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os pontos na mesma coleta.

Enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx branquiais

A atividade da SOD branquial enzima variou de 108 a 130 U da SOD $\text{min}^{-1} \text{mgproteína}^{-1}$ nos exemplares de *A. heckelii* (Figura 7 A), e de 110 a 130 U da SOD $\text{min}^{-1} \text{mgproteína}^{-1}$ nos exemplares de *S. jurupari* (Figura 7 B). A atividade dessa enzima nas brânquias não apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os pontos e tampouco entre as coletas para ambas as espécies.

A atividade da GPx branquial variou de 1,38 a 4,4 $\mu\text{mol de NADPH min}^{-1} \text{mgproteína}^{-1}$ nos exemplares de *A. heckelii* (Figura 7 C), e de 2,63 a 3,54 $\mu\text{mol de NADPH min}^{-1} \text{mgproteína}^{-1}$ nos exemplares de *S. jurupari* (Figura 7 D). Um aumento significativo ($P < 0,05$) de 1,41 e 1,77 vezes foi observado nos exemplares de *A. heckelii* coletados no SR em relação aos coletados no TP nas coletas de 10 e 45 dias pós-acidente, respectivamente. Animais coletados no SR decorridos 45 e 90 dias do acidente apresentaram diminuição significativa ($P < 0,05$) de 1,79 e 2,21 vezes na atividade dessa enzima quando comparados com os animais coletados 10 dias após o acidente; animais coletados no TP apresentaram diminuição significativa ($P < 0,05$) de 2,26 e 1,18 vezes na atividade dessa enzima na coleta de 45 dias pós-acidente em relação às coletas de 10 e 90 dias pós-acidente, respectivamente. Os exemplares de *S. jurupari* não apresentam alterações significativas na atividade da GPx entre os pontos na mesma coleta, nem entre aqueles de coletas diferentes.

A atividade da enzima CAT branquial variou de 12,2 a 23,30 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mgproteína}^{-1}$ nos exemplares de *A. heckelii* (Figura 7 E) e de 8,1 a 15,6 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mgproteína}^{-1}$, nos exemplares de *S. jurupari* (Figura 7 F). Foi observada diminuição significativa ($P < 0,05$) de 1,84 vezes na atividade da CAT nos exemplares de *A. heckelii* coletados após

45 dias do acidente em relação aos coletados após 10 dias do acidente no TP. Além disso, diminuição significativa ($P < 0,05$) de 1,8 e 1,79 vezes na atividade da CAT também foi observada nas brânquias dos exemplares de *A. heckelii* coletados no SR após 45 dias do acidente em relação aos animais coletados após 10 e 90 dias, respectivamente. Exemplares de *S. jurupari* também apresentaram alterações na atividade da CAT nas brânquias onde, aumento significativo ($P < 0,05$) de 1,72 e 1,8 vezes foi observado nos exemplares coletados no SR em relação ao TP nas coletas realizadas após 45 e 90 dias, respectivamente.

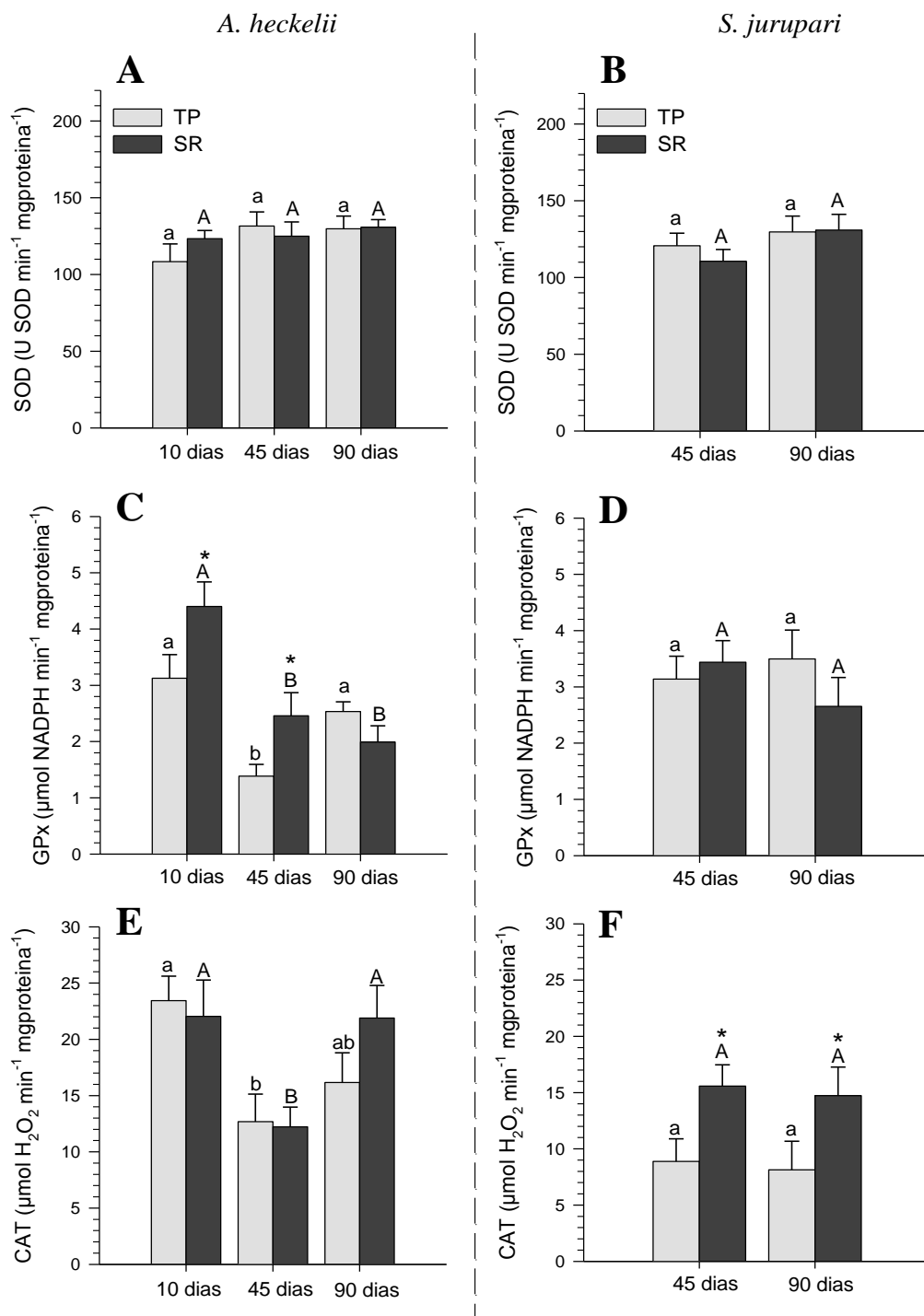


Figura 7. Atividade da enzima SOD (A e B), GPx (C e D) e CAT (E e F) nas brânquias dos exemplares de *A. heckelii* e *S. jurupari* coletados no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP) após 10, 45 e 90 dias do derramamento acidental de CAP. Letras minúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no TP e letras

maiúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no SR. Símbolo (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os pontos na mesma coleta.

Peroxidação lipídica (LPO) branquial

A concentração da LPO branquial variou entre 40 a 122 μmol de CHP (hidroperóxidos de cumeno) mg proteína⁻¹ nos exemplares de *A. heckelii* (Figura 8 A), e de 67 a 110 μmol de CHP mg proteína⁻¹ nos exemplares de *S. jurupari* (Figura 8 B). Um aumento significativo ($P < 0,05$) de 2,20 vezes da concentração da LPO foi verificado nos exemplares de *A. heckelii* coletados no SR em relação ao TP após 10 dias do acidente. Além disso, os animais coletados após 45 e 90 dias do acidente no TP apresentaram valores significativamente maiores ($P < 0,05$) em 2,8 e 3,1 vezes em relação àqueles coletados 10 dias após o acidente no TP. Da mesma forma, espécimes de *S. jurupari* apresentaram aumento significativo de 1,53 e 1,6 vezes, no TP e SR, respectivamente, na coleta realizada após 90 dias do acidente em relação à coleta realizada após 45 dias do acidente.

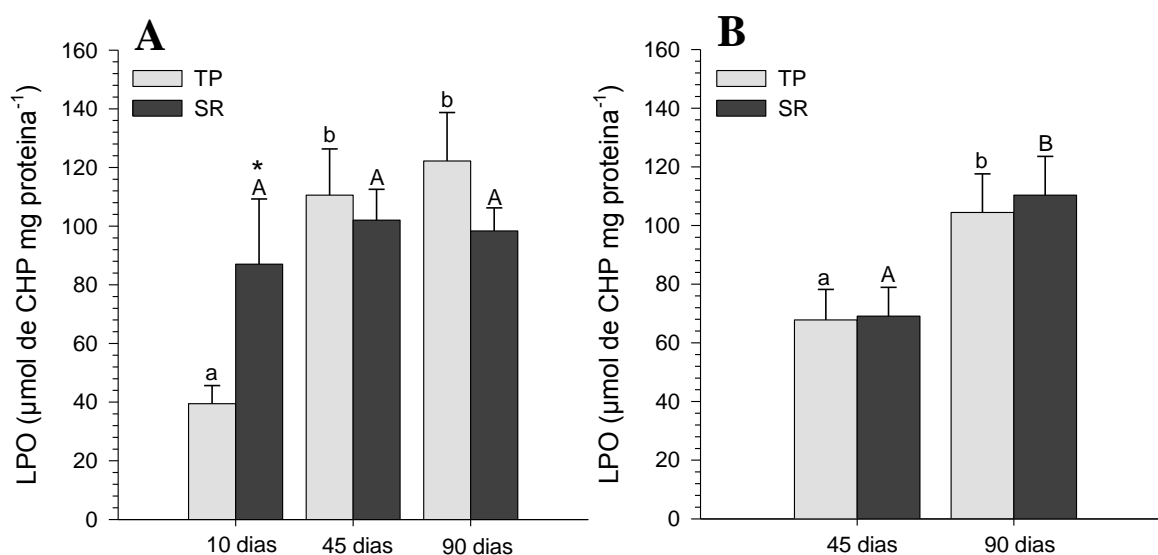


Figura 8. Concentração da LPO branquial de (A) *A. heckelii* e (B) *S. jurupari* coletados no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP) após 10, 45 e 90 dias do

derramamento acidental de CAP. Letras minúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no TP e letras maiúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no SR. Símbolo (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os pontos na mesma coleta.

Atividade da AChE cerebral

A atividade da AChE cerebral variou de 13 a 37,8 $\text{nmol min}^{-1} \text{mgproteína}^{-1}$ nos exemplares de *A. heckelii* (Figura 9 A), e de 13 a 38,55 $\text{nmol min}^{-1} \text{mgproteína}^{-1}$ nos exemplares de *S. jurupari* (Figura 9 B). Para as duas espécies coletadas 90 dias após o acidente, foi observada diminuição significativa ($P < 0,05$) em 2,93 vezes, para os exemplares de *A. heckelii*, e 2,81 vezes, para os exemplares de *S. jurupari*, na atividade dessa enzima no SR em relação ao TP. Para a espécie *A. heckelii*, foi verificado um aumento significativo ($P < 0,05$) de 1,84 e 3,22 vezes na atividade dessa enzima nos animais coletados no TP 45 e 90 dias após o acidente, respectivamente, em relação aos coletados 10 dias após o acidente. Além disso, um aumento significativo ($P < 0,05$) de 1,74 vezes foi verificado nos animais do SR coletados após 90 dias do acidente em relação aos coletados 45 dias após o acidente. Exemplares de *S. jurupari* coletados no SR 90 dias após o acidente apresentaram diminuição significativa ($P < 0,05$) de 2,1 vezes na atividade dessa enzima em relação aos animais coletados 45 dias após o acidente.

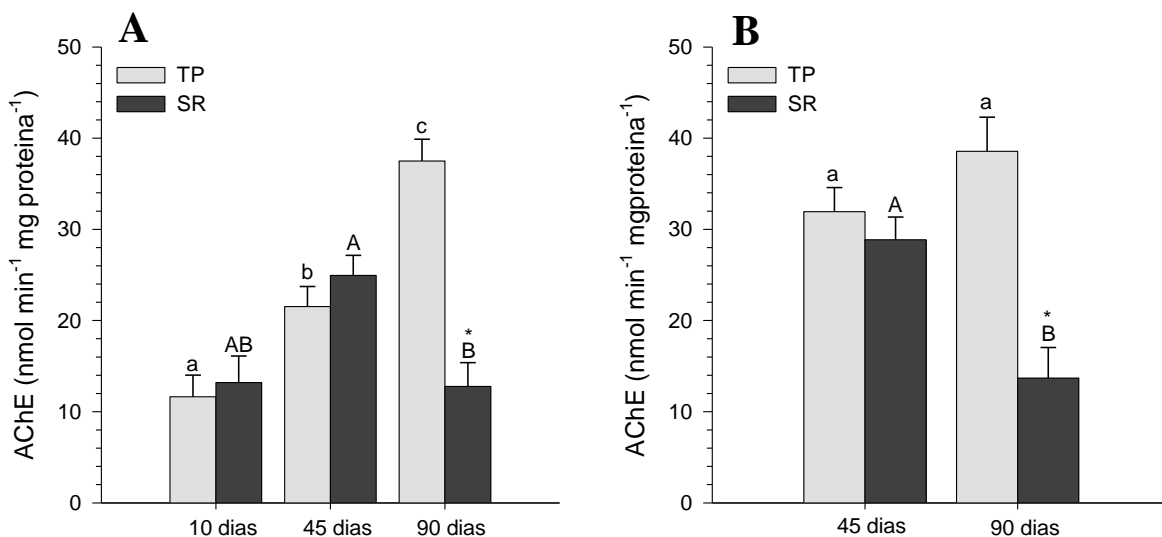


Figura 9. Atividade da enzima AChE cerebral de (A) *A. heckelii* e (B) *S. jurupari* coletados no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP) após 10, 45 e 90 dias do derramamento acidental de CAP. Letras minúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no TP e letras maiúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no SR. Símbolo (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os pontos na mesma coleta.

Danos no DNA dos eritrócitos

Os danos no DNA dos eritrócitos variaram de 46 a 250 (classes do cometa) nos exemplares de *A. heckelii* (Figura 10 A), e de 43 a 222 (classes do cometa) nos exemplares de *S.*

jurupari (Figura 10 B). Um aumento significativo ($P < 0,05$) de 5,36; 2,21 e 1,76 vezes nos danos no DNA dos eritrócitos foi verificado nos exemplares de *A. heckelii* coletados no SR após 10, 45 e 90 dias do acidente, respectivamente, em relação ao TP. Também foi observado um aumento significativo ($P < 0,05$) de 4,46 e 4,02 vezes nos danos no DNA dos eritrócitos nos exemplares de *S. jurupari* coletados no SR após 45 e 90 dias do acidente, respectivamente, em relação ao TP. Além disso, uma diminuição significativa ($P < 0,05$) de 1,5 vezes nos danos no DNA dos eritrócitos foi verificada nos exemplares de *A. heckelii*

coletados 90 dias após o acidente em relação aos exemplares coletados 45 dias após o acidente no SR.

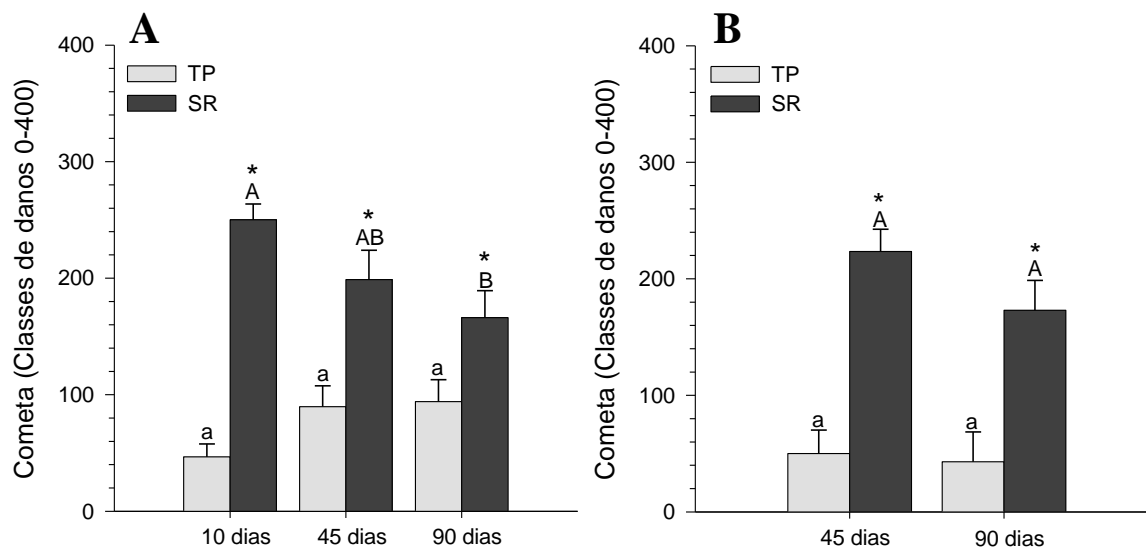


Figura 10. Quebras no DNA dos eritrócitos de (A) *A. heckelii* e (B) *S. jurupari* coletados no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP) após 10, 45 e 90 dias do derramamento acidental de CAP. Letras minúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no TP e letras maiúsculas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas no SR. Símbolo (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os pontos na mesma coleta.

Análise integrada dos dados

A análise de PCA-FA mostrou que a relação entre as variáveis biológicas e variáveis ambientais no TP e SR amostrados em 10, 45 e 90 dias após o acidente para *A. heckelii* e 45 e 90 dias após o acidente para *S. jurupari* podem ser reduzidos em 2 fatores, os quais explicaram 64,25%, 62,4% e 75,4% da variação dos dados em *A. heckelii* (Tabela 4), coletados em 10, 45 e 90 dias, respectivamente e 57,15% e 63,95% para exemplares de *S. jurupari* coletados em 45 e 90 dias (Tabela 5), respectivamente. Cada fator foi descrito de

acordo com o grupo de variáveis associadas, onde 0,45 foi o valor mínimo utilizado para determinar diferença significativa. A associação de cada fator com os animais amostrados em cada coleta (10, 45 e 90 dias para *A. heckelii* e 45 e 90 dias para *S. jurupari*) está representada pelo *fator scores* nas Figuras 11, 12 e 13 para *A. heckelii* e Figuras 14 e 15 para *S. jurupari*.

Tabela 4. Biomarcadores em *A. heckelii* e as variáveis ambientais COD e somatório de HPAs na água nas coletas realizadas após 10, 45 e 90 dias do derramamento accidental de CAP no Porto São Raimundo-AM. Valores significativos são >0,45 (destacados em vermelho).

	10 dias		45 dias		90 dias	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2
Variância %	44	20,25	44,5	17,9	61,4	14
GST br	0,057	-0,94	-0,189	0,252	0,459	0,608
CAT br	-0,08	-0,744	0,127	-0,327	0,605	0,627
GPX br	-0,027	0,355	-0,111	0,255	0,191	-0,928
SOD br	0,862	-0,129	0,657	-0,151	-0,252	-0,33
LPO br	0,799	0,485	-0,005	-0,833	-0,167	0,095
EROD fg	0,267	-0,311	0,341	0,609	0,82	0,168
Cometa er	0,916	0,123	0,749	0,328	0,544	-0,192
AChE cr	0,29	0,509	0,108	0,841	-0,927	0,187
MetBaP	-	-	0,961	0,103	0,915	-0,005
MetPir	-	-	0,972	0,132	0,943	0,141
MetNaft	-	-	0,792	-0,008	0,936	0,097
COD	0,894	0,115	0,962	0,175	0,93	0,108
ΣHPAs	0,894	0,115	0,962	0,175	0,93	0,108

br=brânquia; fg=fígado; er=eritrócito cr=cérebro; Met=metabólitos; Σ=somatório; (-) valores inexistentes

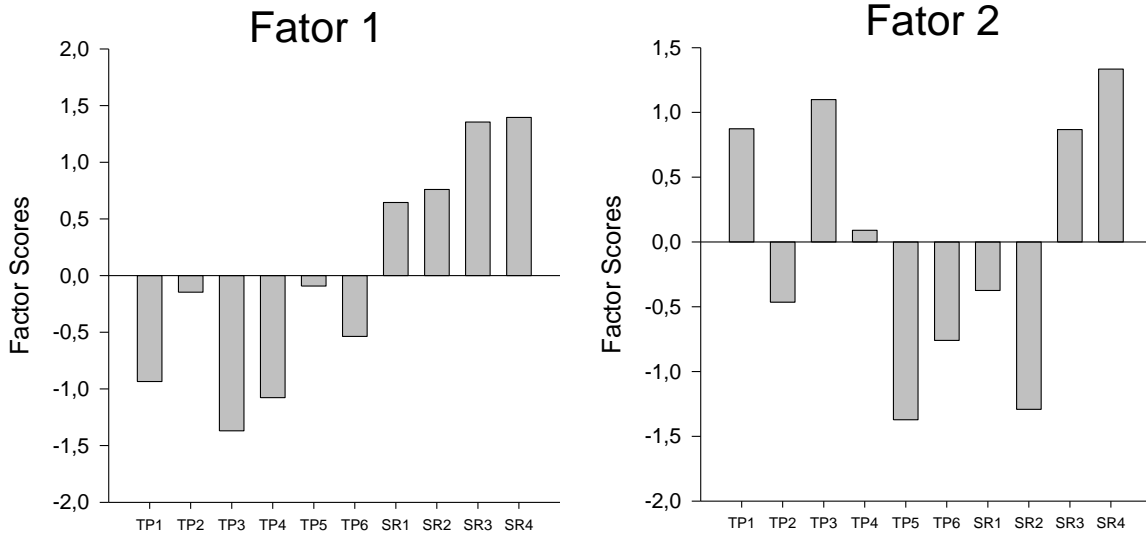


Figura 11. Representação dos *factor scores* estimados, integrando os biomarcadores e o COD e somatório dos HPA na água após análise multivariada, para os exemplares da espécie *A. heckelii* coletados no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP) após 10 dias do derramamento acidental de CAP.

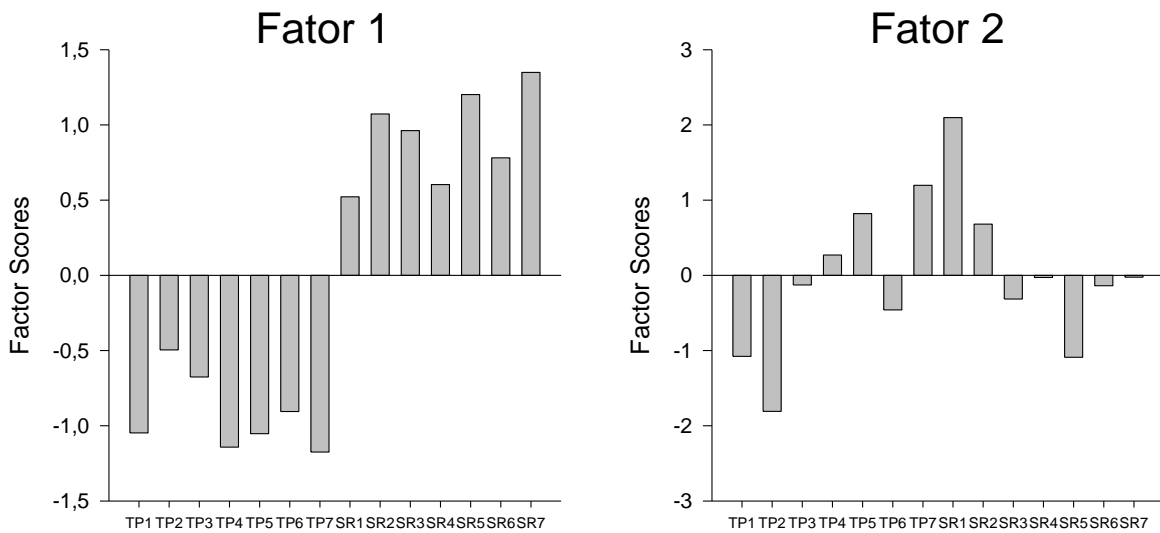


Figura 12. Representação dos *factor scores* estimados, integrando os biomarcadores de exposição e efeito e o COD e somatório dos HPA na água após análise multivariada, para

os exemplares da espécie *A. heckelii* coletados no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP) após 45 dias do derramamento acidental de CAP.

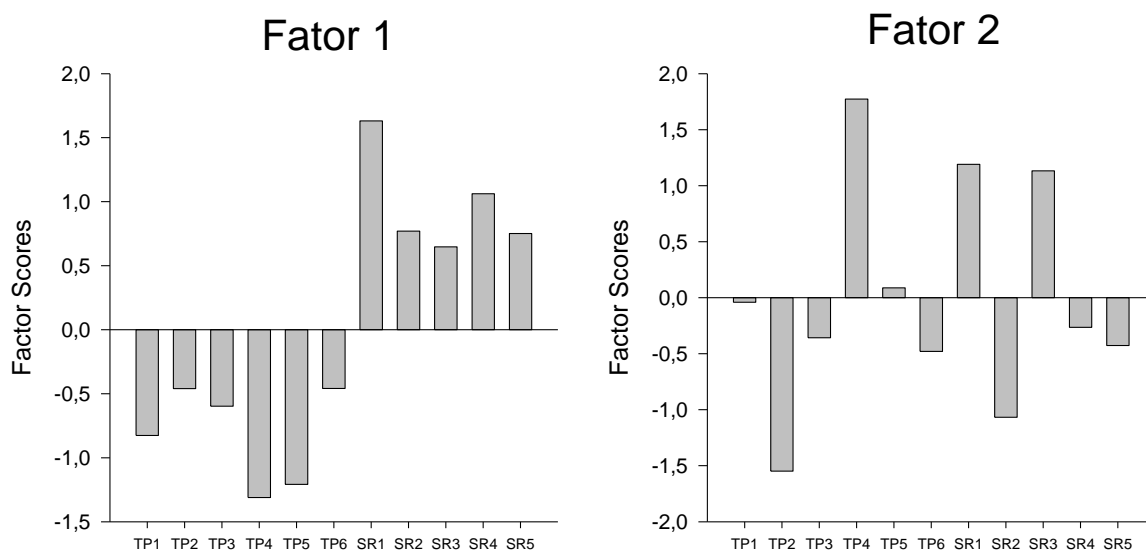


Figura 13. Representação dos *factor scores* estimados, integrando os biomarcadores de exposição e efeito e o COD e somatório dos HPA na água após análise multivariada, para os exemplares da espécie *A. heckelii* coletados no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP) após 90 dias do derramamento acidental de CAP.

Tabela 5. Biomarcadores em *S. jurupari* e as variáveis ambientais COD e somatório de HPA na água nas coletas realizadas após 45 e 90 dias do derramamento acidental de CAP no Porto São Raimundo-AM. Valores significativos são >0,45 (destacados em vermelho).

	45 dias		90 dias	
	F1	F2	F1	F2
<i>Variância %</i>	43,595	13,563	48,626	15,330
GST br	-0,248	-0,845	-0,173	-0,902
CAT br	0,430	0,552	0,308	-0,219
GPX br	-0,256	-0,238	0,129	0,773
SOD br	-0,029	0,629	-0,041	-0,039
LPO br	0,016	0,070	-0,001	0,661
EROD fg	0,415	0,437	-0,052	0,349
Cometa er	0,643	-0,163	0,910	0,082
ACHE cr	-0,095	-0,646	-0,756	-0,226
MetBaP	0,704	0,229	0,487	-0,005
MetPir	0,950	0,041	0,544	0,127
MetNaft	0,865	0,431	0,571	0,087
COD	0,926	0,240	0,847	0,048
ΣHPAs	0,926	0,240	0,847	0,048

br=brânquia; fg=fígado; er=eritrócito cr=cérebro; Met=metabólitos; Σ=somatório

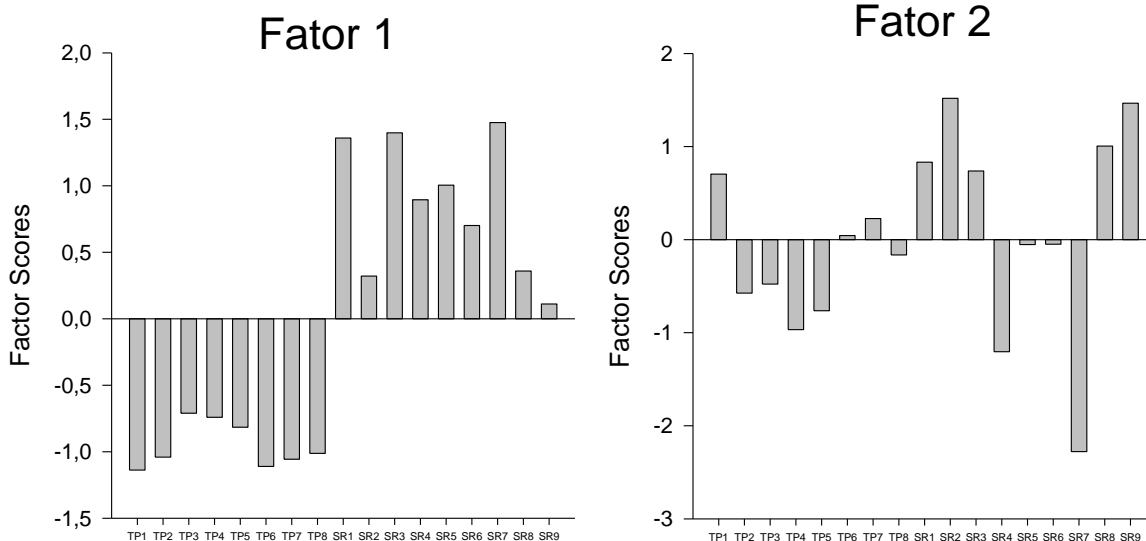


Figura 14. Representação dos *factor scores* estimados, integrando os biomarcadores de exposição e efeito e o COD e somatório dos HPA na água após análise multivariada, para os exemplares da espécie *S. jurupari* coletados no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP) após 45 dias do derramamento acidental de CAP.

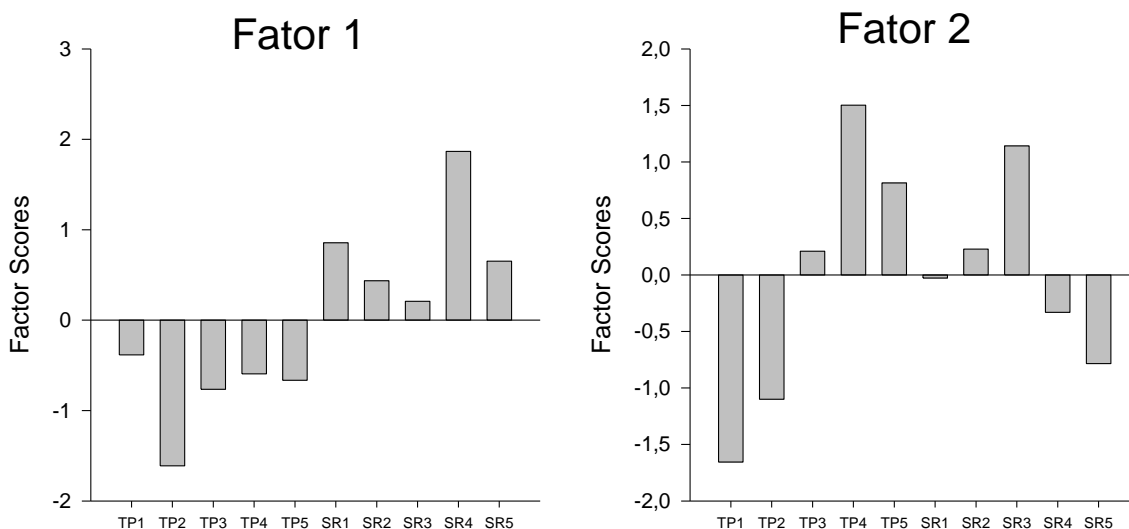


Figura 15. Representação dos *factor scores* estimados, integrando os biomarcadores de exposição e efeito e o COD e somatório dos HPA na água após análise multivariada, para

os exemplares da espécie *S. jurupari* coletados no Porto São Raimundo-AM (SR) e na área de referência (TP) após 90 dias do derramamento acidental de CAP.

Coleta realizada 10 dias após o acidente

Para a espécie *A. heckelii*, o primeiro fator (F1) da PCA-FA explicou 44% da variância total dos dados na coleta realizada após 10 dias do acidente. Esse fator contou com associações positivas significativas entre a enzima antioxidante GPx, a LPO, o cometa e os níveis de COD e HPA na água (Tabela 4). Além disso, na formação do F1 no *fator scores*, representado na Figura 11, os animais coletados no SR e no TP apresentaram padrão inverso de distribuição (i.e. os animais do SR com *scores* positivo, enquanto os animais do TP com *scores* negativos). Assim, a análise integrada evidenciou que a variância dos dados observados no F1 da PCA-FA foi relacionada com o local de coleta dos animais, onde no SR foram observados níveis mais elevados de COD e HPA na água, e que foram positivamente associados a maiores níveis de GPx, LPO e cometa nos animais, enquanto no TP foram observados níveis menores dos parâmetros da água e dos biomarcadores selecionados pela análise.

Por outro lado, o segundo fator (F2) da PCA-FA explicou apenas 20,25% da variância total dos dados. Esse fator contou com associações positivas significativas entre a LPO e AChE, sendo que ambos biomarcadores foram associados negativamente às atividades das enzimas GST e CAT (Tabela 4). Já o F2 do *factor scores* indicou que essas associações foram representativas para os animais tanto no TP quanto no SR (Figura 11), indicando que a variação nas respostas da LPO, AChE, GST e CAT nos animais não foram diretamente relacionadas ao local de coleta.

Coleta realizada 45 dias após o acidente

Para a coleta realizada 45 dias após o acidente, o primeiro fator (F1) da PCA-FA explicou novamente 44% da variância total dos dados, tanto para *A. heckelii* quanto para *S. jurupari*. Esse fator contou com associações positivas significativas entre o cometa, os metabólitos do tipo B[a]P, pireno e naftaleno na bile, e as variáveis ambientais COD e HPA, para ambas as espécies estudadas (Tabela 4 e 5). Além disso, a enzima antioxidante GPx também apresentou associação positiva significativa na formação do F1 junto aos demais biomarcadores acima citados, para a espécie *A. heckelii* (Tabela 4). Novamente, o *fator scores*, representado na Figura 12 para *A. heckelii* e Figura 14 para *S. jurupari*, evidenciou que os animais coletados no SR apresentaram *scores* positivos, enquanto no TP *scores* negativos, sugerindo fortemente que a variação observada no F1 da PCA-FA foi relacionada ao local de coleta dos animais, para ambas as espécies estudadas.

Já o segundo fator (F2) da PCA-FA explicou 20% da variância total dos dados para a espécie *A. heckelii*, e somente 14% para a espécie *S. jurupari*. A formação do F2 para a espécie *A. heckelii* contou com associações positivas significativas entre EROD e AChE, que foram negativamente associadas a LPO (Tabela 4). Por outro lado, para os exemplares de *S. jurupari* o F2 foi formado pela associação positiva entre a CAT e a GPx, e também pela associação negativa entre as atividades da GST e AChE nos animais (Tabela 5). Como observado para a coleta de 10 dias após o acidente, a distribuição dos animais no eixo F2 do *fator scores* (Figura 12 e 14, para *A. heckelii* e *S. jurupari*, respectivamente) sugere que a variação dos dados no F2 da PCA-FA, para ambas as espécies, não está relacionada com o local de coleta dos animais, como visto pela presença de *scores* positivos e negativos nos animais coletados em ambos os locais de coleta.

Coleta realizada 90 dias após o acidente

Após 90 dias do acidente, o primeiro fator (F1) explicou a maior variância total dos dados para *A. heckelii* (61,5%) e para *S. jurupari* (50%) entre os períodos após o acidente avaliados. Esse fator foi formado pelas associações positivas significativas entre as variáveis ambientais COD e HPA e os biomarcadores EROD, cometa e metabólitos do tipo B[a]P, pireno e naftaleno na bile de ambas as espécies estudadas (Tabela 4 e 5), assim como pela relação negativa das variáveis acima citadas com a atividade da AChE. Além disso, para a espécie *A. heckelii*, o F1 da PCA-FA também foi formado pela associação positiva da CAT e GST (Tabela 3). Os *factor scores* representado nas Figuras 13 e 15 demonstraram claramente que os scores positivos atribuídos aos animais coletados no SR indicam que os biomarcadores selecionados pela análise (EROD, cometa e metabólitos na bile para ambas as espécies; e CAT e GST apenas para *A. heckelii*) apresentaram maior atividade nesses animais, assim como redução da atividade da AChE. Por outro lado, o padrão inverso de resposta pode ser observado nos indivíduos coletados no TP; *i.e.*, menores níveis de EROD, CAT, GST, cometa e metabólitos na bile, e maior atividade da AChE. Essas relações positivas no SR também foram fortemente associadas com a concentração de COD e HPA na água desse local.

Já o segundo fator (F2) explicou somente 14% da variância total dos dados para *A. heckelii* e 15% para *S. jurupari*. Este fator foi formado pelas associações negativas entre a GST e SOD para ambas as espécies estudadas, sendo que para *A. heckelii* a atividade da CAT foi também positivamente associada à GST (e negativamente a SOD), enquanto para *S. jurupari* a LPO foi associada positivamente a SOD (e negativamente a GST) (Tabelas 4 e 5). Novamente, os *scores* do F2 do *factor scores* (Figuras 13 e 15) atribuídos para os

exemplares analisados de ambas as espécies sugerem que a variância observada no F2 da PCA-FA (Tabelas 4 e 5) não está relacionada diretamente ao local de coleta dos animais, como visto pela presença de *scores* positivos e negativos entre os indivíduos coletados tanto no TP quanto no SR.

4. Discussão

O presente estudo buscou avaliar as respostas de um conjunto de biomarcadores amplamente utilizados em monitoramento ambiental e risco ecológico em duas espécies de ciclídeos amazônicos, *Acarichtys heckelii* e *Satanoperca jurupari*. Para tanto, os biomarcadores foram avaliados em exemplares de ambas as espécies residentes da área portuária do São Raimundo (SR), no Rio Negro-AM, impactada pelo derramamento acidental do derivado de petróleo (CAP), e também em uma área de referência (Reserva do Desenvolvimento Sustentável do Tupé (TP)), nos períodos de 10, 45 e 90 dias após a ocorrência do acidente. As respostas dos exemplares de ambas as espécies coletadas no porto SR sugerem fortemente que o derramamento acidental do CAP promoveu ativação dos processos de desintoxicação nos animais, sendo observados também efeitos genotóxicos e neurotóxicos nos organismos. Além disso, a análise integrada dos dados demonstrou ser uma ferramenta robusta para a avaliação da qualidade de ambientes aquáticos impactados, evidenciando que as respostas dos biomarcadores foram mais acentuadas na espécie *A. heckelii* que em *S. jurupari*, e também que a magnitude das respostas dos biomarcadores nas espécies estudadas foi dependente do tempo. Por fim, o estudo demonstrou que ambas as espécies coletadas no porto SR sofreram alterações nos parâmetros estudados que foram relacionados tanto com a presença do CAP derramado quanto com a presença de grande fluxo de embarcações no local.

Análise dos HPA e COD na água

O naftaleno e seus alquilados, assim como os alquilados de fenantreno, são os principais HPA presentes no petróleo bruto; e em menores concentrações, o fenantreno e o antraceno (United Environmental Programme, 1991). Assim, a presença de homólogos alquilados no ambiente indica forte contaminação recente por petróleo e derivados. No entanto, esses HPA de menor peso molecular, juntamente com seus homólogos alquilados, também podem indicar pirólise de combustíveis fósseis, como o diesel. Segundo Wang et al. (1999), a avaliação da distribuição dos HPA no ambiente é uma ferramenta muito utilizada para se distinguir os HPA de fontes petrogênicas dos de fontes pirogênicas. De modo geral, os HPA de origem pirogênica são caracterizados pela dominância dos compostos não substituídos, como por exemplo, o naftaleno, em relação a seus alquilados homólogos (C1; C2; C3 e C4), além da dominância dos HPA de 4 a 6 anéis em relação aos HPA de 2 a 3 anéis (Bjøesethin and Ramdahl, 1984; Blumer and Youngblood, 1975; Page et al., 1996). Por outro lado, os HPA de origem petrogênica possuem predominância dos HPA de 2 a 3 anéis, além de menores concentrações do composto não substituído em relação a seus homólogos alquilados (Bjøesethin and Ramdahl, 1984; Blumer and Youngblood, 1975; Page et al., 1996). Dessa forma, a diferenciação da fonte dos HPA encontrados no ambiente, geralmente, pode ser estimada por meio da determinação de índices diagnósticos, calculados levando em consideração a proporção entre os HPA encontrados na coluna de água.

Entre os vários índices já propostos (Blumer and Youngblood, 1975; Maher and Aislabil, 1992), o índice pirolítico (IP) possui algumas vantagens, uma vez que leva em consideração a relação entre a soma dos HPA de 3 a 6 anéis e a soma dos 5 alquilados homólogos (Σ

HPA de 3 a 6 anéis/ Σ dos 5 alquilados homólogos) (Wang et al., 1999). Esses autores determinaram os valores do IP para diferentes óleos crus (fonte petrogênica), e também para produtos da queima do óleo cru (fonte pirogênica), sendo essa taxa em torno de 0,001 para a maioria dos óleos crus e diesel, em torno de 0,05 para óleos pesados, como o betume, e de 0,8 a 2,0 para amostras coletadas em locais próximos a rodovias, onde existe a queima dos combustíveis pelos automóveis. No presente estudo, o IP determinado para as amostras de água foi de 0,36; 1,10 e 1,22 no TP, nas coletas de 10, 45 e 90 dias respectivamente; e de 0,43; 1,65 e 0,41 no SR, nas coletas de 10, 45 e 90 dias respectivamente. Os valores do IP determinados tanto do TP quanto no SR, quando comparados com as taxas encontradas na revisão realizada por Wang et al. (1999) não esclarecem a principal fonte de entrada dos HPA encontrados na coluna de água em ambos os locais estudados. Outros autores também encontraram valores do IP intermediários entre os valores encontrados para amostras de óleo cru e de queima, sendo que esses valores podem ser atribuídos a fontes mistas de contaminação (Barakat et al., 2011), ou também ao tipo de óleo derramado (Wang et al., 2001). Com base nos valores do IP encontrados no presente estudo, podemos sugerir que nas áreas de estudo existe uma contribuição de fontes mistas de HPA para o sistema aquático, particularmente no SR, uma vez que, além da contaminação aguda do derramamento acidental do CAP, o local sofre constante liberação de HPA provenientes da queima do diesel das embarcações, as quais apresentam um fluxo intenso nesse local. Além disso, os altos valores de IP no SR também podem estar associados ao processo de lixiviação dos HPA provindos da queima dos combustíveis pelos automóveis na área urbana no entrono do porto, uma vez que o período no qual foram realizadas as coletas corresponde ao período hidrológico de enchente e cheia, onde ocorrem os maiores índices pluviométricos do ano na região (CPRM - Serviço Geológico do Brasil,

2014). Por outro lado, no TP, a discreta fonte de contaminação observada se deve, provavelmente, ao inevitável uso de pequenas embarcações pelos ribeirinhos da RDS do Tupé, que utilizam o lago para a pesca. Além disso, essas pequenas embarcações são o único meio de transporte existente entre a RDS e a cidade de Manaus.

No contexto da contaminação de sistemas aquáticos por compostos orgânicos como os HPA, a presença de altos níveis de matéria orgânica natural (NOM) como observada na calha principal no Rio Negro, pode ser considerada um fator importante na toxicidade final dos compostos para a biota aquática residente. Os HPA são considerados moléculas altamente hidrofóbicas, ou seja, quando no ambiente aquático, se ligam às porções orgânicas do sistema, tais como as membranas biológicas dos seres vivos, e também as porções da NOM, tais como sua fração dissolvida (COD) e particulada (COP). Diante disso, diversos autores têm demonstrado que a afinidade dos HPA com o carbono orgânico aumenta em função de sua hidrofobicidade, ou seja, quanto maior o peso molecular desses compostos, maior sua afinidade pela matéria orgânica, particularmente pela fração particulada. Assim, em geral, os HPA de maior peso molecular se encontrariam ligados à fração particulada do carbono, com forte tendência de serem também encontrados no sedimento (McCarthy and Jimenez, 1985; Moeckel et al., 2014). Esse fato pode estar associado com a ausência de HPA de alto peso molecular dissolvidos na água dos dois pontos de coleta no Rio Negro, indicando que os HPA de alto peso molecular, provenientes tanto do CAP quanto da queima dos combustíveis dos barcos, provavelmente devem estar ligados ao sedimento, como já observado por Lopes (2010), que encontrou altas concentrações de HPA como o benzo[a]pireno e pireno no sedimento do igarapé do São Raimundo, o qual desagua na área do porto São Raimundo. Assim, a principal rota de

absorção destes HPA de maior peso molecular pela biota aquática estaria ligada à alimentação, uma vez que muitos organismos aquáticos forrageiam e se alimentam próximos ao sedimento. Por outro lado, no presente estudo a concentração do COD na água apresentou uma forte correlação positiva com a concentração dos HPA totais na água (Soma HPA= $-6897 + 930,56 \cdot \text{COD}$, $r^2=90\%$) de ambos os locais de coleta. Da mesma forma, essa relação positiva entre compostos hidrofóbicos, como os HPA e a matéria orgânica dissolvida na água tem sido amplamente relatada na literatura (Landrum et al., 1984; Li and Ran, 2012; Mccarthy and Jimenez, 1985; Moeckel et al., 2014; Playle and Dixon, 1993; Richards et al., 2001, 1999). Dessa forma, fica claro que o COD presente na água do Rio Negro pode adsorver os HPA encontrados no ambiente, influenciando a biodisponibilidade e toxicidade dos hidrocarbonetos para a biota aquática, particularmente por meio do aumento da taxa de transferência de compostos orgânicos hidrofóbicos (HOC), como os HPA de uma fase não aquosa (i.e. camada superficial do óleo na água) para a coluna de água (Landrum et al., 1984; Playle and Dixon, 1993; Richards et al., 2001, 1999).

Metabólitos de HPA da bile

A investigação da presença de HPA na bile de peixes é uma técnica eficiente em determinar a presença e disponibilidade desses contaminantes no meio aquático. É, portanto, uma ferramenta útil para avaliarmos a tomada e absorção desses compostos pelos peixes (Aas et al., 2000b; Nongnutch et al., 2012a, 2012b). No presente estudo, ambas as espécies estudadas (*A. heckelii* e *S. jurupari*) apresentaram aumento na concentração dos metabólitos de B[a]P, pireno e naftaleno na bile dos animais coletados no SR, em relação aos animais coletados no TP, após 45 e 90 dias do acidente (na coleta de 10 dias não foi possível analisar os HPA na bile devido ao fato de quase todas estavam esvaziadas). Da

mesma forma, diversos autores têm mostrado que a concentração de metabólitos de HPA na bile de diferentes espécies de peixes é aumentada em locais contaminados por derivados de petróleo (Neves et al., 2007; Ribeiro et al., 2013). Além disso, também foi observado que a acumulação de HPA pelos peixes no SR após o acidente, como visto pela concentração de metabólitos na bile dos indivíduos, foi dependente do tipo de hidrocarboneto avaliado (B[a]P e pireno x naftaleno) e da espécie estudada.

Os exemplares de *A. heckelii* coletados no SR após 90 dias do acidente apresentaram um aumento significativo dos três metabólitos de HPA estudados na bile, em relação aos animais coletados após 45 dias do acidente na mesma área. Por outro lado, apenas a concentração do metabólito de naftaleno foi maior na bile dos exemplares de *S. jurupari* após 90 dias do acidente, em relação aos animais coletados no período de 45 dias. Ao contrário, os níveis de metabólito de pireno nos animais coletados no SR após 90 dias do acidente foram significativamente reduzidos em relação aos exemplares coletados em 45 dias. Contudo, as concentrações dos HPA dissolvidos na água foram reduzidas ao longo dos períodos de coleta. Da mesma forma, Jung et al. (2011) observaram um aumento significativo dos metabólitos de HPA na bile de duas espécies de peixes marinhas (*Sebastes schlegeli* e *Pseudopleuronectes yokohamae*) coletadas em uma área impactada pelo derramamento acidental de óleo cru (*Hebei Spirit oil spill*), e que também foram associadas com a diminuição na concentração dos HPA na água ao longo do período no qual as coletas foram realizadas. Para esses autores, a presença dos metabólitos de HPA na bile dos peixes reflete a exposição recente a esses compostos, e, apesar da redução aparente da disponibilidade de HPA via coluna de água, outras fontes de absorção devem ser consideradas, como por exemplo, a alimentação (Jung et al., 2011).

Nesse contexto, a espécie *A. heckelii* é considerada uma espécie onívora, conhecida por se alimentar próximo ao substrato (Tan and Lim, 2008), tendo como principais itens alimentares em sua dieta algas e macroinvertebrados bentônicos. Como os HPA de alto peso molecular tendem a se ligar mais facilmente as frações do material orgânico particulado que se deposita no sedimento, isto favorece que espécies como *A. heckelii* entrem em contato com os HPA não somente de uma forma direta, por meio da absorção pelas brânquias e pele, mas, também, de uma forma indireta, por meio da alimentação junto ao sedimento contaminado. Esta hipótese parece ser corroborada pelos dados de concentração de metabólitos na bile de *A. heckelii*, uma vez que apenas nos exemplares desta espécie as concentrações de metabólitos de B[a]P e pireno (HPA de alto peso molecular) foram significativamente aumentadas nos animais coletados 90 dias após o acidente em relação aos animais coletados após 45 dias. Da mesma forma, níveis significativamente maiores de metabólitos de B[a]P e pireno na bile foram observados em exemplares de *A. heckelii* coletados no TP após 90 dias do acidente. Como a área de referência se encontra à montante da área do derramamento, essa resposta não está diretamente associada à contaminação do SR. Contudo, vemos que o período de 45 dias entre as duas últimas campanhas de coleta (45 e 90 dias) coincidem com o período de aumento do volume e fluxo de água (enchente-cheia) do Rio Negro, o que por sua vez, levaria a ressuspensão de HPA presentes no sedimento, provavelmente devido a sedimentação dos hidrocarbonetos de maior peso molecular oriundos da queima de diesel pelas embarcações locais no TP. Por outro lado, apesar da espécie *S. jurupari* também ser conhecida por se alimentar próximo ao sedimento, sendo plantas e insetos os principais itens alimentares em sua dieta (Hahn and Cunha, 2005), os níveis de metabólitos de alto peso molecular (particularmente de pireno) foram reduzidos nos exemplares dessa espécie

após 90 dias do acidente no SR. Esses resultados sugerem menor contato dessa espécie com os HPA de alto peso molecular (B[a]P e pireno), geralmente associados com o sedimento (Moeckel et al., 2014), e maior contato com os HPA de baixo peso molecular (naftaleno) geralmente encontrado dissolvido na água (Moeckel et al., 2014).

Assim como para os HPA dissolvidos na água, é possível verificar a fonte de contribuição dos metabólitos de HPA encontrados na bile através do cálculo da taxa entre o valor dos metabólitos de naftaleno e de B[a]P. Segundo alguns autores, na contaminação de origem petrogênica, existem a predominância de HPA de baixo peso molecular (2 a 3 anéis) em relação aos de alto peso molecular (4 a 5 anéis) (Aas et al., 2000a; Krahn et al., 1992, 1986; Neff, 1990). Logo, altas taxas indicam exposição a produtos do petróleo, rico em naftalenos, e baixas taxas indicam exposição à HPA de origem pirolítica, como combustão do diesel. No presente estudo, as taxas determinadas para os indivíduos da espécie *A. heckelii* no TP foram em média de 417 e de 349 nas coletas de 45 e 90 dias pós-acidente, respectivamente. Já no SR as taxas calculadas para *A. heckelii* foram em média de 871 e 1197 nas coletas de 45 e 90 dias pós-acidente, respectivamente. Para espécie *S. jurupari*, a taxa determinada foi em média de 434 e 505 no TP nas coletas de 45 e 90 dias pós-acidente, respectivamente. Já no SR, foi em média de 815 e 2565 na coleta de 45 e 90 dias pós-acidente, respectivamente. Segundo Krahn et al. (1992), exemplares de *Oncorhynchus gorbuscha* expostos ao óleo cru apresentaram uma taxa de naftaleno/B[a]P de cerca de 1300, enquanto a mesma espécie coletada em local contaminado com creosoto (fuligem) foi observada uma taxa por volta de 110. Além disso, Gagnon and Holdway (2002) observaram taxas de naftaleno/B[a]P na bile da espécie *Platycephalus bassensis* variando entre 188 a 830 em diferentes pontos em área portuária que sofre influência da indústria do

petróleo, sendo que os autores atribuíram a contaminação encontrada nos pontos que apresentaram taxas entre 188 a 300 a fontes pirogênica, enquanto nos pontos que apresentaram valores 400 a 800 à fontes mistas (petrogênica e pirogênica). Em geral, as taxas determinadas para os exemplares de ambas as espécies coletadas no TP indicam que as fontes de contaminação local são de origem mista (petrogênica e pirogênica), com maior contribuição de fontes provenientes da queima de combustíveis. Por outro lado, as taxas de naftaleno/B[a]P determinadas na bile de ambas as espécies estudadas no SR foram, em média, 2 vezes e 4 vezes maiores que nos indivíduos coletados no TP após 45 e 90 dias do acidente, respectivamente, o que, por sua vez, sugere uma grande contribuição de fonte petrogênica. Além disso, ambas as espécies coletadas na SR após 45 do acidente apresentaram taxas similares na bile, sugerindo fontes mistas de contaminação. No entanto, a espécie *S. jurupari* apresentou taxas, em média, 2 vezes maiores que nos exemplares de *A. heckelii* após 90 dias do acidente, indicando fortemente que, apesar do tempo decorrido da liberação do CAP, os peixes residentes no SR, particularmente os exemplares de *S. jurupari*, tiveram menor contato com os HPA de alto peso molecular (B[a]P e pireno) e maior contato com HPA de baixo peso molecular (naftaleno).

Quando comparamos as taxas calculadas de HPA na bile para ambas as espécies estudadas no SR, e a taxa para os HPA encontrados na água nesse local, verificamos que, tanto o índice pirolítico (IP), quanto a taxa naftaleno/B[a]P nos peixes indicam uma fonte de contaminação mistas (petrogênica e pirogênica), particularmente após 45 dias do acidente. No entanto, após 90 dias do acidente no SR, apesar do IP calculado, os exemplares de *S. jurupari* apresentaram taxas de HPA na bile que indicam fortemente contaminação por fontes petrogênicas, enquanto para *A. heckelii* as taxas determinadas continuaram a indicar

contaminação por fontes mistas. Esses dados, em geral, demonstram que houve uma diferenciação da origem dos HPA incorporados na bile pelos peixes no SR entre as coletas realizadas após 45 e 90 dias do acidente, onde na coleta realizada após 45 dias, houve contribuição de fontes mistas, com destaque para as fontes pirolíticas, enquanto na coleta realizada após 90 dias, houve maior contribuição de fontes petrogênicas, sendo que, a acumulação/exposição aos HPA petrogênicos foi diferenciada entre as duas espécies estudadas nesse período de coleta.

Enzimas de biotransformação

Diversos estudos têm reportado a ativação do sistema de biotransformação em peixes, tanto de água doce quanto marinhos, coletados em locais que sofreram impacto de contaminação recente (Jung et al., 2011, 2012; Martínez-Gómez et al., 2006), ou possuem histórico de contaminação por petróleo e derivados (Buet et al., 2006; Dévier et al., 2013; Gagnon and Holdway, 2002; Trisciani et al., 2011). Durante a ativação do sistema de biotransformação, o aumento na atividade da EROD está relacionado com a metabolização dos HPA do petróleo pelos organismos aquáticos, por meio da atividade catalítica das monooxigenases do sistema Citocromo P450, na fase I da biotransformação, sendo a EROD uma das principais enzimas desse sistema. Esse sistema é considerado importante via de biotransformação de compostos hidrofóbicos, como os HPA, em compostos mais hidrofílicos que podem ser mais facilmente excretados do organismo (van der Oost et al., 2003). Além disso, segundo revisão feita por Lee e Anderson (2005), os HPA de alto peso molecular (4 a 6 anéis), como o B[a]P e pireno, são conhecidos pela alta toxicidade e, por sua vez, maiores capacidades de indução da enzima EROD hepática. Assim, os HPA de origem pirolítica, provenientes da queima de combustíveis, possuiriam maior capacidade de

promover a indução dessa enzima. De fato, a ativação do sistema de biotransformação hepática nos animais coletados no SR apresentou um padrão de resposta fortemente associado às taxas de naftaleno/B[a]P na bile dos animais, particularmente nas respostas observadas nos animais coletados após 90 dias do acidente. Isto indica que os HPA provenientes de fontes diferentes de contaminação (pirolítica e petrogênica), particularmente entre as diferentes coletas, estariam envolvidos na ativação da EROD no fígado dos animais.

Apesar das taxas naftaleno/B[a]P calculadas na bile dos exemplares de ambas as espécies estudadas indicarem uma pequena contaminação por HPA provenientes de queima na área de referência (TP), vemos que a atividade da EROD hepática foi similar entre os exemplares analisados, não sendo observadas alterações significativas na atividade da enzima entre as diferentes coletas realizadas nesse local. Por outro lado, a ativação do sistema de biotransformação nos animais, observada pelo aumento significativo da atividade da EROD, foi evidente no fígado dos exemplares de *A. heckelii* e *S. jurupari* coletadas no SR, em relação ao TP, após 45 dias acidente. Da mesma forma, menores taxas naftaleno/B[a]P foram observadas nos indivíduos de ambas as espécies coletados nesse período. Assim, entendemos que a ativação da EROD nos exemplares de *A. heckelii* e *S. jurupari* após 45 dias do acidente parece estar associada a maior proporção de HPA de alto peso molecular encontrada na bile dos animais, indicando, novamente, uma grande contribuição dos HPA de origem pirolítica na ativação do sistema de biotransformação dos animais coletados no SR nesse período. Apesar das taxas naftaleno/B[a]P calculadas para ambas as espécies sugerirem maior contribuição de fontes petrogênicas de contaminação no SR após 90 dias do acidente, a resposta diferencial na atividade da EROD entre as duas

espécies estudadas nesse período suporta a hipótese de que as rotas de incorporação de HPA pelos indivíduos das duas espécies ocorrem através de vias diferentes. Na espécie *A. heckelii*, a atividade da EROD permaneceu significativamente mais elevada nos animais coletados no SR após 90 dias do acidente, em comparação com os animais do TP no mesmo período. Esses dados se relacionam fortemente com as maiores concentrações de metabólitos de B[a]P e pireno observadas apenas nesses animais nesse período, o que, por sua vez, corrobora com a ideia de que esses animais, em consequência de sua biologia, entrem em contato com HPA de alto peso molecular tanto de forma direta, pelas brânquias e pele, quanto de forma indireta, por meio da alimentação junto ao sedimento contaminado. Por outro lado, na espécie *S. jurupari*, a atividade da EROD foi reduzida nos animais coletados no SR após 90 dias do acidente, em comparação com a atividade observada na coleta de 45 dias, apresentando níveis similares aos encontrados nos animais da área de referência. Além disso, os exemplares de *S. jurupari* coletados no SR após 90 dias do acidente apresentaram níveis significativamente reduzidos dos metabólitos do tipo pireno na bile, o que também foi associado com redução do IP na água calculado no SR nesse período. Assim, vemos que a não indução da EROD nos exemplares dessa espécie após 90 dias do acidente parece estar diretamente associada a menor absorção de HPA de alto peso molecular, que em geral se encontram dissolvidos na água e, também, associados ao material particulado e sedimento.

Embora o fígado seja considerado o principal órgão de desintoxicação de xenobióticos, as brânquias também possuem papel fundamental nesse processo, uma vez que, as mesmas possuem grande superfície de contato direto com o ambiente aquático (Cerqueira e Fernandes, 2002). Dessa forma, levando em consideração que os HPA são compostos

altamente lipofílicos, as brânquias constituem a porta principal para sua entrada no organismo, sendo que, o estudo das enzimas envolvidas no processo de biotransformação dos xenobióticos nas brânquias possui grande importância no monitoramento de áreas impactadas pelo petróleo e seus derivados. No presente estudo, a atividade da enzima GST nas brânquias apresentou aumento significativo ($P < 0,05$) somente nos exemplares de *A. heckelii* coletados no SR em relação ao TP após 90 dias do acidente. Por outro lado, para os exemplares de *S. jurupari* coletados no mesmo período, a atividade dessa enzima permaneceu inalterada. O aumento significativo da GST somente nos exemplares de *A. heckelii* coletados após 90 dias do acidente parece estar relacionado com o aumento da absorção dos HPA nessa espécie, tanto de baixo quanto de alto peso molecular, como visto através da análise dos metabólitos de HPA na bile, onde estes animais apresentaram maiores níveis dos três metabólitos estudados após 90 dias do acidente. Da mesma forma, Tim-Tim et al. (2009) também observaram aumento significativo na atividade da GST nas brânquias de mexilhões coletados logo após o derramamento acidental de petróleo (*Prestige*), sendo que esse aumento foi relacionado com o aumento da concentração de óleos e graxas nos mexilhões. Assim, levando em consideração que a GST possui um papel fundamental na eliminação dos compostos tóxicos do organismo na fase II da biotransformação (Rinaldi et al., 2002), nossos resultados evidenciam que o aumento da absorção de HPA do ambiente pelos exemplares de *A. heckelii* no SR, tanto os HPA de origem pirolítica, quanto os de origem petrogênica oriundos do derramamento acidental de CAP, mesmo após 90 dias do acidente, resultaram na indução da GST nesta espécie a fim de eliminar os compostos tóxicos acumulados pelos organismos. Apesar de apresentar níveis ainda elevados de metabólitos na bile no SR nesse período, este padrão de resposta do sistema de biotransformação não foi observado para os exemplares da espécie *S.*

jurupari, sugerindo uma resposta diferencial entre as duas espécies de ciclídeos estudadas frente à toxicidade dos HPA presentes no ambiente aquático.

Enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica (LPO) nas brânquias

A produção de ROS é considerada como parte normal do metabolismo celular, em especial das mitocôndrias (Sriram et al., 2016). Dessa forma, o aumento do metabolismo devido a algum evento estressante pode levar a formação das ROS, o que levaria a um aumento da atividade das enzimas antioxidantes que agem neutralizando essas radicais livres de oxigênio gerados. Caso haja um desequilíbrio entre os antioxidantes e pró-oxidantes, o órgão pode vir a sofrer as consequências do estresse oxidativo, onde radicais como o radical OH, radicais peroxil e hidroxil oxidam as moléculas biológicas essenciais como lipídios, proteínas, carboidratos e DNA (Halliwell, 2007). Assim, a interação desses radicais livres com as biomembranas induzem distúrbios na sua delicada estrutura, integridade, fluidez e permeabilidade, além de perda de funcionalidade por meio dos produtos da peroxidação lipídica (LPO) (Niki, 2009; Wiernsperger, 2003). No entanto, como parte do processo natural do metabolismo celular, a presença de um sistema de enzimas antioxidantes auxilia os organismos a evitar o estresse oxidativo, por meio da neutralização dos radicais livres produzidos durante o evento de estresse (Halliwell, 2007). Além disso, estudos recentes têm evidenciado alterações na atividade das enzimas antioxidantes em função de variações sazonais nas propriedades físicas e químicas do ambiente aquático (Amado et al., 2006; Chiang et al., 2012), tais como na temperatura, no pH e também na biodisponibilidade de contaminantes, por meio da ressuspensão do sedimento (Brinkmann et al., 2013).

De forma semelhante, os exemplares de *A. heckelii* avaliados, tanto na área de referência quanto no SR, apresentaram alterações na atividade de algumas enzimas do sistema antioxidante que, por sua vez, parecem estar mais associadas a alterações físicas e químicas do ambiente aquático, observadas durante o ciclo de enchente/cheia na região do Rio Negro, do que em função da contaminação no SR. Esses animais, em ambos os pontos de coleta, apresentaram atividade da GPx e CAT significativamente reduzida na coleta após 45 dias do acidente, particularmente em relação a primeira coleta (10 dias), com clara tendência de retorno a níveis mais elevados decorridos 90 dias do acidente. Esse padrão de redução da atividade da GPx e da CAT nos exemplares de *A. heckelii* após 45 dias do acidente coincide com o período de elevação das águas no baixo Rio Negro (enchente), e que o retorno de sua atividade a maiores níveis reflete o período de cheia do sistema. Importante ressaltar que, durante o período de elevação das águas ocorrem profundas alterações nos componentes abióticos e bióticos do sistema, tais como alterações na temperatura, fotoperíodo e produtividade local em resposta as condições mais lânticas do ambiente, o que, por sua, vez regulam boa parte dos ciclos de vida (e.g. estratégias alimentares e período reprodutivo) das comunidades de peixes locais (Junk et al., 1989). Assim, nesse contexto, os menores níveis de GPx e CAT indicariam uma menor capacidade antioxidante dos exemplares de *A. heckelii* no período de enchente do sistema (45 dias após o acidente), provavelmente em resposta à pressões diferenciais encontradas no ambiente. Além disso, apesar da menor concentração de HPA na água a maior LPO observada nos exemplares de *A. heckelii* no TP após 45 e 90 dias do acidente, em relação a primeira coleta (10 dias), corroboraria com essa ideia.

Por outro lado, alterações nas enzimas antioxidantes dos exemplares de *S. Jurupari*, em ambos os locais de coleta, entre as coletas de 45 e 90 após dias do acidente, não foram observadas. No entanto, aumento da concentração da LPO foi observado nos animais coletados após 90 dias, em relação à coleta de 45 dias após o acidente, em ambos os locais de coleta. Dessa forma, o aumento da concentração da LPO branquial nos exemplares de *S. jurupari* não aparenta estar relacionada com a inibição das enzimas antioxidantes, tão pouco com os HPA do ambiente, uma vez que, não foram encontradas diferenças significativas na concentração dos metabólitos de HPA na bile, e da concentração de HPA dissolvidos na água, entre os pontos de coleta após 90 dias do acidente. Da mesma forma, diversos autores verificaram esse mesmo padrão nas respostas das enzimas antioxidantes e da LPO em fêmeas de peixes coletadas em locais contaminados (Almroth et al., 2005; Livingstone et al., 1993; Vega-López et al., 2008). Contudo, no presente estudo, não foi possível identificar o gênero dos indivíduos coletados tanto no TP quanto no SR (devido aos animais não estarem no estágio avançado de maturação sexual) não sendo possível se atribuir as alterações da LPO ao gênero dos animais. Nesse sentido, mais uma vez entendemos que o regime de enchente/cheia na região estaria ligado com alterações nos parâmetros oxidativos dos animais no sistema do Rio Negro, tal como visto pelo aumento dos níveis de LPO nas brânquias dos exemplares das duas espécies estudadas, em ambos os pontos de coleta, em função do tempo decorrido do acidente.

No entanto, a ativação de enzimas do sistema antioxidante em função do derramamento do CAP no SR também foi fortemente evidente em ambas as espécies estudadas, quando comparada com os animais coletados na área de referência. Contudo, as respostas das enzimas foram diferenciais entre as duas espécies avaliadas. Nos exemplares de *A. heckelii*

coletados no SR foi observado um aumento significativo na atividade da GPx, em relação ao TP, nas coletas realizadas após 10 e 45 dias do acidente, além de aumento significativo na LPO nos exemplares coletados no SR na primeira coleta (10 dias). A GPx, juntamente com o tripeptídeo exógeno, GSH, neutraliza o peróxido de hidrogênio, e elimina os hidroperóxidos do organismo, tendo essa enzima importante papel na prevenção da LPO (Oliveira et al., 2008). Em estudo recente, Simonato et al. (2011) encontraram aumento da GPx e GSH no fígado de *P. lineatus* expostos por 96 h a fração solúvel do Diesel (FSD), sendo que, aumento da concentração da LPO não foi observado nesses animais. Por outro lado, os autores encontraram aumento da concentração da LPO após 6 h de exposição, onde a atividade da GPx não foi significativamente elevada. Diferentemente, no presente estudo, a concentração da LPO foi significativamente elevada em *A. heckelii* no SR em relação ao TP, após a coleta de 10 dias, onde a atividade da GPx aumentou significativamente. Dessa forma, apesar da GPx atuar prevenindo a formação da LPO nos organismos, esse fato não foi observado para os indivíduos de *A. heckelii* no presente estudo. Além dos HPA do petróleo e derivados serem conhecidos por causar aumento das ROS através do sistema antioxidante, eles também podem causar danos diretos no epitélio branquial, uma vez que, os mesmos são altamente lipofílicos. Esse fato pode explicar a alta concentração da LPO nos exemplares de *A. heckelii* coletados após 10 dias do acidente, onde altas concentrações de HPA dissolvidos na água foram também encontradas no SR. Além disso, os animais coletados após 45 dias do acidente no SR também apresentaram aumento significativo da GPx, em relação ao TP, na coleta de 45 dias; no entanto, esses animais não apresentaram aumento da LPO nessa coleta. Nesse caso, podemos inferir a que GPx foi eficiente em eliminar os peróxidos de hidrogênio e os hidroperóxidos evitando a formação da LPO.

Por outro lado, apesar dos exemplares de *S. jurupari* coletadas no SR, não terem apresentado alterações significativas na atividade da GPx, foi observado aumento significativo da CAT. A atividade dessa enzima foi significativamente maior nos exemplares de *S. jurupari* coletados no SR, em relação ao TP, após 45 e 90 dias do acidente. Além disso, para essa espécie, não foram encontradas diferenças entre as coletas de 45 e 60 dias pós-acidente em ambos os pontos. Considerando que a enzima CAT age evitando o acúmulo de peróxido de hidrogênio e prevenindo a formação de ânions superóxidos para que não haja produção de radical hidroxil, o aumento da atividade da CAT nos animais coletados no SR, após 45 e 90 dias do acidente, pode ser considerado uma resposta compensatória para a neutralização dos peróxidos de hidrogênio gerados. Da mesma forma, aumento na atividade da CAT tem sido amplamente reportado por diversos autores, em diferentes espécies de organismos aquáticos na presença de HPA (Achuba and Osakwe, 2003; Damásio et al., 2007; Silva et al., 2009). Assim, para as três coletas realizadas no SR, vemos que produção dos pró-oxidantes (ROS), provavelmente, sobrecarregou a capacidade antioxidante do tecido branquial, sendo o tipo de resposta diferenciada entre as espécies estudadas (*i.e.* os exemplares de *A. heckelii* ativaram a enzima antioxidante GPx, enquanto que exemplares de *S. jurupari* ativaram a enzima CAT). Apesar dos nossos resultados sugerirem a formação de peróxido de hidrogênio pelo sistema antioxidante dos animais, a atividade da SOD permaneceu inalterada para ambas as espécies coletadas tanto no SR quanto no TP, em todas as coletas. A enzima SOD é conhecida por converter ânions superóxidos, que são altamente reativos com membranas biológicas, em peróxido de hidrogênio. Assim, no presente estudo, nossos resultados indicam que as respostas das enzimas antioxidantes, assim como o aparecimento de LPO nas brânquias dos animais, foram relacionadas a diferentes fatores, tais como: (i) a

contaminação do ambiente aquático no SR por HPA de fontes mistas, como visto anteriormente, (ii) sensibilidade diferencial entre as espécies e (iii) do tempo decorrido do acidente, o qual representa momentos distintos do regime de elevação das águas no sistema do Rio Negro, e que, dessa forma, exerce o pronunciado efeito sobre a dinâmica física, química e biológica dos sistemas aquáticos da região.

Danos no DNA dos eritrócitos

Os HPA são conhecidos por gerar ROS através de sua metabolização (van der Oost et al., 2003). Radicais livres como o radical OH, radicais peroxil e hidroxil oxidam as moléculas biológicas essenciais como lipídios, proteínas, carboidratos e DNA (Halliwell, 2007) ocasionando danos em sua estrutura. No presente estudo, foi observado um aumento significativo dos danos no DNA nos eritrócitos dos exemplares de ambas as espécies coletadas no SR, em relação aos animais coletados no TP, em todos os períodos de coleta avaliados. O aumento do número de danos no DNA dos eritrócitos foi positivamente associado ao aumento da concentração dos HPA na bile encontrado para ambas as espécies estudadas. Outros autores também têm verificado aumento significativo nos danos no DNA dos eritrócitos em organismos aquáticos coletados em áreas impactadas (Dévier et al., 2013), além de aumento concomitante entre os danos no DNA e a concentração de metabólitos de HPA na bile (Dévier et al., 2013; Telli-Karakoç et al., 2002). Assim, as respostas observadas no presente estudo indicam, em geral, que a maior concentração dos HPA presentes no ambiente do SR levou à ocorrência de danos genotóxicos significativos em ambas as espécies estudadas, mesmo decorridos 90 dias da liberação do CAP no ambiente aquático. Contudo, vemos uma clara tendência de redução na presença de danos no DNA dos animais no SR após 90 dias do acidente, particularmente nos exemplares de *A.*

heckelii, principalmente quando comparado com os peixes coletados logo nos primeiros 10 dias após o derramamento, evidenciando que a liberação do CAP no SR teve profundo impacto sobre a ictiofauna residente da área.

Por outro lado, não foram observados danos significativos no DNA dos exemplares de ambas as espécies coletadas na área de referência, nas três coletas realizadas.

Demonstrando que, apesar das análises químicas indicarem a presença de HPA na água do TP, particularmente pelo uso pequenas embarcações pela população local, essa contaminação não foi suficiente para ocasionar efeitos genotóxicos nos animais nessa região. Assim, vemos que os exemplares de ambas as espécies coletadas no SR foram submetidos a níveis de substâncias tóxicas suficientes para causar danos na estrutura do DNA dos eritrócitos. Tais danos, podem vir a gerar danos genéticos irreversíveis, como mutações (Amado et al., 2006), acarretando em efeitos significativos nas populações de peixes residentes na área do porto. Por outro lado, a tendência de redução nos danos no DNA dos animais no SR após 90 dias do acidente, particularmente nos exemplares de *A. heckelii*, sugerem que as respostas de biotransformação e defesa antioxidante observadas nesses animais foram eficientes em reparar os danos no DNA, provavelmente, devido a uma menor geração de ROS.

Atividade da acetilcolinesterase (AChE) cerebral

A AChE é uma enzima que hidrolisa a acetilcolina, modulando o sinal nervoso, sendo que a inibição dessa enzima no cérebro de peixes têm sido utilizada como um marcador de exposição a compostos neurotóxicos no ambiente aquático, principalmente organofosforados e carbamatos (van der Oost et al., 2003). No entanto, outros autores têm

demonstrado que a atividade dessa enzima pode ser inibida por outros compostos orgânicos (Akaishi et al., 2004; Payne et al., 1996), sendo a atividade da AChE muito utilizada em monitoramentos ambientais de áreas impactadas por petróleo e derivados (Jung et al., 2011; Magni et al., 2006).

No presente estudo, a atividade da AChE cerebral foi inibida significativamente no SR na coleta realizada após 90 dias do acidente, em ambas as espécies estudadas, demonstrando que a contaminação presente no porto do SR foi capaz de induzir respostas neurotóxicas nos animais. Além disso, vemos que a atividade da AChE apresentou aumento significativo nos exemplares de *A. heckelii* coletados no TP em função dos períodos de coleta, enquanto esse padrão de resposta na atividade cerebral de AChE não foi observado nos exemplares de *S. jurupari* avaliados nesse estudo. Muitos fatores abióticos, como temperatura; pH e oxigênio dissolvido, e bióticos, como gênero, estágio reprodutivo e tamanho dos indivíduos, podem influenciar nas respostas dos parâmetros bioquímicos dos organismos, levando a dificuldades na interpretação dos resultados entre diferentes locais de coleta em casos de monitoramento ambiental (van der Oost et al., 2003). No presente estudo, o aumento da atividade da AChE cerebral dos exemplares de *A. heckelii* coletados no TP aparenta estar mais relacionado com fatores biológicos intrínsecos dos indivíduos, em resposta a alterações na dinâmica do ambiente aquático associadas ao pulso de inundação do canal principal do rio (Junk et al., 1989), do que em relação aos fatores abióticos do ambiente, uma vez que, os exemplares de *S. jurupari*, coletados no mesmo local e períodos, não apresentaram alterações na atividade dessa enzima no TP. Por outro lado, a diferenciação do gênero dos animais não foi possível devido aos mesmos não se encontrarem em estágio avançado do desenvolvimento gonadal, o que dificulta a

interpretação das respostas da AChE nas duas espécies estudadas. Além disso, não foi observada uma relação significativa ($P < 0,05$) entre a atividade dessa enzima e o peso dos exemplares de *A. heckelii* coletados tanto no TP quanto no SR. Dessa forma, a interpretação dos resultados da atividade da AChE cerebral nessa espécie precisa ser realizado com cautela. A atividade da AChE cerebral em ambas as espécies coletadas no SR após 90 dias do acidente foi significativamente inibida, em relação aos animais analisados no TP, o que demonstra que a contaminação no porto SR, mesmo decorridos 90 dias do acidente com o CAP, possui grande potencial de causar danos neurotóxicos aos peixes residentes na área, no qual podem interferir na capacidade de alimentação, locomoção e fuga.

Análise integrada dos dados

A análise multivariada dos dados evidenciou as principais relações entre as respostas dos biomarcadores e as variáveis ambientais, além de destacar em quais locais (pontos e períodos das coletas) essas relações foram mais fortes. Essas informações geradas contribuíram para caracterizar os locais de coleta (porto SR e área de referência TP) estudados nos diferentes períodos, demonstrando, de uma forma abrangente, a saúde do ecossistema frente às pressões antrópicas, como realizado previamente por outros autores em ambientes aquáticos neotropicais (Fernandes et al., 2013; Sadauskas-henrique et al., 2010; Sakuragui et al., 2013).

Baseado no conjunto de dados gerados para ambas as espécies, verificamos que as diferenças entre os locais de coleta (SR e TP) nas três campanhas (10, 45 e 90 dias) foram relacionadas com respostas dos biomarcadores de exposição e efeito, juntamente com a presença dos HPA na coluna d'água. Como visto nos gráficos de *factor scores*, essas

relações foram fortemente correlacionadas e significativas, evidenciando claramente que a contaminação encontrada no ambiente do SR promoveu a ativação dos biomarcadores de exposição e efeito estudados. Além disso, foi verificada uma diferença nas correlações entre os biomarcadores nos diferentes períodos de coleta. Após 90 dias do acidente, apesar das concentrações dos HPA na coluna d'água terem sido reduzidas, foi verificado um maior número de biomarcadores significativamente correlacionados. Este fato sugere que esses animais coletados no SR, mesmo após 90 dias do acidente, mantiveram ativos os processos de metabolização dos HPA incorporados, com conseqüente ativação do sistema antioxidante, mas que, em geral, não foi efetivo em evitar um pronunciado efeito genotóxico e neurotóxico observado nos animais. Além disso, a análise integrada dos dados também evidenciou diferenças na sensibilidade entre as duas espécies estudadas, onde exemplares de *A. heckelii* apresentaram-se mais sensíveis aos HPA presentes no ambiente do SR, provenientes tanto do CAP quanto do constante fluxo de embarcações no local, como observado pelo maior número de biomarcadores significativamente correlacionados nas três campanhas para essa espécie. Já os exemplares de *S. jurupari*, também apresentaram correlações entre os biomarcadores e a presença dos HPA no ambiente do SR, no entanto, em menor magnitude.

Essas diferenças entre as espécies, novamente evidenciadas, demonstram que, apesar de pertencerem à mesma ordem e à mesma família (Perciformes, Cichlidae), elas apresentam diferenças nas respostas à contaminação por petróleo e derivados, as quais podem ser devidas a características intrínsecas à sua biologia, bem como a diferenças no comportamento, como hábito e estratégia alimentar e área de forrageio. Como visto anteriormente, as respostas dos biomarcadores frente à presença de HPA no SR foram mais

evidentes em *A. heckelli* do que nos exemplares de *S. jurupari*, sugerindo que as espécies estudadas possuem diferentes rotas de exposição e absorção dos HPA presentes no ambiente, sendo fortes os indícios de que a espécie *A. heckelii* pode incorporar os HPA não somente por meio da absorção direta nas brânquias, mas também através da alimentação (biomagnificação trófica). Essas informações são de extrema relevância quando se trata da realização de monitoramento ambiental e avaliação de risco ecológico de áreas impactadas por contaminantes. Assim, é possível afirmar, como visto por meio da análise multivariada, que somente a utilização da análise da qualidade da água dos ambientes impactados não é suficiente para demonstrar os reais impactos desses contaminantes a outros componentes do ambiente, como a ictiofauna residente da área, uma vez que, a dinâmica local pode levar à permanência desses compostos no ambiente, enquanto respostas biológicas intrínsecas de cada espécie podem aumentar os efeitos deletérios da presença de xenobióticos no ambiente aquático.

5. Conclusões

A concentração dos HPA encontrados na água do porto SR apresentou diminuição temporal, ou seja, em função das coletas realizadas após 10, 45 e 90 dias do derramamento. O índice pirolítico (IP) calculado demonstrou que essa contaminação do porto SR é decorrente não apenas do derramamento acidental do CAP, mas também devido ao constante fluxo de embarcações no local.

Apesar da diminuição na concentração dos HPA na coluna de água do porto SR, foi observado um aumento nas respostas dos biomarcadores de exposição e efeito analisados em ambas as espécies em função das coletas, especialmente da concentração de HPA na

bile; atividade da EROD hepática; danos no DNA dos eritrócitos e inibição da AChE cerebral. Verificamos ainda que, as duas espécies estudadas apresentaram diferenças na sensibilidade aos HPA presentes no ambiente, onde *A. heckelii* apresentou-se mais sensível em relação à *S. jurupari*, sendo que essas diferenças na sensibilidade podem ser em decorrência de características intrínsecas da biologia das espécies, assim como do modo de vida.

A análise integrada dos dados (PCA-FA) demonstrou importantes relações entre os HPA presentes no ambiente e as respostas dos biomarcadores avaliados em ambas as espécies coletadas no SR após 10, 45 e 90 dias do derramamento. O primeiro eixo da PCA-FA explicou a maior porcentagem da variabilidade dos dados, demonstrou claramente que a presença dos HPA na água juntamente com o COD do ambiente no SR influenciou positivamente as respostas dos biomarcadores em ambas as espécies. Assim, os biomarcadores de exposição e efeito estudados e aplicados em campo para as duas espécies residentes de ciclídeos foram eficientes em demonstrar os efeitos negativos da presença dos HPA no ambiente da área do porto SR.

Conclusões gerais da tese

No primeiro capítulo, verificamos que os biomarcadores, metabólitos de B[a]P na bile, atividade da enzima GST hepática, e a presença de danos no DNA dos eritrócitos dos exemplares de tambaqui apresentaram respostas dependentes da dose de B[a]P injetada intraperitonealmente. Isso demonstra que esses são bons biomarcadores para se avaliar os efeitos da contaminação dos HPA nessa espécie, uma vez que esses marcadores apresentaram-se aumentados em função da concentração do contaminante. Ainda, o conjunto de biomarcadores, enzimas EROD; GST; SOD e CAT hepáticas, a enzima SDH plasmática, a concentração da LPO hepática, os danos no DNA dos eritrócitos juntamente com a análise dos metabólitos de B[a]P na bile, se mostraram eficientes para serem utilizados em conjunto na indicação dos efeitos do B[a]P nos tambaquis. Portanto, esses marcadores podem ser considerados um grupo de biomarcadores promissores para se avaliar os efeitos dos HPA do petróleo em peixes da região Amazônica.

No segundo capítulo, verificamos que a dispersão química resultou no aumento da toxicidade do óleo cru de Urucu-AM para os exemplares de tambaqui, como visto pela maior resposta dos biomarcadores analisados (EROD, GST, SOD, LPO, danos no DNA dos eritrócitos, SDH plasmática e metabólitos de HPA na bile). Além disso, as respostas foram observadas em maior magnitude nos animais expostos ao óleo cru quimicamente dispersado em água natural do Rio Negro (água com baixa disponibilidade de sais dissolvidos e alta concentração de COD), do que em água de poço sem a presença de COD. Entendemos que este aumento da toxicidade para os exemplares de tambaqui aclimatados em água natural do Rio Negro pode estar relacionado não somente ao sinergismo entre as

moléculas dos xenobióticos orgânicos (CO, CO+D e COD) presentes na água, mas também entre esses contaminantes e as moléculas de COD/SH. Assim, o presente capítulo trouxe evidências adicionais de que um derramamento acidental de petróleo em águas com altos níveis de COD, como as águas do Rio Negro-AM, pode induzir mudanças nos biomarcadores estudados em maior magnitude. Além disso, o uso de dispersantes químicos aniônicos (Corexit 9500[®]) como ação mitigadora de um derramamento acidental de óleo cru no Rio Negro-AM levaria a complexas interações sinérgicas entre essas substâncias, com consequente aumento da toxicidade para a biota aquática local.

No terceiro capítulo, realizamos um monitoramento em uma área portuária (porto São Raimundo-Manaus-AM) do Rio Negro que sofreu um derramamento de 60 mil litros de petróleo asfáltico (CAP). Nesse capítulo foi possível averiguar uma situação real de contaminação do Rio Negro-AM por um derivado de petróleo, onde os biomarcadores avaliados em laboratório foram validados para duas espécies de ciclídeos coletadas em campo. Verificamos que houve uma diminuição na concentração dos HPA dissolvidos na coluna de água em função do período das campanhas de coleta (10, 45 e 90 dias), a qual não foi acompanhada pela diminuição das respostas dos biomarcadores de exposição e efeito analisados, onde um aumento nas respostas desses biomarcadores em ambas as espécies em função das coletas foi observado, especialmente da concentração de HPA na bile; atividade da EROD hepática; danos no DNA dos eritrócitos e inibição da AChE cerebral. Verificamos, ainda, que as duas espécies estudadas apresentaram diferenças na sensibilidade aos HPA presentes no ambiente, pois *A. heckelii* apresentou-se mais sensível em relação à *S. jurupari*, sendo que essas diferenças na sensibilidade podem ser em decorrência de características intrínsecas da biologia das espécies, assim como do modo de

vida. Portanto, os biomarcadores de exposição e efeito estudados e aplicados em campo para as duas espécies residentes de ciclídeos foram eficientes em demonstrar os efeitos da presença dos HPA no ambiente da área do porto SR.

Perspectivas sobre o biomonitoramento ambiental dos ambientes aquáticos de água preta da Amazônia

Podemos considerar que no presente estudo foram geradas importantes informações para que entendamos os impactos da presença do petróleo e derivados no ambiente de águas pretas da Amazônia. No entanto, como qualquer outro trabalho, novas dúvidas e novas preocupações sobre a presença desses contaminantes nesse ambiente foram geradas. Assim, nesse tópico da tese serão apresentadas duas sugestões sobre estudos futuros que podem ser realizados no sentido de oferecer uma melhor compreensão da toxicidade dos HPA do petróleo e derivados no Rio Negro-AM.

→ Como observado no Capítulo 2 da presente tese, o óleo cru de Urucu-AM sozinho e em associação com o dispersante químico Corexit 9500 apresentaram maior toxicidade para os tambaquis em água natural do Rio Negro. Para se entender melhor essa maior toxicidade, inerente ao COD encontrado nessa água, sugere-se um estudo com água reconstituída (que possua as mesmas características físico-químicas do Rio Negro-AM) onde seja possível variarmos a concentração do COD na água. Assim, seria possível verificarmos se esse aumento da toxicidade do petróleo aumenta também em função da concentração do COD na água. Sabe-se que durante o período de cheia do Rio Negro-AM, existe maior concentração de COD; assim, um derramamento acidental de petróleo no Rio Negro pode apresentar toxicidade diferencial nos diferentes períodos hidrológicos da região. Além disso, a presença constante de embarcações nos portos de Manaus pode gerar toxicidade diferencial desses HPA em função do período hidrológico da região sendo esta uma situação mais realística;

→ Como verificado no Capítulo 3 da presente tese, existe uma grande contaminação da área portuária do São Raimundo que foi resultante não somente do derramamento acidental do CAP no Rio Negro, mas também do constante fluxo de embarcações (queima de combustíveis fósseis). Ainda, verificamos que existiu uma diminuição das concentrações dos HPA analisados na água em função das coletas, a qual não foi acompanhada por uma diminuição na toxicidade para as espécies estudadas. Dessa forma, podemos verificar que o uso de biomarcadores em peixes é de suma importância para avaliarmos a qualidade do ambiente aquático do Rio Negro. Assim, levando em consideração esses resultados, sugerimos um monitoramento das áreas portuárias de Manaus durante os períodos de enchente, cheia, vazante e seca para que possamos gerar dados de risco ambiental nesses ambientes bem como sugerir a implantação de políticas públicas que melhorem o uso e a qualidade dos portos de Manaus.

Referências Bibliográficas

- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., Andersen, O.K., 2000a. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: A laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquat. Toxicol.* 51, 241–258. doi:10.1016/S0166-445X(00)00108-9
- Aas, E., Beyer, J., Goksøyr, A., 2000b. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers* 5, 9–13.
- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2015. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25, 107–123. doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.011
- Achuba, F., Osakwe, S., 2003. Petroleum-induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiol. Biochem.* 29, 97–103.
- Akaishi, F.M., Assis, H.C.S. De, Jakobi, S.C.G., Courtenay, S.C., Lima, E.F., Wagener, A.L.R., Scofield, A.L., Ribeiro, C.A.O., 2004. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax sp.*) After Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 253, 244–253. doi:10.1007/s00244-003-2260-1
- Akkanen, J., Tuikka, A., Kukkonen, J.V.K., 2012. On the borderline of dissolved and particulate organic matter: Partitioning and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 91–98. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.11.010
- Almeida, J.R., Gravato, C., Guilhermino, L., 2012. Biological parameters towards polycyclic aromatic hydrocarbons pollution: A study with *dicentrarchus labrax* L. exposed to the model compound benzo(a)pyrene. *Water. Air. Soil Pollut.* 223, 4709–4722. doi:10.1007/s11270-012-1227-0
- Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A., Forlin, L., 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 73, 171–180. doi:10.1016/j.aquatox.2005.03.007

- Amado, L.L., Robaldo, R.B., Geracitano, L., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2006. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei : Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Mar. Pollut. Bull.* 52, 207–213. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.11.007
- Anderson, J.W., Neff, J.M., Cox, B. a., Tatem, H.E., Hightower, G.M., 1974. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Mar. Biol.* 27, 75–88. doi:10.1007/BF00394763
- Banni, M., Bouraoui, Z., Ghedira, J., Clerandeanu, C., Guerbej, H., Narbonne, J.F., Boussetta, H., 2009. Acute effects of benzo[a]pyrene on liver phase I and II enzymes, and DNA damage on sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 293–299. doi:10.1007/s10695-008-9210-9
- Barakat, A.O., Mostafa, A., Wade, T.L., Sweet, S.T., El, N.B., 2011. Distribution and characteristics of PAHs in sediments from the Mediterranean coastal environment of Egypt. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1969–1978. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.06.024
- Bernhardt, R., 1995. Cytochrome P450: Structure, function, and generation of reactive oxygen species, in: *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Volume 127. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 137–221. doi:10.1007/BFb0048267
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Grune and Stratton, New York.
- Beyer, J., Sandvik, M., Sk, J.U., Egaas, E., Hylland, K., Waagbø, R., Goksù, A., 1997. Time- and dose-dependent biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) exposed to benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4', 5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium. *Biomarkers* 2, 35–45.
- Bjõesethin, A., Ramdahl, T., 1984. *Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Marcel Dekker, New York.
- Blumer, M., Youngblood, W.W., 1975. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils and*

- Recent Sediments. *Science* (80-.). 188, 53–55.
- Bosveld, A.T.C., De Bie, P.A.F., Van den Brink, N.W., Jongepier, H., Klomp, A. V., 2002. In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in the Netherlands. *Chemosphere* 49, 75–83. doi:10.1016/S0045-6535(02)00161-3
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brauner, C.J., Ballantyne, C.L., Vijayan, M.M., A.I. V., V., 1999. Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123, 127–134. doi:10.1016/S0742-8413(99)00018-3
- Braz-Mota, S., Sadauskas-Henrique, H., Duarte, R.M., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., 2015. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere* 135, 53–60. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.03.042
- Brinkmann, M., Hudjetz, S., Kammann, U., Hennig, M., Kuckelkorn, J., Chinoraks, M., Cofalla, C., Wiseman, S., Giesy, J.P., Schäffer, A., Hecker, M., Wölz, J., Schüttrumpf, H., Hollert, H., 2013. How flood events affect rainbow trout : Evidence of a biomarker cascade in rainbow trout after exposure to PAH contaminated sediment suspensions. *Aquat. Toxicol.* 128-129, 13–24. doi:10.1016/j.aquatox.2012.11.010
- Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Picard, C., Garrigues, P., 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Mar. Chem.* 58, 85–97.
- Buet, A., Banas, D., Vollaire, Y., Coulet, E., Roche, H., 2006. Biomarker responses in European eel (*Anguilla anguilla*) exposed to persistent organic pollutants. A field study in the Vaccarès lagoon (Camargue, France). *Chemosphere* 65, 1846–1858. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.074

- Campos-baca, L., Kohler, C.C., 2005. Aquaculture of *Colossoma macropomum* and Related Species in Latin America. Am. Fish. Soc. Symp. 46, 541–561.
- Camus, L., Aas, E., Børseth, J.F., 1998. Ethoxyresorufin-O-deethylase activity and fixed wavelength fluorescence detection of PAHs metabolites in bile in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) exposed to a dispersed topped crude oil in a Continuous Flow System. Mar. Environ. Res. 46, 29–32. doi:10.1016/S0141-1136(97)00045-7
- Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill Tissue Recovery after Copper Exposure and Blood Parameter Responses in the Tropical Fish *Prochilodus scrofa*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 91, 83–91. doi:10.1006/eesa.2002.2164
- Chiang, G., Munkittrick, K.R., Urrutia, R., Concha, C., Rivas, M., Diaz-jaramillo, M., Barra, R., 2012. Ecotoxicology and Environmental Safety Liver ethoxyresorufin-O-deethylase and brain acetylcholinesterase in two freshwater fish species of South America ; the effects of seasonal variability on study design for biomonitoring. Ecotoxicol. Environ. Saf. 86, 147–155. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.09.008
- Cho, H.-H., Choi, J., Goltz, M.N., Park, J.-W., 2002. Combined effect of natural organic matter and surfactants on the apparent solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons. J. Environ. Qual. 31, 275–80. doi:10.2134/jeq2002.0275
- Collier, T., Varanasi, U., 1990. Hepatic activities metabolizing enzymes and billiary levels of xenobiotics in English Sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20, 462–473.
- CONAMA, 2000. Resolucao CONAMA no 269, Regulamenta o uso de dispersantes quimicos em derrames de oleo no mar. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brazil.
- Conte, P., Agretto, A., Spaccini, R., Piccolo, A., 2005. Soil remediation: Humic acids as natural surfactants in the washings of highly contaminated soils. Environ. Pollut. 135, 515–522. doi:10.1016/j.envpol.2004.10.006
- Costa, E.M. de M.B., de Oliveira, V., Pimenta, F.C., 2004. CYP450 e biotransformacao microbiana. Atualiazação 33, 21–31.

CPRM - Serviço Geológico do Brasil, 2014. Monitoramento hidrológico. Boletim número 5.

Da Silva, J., De Freitas, T.R.O., Marinho, J.R., Speit, G., Erdtmann, B., 2000. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet. Mol. Biol.* 23, 241–245. doi:10.1590/S1415-47572000000100042

Damásio, J.B., Barata, C., Munné, A., Ginebreda, A., Guash, H., Sabater, S., Caixach, J., Porte, C., 2007. Comparing the response of biochemical indicators (biomarkers) and biological indices to diagnose the ecological impact of an oil spillage in a Mediterranean river (NE Catalunya, Spain). *Chemosphere* 66, 1206–1216. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.07.055

Dave, D., Ghaly, a. E., 2011. Remediation technologies for marine oil spills : A critical review and comparative analysis. *Am. J. Environ. Sci.* 7, 423–440.

Departamento Nacional de Infraestrutura de Transportes - DNIT, 2014. No Title [WWW Document]. URL <http://www.dnit.gov.br/>

Dévier, M.H., Le Dû-Lacoste, M., Akcha, F., Morin, B., Peluhet, L., Le Menach, K., Burgeot, T., Budzinski, H., 2013. Biliary PAH metabolites, EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from Seine Estuary (France). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 708–722. doi:10.1007/s11356-012-1345-7

Dixon, D.G., Hodson, P. V., Kaiser, K.L.E., 1987. Serum sorbitol dehydrogenase activity as an indicator of chemically induced liver damage in rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 685–696. doi:10.1002/etc.5620060906

Duarte, R.M., Honda, R.T., Val, A.L., 2010. Acute effects of chemically dispersed crude oil on gill ion regulation, plasma ion levels and haematological parameters in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquat. Toxicol.* 97, 134–141. doi:10.1016/j.aquatox.2009.12.020

Duarte, R.M., Smith, D.S., Val, A.L., Wood, C.M., 2016. Dissolved organic carbon from

- the upper Rio Negro protects zebrafish (*Danio rerio*) against ionoregulatory disturbances caused by low pH exposure. *Sci. Rep.* 6, 20377. doi:10.1038/srep20377
- Dû-Lacoste, M. Le, Akcha, F., Dévier, M.H., Morin, B., Burgeot, T., Budzinski, H., 2013. Comparative study of different exposure routes on the biotransformation and genotoxicity of PAHs in the flatfish species, *Scophthalmus maximus*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 690–707. doi:10.1007/s11356-012-1388-9
- Ellman, G.L., Courtney, D.K., Jr, V.A., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Fernandes, M.N., Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Ramos, C.A., Pereira, C.D.S., Sadauskas-Henrique, H., 2013. Organochlorines and metals induce changes in the mitochondria-rich cells of fish gills: An integrative field study involving chemical, biochemical and morphological analyses. *Aquat. Toxicol.* 126, 180–190.
- Filizola, N., Spínola, N., Arruda, W., Seyler, F., Calmant, S., Silva, J., 2010. The Rio Negro and Rio Solimões confluence point – hydrometric observations during the 2006/ 2007 cycle. *River, Coast. Estuar. Morphodynamics. RCEM 2009* 1003–1006.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2016. Introduced species fact sheet [WWW Document]. URL <http://fao.org/fishery/introsp/3885/en>. (accessed 5.20.16).
- Frederico, R.G., Farias, I.P., Lúcia, M., Araújo, G. De, Charvet-almeida, P., Alves-gomes, J.A., 2012. Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle , 1841 (Chondrichthyes : Potamotrygonidae). *Neotrop. Ichthyol.* 10, 71–80.
- Gagnon, M.M., Holdway, D. a., 2000. EROD induction and biliary metabolite excretion following exposure to the water accommodated fraction of crude oil and to chemically dispersed crude oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 70–77. doi:10.1007/s002449910009
- Gagnon, M.M., Holdway, D.A., 2002. EROD activity, serum SDH and PAH biliary

- metabolites in sand flathead (*Platycephalus bassensis*) collected in Port Phillip Bay, Australia. Mar. Pollut. Bull. 44, 230–237. doi:10.1016/S0025-326X(01)00245-4
- Gagnon, M.M., Holdway, D.A., 1998. MFO induction in atlantic salmon (*Salmo salar*) during and after exposure to bass strait crude oil. Australas. J. Ecotoxicol. 4, 29–35.
- George-Ares, A., Clark, J.R., 2000. Aquatic toxicity of two Corexit® dispersants. Chemosphere 40, 897–906. doi:10.1016/S0045-6535(99)00498-1
- Gravato, C., Guilhermino, L., 2009. Effects of Benzo(a)pyrene on Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): Biomarkers, Growth and Behavior. Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J. 15, 121–137. doi:10.1080/10807030802615659
- Gravato, C., Santos, M. a, 2002. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. Ecotoxicol. Environ. Saf. 51, 115–127. doi:10.1006/eesa.2001.2133
- Gravato, C., Santos, M.A., 2003. Genotoxicity biomarkers: association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. Ecotoxicol. Environ. Saf. 55, 352–358. doi:10.1016/S0147-6513(02)00070-2
- Hahn, N.S., Cunha, F., 2005. Feeding and Trophic Ecomorphology of *Satanoperca pappaterra* (Pisces, Cichlidae) in the Manso Reservoir , Mato. Brazilian Arch. Biol. Technol. 48, 1007–1012.
- Haitzer, M., Hgss, S., Traunspurger, W., 1998. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms - A review-. Chemosphere 37, 1335–1362.
- Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants - Quo vadis? Trends Pharmacol. Sci. 32, 125–130. doi:10.1016/j.tips.2010.12.002
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. Biochem. Soc. Trans. 35, 1147–1150. doi:10.1042/BST0351147
- He, Y.L., Murby, S., Warhurst, G., Gifford, L., Walker, D., Ayrton, J., Eastmond, R.,

- Rowland, M., 1998. Species differences in size discrimination in the paracellular pathway reflected by oral bioavailability of poly(ethylene glycol) and D-peptides. *J. Pharm. Sci.* 87, 626–633. doi:10.1021/js970120d
- Heath, A.G., 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press.
- Hemmer, M.J., Barron, M.G., Greene, R.M., 2011. Comparative toxicity of eight oil dispersants, Louisiana sweet crude oil (LSC), and chemically dispersed LSC to two aquatic test species. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2244–2252. doi:10.1002/etc.619
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Br. J. Haematol.* 25, 563–575.
- Hylland, K., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 69, 109–123. doi:10.1080/15287390500259327
- Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E., 2010. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky, Olomouc, Czech Repub.* 154, 103–116. doi:10.5507/bp.2010.017
- Jiang, Z.Y., Woollard, A.C.S., Wolff, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26, 853–856. doi:10.1007/BF02536169
- Johannsson, O.E., Smith, D.S., Sadauskas-Henrique, H., Cameron, G., Wood, C.M., Val, A.L., 2016. Photo-oxidation processes, properties of DOC, reactive oxygen species (ROS), and their potential impact on native biota and carbon cycling in the Rio Negro (Amazonia, Brazil). *Hydrobiologia* 1–23. doi:10.1007/s10750-016-2687-9
- Johnson, W.P., John, W.W., 1999. PCE solubilization and mobilization by commercial humic acid. *J. Contam. Hydrol.* 35, 343–362.
- Jönsson, M.E., Brunström, B., Brandt, I., 2009. The zebrafish gill model: Induction of CYP1A, EROD and PAH adduct formation. *Aquat. Toxicol.* 91, 62–70. doi:10.1016/j.aquatox.2008.10.010

- Jung, J., Kim, M., Yim, U.H., Ha, S.Y., An, J.G., Won, J.H., Han, G.M., Kim, N.S., Addison, R.F., Shim, W.J., 2011. Biomarker responses in pelagic and benthic fish over 1 year following the Hebei Spirit oil spill (Taean, Korea). *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1859–1866. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.04.045
- Jung, J.H., Chae, Y.S., Kim, H.N., Kim, M., Yim, U.H., Ha, S.Y., Han, G.M., An, J.G., Kim, E., Shim, W.J., 2012. Spatial variability of biochemical responses in resident fish after the M/V Hebei Spirit Oil Spill (Taean, Korea). *Ocean Sci. J.* 47, 209–214. doi:10.1007/s12601-012-0021-7
- Jung, J.H., Yim, U.H., Han, G.M., Shim, W.J., 2009. Biochemical changes in rockfish, *Sebastes schlegeli*, exposed to dispersed crude oil. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 150, 218–223. doi:10.1016/j.cbpc.2009.04.009
- Junk, W.M., Bayley, R.E., Sparks, P.B., 1989. The flood pulse concept in river- foodplain systems, in: *Proceedings of the International Large River Symposium*. *Can Spec Publ fish Sci* 106, pp. 110–127.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.
- Kirby, K.R., Laurance, W.F., Albernaz, A.K., Schroth, G., Fearnside, P.M., Bergen, S., Venticinque, E.M., da Costa, C., 2006. The future of deforestation in the Brazilian Amazon. *Futures* 38, 432–453. doi:10.1016/j.futures.2005.07.011
- Kirby, M.F., Law, R.J., 2010. Accidental spills at sea – Risk, impact, mitigation and the need for co-ordinated post-incident monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 797–803. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.03.015
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofundi, T., 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun* 3, 103–115.
- Kochhann, D., De Azevedo Brust, S.M., Domingos, F.X.V., Val, A.L., 2013. Linking hematological, biochemical, genotoxic, and behavioral responses to crude oil in the

- Amazon fish *Colossoma macropomum* (cuvier, 1816). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 65, 266–275. doi:10.1007/s00244-013-9894-4
- Krahn, M.M., Burrows, D.G., Ylitaio, G.M., Brown, D.W., Wlgren, C.A., Collier, T.K., Chan, S.L., Varanasi, U., 1992. Mass Spectrometric Analysis for Aromatic Compounds in Bile of Fish Sampled After the Exxon Valdez Oil Spill Mass Spectrometric Analysis for Aromatic Compounds in Bile of Fish. Environ. Sci. Technol Technol. doi:10.1021/es00025a012
- Krahn, M.M., Rhodes, L.D., Myers, M.S., Moore, L.K., Macleod, W.D., Malins, D.C., 1986. Associations between metabolites of aromatic compound in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 67, 61–67.
- Landrum, P.F., Nihart, S.R., Eadie, B.J., Gardner, W.S., 1984. Reverse-phase separation method for determining pollutant binding to Aldrich humic acid and dissolved organic carbon of natural waters. Environ. Sci. Technol. 18, 187–92. doi:10.1021/es00121a010
- Lee, R.F., Anderson, J.W., 2005. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. Mar. Pollut. Bull. 50, 705–723. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.04.036
- Lemaire, P., Förlin, L., Livingstone, D.R., 1996. Responses of hepatic biotransformation and antioxidant enzymes to CYP1 A-inducers (3-methylcholanthrene, B-naphthoflavone) in sea bass (*Dicentrarchus lab-ax*), dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 36, 141–160.
- Li, H., Ran, Y., 2012. Distribution and Bioconcentration of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Water and Fishes. Sci. World J. 2012, 14. doi:10.1100/2012/632910
- Liao, I.C., Su, H.M., Chang, E.Y., 2001. Techniques in finfish larviculture in Taiwan, Aquaculture. doi:10.1016/S0044-8486(01)00692-5

- Lin, E.L., Cormier, S.M., Torsella, J.A., 1996. Fish biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites estimated by fixed-wavelength fluorescence: comparison with HPLC-fluorescent detection. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 16–23.
doi:10.1006/eesa.1996.0077
- Lippold, H., Gottschalch, U., Kupsch, H., 2008. Joint influence of surfactants and humic matter on PAH solubility. Are mixed micelles formed? *Chemosphere* 70, 1979–86.
doi:10.1016/j.chemosphere.2007.09.040
- Livingstone, D.R., Forlin, L., George, S.G., 1993. Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms, in: Sutcliffe, D.W. (Ed.), *Water Quality and Stress Indicators in Marine and Freshwater Ecosystems: Linking Levels of Organisation*. Freshwater Biological Association.
- Lopes, A.P., 2010. Estudo de hidrocarbonetos e metais em sedimentos de fundo do Rio Negro na orla urbana de Manaus. Universidade Federal do Amazonas - UFAM.
- Lu, G.H., Wang, C., Zhu, Z., 2009. The dose-response relationships for EROD and GST induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in *Carassius auratus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 194–9. doi:10.1007/s00128-008-9622-3
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Magni, P., Falco, G. De, Falugi, C., Franzoni, M., Monteverde, M., Perrone, E., Sgro, M., Bolognesi, C., Sperimentale, B., 2006. Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia , western Mediterranean). *Environ. Pollut.* 142, 65–72. doi:10.1016/j.envpol.2005.09.018
- Maher, W.A., Aislabei, J., 1992. Polycyclic aromatic hydrocarbons in nearshore marine sediments of Australia. *Sci. Total Environ.* 112, 143–164.
- Manoli, E., Samara, C., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and. *Trends Anal. Chem.* 18, 417–428.

- Martínez-Gómez, C., Campillo, J.A., Benedicto, J., Fernández, B., Valdés, J., García, I., Sánchez, F., 2006. Monitoring biomarkers in fish (*Lepidorhombus boscii* and *Callionymus lyra*) from the northern Iberian shelf after the Prestige oil spill. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 305–314. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.03.010
- Matsuo, a Y.O., Duarte, R.M., Val, a L., 2005. Unidirectional sodium fluxes and gill CYP1A induction in an Amazonian fish (*Hyphessobrycon erythrostigma*) exposed to a surfactant and to crude oil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 851–8. doi:10.1007/s00128-005-0828-3
- Matsuo, A.Y.O., Woodin, B.R., Reddy, C.M., Val, A.L., Stegeman, J.J., 2006. Humic substances and crude oil induce cytochrome P450 1A expression in the amazonian fish species *Colossoma macropomum* (tambaqui). *Environ. Sci. Technol.* 40, 2851–2858. doi:10.1021/es052437i
- Mccarthy, J.F., Jimenez, D., 1985. Reduction in bioavailability to bluegills of polycyclic aromatic hydrocarbons bound to dissolved humic material. *Environ. Toxicol. Chem.* 4, 511–521.
- McCord, J., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase An enzymic function for erythrocyte (Hemocytin). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (Hemocytin). *J. Biol. Chem.* 24, 6049–6055.
- Mcgeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2002. The role of dissolved organic carbon in moderating the bioavailability and toxicity of Cu to rainbow trout during chronic waterborne exposure. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 133, 147–160.
- Menzel, R., Stürzenbaum, S., Bärenwaldt, A., Kulas, J., Steinberg, C.E.W., 2005. Humic material induces behavioral and global transcriptional responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8324–8332. doi:10.1021/es050884s
- Mídio, A., Martins, D.I., 2000. *Toxicologia de alimentos*. Varela, São Paulo.

- Milinkovitch, T., Ndiaye, A., Sanchez, W., Le Floch, S., Thomas-Guyon, H., 2011. Liver antioxidant and plasma immune responses in juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*) exposed to dispersed crude oil. *Aquat. Toxicol.* 101, 155–64.
doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.013
- Miller, K.P., Ramos, K.S., 2001. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab. Rev.* 33, 1–35.
doi:10.1081/DMR-100000138
- Modesto, K. a, Martinez, C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781–7.
doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.005
- Moeckel, C., Monteith, D.T., Llewellyn, N.R., Henrys, P. a, Pereira, M.G., 2014. Relationship between the concentrations of dissolved organic matter and polycyclic aromatic hydrocarbons in a typical U.K. upland stream. *Environ. Sci. Technol.* 48, 130–138.
- Morris, S., Vosloo, S., 2006. Animals and Environments: Resisting Schisms in Comparative Physiology and Biochemistry. *Invit. Perspect. Physiol. Biochem. Zool.* 79, 211–223.
- Mu, J. li, Wang, X. hong, Jin, F., Wang, J. ying, Hong, H. sheng, 2012. The role of cytochrome P4501A activity inhibition in three- to five-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons embryotoxicity of marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1445–1451. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.04.007
- Nardi, S., Pizzeghello, D., 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1527–1536. doi:10.1016/S0038-0717(02)00174-8
- National Research Council, 1989. Using oil spills dispersants on the sea. National Academy Press, Washington, DC.
- Neff, J.M., 1990. Composition and fate of petroleum and spill-treating agents in the marine environment, in: *Sea Mammals and Oil: Confronting the Risks*. Academic Press, San

Diego, CA, USA, pp. 1–43.

- Neves, R.L.S., Oliveira, T.F., Ziolli, R.L., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish bile (*Mugil liza*) as biomarkers for environmental monitoring in oil contaminated areas. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1818–1824. doi:10.1016/j.marpolbul.2007.08.013
- Niki, E., 2009. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 469–484. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032
- Nkpaa, K.W., Wegwu, M.O., Essien, E.B., 2013. Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Levels in Two Commercially Important Fish Species from crude oil polluted Waters of Ogoniland and Their Carcinogenic Health Risks. *J. Environ. Earth Sci.* 3, 128–138.
- Nogueira, L., Rodrigues, A.C.F., Trídico, C.P., Fossa, C.E., de Almeida, E.A., 2011. Oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil. *Environ. Monit. Assess.* 180, 243–255. doi:10.1007/s10661-010-1785-9
- Nongnutch, K., Nanuam, J., Somnuek, C., 2012b. The efficiency of PAH metabolites fluorescence intensity measurement to study PAHs contamination. *Environ. Nat. Resour. Res.* 2, 32–37. doi:10.5539/enrr.v2n2p32
- Nongnutch, K., Nanuam, J., Somnuek, C., 2012a. The Efficiency of PAH Metabolites Fluorescence Intensity Measurement to Study Pahs Contamination. *Environ. Nat. Resour. Res.* 2, 32–37. doi:10.5539/enrr.v2n2p32
- Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2008. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. *Sci. Total Environ.* 96. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.02.012
- Oliveira, T.C.S., 2007. Caracterização de marcadores moleculares e uso de diferentes proxis para estudo do registro de combustão em sedimento na Amazônia Central (Coari-Manaus). Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

- Page, D.S., Boehm, P.D., Douglas, G.S., Bence, A.E.A., Burns, W.M., Mankiewicz, P.J., 1996. The natural petroleum hydrocarbon background in subtidal sediments of prince william sound, Alaska, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1266–1281.
- Paine, R.T., Ruesink, J.L., Sun, A., Soulanille, E.L., Wonham, M.J., Harley, C.D.G., Brumbaugh, D.R., Secord, D.L., 1996. TROUBLE ON OILED WATERS: Lessons from the Exxon Valdez Oil Spill. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27, 197–235.
doi:10.1146/annurev.ecolsys.27.1.197
- Payne, J.F., Mathieu, A., Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an Old Biomarker with a New Future? Field Trials in Association with Two Urban Rivers and a Paper Mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 225–231.
- Petrobrás, 1997. Características do petróleo de Urucu. CENPES/SEPESQ/DIQUIM/SETAV 10 p. Anexo V.
- Piccolo, A., Mbagwu, J.S.C., 1994. Humic substances and surfactants effects on the stability of two tropical soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58, 950.
doi:10.2136/sssaj1994.03615995005800030044x
- Playle, R.C., Dixon, D.G., 1993. Copper and Cadmium Binding to Fish Gills : Modification by Dissolved Organic Carbon and Synthetic Ligands. *Can J Fish Aquat Sci* 50, 2667–2677. doi:doi: 10.1139/f93-290
- Ramachandran, S.D., Hodson, P. V., Khan, C.W., Lee, K., 2004. Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 300–308.
doi:10.1016/j.ecoenv.2003.08.018
- Ramachandran, S.D., Swezey, M.J., Hodson, P. V., Boudreau, M., Courtenay, S.C., Lee, K., King, T., Dixon, J. a., 2006. Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 1182–1189.
doi:10.1016/j.marpolbul.2006.02.009
- Regoli, F., Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and

antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquat. Toxicol.* 105, 56–66.

doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.014

Ribeiro, C.A. de O., Katsumiti, A., França, P., Maschio, J., Zandoná, E., Cestari, M.M., Vicari, T., Roche, H., de Assis, H.C.S., Filipak Neto, F., 2013. Biomarkers responses in fish (*Atherinella brasiliensis*) of paranaguá bay, southern Brazil, for assessment of pollutant effects. *Brazilian J. Oceanogr.* 61, 1–11. doi:10.1590/S1679-87592013000100001

Richards, J.G., Burnison, B.K., Playle, R.C., 1999. Natural and commercial dissolved organic matter protects against the physiological effects of a combined cadmium and copper exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can J Fish Aquat Sci* 418, 407–418.

Richards, J.G., Curtis, P.J., Burnison, B.K., Playle, R.C., 2001. Effects of natural organic matter source on reducing metal toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and on metal binding to their gills. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1159–1166.

Rinaldi, R., Eliasson, E., Swedmark, S., Morgenstern, R., 2002. Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. *Drug Metab. Dispos.* 30, 1053–1058. doi:10.1124/dmd.30.10.1053

Roditi, H.A., Fisher, N.S., Sanudo-Wilhelmy, S.A., 2000. Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. *Nature* 407, 78–80.

Ruddock, P.J., Bird, D.J., McCalley, D. V, 2002. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in three species of fish from the Severn Estuary. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 97–105. doi:10.1006/eesa.2001.2131

Sadauskas-henrique, H., Sakuragui, M.M., Paulino, M.G., Fernandes, M.N., 2010. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. *Environ. Monit. Assess.* doi:10.1007/s10661-010-1810-z

Sakuragui, M.M., Paulino, M.G., Pereira, C.D.S., Carvalho, C.S., Sadauskas-Henrique, H., Fernandes, M.N., 2013. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage

- in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. *Environ. Pollut.* 178, 41–51. doi:doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.032
- Shailaja, M.S., D'Silva, C., 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* 53, 835–841. doi:10.1016/S0045-6535(03)00667-2
- Shimada, T., 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 257–276. doi:10.2133/dmpk.21.257
- Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y., 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci* 95, 1–6. doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb03162.x
- Shukla, P., Gopalani, M., Ramteke, D.S., Wate, S.R., 2007. Influence of salinity on PAH uptake from water soluble fraction of crude oil in *Tilapia mossambica*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 601–605. doi:10.1007/s00128-007-9272-x
- Silva, C.A., Ribeiro, C.A.O., Katsumiti, A., Araújo, M.L.P., Zandoná, E.M., Silva, G.P.C., Maschio, J., Roche, H., Silva de Assis, H.C., 2009. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 400–409. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.03.009
- Silva, J., Freitas, T.R.O., Marinho, J.R., Speit, G., Erdtmann, B., 2000. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet. Mol. Biol.* 23, 241–245. doi:10.1590/S1415-47572000000100042
- Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology* 20, 1400–1410. doi:10.1007/s10646-011-0697-y
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0

- Sioli, H., 1984. The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river course, and river types., in: The Amazon: Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and Its Basin. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, pp. 127–166.
- Smith, K.E.C., Thullner, M., Wick, L.Y., Harms, H., 2011. Dissolved Organic Carbon Enhances the Mass Transfer of Hydrophobic Organic Compounds from Nonaqueous Phase Liquids (NAPLs) into the Aqueous Phase. *Environ. Sci. Technol* 45, 8741–8747. doi:dx.doi.org/10.1021/es202983k
- Sriram, A., Scialo, F., Ferna, D., Enri, J.A., Murphy, M.P., Sanz, A., Nelson, G., Enri, J.A., Murphy, M.P., Sanz, A., Logan, A., Cooper, H.M., 2016. Short Article Mitochondrial ROS Produced via Reverse Electron Short Article Mitochondrial ROS Produced via Reverse Electron Transport Extend Animal Lifespan. *Cell Metab.* 725–734. doi:10.1016/j.cmet.2016.03.009
- Steinberg, C.E.W., Kamara, S., Prokhotskaya, V.Y., Manusadžianas, L., Karasyova, T. a., Timofeyev, M. a., Jie, Z., Paul, A., Meinelt, T., Farjalla, V.F., Matsuo, A.Y.O., Burnison, B.K., Menzel, R., 2006. Dissolved humic substances - Ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? *Freshw. Biol.* 51, 1189–1210. doi:10.1111/j.1365-2427.2006.01571.x
- Steinberg, C.E.W., Paul, A., Pflugmacher, S., Meinelt, T., Klöcking, R., Wiegand, C., 2003. Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals - A review. *Fresenius Environ. Bull.* 12, 391–401.
- Tan, H.H., Lim, K.K.P., 2008. *Acarichthys heckelii*. *Nat. Singapore* 1, 129–133.
- Telli-Karakoç, F., Ruddock, P.J., Bird, D.J., Hewer, A., Van Schanke, A., Phillips, D.H., Peters, L.D., 2002. Correlative changes in metabolism and DNA damage in turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to benzo[a]pyrene. *Mar. Environ. Res.* 54, 511–515. doi:10.1016/S0141-1136(02)00192-7
- Tiehm, A., 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 258–263.

- Timbrell, J., 2015. Principles of Biochemical Toxicology, Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Timofeyev, M.A., Shatilina, Z.M., Kolesnichenko, A. V., Bedulina, D.S., Kolesnichenko, V. V., Pflugmacher, S., Steinberg, C.E.W., 2006. Natural organic matter (NOM) induces oxidative stress in freshwater amphipods *Gammarus lacustris* Sars and *Gammarus tigrinus* (Sexton). *Sci. Total Environ.* 366, 673–681. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.02.003
- Tim-Tim, A.L.S., Morgado, F., Moreira, S., Rangel, R., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2009. Cholinesterase and glutathione S-transferase activities of three mollusc species from the NW Portuguese coast in relation to the “Prestige” oil spill. *Chemosphere* 77, 1465–1475. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.014
- Trisciani, A., Corsi, I., Torre, C. Della, Perra, G., Focardi, S., 2011. Hepatic biotransformation genes and enzymes and PAH metabolites in bile of common sole (*Solea solea*, Linnaeus, 1758) from an oil-contaminated site in the Mediterranean Sea: A field study. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 806–814. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.01.001
- United Environmental Programme, 1991. Determinations of petroleum hydrocarbons in sediment, reference methods for marine pollution studies.
- United Nations Documents, 1987. Report of the World Commission on Environment and Development: Our Common Future.
- Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., 1999. Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon, in: Val, A.L., Almeida-val, V.M.F. (Eds.), *Biology of Tropical Fishes*. p. 460.
- Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., 1995. *Fishes of the Amazon and Their Environment, Zoophysiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-79229-8
- Val, A.L., De Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J., 2005. Tropical Environment, in: *Fish*

- Physiology. pp. 1–45. doi:10.1016/S1546-5098(05)21001-4
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- van Schanke, A., Holtz, F., van der Meer, J., Boon, J.P., Ariese, F., Stroomberg, G., van den Berg, M., Everaarts, J.M., 2001. Dose- and time-dependent formation of biliary benzo[a]pyrene metabolites in the marine flatfish DAB (*Limanda limanda*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1641–1647. doi:10.1002/etc.5620200804
- Varanasi, U., Stein, J.E., Nishimoto, M., Reichert, W.L., Collier, T.K., 1987. Chemical carcinogenesis in feral fish: uptake, activation, and detoxication of organic xenobiotics. *Environ. Health Perspect.* 71, 155–170. doi:10.1289/ehp.8771155
- Vega-López, A., Jiménez-Orozco, F.A., García-Latorre, E., Domínguez-López, M.L., 2008. Oxidative stress response in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*) by exposure to water from its extant localities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 94–103. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.10.031
- Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L., 2008. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Sci. Total Environ.* 395, 87–100. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.01.052
- Wang, Z., Fingas, M., Lambert, P., Zeng, G., Yang, C., Hollebone, B., 2004. Characterization and identification of the Detroit River mystery oil spill (2002). *J. Chromatogr. A* 1038, 201–214. doi:10.1016/j.chroma.2004.03.004
- Wang, Z., Fingas, M., Page, D.S., 1999. Oil spill identification. *J. Chromatogr. A* 843, 369–411.
- Wang, Z., Fingas, M., Sigouin, L., 2001. Characterization and identification of a “mystery” oil spill from Quebec (1999). *J. Chromatogr. A* 909, 155–169.
- Wang, Z., Hollebone, B.P., Fingas, M., Fieldhouse, B., 2003. Characteristics of Spilled

- Oils, Fuels, and Petroleum Products : 1. Composition and Properties of Selected Oils.
- Webb, D., Gagnon, M.M., 2007a. Serum Sorbitol Dehydrogenase Activity as an Indicator of Chemically Induced Liver Damage in Black Bream (*Acanthopagrus butcheri*). Environ. Bioindic. 2, 172–182. doi:10.1080/15555270701591006
- Webb, D., Gagnon, M.M., 2007b. Serum sorbitol dehydrogenase activity as an indicator of chemically induced liver damage in black bream (*Acanthopagrus butcheri*). Environ. Bioindic. 2, 172–182. doi:10.1080/15555270701591006
- Webb, D., Gagnon, M.M., Rose, T., 2005. Interseasonal variability in biomarkers of exposure in fish inhabiting a southwestern Australian estuary. Environ. Toxicol. 20, 522–32. doi:10.1002/tox.20141
- Wiernsperger, N.F., 2003. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. Diabetes Metab. 29, 579–585. doi:10.1016/S1262-3636(07)70072-1
- Willett, K.L., Gardinali, P.R., Lienesch, L. a, Di Giulio, R.T., 2000. Comparative metabolism and excretion of benzo(a)pyrene in 2 species of ictalurid catfish. Toxicol. Sci. 58, 68–76. doi:10.1093/toxsci/58.1.68
- Wood, C.M., Al-Reasi, H.A., Smith, D.S., 2011. The two faces of DOC. Aquat. Toxicol. 105, 3–8. doi:10.1016/j.aquatox.2011.03.007
- Wood, C.M., Matsuo, A.Y.O., Wilson, R.W., Gonzalez, R.J., Patrick, M.L., Playle, R.C., Luis Val, A., 2003. Protection by natural blackwater against disturbances in ion fluxes caused by low pH exposure in freshwater stingrays endemic to the Rio Negro. Physiol. Biochem. Zool. 76, 12–27. doi:10.1086/367946
- Yin, Y., Jia, H., Sun, Y., Yu, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2007. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol. 145, 288–293. doi:10.1016/j.cbpc.2007.01.002