

## **AVALIAÇÃO DA ENZIMA 7 – ETOXIRESORUFINA – O – DEETILASE (EROD) EM EXEMPLARES DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) EXPOSTOS AO PETRÓLEO DE URUCU**

Dhemerson Souza de LIMA<sup>1</sup>; Fabíola Xochilt VALDEZ DOMINGOS<sup>2</sup>; Adalberto Luis VAL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientador LEEM/INPA; <sup>3</sup>Coorientador LEEM/INPA

### **1.Introdução**

A ação antrópica ameaça cada vez mais o ambiente aquático, visto que esse ecossistema é o destino final de diversos poluentes. O petróleo nas últimas décadas tem se tornado um dos principais contaminantes do ambiente aquático, sendo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) extremamente tóxicos aos organismos aquáticos (Heath, 1995). Na maior floresta do planeta, a Petrobrás explora petróleo e gás natural desde 1988 (Castelões, 2003) na província petrolífera de Urucu que encontra-se a cerca de 650 km da capital Manaus. As expectativas para os próximos anos são ampliar a produção de petróleo e gás natural, atualmente a produção elevou o Amazonas ao posto de segundo maior produtor terrestre no país (G1, 2011). Até o presente momento ainda não foram registrados acidentes graves durante o transporte de petróleo; todavia, em 1999 ocorreu um vazamento de pequena proporção em Manaus devido ao rompimento de uma tubulação submersa no igarapé Cururu (Couceiro *et al.*, 2006). Apesar da remoção do óleo, a riqueza e abundância da população de insetos diminuíram após o acidente (Couceiro *et al.*, 2006).

Os organismos vivos apresentam um conjunto de enzimas de biotransformação, a maioria presente no fígado (Livingstone e Goldfarb, 1998), principal órgão envolvido no processo de metabolização de compostos endógenos e exógenos (Bonacci *et al.*, 2003). Essas enzimas são biomarcadores sensíveis, além de suas determinações custarem entre 100 e 200 vezes menos que a análise química (Schlenk, 1999). A CYP1A, uma subfamília do citocromo P450, faz parte deste conjunto de enzimas, é relevante na avaliação das consequências ambientais causadas por HPAs. Uma de suas enzimas a 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) é frequentemente induzida quando os organismos são expostos a HPAs, sendo considerada um excelente biomarcador de exposição a petróleo e seus derivados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a indutibilidade da EROD no peixe amazônico tambaqui (*Colossoma macropomum*) mediante exposição ao petróleo.

### **2.Material e Métodos**

O experimento foi realizado em 2009 e todos os procedimentos aqui descritos foram compilados de (Kochhann, 2010). Os peixes foram aclimatados em tanques de 2000L com aeração constante, fotoperíodo de 12 horas a 25°C durante duas semanas. A alimentação foi feita três vezes ao dia com ração comercial contendo 35% de proteína bruta. Os juvenis de tambaqui foram transferidos para aquários de vidro com capacidade de 3L de água. Os animais foram expostos a alta concentração de petróleo, sendo de 100mL de petróleo/L, durante três e seis dias. Os peixes foram divididos em três grupos: água do poço (controle), fração solúvel do petróleo (FSP) e fração insolúvel do petróleo (FIP). Cada grupo continha seis peixes, sendo que cada animal foi considerado como uma réplica. O sistema de exposição foi estático e os animais não foram alimentados durante o experimento. A preparação das frações solúvel e insolúvel do petróleo foi realizada de acordo com (Anderson *et al.*, 1974).

Neste experimento a qualidade da água foi monitorada a cada dois dias para oxigênio ( $5,6 \pm 0,5$  mg/L), pH ( $6,0 \pm 0,4$ ), temperatura ( $28,1 \pm 0,3$ °C), amônia ( $1,2 \pm 0,07$  mg/L), nitrito ( $0,2 \pm 0,07$  mg/L), alcalinidade ( $9 \pm 0,8$  mg CaCO<sub>3</sub>/L) e a dureza ( $12 \pm 0,3$  mg CaCO<sub>3</sub>/L). Ao iniciar o experimento, nos intervalos de 2, 24, 72 horas e seis dias a água foi coletada para a quantificação e a qualificação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os peixes foram anestesiados em MS222 tamponado com bicarbonato de sódio e sacrificados por secção medular. Amostras de fígado foram coletadas e armazenadas em freezer a -80°C.

A análise da EROD foi realizada de acordo com o método proposto por (Hodson *et al.*, 1991). Os fígados foram pesados e homogeneizados em relação de 1:4 em tampão HEPES 0,02 M, pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, os microsossomos foram utilizados como fonte de enzima. A leitura da resorufina produzida foi feita em fluorímetro em 530/580 nm (excitação/emissão). As concentrações de proteínas dos microsossomos foram determinadas pelo método de (Bradford, 1976) em 595 nm. A atividade da EROD foi expressa em picomoles de resorufina produzida por minuto por miligrama de proteína microsossomal ( $\text{pmol min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$ ). Os resultados obtidos foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis, com significância de 5%.

### **3.Resultados e Discussão**

Nossos resultados mostram que exemplares de tambaqui expostos ao petróleo apresentam indução da EROD. A atividade da EROD foi significativamente maior nos peixes expostos à fração insolúvel do petróleo (FIP) tanto após três ( $p=0,001$ ) quanto após seis dias de exposição ( $p=0,031$ ), quando comparados aos respectivos controles (Figura 1). Os maiores valores de atividade da EROD foram

observados nos animais expostos a FIP porque esta fração é constituída de compostos não voláteis e apresenta maior toxicidade (Freedman, 1989), enquanto que a FSP é rapidamente volatilizada e por isso os peixes permanecem pouco tempo em contato com os compostos tóxicos (Heath, 1995).

A

B

Figura-1. Atividade da EROD ( $\text{pmol min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ ) em microsossomos hepáticos de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos à alta concentração de petróleo no período de 3 (A) e 6 dias (B). \* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle.

A indução da EROD foi verificada por (Ramsak *et al.*, 2007) em enguias europeias expostas a HPAs, (Abrahamson *et al.*, 2008), também mostraram a indução da EROD a diferentes concentrações de HPAs no bacalhau do atlântico. Esta enzima se mostra extremamente sensível a exposição a HPAs, e por isso a avaliação da atividade hepática da EROD vem sendo amplamente utilizada em programas de biomonitoramento (Abrahamson *et al.*, 2007, Nahrgang *et al.*, 2010). Nossos resultados demonstram que o tambaqui também responde a exposição ao petróleo com o aumento da atividade da EROD.

#### 4. Conclusão

A atividade hepática da EROD é induzida mediante a exposição de exemplares de tambaqui à fração insolúvel do petróleo. Os resultados obtidos demonstram que a técnica é aplicável para o peixe amazônico tambaqui em condições laboratoriais. É importante que os próximos estudos analisem um número maior de indivíduos e que a indução da enzima seja verificada em animais coletados em campo.

#### 5. Referências Bibliográficas

- Abrahamson, A.; Andersson, C.; Jonsson, M.E.; Fogelberg, O.; Orberg, J.; Brunstrom, B.; Brandt, I. 2007. Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish – a study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala Waters. *Aquatic Toxicology*, 85 (1): 1-8.
- Abrahamson, A.; Brandt, I.; Brunstrom, B.; Sundt, R.C.; Jorgensen, E.H. 2008. Monitoring contaminants from oil production at sea by measuring gill EROD activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Environmental Pollution*, 153: 169-175.
- 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. *Marine Biology*, 27: 75-88.
- Bonacci, S.; Corsi, I.; Chiaia, R.; Regoli, F.; Forcardi, S. 2003. Induction of EROD activity in European eel (*Anguilla anguilla*) experimentally exposed to benzo [a] pireme and  $\beta$ -naphthoflavone. *Environment International*, 29: 467-473.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Castelões, L. 2003. Bacia sedimentar do Amazonas é a terceira em produção de petróleo ([www.comciencia.br/reportagens/petroleo](http://www.comciencia.br/reportagens/petroleo)). Acesso em 20.06.2012.
- Couceiro, S.R.M.; Forsberg, B.R.; Hamada, N.; Ferreira, R.L.M. 2006. Effects of an oil spill and discharge of domestic sewage on the insect fauna of Cururu stream, Manaus, AM, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 66: 35-44.
- Freedman, B. 1989. The impacts of pollution and other stresses on ecosystem structure and function. *Environmental Ecology*, Academic Press, San Diego, U.S.A. 424 pp.
- G1, 2011. Província Petrolífera de Urucu completa 25 anos no Amazonas (<http://g1.globo.com/brasil/noticia/2011/10qprovincia-petrolifera-de-urucu-completa-25-anos-no-amazona-s.html>). Acesso em 24.06.2012.
- Heath, A.G. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press, Boca Raton. 359 pp.
- Hodson, P.V.; Kloepper-Sams, P.J.; Munkittrick, K.R.; Lockhart, W.L.; Metner, D.A.; Luxon, P.L.; Smith, I.R.; Gagnon, M.M.; Servos, M.; Payne, J.F. 1991. Protocols for measuring mixed function oxygenases of fish liver. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1829: 49p.

- Kochhann, D. 2010. Exposição do tabaqui ao petróleo: marcadores fisiológicos, bioquímicos e comportamentais, Amazonas, Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA, Manaus, Amazonas. 60 pp.
- Livingstone, D.R.; Goldfarb, P.S. 1998. Biomonitoring in the aquatic environment, use of cytochrome P4501A and other molecular biomarkers in fish and mussels. *The biotechnology ecotoxicology interface*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. 101-29 pp.
- Nahrgang, J.; Jonsson, M.; Camus, L. 2010. EROD activity in liver and gills of polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to waterborne and dietary crude oil. *Marine Environmental Research*, 70(1): 120-123.
- Ramsak, A.; Stopar, K.; Sepcic, K.; Berden, M.; Bait, O.; Malei, A. 2007. Reflection of hydrocarbon pollution on hepatic EROD activity in the black goby (*Gobius niger*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24(3): 304-310.
- Schlenk, D. 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin*, 39: 48-53.