

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**  
**ANIMAL**

**DISSERTAÇÃO**

**Avaliação da Qualidade Ambiental da Bacia do Rio Paraíba do Sul e Reservatório do Funil, Sudeste, Brasil, Utilizando Biomarcadores e Bioindicadores em Peixes.**

**Claudio Nona Morado**

**2008**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL DA BACIA DO  
RIO PARAÍBA DO SUL E RESERVATÓRIO DO FUNIL,  
SUDESTE, BRASIL, UTILIZANDO BIOMARCADORES E  
BIOINDICADORES EM PEIXES.**

**CLAUDIO NONA MORADO**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Francisco Gerson Araújo**

*Sob a Co-Orientação do Professor*  
**Francisco José Roma Paumgarten**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Seropédica, RJ

Abril de 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**CLAUDIO NONA MORADO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM / / 2008.

---

Francisco Gerson Araújo – UFRRJ  
(Orientador)

---

Francisco José Roma Paumgartten - FIOCRUZ  
(Co-Orientador)

---

Sérgio Noboru Kuriyama – FIOCRUZ

---

João Paulo Machado Torres - UFRJ

Aos meus pais Armindo e Gilca, pela minha existência nesta vida e por todo apoio, incentivo e dedicação incondicional.

## **DEDICO**

À minha futura esposa Juliana Ribeiro, por sua ajuda no meu processo de autoconhecimento e busca da paz e da serenidade (ainda temos um longo caminho a percorrer); por seu apoio e incentivo constantes, que nunca me deixaram esmorecer; por seu entusiasmo e alegria contagiantes, poderosas alavancas para a superação dos obstáculos surgidos. Por tudo isso, e pela felicidade de tê-la ao meu lado.

## **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Armindo por todo o apoio, dedicação e paciência. As palavras são limitadas para expressar toda minha gratidão.

Ao meu orientador Professor Francisco Gerson Araújo, co-responsável pelo meu crescimento científico. Pesquisador incansável, que exatamente por ser exigente com seus orientandos, faz com que nos superemos a cada dia. Obrigado por tudo que me ensinou e pela paciência.

Ao meu co-orientador, Francisco José Roma Paungarten, por ter aberto as portas do seu prestigiado laboratório para o desenvolvimento de parte desta pesquisa, pelas valiosas explicações dadas, e por ter me recebido tão bem durante o período em que aí estive.

À doutora Ana Cecília e ao mestrando Thiago Parente, pela aprendizagem e ajuda no desenvolvimento de todas as etapas das análises das atividades de EROD.

Ao Thiago e à sua estagiária Helen pelo desenvolvimento das análises da atividade de EROD na fração microssomal para o capítulo IV.

Aos mestres Kátia e Manoel pelas orientações para o preparo das lâminas para os testes de micronúcleo.

À Rosângela, por seu importante auxílio nas reservas do carro junto à garagem da FIOCRUZ para a realização das coletas.

À Laisa por fornecer os dados brutos para a realização do segundo capítulo.

Ao Renan, pela ajuda em algumas saídas de campo.

A todos os outros membros do Laboratório de Toxicologia Ambiental da Fundação Oswaldo Cruz: Regina, Sérgio, Mara, Igor, Flávio, Karen e Márcia. Pelos momentos agradáveis e descontraídos, que ajudaram a aliviar os medos gerados pelas dificuldades que iam surgindo durante o desenvolvimento do trabalho.

À doutora Iracema, do Laboratório de Ecologia de Peixes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo treinamento referente à abertura dos peixes, retirada dos órgãos e reconhecimento dos estádios de maturação sexual para a realização dos trabalhos de campo antes do início do projeto.

Ao Antônio, Thiago, Iracema e Paulo, pela ajuda nos trabalhos de campo na Baía de Sepetiba, visando meu treinamento para a realização dos trabalhos de campo desta pesquisa.

Ao Marco, Leonardo e Hamilton, por terem me aceito em seu projeto quando iniciei meu estágio no LEP, pelo incentivo e amizade.

Ao Benjamin, por todo apoio recebido quando “migrei” para a água doce. Pela valiosa ajuda no desenvolvimento deste projeto, tanto no laboratório quanto no campo, pelas sugestões, pelo incentivo e amizade.

Ao Ruan, pela preciosa ajuda ao longo do desenvolvimento deste trabalho, pelo incentivo e amizade.

Ao Eduardo, pelas boas sugestões e ajuda prática referente ao campo e pela amizade.

Ao Thiago, Paulo, José, Tatiana, Leonardo, Renata, José Fernando, Albieri, Wagner, Sérgio, André Santista, Iracema, Benjamin, Ruan e Alexandre pela ajuda nos trabalhos de campo.

Ao Vitor, pela confecção dos mapas, e pela amizade.

À noiva do Eduardo e sua família, pela amável acolhida em sua confortável pousada em uma das saídas de campo.

Ao “gambazinho”, filho do prefeito de Paraibuna (SP), que gentilmente nos ofereceu um excelente local para hospedagem. E pela ajuda constante, a ponto de ter se tornado membro temporário da equipe e se revelado um Biólogo em potencial.

Ao Charles e sua família, por terem gentilmente nos abrigado em sua casa em Volta Redonda. Obrigado por nos receberem tão bem.

E mais uma vez ao Thiago Parente, que ainda não satisfeito por toda sua ajuda tanto no campo quanto no laboratório, também emprestou seu sítio em Santa Rita do Jacutinga (MG) para ficarmos durante as coletas para a realização do bioensaio. Obrigado a você e à sua família, pela ajuda, carinho e amizade.

À EMATER de Rio das Flores, por ter conseguido um ótimo lugar para ficarmos durante as coletas no rio Preto.

Ao “Mineiro”, por ter nos guiado pelo rio Preto em direção aos “acarás” *Geophagus brasiliensis* que ele sabia exatamente onde estavam. E pelo seu bom humor e amizade.

Aos ribeirinhos de São José dos Campos, por terem oferecido gentilmente suas casas para que pudéssemos desenvolver nosso trabalho com mais infra-estrutura (luz, pia, etc.) e tivéssemos um lugar para pernoitar com mais conforto. E a todos os ribeirinhos ao longo da bacia do rio Paraíba do Sul, sempre dispostos a ajudar de boa vontade.

À Márcia e Paulinha, pelo incentivo, carinho e amizade.

Ao Joaquim, pelas várias vezes em que me ajudou desde que entrei no laboratório, e pela amizade.

Aos demais componentes e ex-componentes da equipe do LEP, que de alguma forma também colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho: André Pessanha, Igor, Bianca, Silvana, Débora, Camila, Alex, Fernanda, Chico, Márcio, Rosane, Deca, Jorginho e Roberto.

Aos professores Francisco Manoel de Souza Braga e Afonso Celso Dias Bainy, pela gentileza e atenção de me enviar prontamente seus respectivos trabalhos quando os solicitei, o que em muito contribuiu para um melhor desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e a todos os professores deste curso.

À FIOCRUZ, por ter cedido o carro para as saídas de campo.

Ao CNPq, Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico, (projeto: CT-HIDRO), pela concessão da bolsa.

À tia Thomires, por ter me recebido gentilmente em sua casa durante os períodos de realização das análises de laboratório na FIOCRUZ. Por todo o carinho e dedicação.

Ao Fábio, por ter me emprestado seu computador por um tempo, seu carro para uma das saídas de campo, por ter ajudado nas anotações em uma das coletas e pela amizade.

Ao meu irmão Marco, pelo seu apoio, incentivo e amizade.

À minha sobrinha Marcelli, por existir.

À minha noiva Juliana, pela felicidade de crescermos juntos.

Aos meus pais, pelo dom da vida e pelo cuidado.

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

Rachel Carson

“Seja a mudança que deseja ver no mundo”.

Mahatma Gandhi

## RESUMO

MORADO, Claudio Nona. **Avaliação da qualidade ambiental da bacia do rio Paraíba do Sul e reservatório do Funil utilizando biomarcadores e bioindicadores em peixes**. 2008. 127p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

A avaliação do uso de quatro espécies de peixes (*Geophagus brasiliensis*, *Pimelodus maculatus*, *Hypostomus affinis* e *Hypostomus auroguttatus*) como biomarcadores e/ou bioindicadores de exposição à xenobióticos foi estudada no rio Paraíba do Sul (RPS), em diferentes locais e períodos do ano. Adicionalmente, este estudo foi realizado com apenas uma espécie (*P. maculatus*) no reservatório do Funil, visando testar se gradientes de qualidade ambiental correspondem a variações nos biomarcadores/bioindicadores. No trecho médio-inferior do rio Paraíba do Sul foram utilizados como biomarcadores a atividade de etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) e Frequências de Micronúcleos (MN) e como bioindicadores, o Índice hepato-somático (IHS), o Índice gonado-somático (IGS) e Fator de Condição (FC) em duas espécies (*G. brasiliensis* e *P. maculatus*) para a comparação de sete locais: 1 – reservatório do Funil; 2 – RPS em Volta Redonda; 3 – reservatório de Ribeirão das Lajes; 4 – RPS em Três Rios; 5 – rio Preto (Referência); 6 – rio Paraibuna (MG); e 7 – rio Piabanha. Com exceção do IGS, todos os biomarcadores e bioindicadores apresentaram diferenças significativas entre os locais para ambas as espécies. Os locais mais críticos foram, em ordem decrescente, 7, 6, 4 e 2, concordando com a hipótese de que locais com maior proximidade de centros urbanos que introduzem cargas de efluentes industriais, domésticos, agrícolas, bem como a proximidade de represas apresentam maiores alterações. Sazonalmente (verão/úmido *versus* inverno/seco), foram testados o IHS e FC em três espécies (*G. brasiliensis*, *H. affinis*, *H. auroguttatus*) em dez locais: 1 – Paraitinga/Paraibuna (Referência); 2 – RPS em São José dos Campos; 3 – RPS em Barra Mansa/Volta Redonda; 4 – rio Preto (Referência); 5 – rio Paraibuna (MG); 6 – rio Piabanha; 7 – RPS em Três Rios/Anta/Sapucaia; 8 – rio Grande; 9 – rio Muriaé; 10 – RPS em Campos/São João da Barra. Os maiores IHS para as três espécies foram registrados nos locais 3 (RPS em Barra Mansa/Volta Redonda) e 6 (rio Piabanha), que são localizados próximos a grandes centros urbanos que poderiam estar contribuindo para introdução de xenobióticos. Os maiores IHS ocorreram no inverno/seco, sugerindo maiores concentrações de poluentes neste período. Os menores valores do FC ocorreram no local 1 (Referência) para *G. brasiliensis*, e os maiores no local 3 (RPS em Barra Mansa/Volta Redonda). Sazonalmente, maiores FC foram registrados no verão/úmido, provavelmente relacionado à maior entrada de material alóctone no período das chuvas. Tais resultados corroboram a hipótese de que o aumento tanto do IHS quanto do Fator de Condição podem indicar sinais de estresse ambiental, com o IHS refletindo melhor a avaliação ambiental nos locais estudados. No reservatório do Funil foram utilizados os biomarcadores EROD e MN e os bioindicadores IHS, IGS e FC em *P. maculatus* em quatro locais ao longo de um gradiente longitudinal: 1 – RPS à montante do reservatório; 2 – parte superior do reservatório; 3 – parte inferior do reservatório; 4 – RPS à jusante do reservatório. Os maiores valores de EROD e menores valores de IGS ocorreram no local 4, em relação aos locais 2 e 1, respectivamente, com diferença significativa ( $P < 0.05$ ), sugerindo que as águas que deixam o reservatório provavelmente possuem a maior presença de xenobióticos. Este padrão não concorda com a hipótese de que o reservatório do Funil atua como filtro para o sistema Paraíba do Sul. A avaliação das respostas de indução em *Geophagus brasiliensis* a poluentes ambientais através de bioensaios. A avaliação das respostas de indução a poluentes ambientais em *G. brasiliensis* realizadas através da exposição por três dias aos compostos de

hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) beta-naftoflavona (BNF) e dimetilbenzoantraceno (DMBA), mostraram-se significativamente aumentadas da atividade de EROD nos indivíduos tratados com BNF, e elevação na Frequência de Micronúcleos no grupo tratado com DMBA em relação ao grupo controle. Tais resultados sugerem uma modulação da BNF no metabolismo de biotransformação (EROD) e a modulação do DMBA na genotoxicidade (MN). Concluimos que, dos locais analisados neste trabalho, os que apresentaram sinais de maior alteração devido à presença de xenobióticos foram: rio Piabanha, rio Paraibuna (MG), Três rios, Volta Redonda e São José dos Campos. O que confirma a hipótese de que locais próximos a grandes centros urbano-industriais apresentam maiores concentrações de poluentes químicos. Na bacia do rio Paraíba do Sul o período de inverno/seco parece ser o que ocorre os maiores níveis de concentração de xenobióticos, possivelmente devido ao menor volume d'água e conseqüente menor proporção de diluição dos poluentes neste período em relação ao verão úmido. O reservatório do Funil não serve como um filtro para xenobióticos das águas do rio Paraíba do Sul da região a montante para jusante da represa. Além disso, provavelmente a estrutura da barragem, assim como as operações para a produção de energia hidrelétrica podem estar liberando xenobióticos no rio Paraíba do Sul a jusante do reservatório, o que pode estar comprometendo as populações de *P. maculatus* neste local, já que muitos desses compostos possuem propriedades antiestrogênicas. O uso integrado dos diferentes biomarcadores e bioindicadores mostrou-se eficiente para a avaliação da qualidade ambiental da bacia do rio Paraíba do Sul e do reservatório do Funil, contribuindo para um diagnóstico mais completo sobre a saúde dos peixes expostos a xenobióticos nesses locais. *Geophagus brasiliensis* mostrou-se uma espécie adequada para a realização de estudos de biomonitoramento em países tropicais.

**Palavras-chave:** Biomonitoramento, peixes, poluentes, rio, reservatório.

## ABSTRACT

MORADO, Claudio Nona. **Environmental qualities evaluation of the Paraíba do Sul river basin and Funil reservoir using biomarkers and bioindicators in fishes.** 2008. 127p. Dissertation (Master in Animal Biology). Institute of Biology, Department of Animal Biology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

An evaluation of the suitability of four fish species (*Geophagus brasiliensis*, *Pimelodus maculatus*, *Hypostomus affinis* e *Hypostomus auroguttatus*) as biomarkers and bioindicators of xenobiotic exposure was assessed in the Paraíba do Sul river (PSR) in different sites and seasons. Additionally, one species (*P. maculatus*) was used in Funil to test environmental quality gradient along the axis river – reservoir. The biomarkers activity of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and Frequency of Micronuclei (MN) and the bioindicators Hepatosomatic Index (HSI), Gonadosomatic Index (GSI) and Condition Factor (CF) were used. In the middle-lower reaches of the PSR the two fish species *G. brasiliensis* and *P. maculatus* were used studied in seven sites: 1 – Funil reservoir; 2 – PSR at Volta Redonda; 3 – Ribeirão das Lajes reservoir; 4 – RPS at Três Rios; 5 – Preto river (Reference); 6 – Paraibuna river (MG); and 7 – Piabanha river. All biomarkers and bioindicators, except GSI, showed significant differences among sites for both species. The most impaired sites, in decreasing order, were 7, 6, 4 and 2, corroborating the hypothesis that sites near to urban centers that introduce large industrial, domestic and agricultural loads into the river show higher values in biomarkers and bioindicators. Seasonally (summer/wet versus winter/dry), HSI and CF were tested for the three species (*G. brasiliensis*, *H. affinis*, and *H. auroguttatus*) at 10 sites: 1 – Paraitinga/Paraibuna (Reference); 2 – PSR at São José dos Campos; 3 – PSR at Barra Mansa/Volta Redonda; 4 – Preto river (Reference); 5 – Paraibuna river (MG); 6 – Piabanha river; 7 – PSR at Três Rios/Anta/Sapucaia; 8 – Grande river; 9 – Muriaé river; 10 – PSR at Campos/São João da Barra. Higher HSI for the three species were recorded at PSR at Barra Mansa/Volta Redonda and site 6 (Piabanha river), both located near to large urban centers that may contribute to large amount of xenobiotics into the river. Higher HSI occurred in winter/dry season, suggesting higher concentrations of pollutants in this period. Lower CF occurred at site 1 (Reference) for *G. brasiliensis*, and the higher for site 3 (PSR at Barra Mansa/Volta Redonda). Seasonally, higher CF occurred in summer/wet, probably related to large amount of allochthonous material brought into the river mainly in rainfall season. Such results corroborate the hypothesis that larger the HSI and CF indicate environmental stress, with HSI reflecting more consistently signals of environmental stress. In Funil reservoir the biomarkers EROD and MN and the bioindicators HSI, GSI and CF were measured in *P. maculatus* at four sites along a longitudinal gradient: 1 – PSR at headwaters of the reservoir; 2 – upper part of the reservoir; 3 – lower part of the reservoir; 4 – PSR after the reservoir dam. Higher EROD activity and lower GSI were recorded at site 4, compared with sites 2 and 1, respectively, with significant differences ( $P < 0.05$ ), suggesting that waters after the reservoir probably have presence of xenobiotics. This pattern does not confirm the hypothesis that Funil reservoir acts as a pollution filter for PSR waters. Induction of xenobiotics in *Geophagus brasiliensis* were tested through bioassays after three days of exposure at Hydrocarbons Polycyclic Aromatic (HPAs)  $\beta$ -naphthoflavone (BNF) and dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). A significant increasing in EROD activity treated with BNF, and increasing in Micronuclei Frequency (MN) with DMBA exposure were detected. Such results suggest a BNF modulation in biotransformation metabolism (EROD) and a DMBA modulation in genotoxicity (MN). We conclude that the more altered sites due to the probable presence of xenobiotics were: Piabanha river, Paraibuna river (MG), Três Rios, Volta Redonda and São José dos Campos.

The hypothesis that sites near to large urban-industrial centers have more concentrations of chemical pollutants is confirmed. In the Paraíba do Sul basin the winter/dry season seems to present the highest xenobiotic concentration, possibly due to the lower water levels and consequently lower capacity of pollutants dilution compared with the summer/wet season. Funil reservoir did not work as a xenobiotic filter for upstreams for Paraíba do Sul river waters. Furthermore, the dam and operation procedures for power generation, may be spilling out xenobiotics for the Paraíba do Sul river downstream the dam, with effect on *P. maculatus* populations, since these compounds have antistrogenic properties. Integrated uses of biomarkers and bioindicators were efficient to assess environmental quality of the Paraíba do Sul river and Funil reservoir, contributing to a holistic view of fish health that are exposed to xenobiotics in these systems. *Geophagus brasiliensis* was a suitable species to be used in biomonitoring aquatic tropical systems.

**Key words:** Biomonitoring, fishes, pollutants, river, reservoir.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Comprimento total médio  $\pm$  desvio padrão e o número de espécimes de cada espécie capturada em cada local. N= número de indivíduos..... **20**

Tabela 2. Atividade de etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) em *G. brasiliensis* coletados em sete locais da bacia do rio Paraíba do Sul (locais: 5 – referência; 1 – reservatório do Funil; 2 – Volta Redonda; 3 – reservatório de Ribeirão das Lajes; 4 – Três Rios; 6 – rio Paraíba Mineiro; 7 – rio Piabanha - alterados). N = Número de indivíduos; Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão. .... **23**

Tabela 3. Atividade de etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) em *P. maculatus* coletados em três locais da bacia do rio Paraíba do Sul (locais: 1 – reservatório do Funil; 4 - Três Rios; 7 – rio Piabanha). N = Número de indivíduos; Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão.....**24**

Tabela 4. Frequência de Micronúcleos (MN) no sangue de *G. brasiliensis* e *P. maculatus* nos seis locais de estudo (locais: 1 – reservatório do Funil; 2 – Volta Redonda; 4 – Três Rios; 5 – rio Preto; 6 – rio Paraíba; 7 – rio Piabanha). N = Número de indivíduos; Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão. .... **25**

Tabela 5. Índice hepato-somático (IHS) em *G. brasiliensis* e *P. maculatus* nos locais de coleta na bacia do rio Paraíba do Sul (locais: 5 – referência; 1 – reservatório do Funil; 2 – Volta Redonda; 3 – reservatório de Ribeirão das Lajes; 4 – Três Rios; 6 – rio Paraíba Mineiro; 7 – rio Piabanha - alterados). N = Número de indivíduos; Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão.**26**

Tabela 6. Índice gonado-somático em *G. brasiliensis* nos locais de coleta na bacia do rio Paraíba do Sul (locais 5 – referência; 1 – reservatório do Funil; 2 – Volta Redonda; 3 – reservatório de Ribeirão das Lajes - alterados). Não houve diferença significativa ..... **26**

Tabela 7. Fator de Condição (FC) em *G. brasiliensis* e *P. maculatus* nos locais de coleta na bacia do rio Paraíba do Sul (locais: 5 – referência; 1 – Reservatório do Funil; 2 – Volta Redonda; 3 – Reservatório de Ribeirão das Lajes; 4 – Três Rios; 6 – Rio Paraíba Mineiro; 7 – Rio Piabanha - alterados). N = Número de indivíduos; Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão. .... **27**

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Número de peixes examinados, por local, estação do ano, tamanho e estágio de maturação sexual de *Geophagus brasiliensis*. N = número de indivíduos. Comprimento: Min – Máx. Sexo/Estádio de maturação: F = Fêmeas; FM = Fêmeas maduras; M = Machos.**43**

Tabela 2. *Hypostomus affinis* nos diferentes períodos sazonais com as respectivas áreas, número de indivíduos, faixas de comprimento, sexo e estádios de maturação sexual. N = número de indivíduos. Comprimento: Min – Máx. Sexo/Estádio de maturação: F = Fêmeas; FM = Fêmeas maduras; M = Machos. .... **44**

Tabela 3. *Hypostomus aurogutatus* nos diferentes períodos sazonais com as respectivas áreas, número de indivíduos, faixas de comprimento e estádios de maturação sexual. N = número de indivíduos. Comprimento: Min – Máx. Sexo/Estádio de maturação: F = Fêmeas; FM = Fêmeas maduras; M = Machos. .... 44

Tabela 4. Comparações dos valores do Índice hepato-somático entre os sites nas diferentes períodos sazonais por espécie, sexo e estágio de maturação sexual (para as fêmeas). \*\* $P < 0.001$  – Altamente significativo; \* $P < 0.05$  – Significativo. .... 46

Tabela 5. Comparações sazonais do Índice hepato-somático considerando-se as espécies, o sexo e o estágio de maturação sexual (para as fêmeas). \*\* $P < 0.001$  – Altamente significativo; \* $P < 0.05$  – Significativo; Períodos sazonais: 1 = Verão Úmido; 2 = Inverno Seco. .... 46

Tabela 6. Comparações dos valores do Fator de Condição entre os sites nos diferentes períodos sazonais considerando cada espécie, sexo e estágio de maturação sexual (para as fêmeas). \*\* $P < 0.001$  – Altamente significativo; \* $P < 0.05$  – Significativo.....47

Tabela 7. Comparações sazonais do Fator de Condição, considerando-se as espécies, os sexos e o estágio de maturação sexual (para as fêmeas). \*\* $P < 0.001$  – Altamente significativo; \* $P < 0.05$  – Significativo; Períodos sazonais: 1 = Verão úmido; 2 = Inverno seco..... 47

### **CAPÍTULO III**

Tabela 1. Número de indivíduos, tamanho, sexo e estágio de maturação das fêmeas de *P. maculatus* examinados. FM = fêmeas maduras; F = fêmeas imaturas; M = machos..... 64

Tabela 2. Diferenças entre os locais para os diferentes marcadores / indicadores biológicos ..... 67

### **CAPÍTULO IV**

Tabela 1. Grupo, peso, comprimento, sexo e peso do fígado dos indivíduos.....83

Tabela 2. Diferenças estatísticas dos biomarcadores e bioindicadores nos diferentes grupos. CONT = controle; BNF = tratado com beta-naftoflavona; DMBA = tratado com DMBA. .... 85

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. <i>Geophagus brasiliensis</i> .....	6
Figura 2. <i>Pimelodus maculatus</i> .....	6
Figura 3. <i>Hypostomus affinis</i> .....	7
Figura 4. <i>Hypostomus auroguttatus</i> .....	7
Figura 5. Bacia do rio Paraíba do Sul e represa do Funil, com destaque para os locais de coleta.....	8

### CAPÍTULO I

Figura 1. Bacia do rio Paraíba do Sul, com destaque para os sete locais de estudo. Locais: 1 – Reservatório do Funil; 2 – Volta Redonda; 3 – Represa de Ribeirão das Lajes; 4 – rio Paraíba do Sul em Três Rios; 5 – rio Preto (referência); 6 – rio Paraibuna (MG); 7 – rio Piabanha. ....	17
Figura 2. Atividade EROD na fração S9 hepática em <i>G. brasiliensis</i> , medida em (pmoles resor/mg prot/min). ....	24
Figura 3. Atividade EROD na fração S9 hepática em <i>P. maculatus</i> , medida em (pmoles resor/mg prot/min). ....	25

### CAPÍTULO II

Figura 1. Bacia do rio Paraíba do Sul com os 10 locais de coleta. Locais inseridos nos círculos foram tomados em conjunto. ....	42
Figura 2. Diferenças entre os sexos para o IHS e FC para cada espécie e período sazonal. ....	48

### CAPÍTULO III

Figura 1. Mapa do Reservatório do Funil com os quatro locais de estudo. ....	63
Figura 2. Gráficos com os valores dos cinco marcadores / indicadores em cada local. ....	68

### CAPÍTULO IV

Figura 1. Atividade de EROD nos diferentes grupos: controle (CONT.) e tratado com beta-naftoflavona (BNF). ....	85
Figura 2. Frequência de MN nos diferentes grupos: controle (CONT), tratado com beta-naftoflavona (BNF), e tratado com dimetilbenzoantraceno (DMBA). ....	86

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ANA - Agência Nacional de Águas  
Ah - Aril hidrocarboneto  
AhR - Receptor aril hidrocarboneto  
Aw - Clima quente e úmido com verão chuvoso (classificação de Köppen)  
BPCs - Bifenilas policloradas  
BKME - Bleached Kraft pulp Mill effluent (sistema de tratamento de efluentes)  
BNF - Betanaftoflavona  
 $\beta$ -NADP - Beta-Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
BSA - Soro Albumina Bovina  
CETESB - Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Ambiental  
Cfa - Clima subtropical com verão quente (classificação de Köppen)  
CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente  
CSN - Companhia Siderúrgica Nacional  
Cwa - Clima tropical de altitude com verão quente e chuvoso (classificação de Köppen)  
CYP1A - Citocromo P450 isoforma 1A  
DDPCs - Dibenzodioxinas policloradas  
DDT - diclorodifeniltricloroetano  
DFPCs - Dibenzofuranos policlorados  
DMBA - Dimetilbenzoantraceno  
DNAEE - Departamento Nacional de Águas e Energia Elétrica  
DNA - Ácido desoxiribonucleico  
DO - Densidade ótica  
EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético  
Em - Emissão  
ENA - Anormalidade nuclear eritrocítica  
EROD - Etoxiresorufina-*O*-desetilase  
ERX - Elementos responsivos a xenobióticos  
Ex - Excitação  
FC - Fator de condição  
FEEMA - Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente  
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz  
FEAM - Fundação Estadual do Meio Ambiente (MG)  
HCH - Hexaclorociclohexano  
HPAs - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos  
IGS - Índice gonado-somático  
IHS - Índice hepato-somático  
KCl - Cloreto de potássio  
Kg - Kilograma  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Fosfato de hidrogênio dipotássio  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Dihidrogenofosfato de potássio  
MFO - Oxidases de função mixta  
MG - Minas Gerais  
MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio  
mg - miligrama  
min - minuto  
ml - mililitro

$\mu$ l - microlitro  
mM - milimolar  
MN - Micronúcleo  
NaCl - Cloreto de sódio  
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
pH - potencial hidrogenionico  
pmol - picomol  
POPs - Poluentes orgânicos persistentes  
prot - proteína  
res - resorufina  
RJ - Rio de Janeiro  
RPS - Rio Paraíba do Sul  
SP - São Paulo  
TCDD - Tetraclorodibenzo-p-dioxina  
VTG - Vitelogenio

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	iv
AGRADECIMENTOS .....	v
RESUMO.....	ix
ABSTRACT .....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xvi
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1 Contaminação em ecossistemas aquáticos.....	1
1.2 Biomarcadores e bioindicadores da qualidade ambiental .....	2
1.3 Poluentes orgânicos persistentes (POPs) .....	4
2 HIPÓTESES .....	5
3 MODELOS BIOLÓGICOS.....	6
4 ÁREA DE ESTUDO.....	8
CAPÍTULO I	
RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVOS .....	15
2.1 Gerais.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 ÁREA DE ESTUDO.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
4.1 COLETA .....	20
4.2 QUÍMICOS .....	21
4.3 ATIVIDADES DE LABORATÓRIO .....	21
4.3.1 Determinação da atividade enzimática – EROD .....	21
4.3.1.1 Preparação da fração citosólica (S9) hepática .....	21
4.3.1.2 Determinação da concentração de proteínas na fração S9 .....	21
4.3.1.3 Determinação da Atividade enzimática - EROD .....	21
4.3.2 Determinação da Frequência de Micronúcleos (MN) .....	22
4.3.3 Bioindicadores.....	22
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	22
5 RESULTADOS .....	23
5.1 Atividade de EROD .....	23
5.2 Frequência de Micronúcleos (MN) .....	25
5.3 Índice hepato-somático .....	25
5.4 Índice gonado-somático.....	26
5.5 Fator de Condição .....	26
6 DISCUSSÃO .....	28
7 CONCLUSÕES.....	31
8 REFERÊNCIAS .....	32

<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>RESUMO</b> .....	<b>38</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>39</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
2.1 Área de estudo.....	42
2.2 Coletas dos peixes .....	42
2.3 Tratamento dos dados.....	44
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
3.1 Índice hepato-somático (IHS).....	46
3.2 Fator de Condição (FC) .....	47
3.3 Diferenças entre os sexos.....	47
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>52</b>
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>

<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>RESUMO</b> .....	<b>58</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>59</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>63</b>
2.1 Área de estudo.....	63
2.2 Coleta de dados .....	64
2.3 Químicos .....	64
2.4 Trabalho de laboratório.....	65
2.4.1 Biomarcadores .....	65
2.4.1.1 Determinação da Atividade Enzimática – EROD .....	65
2.4.1.2 Preparação da fração citosólica (S9) hepática .....	65
2.4.1.3 Determinação da concentração de proteínas na fração S9 .....	65
2.4.1.4 Determinação da Atividade enzimática - EROD .....	65
2.4.1.5 Determinação da Frequência de Micronúcleos (MN) .....	65
2.4.2 Bioindicadores.....	66
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	<b>72</b>
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>73</b>

<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>RESUMO</b> .....	<b>79</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>80</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>81</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>83</b>
2.1 Animais teste .....	83
2.2 Tratamento.....	83
2.3 Preparação da fração microsomal.....	83
2.4 Determinação da concentração de proteínas na fração S9 .....	84
2.5 Determinação da Atividade enzimática - EROD .....	84
2.6 Químicos .....	84
2.7 Procedimentos para micronúcleos .....	84
2.8 Análises estatísticas .....	84

<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>92</b>
<b>7 CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>94</b>
<b>8REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Contaminação em ecossistemas aquáticos

Alterações ambientais em bacias hidrográficas têm sido constantes e crescentes no Brasil. O rio Paraíba do Sul (RPS) é um dos sistemas lóticos mais usados do Brasil, por se localizar em uma das mais importantes regiões industriais do país e, conseqüentemente, não foge a esse processo de deterioração, sendo considerado um dos rios mais impactados por poluentes (PFEIFFER et al. 1986; CARVALHO & TORRES 2002). Suas águas, além do abastecimento para populações de grandes e pequenas cidades, são utilizadas para várias outras atividades, tais como: produção de energia através de barragens de hidrelétricas, navegação, pesca, resfriamento de máquinas de parques industriais, introdução e diluição de efluentes domésticos e agrícolas (Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente - FEEMA 1999; CARVALHO & TORRES 2002).

No geral a bacia do rio Paraíba do Sul recebe 207 toneladas de esgoto doméstico e industrial, sendo que quase 8 milhões de habitantes; 54 mil indústrias; 175 cidades; cerca de 33 hidrelétricas; e grandes áreas de agricultura intensiva localizadas às suas margens em alguns trechos também poluem o rio Paraíba do Sul. Contudo, de acordo com informações da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB 1999), apesar de toda a poluição, em apenas 2 locais (Caçapava e Aparecida) cerca de 400 km de extensão, as águas do rio Paraíba do Sul são consideradas ruins, em todo o resto é definida como “aceitável”, ou seja, que podem ser consumidos após tratamento. Essas informações necessitam ser reavaliadas e estudos de biomonitoramento devem ser realizados para que se tenha uma compreensão mais realista da presença e das alterações causadas por poluentes na bacia do rio Paraíba do Sul, diagnosticando a extensão e tendências espaciais e temporais da poluição difusa por xenobióticos neste importante sistema.

O reservatório do Funil, situado no Município de Resende, na divisa do Estado de São Paulo com o Estado do Rio de Janeiro, construído na década de 60, com o objetivo de geração de energia hidrelétrica, devido à sua importância para a qualidade das águas do rio Paraíba do Sul à sua jusante, e de receber grande quantidade de poluentes provenientes de grandes centros urbano-industriais e áreas de agricultura intensiva das cidades do Estado de São Paulo à sua montante, também foi avaliado quanto à presença de contaminantes químicos.

O monitoramento biológico em rios é essencial para identificar as respostas do ambiente aos impactos causados pela ação antrópica, além de fornecer diretrizes que possam regulamentar o uso dos recursos hídricos, possibilitando o desenvolvimento de alternativas para minimizar a degradação dos rios (KARR et al. 2000).

Peixes são expostos a substâncias tóxicas de maneira similar a outros vertebrados, podendo ser utilizados para avaliar a presença de substâncias potencialmente teratogênicas e carcinogênicas em humanos (HARSHBARGER & CLARK 1990). A utilização de respostas biológicas para avaliação da qualidade ambiental é vantajosa em relação às medidas físicas e químicas da água, desde que estas registram apenas o momento em que foram coletadas, necessitando de muitas análises para a realização de um monitoramento temporal eficiente (METCALFE 1989). Além disso, a poluição de corpos d'água reduz sua qualidade e é estressante para a biota (GAGNÉ et al. 2002; VAN DER OOST et al. 2003). Esses eventos usualmente precedem efeitos mais sérios nas populações e/ou comunidades (ADAMS et al. 2001). Portanto, a qualidade da água também pode ser acessada usando parâmetros biológicos (ILIOPOULOU-GEORGUDAKI et al. 2003) devido aos organismos aquáticos serem os receptores, enquanto os índices químicos não incorporam todos os poluentes presentes na água nem as misturas complexas que são formadas deles e que já são implicadas como a fonte primária de muitos problemas ambientais mostrados hoje.

A toxicocinética e a toxicodinâmica de um contaminante em uma espécie em particular determina se uma exposição é capaz de uma resposta adversa. Uma aproximação baseada em biomarcador fornece uma medida direta dos efeitos tóxicos nas espécies afetadas (DICKERSON et al. 1994).

## **1.2 Biomarcadores e bioindicadores da qualidade ambiental**

De acordo com WALKER et al. (2001) biomarcadores ou marcadores biológicos são alterações xenobioticamente induzidas em componentes ou processos, estruturas ou funções celulares ou bioquímicas que podem ser medidas em um sistema biológico ou amostra, tal como uma variação nos fluidos celulares corporais, tecidos, ou órgãos dentro de um organismo; respostas enzimáticas e produção de metabólitos são exemplos de biomarcadores (LAM & WU 2003; VAN DER OOST et al. 2003), que podem ser relacionados a exposição a, ou efeitos tóxicos do ambiente (ADAM et al. 2001). A presença de um xenobiótico, seu metabólito ou o produto da interação entre um agente xenobiótico e uma molécula alvo (ou célula) que é medida num compartimento de um organismo, pode ser classificada como um biomarcador de exposição. Os biomarcadores são definidos como indicadores de uma habilidade inerente ou adquirida de um organismo em responder a mudanças de exposição a xenobióticos. Estes biomarcadores ajudam a elucidar o grau de resposta relacionada à exposição. Esta divisão é algumas vezes ambígua, mas serve para agrupar biomarcadores.

O principal órgão responsável pela biotransformação é o fígado, que tem a função de receber e processar substâncias químicas absorvidas pelo trato gastrointestinal antes que elas sejam distribuídas para outros tecidos. No fígado, então, os xenobióticos são modificados quimicamente, podendo, a partir daí ser armazenados, secretados na bile ou distribuídos pela circulação para outros tecidos. O metabolismo de xenobióticos também pode ocorrer em outros tecidos ou órgãos. Por ser o sistema enzimático mais importante na catálise dessas reações, o citocromo P450, tem sua atividade metabólica aumentada quando o indivíduo está exposto a determinados xenobióticos. Como demonstrado a alguns anos atrás por PAYNE (1976) e confirmado por extensa literatura, a estimulação da atividade das enzimas do citocromo P450 no fígado representa um dos sinais biológicos mais precoces da exposição a poluentes na água. É sabido que a subfamília CYP1A está relacionada com processos da biotransformação de determinados poluentes tais como: HPAs, BPCs, e outros organoclorados. É através da reação de desalquilação da etoxiresorufina-*O*-desetilase (atividade de EROD) que se pode quantificar a atividade enzimática desta subfamília e inferir sobre a poluição aquática. Entre os indutores mais potentes de CYP1A estão os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), as dibenzodioxinas policloradas (DDPCs) e os dibenzofuranos policlorados (DFPCs), azobenzenos e azóxibenzenos, as bifenilas policloradas (BPCs), e os naftalenos (CASARETT 1991; SCHOLZ & SEGNER 1999). Em geral, compostos altamente clorados são resistentes a biotransformação e causam prolongada indução do citocromo P450 e de outras enzimas (CASARETT 1991). Portanto, o aumento da atividade enzimática (EROD) em peixes, pode ser um indicador da presença de substâncias contaminantes indutoras, organoclorados, no rio. Assim, a determinação da atividade de EROD pode ser usada como biomarcador.

Outro biomarcador muito utilizado é a Frequência de Micronúcleos que avalia a poluição aquática através de danos genotóxicos na célula de algumas espécies de peixes, ou seja, formações de micronúcleos no citoplasma. Os micronúcleos são formados por danos genotóxicos (clastogênicos) - fragmentos de cromossomos ou cromossomos acêntricos que não são incorporados no núcleo principal das células filhas no momento da anáfase da mitose (METCALFE 1988). Estudos de correlação entre o aparecimento de micronúcleos e a exposição a determinadas substâncias são utilizados em peixes para detectar a presença de substâncias químicas genotóxicas no sistema aquático, devido esses organismos apresentarem várias espécies com alto grau de sensibilidade mesmo quando em contato com baixas

concentrações de agentes genotóxicos (CRISOLIA 2001; HOOFTMAN & DE RAAT 1982; AL-SABTI 1994). Além disso, segundo AL-SABTI (1995) o teste de micronúcleos em eritrócitos de peixes é simples, confiável e sensível.

Bioindicadores são respostas a efeitos ambientais que ocorrem em níveis mais altos de organização biológica do que sub-organismo, e eles podem ser medidos a nível individual, populacional (sucesso reprodutivo, mortalidade, distribuição de tamanho, redução na abundância e biomassa), comunidades (produção primária, distribuição do ciclo de nutrientes) ou a níveis de ecossistemas (WALKER et al. 2001; OERTEL & SALÁNKI 2003); medidas biométricas e mudanças na composição específica podem ser considerados como bioindicadores (LAM & WU 2003). Biomarcadores e bioindicadores são largamente usados para determinar respostas de organismos a agentes estressores, biomarcadores sendo mais específicos e com maior variabilidade de respostas, comparados aos bioindicadores (ADAMS et al. 2001; WALKER et al. 2001; SCHMITT et al. 2005). O uso de ambos os tipos de respostas contribui para o diagnóstico do risco ecológico e para estabelecer estratégias adequadas de conservação para as espécies mais afetadas por poluentes.

Os bioindicadores utilizados neste trabalho foram: Índice hepato-somático (IHS), Índice gonado-somático (IGS), Fator de Condição. Devido à estocagem de energia e às funções metabólicas do fígado, alterações no tamanho do fígado devido a estressores ambientais são de grande interesse. Portanto, a avaliação do IHS deve considerar o papel tanto dos fatores endógenos quanto dos fatores exógenos. Dos índices organo-somáticos, o IHS é um dos mais freqüentemente associados a exposição a contaminantes (ADAMS & MCLEAN 1985). Vários investigadores têm sugerido que o alargamento relativo do fígado em peixe indica exposição a carcinógenos ambientais ou outros químicos tóxicos (POELS et al. 1980; FLETCHER et al. 1982; FABACHER & BAUMANN 1985; KICENIUK & KHAN 1987; GALLAGHER & DI GIULIO 1989; ADAMS et al. 1989). Por outro lado, alguns estudos em laboratório apresentaram uma diminuição do IHS em peixes expostos a químicos (CLAMBERS 1979; HICKIE & DIXON 1987).

O Índice gonado-somático (IGS) enquadra-se em uma categoria de indicadores que fornece informação mais a nível estrutural do que funcional; informação a respeito da saúde gonadal e estágio de maturação. O Índice gonado-somático é um dos vários índices organo-somáticos, que, a exemplo do IHS, estabelece uma relação entre o órgão e o corpo inteiro. Há evidência substancial de que a maioria dos animais sofre ciclo reprodutivo e, freqüentemente, variação dramática no tamanho gonadal é observada através deste ciclo (DE VLAMING et al. 1981). Conseqüentemente, o cálculo do peso gonadal como uma percentagem do peso do corpo tem sido usado rotineiramente para determinar a maturidade reprodutiva, assim como acessar mudanças gonadais em resposta às dinâmicas ambientais (e.g. mudanças sazonais) ou estresses exógenos (e.g. exposição a contaminantes). Existem evidências significativas de que exposição a várias classes de poluentes ambientais pode resultar em alterações gonadais tais como uma diminuição no IGS, mudanças morfológicas, ou ambos (SAKAMOTO et al. 2003; PARKS et al. 2001; SEPÚLVEDA et al. 2002b).

O Fator de Condição é um reconhecido indicador de saúde de peixes (BULGER et al. 1995). Em geral, o Fator de Condição varia diretamente com a nutrição (TYLER & DUNN 1976; BRAGA 1986). Uma correlação negativa tem sido vista entre doença e condição em peixes (MÖLLER 1985). Contudo, o Fator de Condição pode variar em uma ou outra direção fora dos limites do alcance normal em resposta a exposição química. O Fator de Condição pode também variar sazonalmente, (GRIFFITHS & KIRKWOOD 1995; SABOROWSKI & BUCHHOLZ 1996; LIMA-JUNIOR & GOITEIN 2005), possivelmente devido a mudanças na disponibilidade alimentar ou metabolismo e com mudanças no estatus gonadal (CHELLAPPA et al. 1995). O Fator de Condição, assim como IHS e IGS, são indicadores da saúde do peixe; entretanto, estes índices devem ser interpretados com cautela. Fatores com

potencial para confundir necessitam ser reconhecidos quando usamos um desses índices para comparar grupos de peixes em relação aos efeitos de contaminantes. Uma restrição primária é que o Fator de Condição e índices organo-somáticos podem ser comparados apenas dentro de uma espécie ou entre espécies similares. E também o protocolo de estudo deve ser consistente e conservativo em termos de amostragem, particularmente desde que o IHS pode ser alterado dentro de minutos pelo estresse da captura.

Neste contexto, peixes vêm sendo amplamente utilizados em estudos de toxicologia e monitoramento ambiental, na avaliação da saúde dos ecossistemas aquáticos tanto com relação à presença quanto aos efeitos de poluentes, desde que estes provocam alterações no ambiente, causando estresse, que se reflete em alterações bioquímicas e fisiológicas nos organismos expostos; por isso a utilização de peixes no monitoramento e avaliação de sistemas aquáticos vem alcançando grande importância na detecção precoce de impactos de origem antrópica (GOKSØYR & FÖRLIN 1992; SWAMI et al. 1992; HAASCH et al. 1993; EGGENS et al. 1995b; STEGEMAN et al. 1997; BAINY et al. 1999; BARRA et al. 2001; KHAN 2003 a, b; GALLOWAY et al. 2003; PARENTE et al. 2004; GALLOWAY et al. 2004; ANTUNES & GIL 2004; BEHRENS & SEGNER 2005; FACEY et al. 2005; VIJAYAN et al. 2006; KIRBY et al. 2007).

### **1.3 Poluentes orgânicos persistentes (POPs)**

Poluentes orgânicos persistentes (POPs) são substâncias químicas eminentemente produzidas pelo homem e que persistem no ambiente, por serem de difícil degradação bioacumulam através da cadeia alimentar, e possuem um risco de causar efeitos adversos à saúde humana e ao meio ambiente (FILLMAN et al. 2002). Com a evidência do transporte de longo alcance dessas substâncias para regiões onde elas nunca foram usadas ou produzidas e a conseqüente ameaça que elas representam ao ambiente de todo o globo, a comunidade internacional tem agora, em várias ocasiões, chamado a atenção para ações globais urgentes para se reduzir e eliminar o lançamento desses químicos (UNEP 2008). Poluentes orgânicos persistentes são caracterizados pela baixa solubilidade em água e alta solubilidade em lipídios, resultando em bioacumulação nos tecidos gordurosos de organismos vivos. Os compostos organoclorados persistem por longos períodos no ambiente, com isso atuam cronicamente sobre os organismos vivos sendo capazes de induzir alterações genéticas nos organismos expostos, podendo levar a alterações congênitas e neoplasias diversas (ALI & SREEKRISHNAN 2001), atuando negativamente, sobretudo como disruptor dos sistemas reprodutivo, imunológico e endócrino, além de serem carcinogênicos (SHEFFIELD et al. 1998; YOSHIDA et al. 2000; SEPÚLVEDA et al. 2004; REYNAUD et al. 2006). Tais compostos são transportados no ambiente em baixas concentrações pelos movimentos das águas continentais e marinhas e o fato de serem semi-voláteis permite moverem-se por longas distâncias na atmosfera, o que determina sua ampla distribuição através do planeta. Num esforço para proteção do ambiente aquático, agências governamentais, em diversos países, têm adotado legislação que visa reduzir ou mesmo eliminar descargas industriais tóxicas (WHITE et al. 1996).

Alguns dos principais xenobióticos são: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (BPCs), diclorodifeniltricloroetano (DDT), hexaclorocicloexano (HCH), dibenzodioxinas policloradas (DDPCs) e dibenzofuranos policlorados (DFPCs).

O presente estudo tem por objetivo a utilização de uma bateria de biomarcadores e bioindicadores de exposição a xenobióticos para detectar possíveis alterações bioquímicas e fisiológicas em algumas espécies de peixes, refletindo o nível de estresse ambiental provocado por poluentes organoclorados na bacia do rio Paraíba do Sul e reservatório do Funil. Para tanto serão testadas algumas hipóteses.

## 2 HIPÓTESES

- Ecossistemas aquáticos próximos a grandes centros urbano-industriais apresentam maiores concentrações de poluentes.
- Um aumento tanto do IHS, quanto do FC podem significar efeitos deletérios de um estressor.
- O nível de concentração de poluentes no rio Paraíba do Sul pode apresentar variações sazonais.
- O reservatório do Funil funciona como um filtro para poluentes das águas do rio Paraíba do Sul à montante.
- A utilização de uma bateria de biomarcadores e bioindicadores é melhor para estudos de biomonitoramento em relação à utilização de apenas uma ferramenta.
- *Geophagus brasiliensis* é uma espécie adequada para estudos de biomonitoramento.

### 3 MODELOS BIOLÓGICOS

*Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD 1824) (Figura 1) conhecido popularmente como acará. De acordo com MENEZES et al. (2007) esta espécie possui dados ecológicos semelhantes ao de *Geophagus iporangensis*, que são as seguintes: é encontrada em quase todos os tipos de ambientes, desde lóticos, como os riachos de altitude, até os lânticos dos rios de planície, e também nos lagos e lagoas. Alimenta-se de invertebrados, que encontram revolvendo o substrato. Apresenta dimorfismo sexual, sendo o macho maior do que a fêmea e, durante a época da reprodução, desenvolve uma protuberância acentuada na cabeça. Estado de conservação: não ameaçada ou em perigo (OYAKAWA et al. 2006).



**Figura 1.** *Geophagus brasiliensis*

*Pimelodus maculatus* LACÉPÈDE 1803 (Figura 2) popularmente chamado de mandi ou bagre, vive em rios grandes, principalmente em áreas de correnteza fraca e moderada. Os espinhos das nadadeiras peitorais e dorsal são duros e pungentes. Alimenta-se de insetos aquáticos e suas larvas, procurando-os ativamente no substrato, principalmente no período noturno e no crepúsculo. Estado de conservação: não ameaçada ou em perigo (OYAKAWA et al. 2006; MENEZES et al. 2007).



**Figura 2.** *Pimelodus maculatus*

*Hypostomus affinis* (STEINDACHNER 1865) (Figura 3) encontrada em trechos lânticos e lóticos, tanto de rios pequenos como grandes, em fundos rochosos ou arenosos. Estado de conservação: Não ameaçada ou em perigo MENEZES et al. (2007).



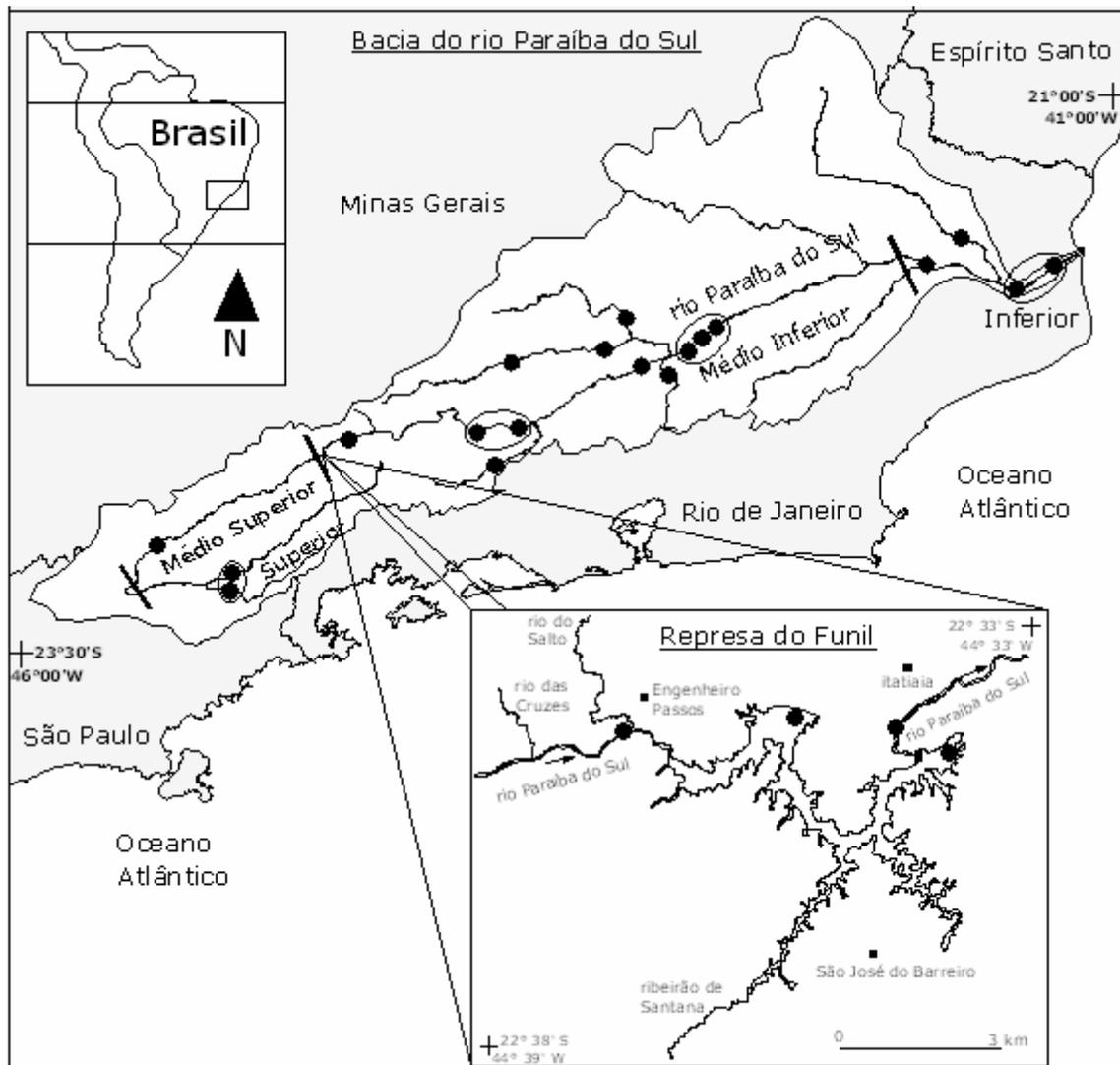
**Figura 3.** *Hypostomus affinis*

*Hypostomus aurogutatus* (STEINDACHNER 1877) (Figura 4) encontrada nas correntezas de grandes rios com fundos rochosos. Estado de conservação: Não ameaçada ou em perigo MENEZES et al. (2007).



**Figura 4.** *Hypostomus aurogutatus*

## 4 ÁREA DE ESTUDO



**Figura 5.** Bacia do rio Paraíba do Sul e represa do Funil, com destaque para os locais de coleta.

**Capítulo I**

**Biomarcadores e bioindicadores em duas espécies de peixes do trecho médio-inferior da Bacia do rio Paraíba do Sul, Brasil.**

## RESUMO

O trecho médio-inferior da bacia do rio Paraíba do Sul é o que apresenta maiores alterações ambientais em função da grande presença de centros urbano-industriais, amplas áreas de agricultura intensiva e muitas barragens para geração de energia hidrelétrica. O objetivo deste estudo foi o de acessar os níveis de contaminação por xenobióticos em 7 locais no trecho médio-inferior da bacia do rio Paraíba do Sul utilizando biomarcadores e bioindicadores em duas espécies de peixes: *Geophagus brasiliensis* e *Pimelodus maculatus* e verificar se as espécies respondem de maneira semelhante. A hipótese a ser testada neste trabalho é a de que os locais com maior entrada de efluentes urbanos, industriais e agrícolas (poluição difusa), assim como maior número de barragens apresentem maior presença de poluentes químicos xenobióticos. Neste trabalho foram usados dois biomarcadores (a atividade de etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD), medida fluorimetricamente na fração S9 hepática, e Frequência de Micronúcleos (MN), observada no citoplasma dos eritrócitos); e três bioindicadores (Índice hepato-somático – IHS, - Índice gonado-somático - IGS -, e Fator de Condição – FC -) em *G. brasiliensis* e *P. maculatus*, espécies amplamente distribuídas no sistema. Os locais amostrados foram: 1 – reservatório do Funil; 2 – Volta Redonda; 3 – represa de Ribeirão das Lajes; 4 – Três Rios; 5 – rio Preto (Referência); 6 – rio Paraibuna (MG); 7 – rio Piabanha. Com exceção do IGS, todos os biomarcadores e bioindicadores apresentaram diferenças significativas entre os locais para ambas as espécies. De acordo com os mesmos, possivelmente os locais mais críticos quanto à presença de xenobióticos no trecho médio-inferior da bacia do rio Paraíba do Sul são os locais 7, 6, 4 e 2, concordando com a hipótese de que locais com maior quantidade de efluentes industriais, domésticos, agrícolas e de represas para geração de energia hidrelétrica apresentam maiores quantidades de químicos xenobióticos. As espécies responderam de maneira semelhante tanto aos biomarcadores quanto aos bioindicadores. A indução de CYP1A, apesar de ter obtido respostas semelhantes entre as espécies, apresentou maiores valores em *G. brasiliensis* para todos os locais onde foram realizadas atividade de EROD em ambas as espécies: 1, 4 e 7.

**Palavras-chave:** Biomonitoramento, peixes, poluição, rio Paraíba do Sul.

## ABSTRACT

The middle-lower river Paraíba do Sul (PSR) watershed is the most altered segment in environmental conditions due to the presence of large urban-industrial centers, with large areas of intensive agriculture and dams obstruction for hydroelectric purposes. The aim of this study was to assess xenobiotic contamination at 7 sites in the middle-lower PSR reaches using biomarkers and bioindicators in two fish species: *Geophagus brasiliensis* and *Pimelodus maculatus* and to test whether these two species respond in a similar way to xenobiotic exposure. The tested hypothesis is that sites near to effluent discharges from urban, industrial and agricultural areas (diffuse pollution), and near to dams have larger xenobiotic influence. Biomarkers used were ethoxyresorufin-O-deethylase activity (EROD), measured fluorimetrically at S9 hepatic fraction, and Micronucleus Frequency (MN), observed in erythrocytes in cytoplasm. The three bioindicators used were the Hepatosomatic Index (HSI), the Gonadosomatic Index (IGS) and Condition Factor (CF) in *G. brasiliensis* and *P. maculatus*, species widely distributed throughout the system. The sampled sites were: 1 – Funil reservoir; 2 – PSR at Volta Redonda; 3 – Ribeirão das Lajes reservoir; 4 – PSR at Três Rios; 5 – Preto river (Reference); 6 – Paraíba river (MG); 7 – Piabanha river. All biomarkers and bioindicator, except GSI, showed significant difference among sites for both species. The most impaired sites due to the xenobiotic presence in the middle-lower PSR reaches were probably 7, 6, 4 e 2, confirming the hypothesis that sites near to larger amount of industrial, domestic and agricultural effluents and reservoir for hydroelectric purposes have large amount of xenobiotics. The species responded similarly to biomarkers and bioindicators. Induction of CYP1A, in spite of showing similar responses between the species, showed higher values for *G. brasiliensis* at all sites where EROD activity occurred, mainly sites 1, 4 e 7.

**Key words:** Biomonitoring, fishes, pollution, Paraíba do Sul river.

## 1 INTRODUÇÃO

A bacia do rio Paraíba do Sul (Figura 1) vem sofrendo intensa pressão antrópica sob a forma de despejos em suas águas de xenobióticos originados principalmente através de atividades industriais, agricultura intensiva, efluentes domésticos e construção de barragens para geração de energia elétrica. Tais atividades vêm crescendo em todo mundo nas últimas décadas e vem sendo alvo de intenso debate devido aos impactos sobre a saúde dos ecossistemas (SINDERMAN 1996). O trecho médio-inferior do rio Paraíba do Sul é considerado o de maior nível de alteração devido à existência de grandes centros urbano-industriais, além da presença de represas para a obtenção de energia hidrelétrica. A começar pelo reservatório do Funil, que recebe as águas do rio Paraíba do Sul com uma grande carga de poluentes proveniente de algumas das principais cidades do Estado de São Paulo, o mais industrializado da América Latina, situadas à sua montante; mais para baixo encontram-se os pólos de Barra Mansa-Volta Redonda, no canal principal; o município de Juiz de Fora que é drenado pelo rio Paraíba do Sul (MG); e o município de Petrópolis, que é drenado pelo rio Piabanha, sendo este represado por duas barragens ao longo de seu curso; os dois últimos são grandes tributários do rio Paraíba do Sul, ambos encontrando-se com este na altura da cidade de Três Rios. Por outro lado, o rio Preto, tributário do Paraíba do Sul (MG), pode ser considerado um local pouco alterado visto não existir nenhum grande centro urbano-industrial, barragem nem agricultura intensiva em sua área de drenagem.

O acesso de poluentes xenobióticos tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), bifenilas policloradas (BPCs), e diclorofeniltricloroetano (DDT) ao meio ambiente ocorre através de derramamentos e lançamentos industriais, depósitos irregulares de produtos químicos em áreas abertas, lixo doméstico e industrial que recebe esses tipos de contaminantes, carreamento de fertilizantes, pesticidas e fungicidas pelas águas da chuva de regiões agrícolas para os rios e acidentes (vazamento, explosão ou superaquecimento de transformadores). Desde a metade da década de 80, o uso de pesticidas organoclorados tem sido restrito no Brasil. Alguns estudos durante as décadas passadas mostraram que no Brasil, como em outras partes do mundo, a contaminação por micropoluentes orgânicos deriva não apenas de campos agrícolas, mas também de áreas urbanas (TOMASI 1985; LUCHINI et al. 1981).

A utilização de peixes como parâmetro para se avaliar o nível de poluição de ecossistemas aquáticos por compostos organoclorados tem sido cada vez mais constante (STEGEMAN et al. 1997; BAINY et al. 1999; PARENTE et al. 2004; FERREIRA et al. 2004; FACEY et al. 2005; KIRBY et al. 2007). Os organismos ou compartimentos desses organismos assim utilizados recebem o nome de biomarcadores ou bioindicadores, dependendo de seu nível de organização.

Biomarcadores moleculares podem ser ferramentas de alerta inicial, prevenindo danos irreversíveis em organismos, comunidades e ecossistemas (LOPEZ-BAREA & PUEYO 1998). Um biomarcador é definido como uma mudança (molecular, bioquímica, fisiológica, estrutural ou comportamental) ou aberração em um organismo, que pode ser usado para estimar exposição a químicos, ou efeitos resultantes dessa exposição (HANDY et al. 2003).

O uso de uma bateria de biomarcadores pode ser usado para avaliar as várias respostas a misturas de poluentes em organismos sob estresse (AARAB et al. 2004). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (BPCs), dioxinas e furanos são poluentes amplamente encontrados em ambientes aquáticos com potencial para exercer uma ampla gama de efeitos adversos sobre a biota. Devido à alta lipofilicidade característica dos compostos orgânicos de alto peso molecular, esses poluentes tendem a se acumular em

tecidos vivos (IEOPOPS 1990; MACKAY & PATERSON 1982). Dessa forma, esses poluentes são acumulados ao longo da cadeia trófica (biomagnificação). O potencial carcinogênico causado por essas moléculas estão listados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos como poluentes prioritários. Estima-se que mais de um milhão de toneladas de BPCs tenham sido produzidas e comercializadas (WHO 1993).

A biotransformação de xenobióticos é o processo pelo qual a molécula hidrofóbica do composto parental é gradualmente transformada em outro composto mais hidrofílico para facilitar sua excreção do organismo. O processo de biotransformação ocorre principalmente no fígado e é mediado por algumas famílias de enzimas (CASARETT et al. 1991). Essas enzimas de biotransformação participam também do metabolismo endógeno e são geralmente divididas em duas fases: fase I, onde grupos funcionais são adicionados ou expostos ao composto parental, nesta fase desenvolvem-se em sua maioria reações de oxidação e hidrólise e, em alguns casos, reações de redução, e as reações de fase II, onde as moléculas endógenas são conjugadas ao produto da fase I ou diretamente ao xenobiótico. Os produtos finais são mais hidrofílicos, e menos reativos podendo ser excretados do organismo (VAN DER OOST et al. 2003). Entretanto, em alguns casos o metabólito produzido é mais reativo (tóxico) do que a substância original, sendo que o sistema enzimático citocromo P450 é o principal envolvido neste processo (STINE & BROWN 1996).

Os citocromos P450 são as principais enzimas da fase I da biotransformação. A indução de isoformas da subfamília CYP1A em fígado de peixes tem sido utilizada como biomarcador de exposição a poluentes industriais, tanto em águas continentais como em ecossistemas marinhos (HAASCH et al. 1993; BAINY et al. 1999; PARENTE et al. 2004; KIRBY et al. 2007). A indução de CYP1A ocorre pela ligação do indutor (poluente) ao receptor de hidrocarbonetos aromáticos (*Receptor Aril hidrocarbon* - AhR) no citoplasma dos hepatócitos, em seguida, o complexo AhR-poluente é translocado para o núcleo celular onde se liga a regiões reguladoras da expressão gênica (conhecidas como elementos responsivos a xenobióticos – ERX) induzindo a expressão de diversas proteínas, entre elas o CYP1A. A atividade catalítica do CYP1A pode ser medida pela determinação da reação de desetilização da etoxiresorufina (etoxiresorufina-O-desetilase - EROD). A determinação da atividade de EROD é um dos métodos mais utilizados para se avaliar a indução do CYP1A (GOKSOYR 1995).

Outro método utilizado para estudos de biomonitoramento ambiental em peixes é a Frequência de Micronúcleos (MN) em eritrócitos no sangue periférico. Estudos de correlação entre o aparecimento de micronúcleos e a exposição a determinadas substâncias são atualmente realizados em várias espécies, inclusive peixes para detectar a presença de substâncias químicas genotóxicas no ambiente aquático. Apesar de mais simples do que a atividade de EROD, este método também é considerado confiável e sensível (AL-SABTI & METCALFE 1995). O teste de micronúcleo (MN), considerado como sendo um dos métodos mais usados para avaliar a genotoxicidade em sistemas aquáticos, tem sido extensivamente aplicado em espécies de peixes (AL-SABTI & METCALFE 1995; ÇARVAŞ & ERGENE GÖZÜKARA 2005a, b). Micronúcleos são formações de material nuclear que aparecem no citoplasma como pequenos núcleos satélites do núcleo principal das células filhas. Sua formação indica dano genotóxico, mais especificamente, clastogênico. Após exposição a diferentes poluentes genotóxicos, clastogênicos, tanto sob condições de laboratório quanto de campo, eritrócitos do sangue periférico em peixes apresentaram alta Frequência de Micronúcleos (AL-SABTI 1994; CRISOLIA & STARLING 2001; RODRIGUEZ-CEA et al. 2003; ÇAVAŞ 2005a; DA SILVA SOUZA & FONTANETT 2006). A hipótese a ser testada é a de que os locais com maior entrada de efluentes urbanos, industriais e agrícolas (poluição difusa), assim como locais com maior número de barragens apresentam maior presença de poluentes químicos xenobióticos, registradas pelos maiores valores de atividade de EROD,

Frequência de Micronúcleos (MN), Índice hepato-somático (IHS) e menores valores de Índice gonado-somático (IGS) em relação aos locais de referência. E se as espécies respondem da mesma maneira.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Gerais**

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a qualidade ambiental em locais selecionados do trecho médio-inferior da bacia do rio Paraíba do Sul através do uso de biomarcadores (atividade de EROD e Frequência de Micronúcleos) e bioindicadores (Índice hepato-somático, Índice gonado-somático e Fator de Condição).

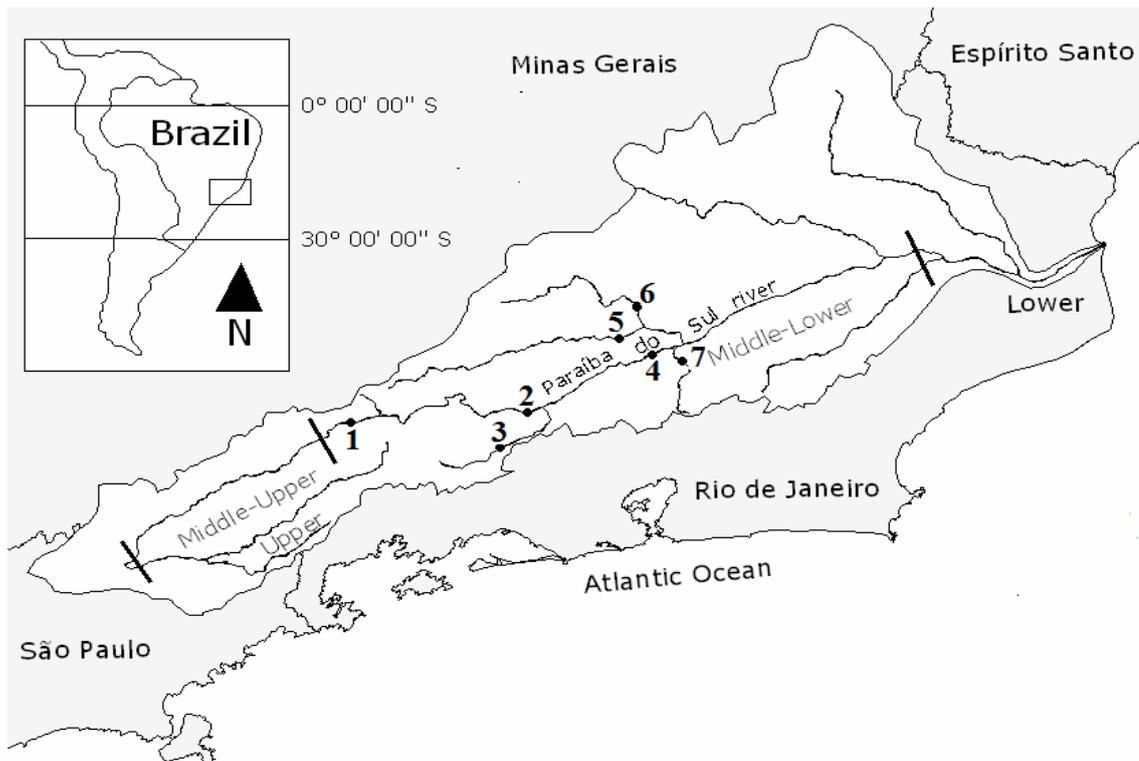
### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a indução da atividade de EROD na fração S9 hepática de peixes coletados no trecho médio-inferior da bacia do rio Paraíba do Sul;
- Avaliar tendências espaciais ao longo dos locais amostrados;
- Verificar Frequência de Micronúcleos (MN) entre os locais amostrados;
- Comparar os valores do Índice hepato-somático (IHS) entre os locais amostrados;
- Comparar os valores do Índice gonado-somático (IGS) entre os locais amostrados;
- Comparar os valores do Fator de Condição (FC) entre os locais amostrados;
- Verificar se as espécies respondem da mesma forma.

### 3 ÁREA DE ESTUDO

O rio Paraíba do Sul (RPS) (Figura 1) é formado pelo encontro do rio Paraitinga com o rio Paraibuna, a 1.800 m de altitude na Serra da Bocaina, no Estado de São Paulo e sua foz localiza-se na cidade de São João da Barra, no Estado do Rio de Janeiro, onde se encontra com o Oceano Atlântico. Representa o principal recurso hídrico da Região Sudeste, a mais industrializada do Brasil, banhando os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Sua bacia hidrográfica está situada entre as latitudes 20°26' e 23°39'Sul e as longitudes de 41° e 46°30'Oeste, possuindo uma área total de cerca de 55.500 km<sup>2</sup> e uma extensão de 1.150 km. É o principal manancial de água lóticis do Estado do Rio de Janeiro, abastece cerca de 80% do suprimento de água da população de aproximadamente 10 milhões de pessoas da área metropolitana do Grande Rio, quando cerca de 40% de sua vazão é desviada para o rio Guandu após atravessar a divisa de São Paulo com o Rio de Janeiro, sendo também responsável por cerca de 20% da produção de energia hidrelétrica deste estado. Ao todo suas águas são utilizadas por mais de 20 milhões de pessoas para os mais diversos fins: indústria, agricultura, energia elétrica através da construção de várias represas ao longo do seu percurso, consumo, lazer, pesca, preservação da fauna e flora. Por tão grande importância, justifica-se a adoção de medidas de controle e ações preventivas e de acompanhamento permanente da qualidade de suas águas.

O clima é subtropical com um regime de precipitação bem caracterizado onde ocorrem chuvas entre novembro e janeiro. Essas chuvas pesadas ocasionalmente causam grandes enchentes do rio Paraíba do Sul. O período entre junho e agosto é o mais seco do ano. O fluxo máximo do rio é observado durante o verão (4380 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>) e o período de descargas mais baixas ocorre geralmente no inverno (180 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>) (DNAEE 1983; ROSSO et al. 1991). De acordo com DNAEE (1983), que usou a classificação de Köppen, ao longo da porção média o tipo *Cwa* (tropical de altitude com verão quente e chuvoso) domina, e nas regiões inferiores *Cfa* (subtropical com verão quente) e *Aw* (quente e úmido com verão chuvoso). A temperatura no trecho médio e inferior do RPS é mais alta, com máxima alcançando entre 32 e 34°C (DNAEE 1983).



**Figura 1.** Bacia do rio Paraíba do Sul, com destaque para os sete locais de estudo. Locais: 1 – Reservatório do Funil; 2 – Volta Redonda; 3 – Represa de Ribeirão das Lajes; 4 – rio Paraíba do Sul em Três Rios; 5 – rio Preto (referência); 6 – rio Paraibuna (MG); 7 – rio Piabanha.

**Abaixo estão descritas algumas características dos 7 locais do trecho médio-inferior da bacia do rio Paraíba do Sul estudados no presente trabalho:**

#### **Local 1: (Reservatório do Funil)**

O Reservatório do Funil localiza-se no Estado do Rio de Janeiro, na divisa com o Estado de São Paulo, no Município de Resende entre as coordenadas ( $22^{\circ}30' S$ ,  $44^{\circ}45' W$ , altitude 440 m), onde represa o rio Paraíba do Sul no seu trecho médio, além de dois tributários: Santana e Lages. O reservatório apresenta uma superfície de  $40 \text{ km}^2$ , profundidade média de 22 m, profundidade máxima de 70m e volume total de  $890 \times 10^6 \text{ m}^3$ . O tempo de retenção é de 10 a 50 dias, de acordo com a estação do ano (BRANCO et al. 2002).

#### **Local 2: (Volta Redonda)**

Volta Redonda é um grande centro urbano-industrial localizado no Vale do Paraíba no Sul Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. Possui além de outras grandes indústrias a Companhia Siderúrgica Nacional (CSN), a maior siderúrgica da América Latina. Em Volta Redonda o rio Paraíba do Sul sofre uma diminuição em sua vazão média em relação a Barra Mansa, município situado imediatamente à sua montante. Essa diminuição da vazão é devido ao grande consumo de água pela CSN.

### **Local 3: (Reservatório de Ribeirão das Lajes)**

O Reservatório de Lajes corresponde ao maior represamento do Estado do Rio de Janeiro, localizando-se nas vertentes da Serra do Mar, entre os municípios de Pirai e Rio Claro. O lago artificial ocupa cerca de 30 km<sup>2</sup> de superfície, e sua principal finalidade é a geração de energia elétrica pela LIGHT (Serviços de Eletricidade S.A).

### **Local 4: (Três Rios)**

A drenagem nesta área é bastante elevada, constituída pelo aporte de dois grandes tributários do rio Paraíba do Sul: na margem esquerda o rio Paraíba (MG), drenando grandes áreas do Sudeste de Minas, e o rio Piabanha, na margem direita, drenando áreas de altitude a partir de Petrópolis. Área predominantemente ocupada por pastagem e capoeira. É um local onde apresenta uma qualidade ambiental da água ruim.

### **Local 5: (rio Preto) - LOCAL DE REFERÊNCIA -**

O rio Preto nasce na Serra da Mantiqueira, no estado de Minas Gerais, banhando as comunidades de Maromba e Maringá (município de Itatiaia) e Visconde de Mauá, Lote Dez, Campo Alegre e Rio Preto (em Resende - RJ), até desaguar no Rio Paraíba (MG), que tem sua foz no rio Paraíba do Sul na altura de Três Rios (RJ), a tempo de abastecer cidades como Campos e outras. Possui poucas indústrias ao longo de seu curso, assim como agricultura extensiva, além disso, não possui nenhuma barragem para geração de energia elétrica. Tais características o tornam apropriado para ser utilizado como local de referência.

### **Local 6: (Paraibuna Mineiro)**

O rio Paraíba banha os estados de Minas Gerais e do Rio de Janeiro. Nasce na Zona da Mata Mineira e recebe como principais afluentes os rios Preto, Cágado e do Peixe antes de desaguar no rio Paraíba do Sul próximo à cidade de Três Rios, no Rio de Janeiro. Dentre os municípios banhados pelo rio Paraíba, destaca-se Juiz de Fora, importante pólo industrial de Minas Gerais. Ao longo do vale do Paraíba foram abertas estradas que historicamente marcaram o povoamento e o desenvolvimento de Minas Gerais e da Zona da Mata, como o Caminho Novo das Minas em 1707, a Estrada União e Indústria em 1856 e também a Estrada de Ferro Central do Brasil. O rio Paraíba também está ligado ao pioneirismo da utilização dos rios brasileiros para a geração de energia. Nele foi construída em 1889, próxima a Juiz de Fora, a Usina de Marmelos, primeira usina hidrelétrica da América do Sul. Embora com influência de área urbana ao longo do seu trecho em Levy Gasparian, na ecologia da paisagem predominam pastagens e alguns pequenos fragmentos florestais em recuperação. Assim como o Piabanha representa neste sistema estudado, um dos tributários de maior porte e alta complexidade ambiental. No setor mineiro da bacia, segundo a Fundação estadual do Meio Ambiente (FEAM) *Apud* (GRUBEN et al., 2002), localizam-se cerca de 2000 indústrias, das quais 1000 se situam na sub-bacia do rio Paraíba. O Município de Juiz de Fora comporta 83% das indústrias potencialmente poluentes, incluindo metalúrgicas, químicas, têxteis, alimentícias, de papel e outras. A maior parte dos municípios da bacia do Paraíba não possuem nenhum tipo de tratamento, ou apenas dispõem de simples desinfecção da água.

**Local 7: (rio Piabanha)**

A bacia hidrográfica do rio Piabanha que abrange uma área de 2.065 km<sup>2</sup>, percorrendo quatro municípios fluminenses – Areal, Petrópolis, Teresópolis e São José do Vale do Rio Preto, onde vivem cerca de 400 mil pessoas.

Seu principal afluente é o rio Paquequer, com curso de 75 km, banhando Teresópolis e São José do Vale do Rio Preto. A principal fonte de poluição nessa região é o lançamento de esgoto doméstico *in natura* e de efluentes industriais, além de represas para geração de energia hidrelétrica.

Nas estações monitoradas pela Fundação Estadual de Engenharia e Meio Ambiente (FEEMA 1999), uma delas no centro de Petrópolis e outra próxima à sua foz, se confirmou o recebimento em suas águas de despejos domésticos sem tratamento, além de despejos industriais. Petrópolis é um dos três municípios do Estado do Rio de Janeiro que privatizaram os serviços de abastecimento de água. Todos os sistemas de esgotos são operados e mantidos por serviços ou companhias ligadas à prefeituras ou pelas concessionárias privadas. Em esgoto sanitário os índices de atendimento podem ser assim considerados: 45,0% das populações urbanas são atendidas por rede coletora, e, dessas, apenas 3,5% possuem tratamento, mesmo assim de forma parcial (GRUBEN et al. 2002).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA

As espécies selecionadas para este estudo foram: *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824) e *Pimelodus maculatus* Lacepède 1803. A escolha dessas espécies foi devido ao fato de ambas serem abundantes ao longo de todo o trecho do rio Paraíba do Sul, pelos hábitos alimentares e o local de preferência no espaço físico do rio; para que se pudesse ter um maior nível de abrangência sobre a qualidade ambiental desse sistema. *Pimelodus maculatus* é iliófago e bentônico; enquanto *G. brasiliensis*, é onívoro e nectônico, tendo preferência pelas margens rasas.

As coletas dos peixes foram realizadas nos meses de maio a setembro de 2006. Para a captura foram utilizadas tarrafas e redes de espera. Logo após a captura, os peixes foram anestesiados em banho de gelo e sacrificados por secção cervical, em seguida foram dissecados com auxílio de material cirúrgico. Foram coletados indivíduos machos e fêmeas de ambas as espécies em todos os locais amostrados, com exceção do rio Preto onde não foi capturado nenhum espécime de *P. maculatus*.

Os indivíduos foram pesados em balança eletrônica portátil *Acculab* VI-600 e tomados os comprimentos totais. O sexo foi determinado através de inspeção das gônadas, após incisão da cavidade celomática, os órgãos da cavidade abdominal foram cuidadosamente retirados e os fígados foram pesados em balança eletrônica portátil - *Acculab* VI-200, embalados em papel laminado, previamente identificados, e rapidamente congelado em galão portátil de nitrogênio líquido até a chegada ao laboratório. O comprimento total dos indivíduos de *G. brasiliensis* nos locais foi de 15.83 (cm) a 24.83 (cm) (Min-Máx) (Tabela 1), e o comprimento total dos indivíduos de *P. maculatus* nos locais foi de 19.79 (cm) a 27.25 (cm) (Min-Máx) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Comprimento total médio  $\pm$  desvio padrão e o número de espécimes de cada espécie capturada em cada local. N= número de indivíduos.

Espécies	Locais	Comprimento médio $\pm$	N
		Desvio padrão	
<i>G. brasiliensis</i>	1	20.29 $\pm$ 3.55	7
	2	23.00 $\pm$ 3.40	10
	3	24.83 $\pm$ 3.59	6
	4	22.21 $\pm$ 2.45	7
	5	16.98 $\pm$ 2.05	9
	6	15.83 $\pm$ 2.52	3
	7	16.75 $\pm$ 1.66	5
<i>P. maculatus</i>	1	27.25 $\pm$ 4.34	4
	4	24.67 $\pm$ 4.26	6
	7	19.79 $\pm$ 3.35	8

## 4.2 PRODUTOS QUÍMICOS

O substrato (etoxiresorufina), o produto da reação (resorufina),  $\beta$ -NADP, glicose-6-fosfato, glicose-6-fosfatodesidrogenase, albumina sérica bovina e o reagente de Bradford foram todos comprados de Sigma Chemical Company, St Louis MO, USA. TRIS,  $MgCl_2$  e outros sais foram de classe analítica e fornecidos por Merck SA Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil.

## 4.3 ATIVIDADES DE LABORATÓRIO

### 4.3.1 Determinação da atividade enzimática – EROD

#### 4.3.1.1 Preparação da fração citosólica (S9) hepática

Os fígados foram colocados em placa de Petri e descongelados em banho de gelo para a preparação da fração S9. A homogeneização de cada fígado foi realizada à temperatura de 4°C - em homogeneizadores de vidro do tipo Potter-Elvehjem com pistilo de teflon - em solução contendo TRIS 50mM, sacarose 250mM, EDTA 100mM e glicerol 20% num volume correspondente a 4 vezes o seu peso, a uma velocidade angular de aproximadamente 1200 rpm. O homogeneizado foi, em seguida, levado à centrifugação (*Eppendorf* ®5804R) à 4°C e 9000g por 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante de cada amostra foi filtrado em gaze e transferido para 3 criotubos.

#### 4.3.1.2 Determinação da concentração de proteínas na fração S9

Para a dosagem de proteínas totais na fração S9 usou-se o método colorimétrico descrito por BRADFORD et al. (1976), adaptado para microplaca, utilizando o corante Azul de Coomassie G-250 e leitura de densidade ótica (DO) a 595 nm (espectrofotômetro de microplaca Molecular Devices - Spectra Max Plus 384). As curvas de calibração foram realizadas com albumina sérica bovina – BSA Sigma Chemical Co - 1,4 mg/ml diluída em solução tampão fosfato ( $KH_2PO_4$  50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2) para se obter concentrações adequadas. Para determinação da concentração de proteínas na fração S9, esta foi diluída 1:30 e colocado 5  $\mu$ l de amostra diluída na microplaca. Em seguida foram adicionados 250 $\mu$ l de reagente de *Bradford* – Merck em cada poço da microplaca. Cada valor de densidade ótica foi convertido em concentração de proteína, empregando-se a curva padrão. Foram feitas correções para cada fator de diluição, e as concentrações de proteína na fração S9 calculadas como a média obtida (média final) a partir do valor de cada réplica e expressas como mg de proteína / ml de S9. As determinações foram realizadas em triplicata considerando um coeficiente máximo de variação de 10%.

#### 4.3.1.3 Determinação da Atividade enzimática - EROD

A determinação da atividade de EROD foi realizada em espectrofluorímetro de microplaca. Inicialmente, foi adicionado em cada poço tampão fosfato de potássio dibásico. Em seguida, a cada poço foi adicionado volume exato da fração S9 para a obtenção de 25 microgramas de proteínas totais por poço e o substrato. A microplaca foi, então, encubada por 2 minutos a 30°C e a reação iniciada pela adição de um sistema regenerador de elétrons em cada poço. A reação ocorreu durante 10 minutos, quando foi terminada pela adição de acetônitrila nos poços. O produto final, resorufina, foi quantificado em espectrofotômetro (Em: 50; Ex: 582).

### **4.3.2 Determinação da Frequência de Micronúcleos (MN)**

No momento da dissecação dos peixes adicionou-se uma gota de sangue periférico de cada indivíduo em lâminas para microscopia devidamente identificadas e fez-se o esfregão sanguíneo. As lâminas foram mantidas em estantes à temperatura ambiente até que estivessem secas e posteriormente as amostras foram fixadas com etanol PA por 20 minutos e novamente secas à temperatura ambiente.

Em laboratório, a coloração das lâminas foi feita com Giemsa por 6 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente até o excesso de corante ser retirado completamente. Após a secagem das lâminas, os eritrócitos dos peixes foram observados ao microscópio óptico Olympus BX 45 no aumento final de 1000 vezes (imersão). Foram examinadas 1000 células em cada lâmina.

Foram consideradas apenas hemácias nucleadas com membranas nucleares e citoplasmáticas intactas. Os micronúcleos foram considerados como os corpúsculos que em relação ao núcleo apresentaram até 1/3 do seu tamanho, estando nitidamente separados, com bordas distinguíveis, mesma cor e refringência.

### **4.3.3 Bioindicadores**

Foram calculados três bioindicadores: Índice hepato-somático (IHS), Índice gonado-somático (IGS) e Fator de Condição (FC), através das seguintes equações:

$IHS = (\text{Peso do fígado} / \text{Peso total}) * 100$ ;  $IGS = (\text{Peso da gônada} / \text{Peso total}) * 100$ ;  $FC = (\text{Peso total} / \text{Comprimento padrão}^3) * 100$ .

### **4.4 Análises estatísticas**

Atividade enzimática (EROD), Frequência de Micronúcleos (MN), Índice hepato-somático (IHS), Índice gonado-somático (IGS), e Fator de Condição (FC) foram comparados entre os locais amostrados através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste “a posteriori” de diferenças de média de Tukey ao nível de confiança de 95% ( $P < 0.05$ ) para determinação de que médias foram significativamente diferentes.

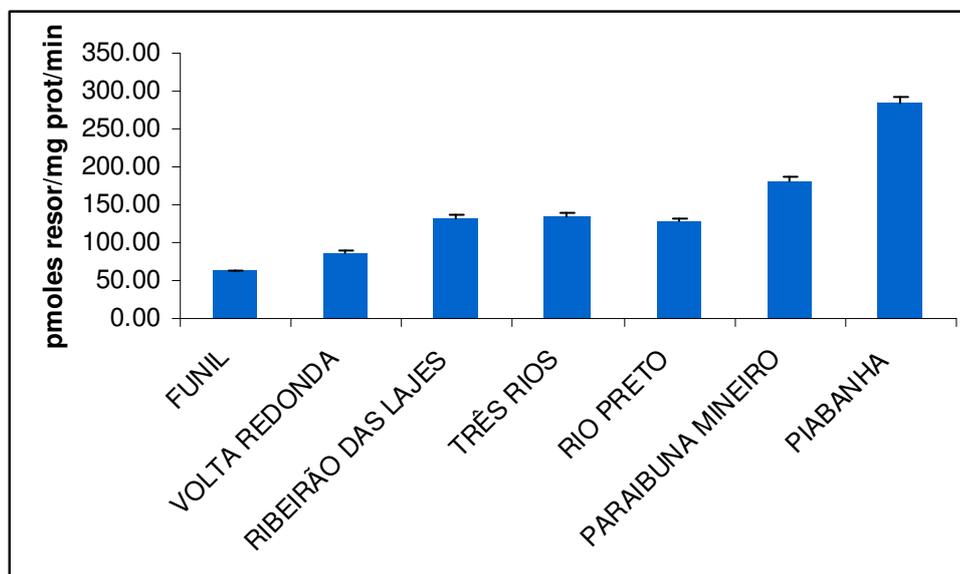
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Atividade de EROD

O rio Piabanha (local 7) foi o local que apresentou a maior indução de EROD em *G. brasiliensis* dentre todos os locais estudados, tendo sido detectado mais que o dobro de indução de CYP1A do que a verificada para o local 5 (rio Preto -referência-), (Tabela 2, Figura 2). A atividade de EROD para *G. brasiliensis* no rio Piabanha foi significativamente diferente ( $F=22.5$ ;  $P=0.0000^{**}$ ) em relação a todos os demais locais estudados.

**Tabela 2.** Atividade de etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) em *G. brasiliensis* coletados em sete locais da bacia do rio Paraíba do Sul (locais: 5 – referência; 1 – reservatório do Funil; 2 – Volta Redonda; 3 – reservatório de Ribeirão das Lajes; 4 – Três Rios; 6 – rio Paraíba Mineiro; 7 – rio Piabanha - alterados). N = Número de indivíduos; Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão.

Locais	Comprimento (cm)	Peso (g)	N	Atividade de EROD (pmoles resor/mg prot/min)	Diferenças-Tukey
5 (Referência)	16.98 $\pm$ 2.05	93.00 $\pm$ 41.47	9	130.18 $\pm$ 46.72	A
1	20.29 $\pm$ 3.55	151.83 $\pm$ 75.51	7	62.14 $\pm$ 1.75	A
2	23.00 $\pm$ 3.40	277.00 $\pm$ 114.63	10	86.72 $\pm$ 2.24	A
3	24.83 $\pm$ 3.59	251.35 $\pm$ 83.75	6	131.79 $\pm$ 4.85	A
4	22.21 $\pm$ 2.45	225.00 $\pm$ 75.05	7	134.38 $\pm$ 60.16	A
6	15.83 $\pm$ 2.52	85.25 $\pm$ 30.66	3	182.52 $\pm$ 65.72	A
7	16.75 $\pm$ 1.66	84.00 $\pm$ 33.62	5	284.06 $\pm$ 100.32	B

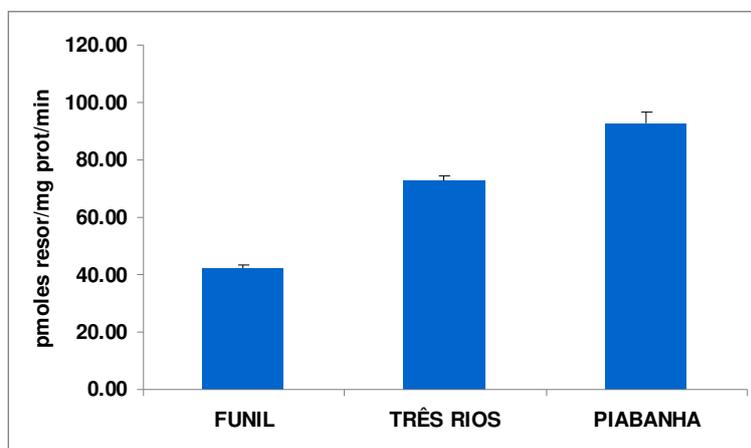


**Figura 2.** Atividade EROD na fração S9 hepática em *G. brasiliensis*, medida em (pmoles resor/mg prot/min).

Para *Pimelodus maculatus* foram detectados maiores valores de atividade de EROD nos locais 4 (Três Rios) e 7 (rio Piabanha) (Tabela 3, Figura 3), ambos com diferença significativa ( $F=4.49$ ;  $P=0.012^*$ ) em relação ao local 1 (reservatório do Funil).

**Tabela 3.** Atividade de etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) em *P. maculatus* coletados em três locais da bacia do rio Paraíba do Sul (locais: 1 – reservatório do Funil; 4 - Três Rios; 7 – rio Piabanha). N = Número de indivíduos; Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão.

Locais	Parâmetros dos peixes		N	EROD (pmoles resor/mg prot/min)	Dif. Tukey
	Comprimento (cm)	Peso (g)			
1	27.25 $\pm$ 4.34	249.75 $\pm$ 104.57	4	42.25 $\pm$ 0.99	A
4	24.67 $\pm$ 4.26	185.05 $\pm$ 100.03	6	72.80 $\pm$ 9.57	B
7	19.79 $\pm$ 3.35	63.62 $\pm$ 43.98	8	92.75 $\pm$ 29.68	B



**Figura 3.** Atividade EROD na fração S9 hepática em *P. maculatus*, medida em (pmoles resor/mg prot/min).

### 5.2 Frequência de Micronúcleos (MN)

A Frequência de Micronúcleos MN (%) nos eritrócitos de *G. brasiliensis* foi mais elevada nos locais 4 (Três Rios) e 7 (rio Piabanha) (Tabela 4). Ambos apresentaram diferenças significativas ( $F=26.91$ ;  $P=0.001^{**}$ ) em relação aos locais 1 (reservatório do Funil), 2 (Volta Redonda) e 5 (rio Preto-Referência).

**Tabela 4.** Frequência de Micronúcleos (MN) no sangue de *G. brasiliensis* e *P. maculatus* nos seis locais de estudo (locais: 1 – reservatório do Funil; 2 – Volta Redonda; 4 – Três Rios; 5 – rio Preto; 6 – rio Paraíba; 7 – rio Piabanha). N = Número de indivíduos; Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão.

Locais	<i>G. brasiliensis</i>		<i>P. maculatus</i>	
	N	MN	N	MN
1	7	0 $\pm$ 0	4	0.25 $\pm$ 0.5
2	9	0.56 $\pm$ 0.73	0	-
4	6	3.3 $\pm$ 1.4	5	3.2 $\pm$ 1.6
5	8	0.13 $\pm$ 0.35	0	-
6	0	-	6	1.8 $\pm$ 1.2
7	5	2.2 $\pm$ 0.4	9	1.6 $\pm$ 1.0

*Pimelodus maculatus* apresentou a maior Frequência de Micronúcleos (MN) para o local 4 (Três Rios) (Tabela 4), sendo significativamente diferente ( $F=4.98$ ;  $P=0.010^{*}$ ) em relação ao local 1.

### 5.3 Índice hepato-somático

Em *Geophagus brasiliensis* os maiores valores do IHS foram detectados no local 2 (Volta Redonda) (Tabela 5), com diferença significativa ( $F=6.31$ ;  $P=0.00007^{**}$ ) em relação aos outros seis locais estudados.

**Tabela 5.** Índice hepato-somático (IHS) em *G. brasiliensis* e *P. maculatus* nos locais de coleta na bacia do rio Paraíba do Sul (locais: 5 – referência; 1 – reservatório do Funil; 2 – Volta Redonda; 3 – reservatório de Ribeirão das Lajes; 4 – Três Rios; 6 – rio Paraibuna Mineiro; 7 – rio Piabanha - alterados). N = Número de indivíduos; Valores: Média ± Desvio padrão.

Locais	N	IHS - <i>G. brasiliensis</i>	N	IHS - <i>P. maculatus</i>
5 (Referência)	9	1.08±0.49	-	-
1	7	0.83±0.40	4	0.62±0.21
2	10	1.97±0.75	-	-
3	6	0.77±0.34	-	-
4	7	1.07±0.23	10	1.03±0.20
6	3	0.89±0.38	4	0.60±0,14
7	5	0.97±0.32	8	0.96±0.23

Para *Pimelodus maculatus* este índice apresentou maiores valores no local 4 em relação aos locais 1 e 6 (Tabela 5) com diferença significativa ( $F=7.18$ ;  $P=0.00155^*$ ) e maior valor no local 7 em relação ao local 6 (Tabela 5) com diferença significativa ( $F=7.18$ ;  $P=0.00155^*$ ).

#### 5.4 Índice gonado-somático

*Geophagus brasiliensis* não apresentou diferença significativa entre os locais analisados (1, 2, 3, 5) para o Índice gonado-somático (Tabela 6).

**Tabela 6.** Índice gonado-somático em *G. brasiliensis* nos locais de coleta na bacia do rio Paraíba do Sul (locais 5 – referência; 1 – reservatório do Funil; 2 – Volta Redonda; 3 – reservatório de Ribeirão das Lajes - alterados). Não houve diferença significativa

Locais	N	IGS – <i>G. brasiliensis</i>
5 (Referência)	10	1.24±1.10
1	6	1.86±1.86
2	10	1.85±1.09
3	6	0.34±0.26

#### 5.5 Fator de Condição

Para o Fator de Condição, os maiores valores em *G. brasiliensis* foram detectados nos locais 2 e 4 (Tabela 7), tendo ambos apresentado diferença significativa ( $F=3.73$ ;  $P=0.00430^{**}$ ) em relação ao local 3.

**Tabela 7.** Fator de Condição (FC) em *G. brasiliensis* e *P. maculatus* nos locais de coleta na bacia do rio Paraíba do Sul (locais: 5 – referência; 1 – Reservatório do Funil; 2 – Volta Redonda; 3 – Reservatório de Ribeirão das Lajes; 4 – Três Rios; 6 – Rio Paraibuna Mineiro; 7 – Rio Piabanha - alterados). N = Número de indivíduos; Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão.

Locais	N	FC - <i>G. brasiliensis</i>	N	FC - <i>P. maculatus</i>
5 (Referência)	9	1.85 $\pm$ 0.29		-
1	7	1.88 $\pm$ 0.27	4	1.17 $\pm$ 0.16
2	10	2.19 $\pm$ 0.29		-
3	6	1.60 $\pm$ 0.14		-
4	7	2.08 $\pm$ 0.25	10	1.14 $\pm$ 0.33
6	3	1.93 $\pm$ 0.31	4	0.63 $\pm$ 0.08
7	5	1.84 $\pm$ 0.19	8	0.78 $\pm$ 0.21

Entre os quatro locais analisados para o Fator de Condição em *P. maculatus*, os locais 1 e 4 apresentaram maiores valores em relação ao local 6 (Tabela 7), com diferença significativa (F=6.30;  $P=0.00963^{**}$ ). E o local 4 também apresentou maiores valores em relação ao local 7 (Tabela 7), tendo apresentado diferença significativa (F=6.30;  $P=0.00963^{**}$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Em *Geophagus brasiliensis* os maiores valores de EROD foram apresentados pelos indivíduos do local 7 (rio Piabanha) com diferença significativa ( $P < 0.001$ ) em relação a todos os outros locais analisados. Os indivíduos desta espécie coletados no local 6 (rio Paraibuna (MG)) apresentaram o segundo maior valor de indução (Tabela 2, Figura 2), apesar de não ter tido diferença significativa em relação aos demais locais estes valores podem sugerir uma grande presença de poluentes químicos no local 6. PARENTE et al. (2004) utilizando a indução de CYP1A na fração S9 hepática de *Oreochromis niloticus* – espécie pertencente à mesma família de *G. brasiliensis* – para detectar possíveis alterações em três locais do rio Guandu (RJ), encontrou uma magnitude de indução de 17.7 vezes entre locais de referência e locais mais alterados. No presente estudo, *G. brasiliensis* apresentou magnitude de apenas 2.2 vezes entre o local considerado de referência (rio Preto) e o local de maiores indicações de alteração (rio Piabanha), porém apresentou uma diferença de 4.5 vezes em relação ao local 1 (reservatório do Funil), onde foram detectados menores valores de indução, indicando que estudos mais detalhados precisam ser realizados ou que bioensaios são necessários para estimar parâmetros confiáveis e que possam ser associados com níveis de exposição.

Em *Pimelodus maculatus*, foram detectados maiores valores de indução nos indivíduos dos locais 4 (Três Rios) e 7, comparados aos indivíduos do local 1, com os primeiros apresentando diferença significativa ( $P < 0.05$ ) em relação ao último (Tabela 3, Figura 3). Apesar de terem apresentado resultados semelhantes em relação aos locais, os valores de indução em *G. brasiliensis* (Tabela 2, Figura 2) foram sempre superiores aos de *P. maculatus* (Tabela 3, Figura 3). Essas diferenças de respostas de indução entre as espécies podem estar relacionado com diferenças na eficiência dos processos de metabolismo/excreção; diferenças na distribuição de lipídios pelo corpo; distintas estratégias alimentares ou estilos de vida. FERREIRA et al. (2004) estudando os níveis de indução de CYP1A por compostos organoclorados em “flounder” (*Platichthys flesus*) e “mullet” (*Mugil cephalus*) no estuário do rio Douro, Portugal, levantaram as mesmas possibilidades para os diferentes valores de indução apresentados por estas espécies.

Estes valores aumentados de EROD nos locais 4 e 7 sugerem que os peixes do rio Paraíba do Sul na cidade de Três Rios e do rio Piabanha, um dos seus principais tributários, foram expostos a maiores concentrações de contaminantes indutores de CYP1A em relação aos outros locais do trecho médio-inferior. O rio Paraíba do Sul na altura de Três Rios provavelmente concentra os poluentes de dois de seus principais tributários (rio Paraibuna Mineiro e rio Piabanha), ambos possuem grandes centros urbano-industriais a montante das áreas onde os peixes foram coletados (Juiz de Fora e Petrópolis, respectivamente).

Possivelmente, a grande quantidade de despejos de resíduos industriais sem um prévio tratamento seja a razão dos valores de indução de CYP1A em *G. brasiliensis* para o local 6 (rio Paraibuna (MG)) (Tabela 2), visto que tais práticas são comuns em todos os municípios ao longo desta bacia hidrográfica.

Quanto ao rio Piabanha, além de percorrer a cidade de Petrópolis, que possui várias indústrias e grande concentração populacional, este rio possui também duas represas para geração de energia hidrelétrica em seu curso, o que deve estar agravando de forma significativa os níveis de poluição por compostos organoclorados neste rio, contribuindo desta forma para os maiores valores de indução de CYP1A verificados nos indivíduos de ambas as espécies de peixes coletados neste rio, desde que HPAs podem ser introduzidos no ambiente através da geração de energia hidrelétrica (ALBERS 1995; PINTO 2001). Além disso, as aplicações mais importantes dos BPCs em termos de tonelagem foram os óleos de transformadores e os condensadores (DE VOOGT & BRINKMAN 1989). Em óleos de

transformadores, os BPCs foram misturados com clorobenzenos (principalmente triclorobenzenos e tetraclorobenzenos) como solventes (SWAMI et al. 1992; DE VOOGT & BRINKMAN 1989).

A maior Frequência de Micronúcleos (MN) em *G. brasiliensis* detectada para os locais 4 e 7 (Tabela 4) com diferença significativa ( $P < 0.001$ ) em relação aos locais 1, 2 (Volta Redonda) e 3 (reservatório de Ribeirão das Lajes) (Tabela 4); assim como a maior Frequência de Micronúcleos verificada para o local 4 (Tabela 4) em relação ao local 1, com diferença significativa ( $P < 0.05$ ) em *P. maculatus* sugerem que os locais 4 e 7 estejam mais poluídos por contaminantes responsáveis por efeitos genotóxicos. Tais resultados corroboram com os observados para atividade de EROD, reforçando a possibilidade de que esses locais sejam dois dos mais críticos em relação à quantidade de poluentes xenobióticos dentre os locais pesquisados neste trabalho, desde que testes de micronúcleo em eritrócitos de peixes respondem positivamente a um grande número de substâncias mutagênicas e carcinogênicas, tais como aflatoxinas, benzidinas, metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) (AL-SABTI & METCALFE 1995; PACHECO & SANTOS 2002; GRAVATO & SANTOS 2003; BARSINIÉ et al. 2006).

*Pimelodus maculatus* apresentou valores de MN abaixo dos observados para *G. brasiliensis*, tanto no local 4 quanto no local 7 (Tabela 4). Segundo ERGENE et al. (2007), diferenças na anormalidade nuclear podem ser atribuídas às diferenças nos hábitos alimentares das espécies.

Os maiores valores de IHS no local 2 (Tabela 5) em *G. brasiliensis* e nos locais 4 e 7 em *P. maculatus* (Tabela 5) sugerem altos níveis de poluentes nestes locais. Excetuando-se o local 2, estes resultados também corroboram com os verificados para EROD e MN neste trabalho. Muitos estudos dos efeitos de efluentes de indústrias de papel registram um aumento correspondente no IHS em peixes com altas atividades de EROD (BANKEY et al. 1994; HUUSKONEN & LINDSTRÖM-SEPPA 1995; LARSSON et al. 1988). Tipicamente, aumentos no peso do fígado seguindo exposição a receptor agonista Ah é devido à proliferação do retículo endoplasmático liso como o resultado da síntese aumentada de proteínas relacionadas à CYP1A (LARSSON et al. 1988). HUUSKONEN & LINDSTRÖM-SEPPA (1995) e STEPHENSEN et al. (2000) registraram que altos valores de IHS encontrados em “perch” (*Perca fluviatilis*) e “sculpin” (*Myoxocephalus scorpius*) podem ser indicativos de atividade aumentada de enzimas de biotransformação de xenobióticos. SLOOFF et al. (1983) também sugerem uma relação positiva entre o peso relativo do fígado e enzimas que metabolizam xenobióticos de peixes de águas poluídas.

Os menores valores de EROD em *G. brasiliensis* no local 2 (Volta Redonda), uma área de grande influência de poluentes urbano-industriais, quando comparados com o local de referência (Local 5- rio Preto) podem ser devido a um mau funcionamento do fígado gerado por uma exposição crônica a poluentes nesta primeira área. Embora estudos histopatológicos não tenham sido feitos neste trabalho, observações macroscópicas de campo dos fígados de todos os indivíduos coletados no local 2 apresentavam um aspecto de decomposição (necrose), fraca consistência (quebradiço); e metade deles possuía grande quantidade de gordura aderida. Devido aos processos de absorção e metabolização, lesões observadas no fígado podem estar relacionadas à exposição crônica a poluentes. Estes tipos de lesões têm sido registrados em peixes de áreas impactadas por múltiplos contaminantes (MARTY et al. 2003; STENTIFORD et al. 2003; OLIVEIRA RIBEIRO et al. 2005). Tais lesões causam prejuízos funcionais e estruturais no fígado de peixes (STENTIFORD et al. 2003), diminuem a funcionalidade, podendo causar a falência do órgão e conseqüentemente afetar maiores níveis de organização biológica (RABITTO et al. 2005). Enquanto a acumulação de lipídios pode ser uma estocagem fisiológica normal, ela pode ser também um mecanismo de defesa contra contaminantes lipossolúveis (BIAGIANTI-RISBOURG et al. 1997). Os indivíduos

coletados nesse local também apresentaram grande quantidade de gordura visceral (15,42 g – soma da gordura visceral de todos os indivíduos).

Os resultados do FC em *G. brasiliensis* foram consistentes com os obtidos para IHS e MN nesta espécie, reforçando a possibilidade de que os locais 2 e 4 estejam entre os mais poluídos por contaminantes químicos no trecho médio-inferior da bacia do rio Paraíba do Sul.

Os maiores valores do FC em *P. maculatus* no local 4 (Tabela 7) concordam com os maiores valores de IHS, MN e EROD verificados para este local. Porém, os maiores valores deste bioindicador também foram registrados para o local 1 nesta espécie, o que não concorda com nenhum dos outros biomarcadores e bioindicadores, que ao contrário, apresentaram os menores valores para este local.

Apesar da idéia geral de que indivíduos com maior peso em um dado comprimento estão em melhor condição, este bem estar tem sido relacionado a como o animal aproveita os recursos disponíveis existentes em uma determinada época do ano, ou seja, associado diretamente à nutrição (TYLER & DUNN 1976 *Apud* SCHMITT & DETHLOFF 2005; BRAGA 1986). Entretanto, a presença de poluentes xenobióticos no ambiente pode fazer o Fator de variar em uma ou outra direção, saindo do alcance normal em resposta a exposição química. Elevados valores do Fator de Condição têm sido encontrados em “white sucker” (*Catostomus commersoni*) e “redbreast sunfish” (*Lepomis auritus*) para locais poluídos com efluentes da produção de papel (MCMASTER et al. 1991; ADAMS et al. 1992a ). Por outro lado, uma diminuição no Fator de Condição foi registrada em “Atlantic cod” (*Gadus morhua*) expostos a petróleo (KICENIUK & KHAN 1987). Nossos resultados concordam mais com o primeiro caso, uma vez que para ambas as espécies estudadas o Fator de Condição apresentou os maiores valores para alguns dos locais em que outros biomarcadores/bioindicadores sugeriram maior presença de contaminantes, à exceção do local 1.

Os dados fornecidos dificultam a explicação em alguns casos, por exemplo, o baixo nível de indução no local 1 (reservatório do Funil), que recebe resíduos industriais e agrícolas de cidades do Estado de São Paulo a montante. Isto sugere que é necessário se saber muito mais em relação às influências ambientais na atividade da enzima antes que dados para monitoramento possam ser utilizados de maneira mais confiável para interpretar os efeitos biológicos de contaminantes. Contudo, a utilização de uma bateria de biomarcadores e bioindicadores nos permitiu avaliar e formular um bom retrato dos diferentes efeitos da poluição em peixes nos diferentes locais estudados do trecho médio-inferior da bacia do rio Paraíba do Sul.

## 7 CONCLUSÕES

1. Os resultados deste trabalho sugerem que os tributários Piabanha e Paraibuna (MG), assim como o canal principal do rio Paraíba do Sul na altura das cidades de Três Rios e Volta Redonda sejam os locais que se encontram em situação mais crítica em relação à presença de poluentes xenobióticos no trecho médio-inferior da bacia do rio Paraíba do Sul.
2. Diferenças quanto à atividade de EROD entre as espécies *Geophagus brasiliensis* e *Pimelodus maculatus* foram constatadas com a primeira espécie apresentando valores mais elevados.
3. Ambas as espécies mostraram-se adequadas para estudos de biomonitoramento ambiental por atividade de EROD.
4. Estudos utilizando a indução de CYP1A em espécies de peixes nativas, visando melhor detalhar o comportamento desta isoenzima são necessários, o que viabilizará o biomonitoramento por atividade de EROD em sistemas lóticos tropicais.
5. Peixes expostos a poluentes químicos podem também apresentar maiores valores do FC, indicando menor qualidade ambiental em relação à poluição, diferindo da interpretação deste índice quanto à melhor qualidade ambiental relacionada à maior disponibilidade alimentar onde os maiores valores são, ao contrário, associados à melhor qualidade ambiental.
6. O uso de uma bateria de biomarcadores e bioindicadores mostrou-se importante para se avaliar a qualidade ambiental do trecho médio-inferior do rio Paraíba do Sul, pois a comparação dos resultados das diferentes ferramentas ajudou na interpretação geral dos efeitos dos poluentes sobre a saúde dos peixes.

## 8 REFERÊNCIAS

- AARAB, N.; CHAMPEAU, O.; MORA, P.; DAUBEZE, M.; GARRIGUES, P.; NARBONE, J. F. 2004. Scoring approach based on fish biomarkers applied to French river monitoring. *Biomarkers*, 9(3): 258-270.
- ADAMS, S. M.; CRUMBY, W. D.; GREELEY, M. S.; JR. SHUGART, L. R.; SAYLOR, C. F. 1992a. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 243: 347-60.
- ALBERS, P. H. 1995. *Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons*. In: Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, J., (Eds.). Handbook of ecotoxicology. Boca Raton: Lewis publishers. p. 330-355.
- AL-SABTI, K., 1994. Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. *Mutation Research*. 320: 157-163.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343: 121-135.
- BAINY, A. C. D.; Woodin, B. R.; Stegeman, J. J. 1999. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir-São Paulo, Brazil. *Aquatic Toxicology*, 44: 289-305.
- BANKEY, L. A.; VAN VELD, P. A.; BORTON, D. L.; LAFLEUR, L.; STEGEMAN, J. J. 1994. Responses of cytochrome P4501A in freshwater fish exposed to bleached kraft mill effluent in experimental stream channels. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52: 439-447.
- BARSIENÉ, J.; DEDONYTÉ, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKÉNAITÉ, L.; ANDERSEN, O. K. 2006. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquatic Toxicology*, 78S: S99-S104.
- BIAGIANTI-RISBOURG, S.; PAIRAULT, C.; VERNET, G.; BOULEKBACHE, H. 1997. Effect of lindane on the ultrastructure of the liver of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Sac-Fry. *Chemosphere*, 33: 2065-2079.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-54.
- BRAGA, F. M. S. 1986. Estudo entre fator de condição e relação peso / comprimento para alguns peixes marinhos. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, 46: 339-346.
- BRANCO, C. W. C.; ROCHA, M. I. A.; PINTO, G. F. S.; GÔMARA, G. A.; DE FILIPPO, R. 2002. Limnological features of Funil Reservoir (R.J., Brazil) and indicator properties of rotifers and cladocerans of the zooplankton community. *Lakes & Reservoirs: Research and Management*, 7: 87-92.
- CASARETT, L. J.; AMDUR, M. O.; KLAASSEN, C. D.; DOULL, J. 1991. *Toxicology – The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill; pp 89.
- ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. 2005a. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*, 74: 264-271.
- ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. 2005b. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46: 64-70.

- COSTA, G.; NEVES, C. F. 1993. O estuário do Rio Paraíba do Sul. X Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. Associação Brasileira de Recursos Hídricos – ABRH, Gramado, RS. Anais. 2: 31-40.
- CRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research (Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis)*, 491: 39-44.
- DA SILVA SOUZA, T.; FONTANETTI, C. S., 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research*, 605(1-2): 87-93.
- DE VOOGT, P.; BRINKMAN, U. A. TH. 1989. Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. In: *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxines and related products*. Kimbrough, R.D., Jensen, A.A., [Eds] Topics in environmental health, Vol.4. Publ. By Elsevier Science Publishers B.V.: 3-29
- DNAEE—Departamento Nacional de Águas e Energia Elétrica. 1983. Boletim Fluviométrico F-5.02, Bacia do Paraíba do Sul.
- ERGENE, S.; CAVAS, T.; CELIK, A.; KÖLELI, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A. 2007. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksur Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, 16(4): 385-91.
- FACEY, D. E.; BLAZER, V. S.; GASPER, M. M.; TURCOTTE, C. L. 2005. Using Fish Biomarkers to Monitor Improvements in Environmental Quality. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17: 263-266.
- FEEMA – Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente. 1999. *Análises de Micropoluentes Orgânicos em Águas e Sedimento, Rio Paraíba do Sul, Trecho Resende – Vargem Alegre*. Rio de Janeiro, 18p.
- FERREIRA, M.; ANTUNES, P.; GIL, O.; VALE, C.; REIS-HENRIQUESA, M. A. 2004. Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 69: 347-357.
- GOKSOYR, A., 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Archives of Toxicology*, 17: 80-95.
- GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. 2003. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 352-358.
- HAASCH, M. L.; PRINCE, R.; WEIKSNORA, P. J.; COOPER, K. R.; LEACH, J. J. 1993. Caged and wild fish induction of hepatic cytochrome P450 (CYP1A1) as an environmental biomonitor. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 885-895.
- HANDY, R. D.; GALLOWAYS, T. S.; DEPLEDGE, M. H. 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution in regulatory toxicology. *Ecotoxicology*, 12: 331-343.
- HUUSKONEN, S.; LINDSTRÖM-SEPPA, P. 1995. Hepatic cytochrome P4501A and other biotransformation activities in perch (*Perca fluviatilis*): the effects of unbleached pulp mill effluents. *Aquatic Toxicology*, 31, 27-41.
- IEOPOPS (International experts on POPs), 1990. Meeting background report *International Experts Meeting on Persistent Organic Pollutants: Towards Global Action*. Ministry of Environment, Ottawa.
- KICENIUK, J. W.; KHAN, R. A. 1987. Effect of petroleum hydrocarbons on Atlantic cod, *Gadus morhua*, following chronic exposure. *Canadian Journal of Zoology*, 65: 490-4.

- KIRBY, M. F.; SMITH, A. J.; ROOKE, J.; NEALL, P.; SCOTT, A. P.; KATSIADAKI, I. 2007. Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquatic Toxicology*, 81: 233–244.
- LARSSON, Å.; ANDERSSON, T.; FÖRLIN, L.; HÄRDING, J. 1988. Physiological Disturbance in Fish Exposed to Bleached Kraft Mill Effluents. *Water Science and Technology*, 20(2): 67-76.
- LEHTONEN, H.; JOKIKOKKO, E., 1995. Changes in the heavily exploited vendace (*Coregonus albula* L.) stock in northern Bothnian Bay. *Advanced Limnology*, 46: 379-86.
- LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. 1998. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by mollusks as biomarkers of marine pollution. *Mutation Research*, 399: 3-15.
- LUCHINI, L. C.; LORD, K. A.; RUEGG, E. F. 1981. Sorption and desorption of pesticides on Brazilian soils. *Ciência e Cultura*, 33(1): 97–101.
- MACKAY, D.; PATERSON, S. 1982. Fugacity revisited. *Environmental Science and Technology*, 16(12), 654a–660a.
- MCMASTER, M. E.; VAN DER KRAAK, G. J.; PORTT, C. B.; MUNKITTRICK, K. R.; SIBLEY, P. K.; SMITH, I. R.; DIXON, D. G. 1991. Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus commersoni*) population exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 21: 199-218.
- MARTY, G. D.; HOFFMANN, A.; OKIHIRO, M. S.; HEPLER, K.; HANES, D. 2003. Retrospective analyses: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Marine Environmental Research*, 56: 569–584.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*, 74: 53-69.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A. 2002. Naphthalene and  $\beta$ -naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. *Environment International*, 28: 285–293.
- PAPALI, M. A. (Coord.). 2000. Rio Paraíba do Sul Vale Vida. São José dos Campos: UNIVAP.
- PARENTE, T. E. M.; DE OLIVEIRA, A. C. X.; SILVA, I. B.; ARAÚJO, F. G.; PAUMGARTTEN, F. J. R. 2004. Induced alkoxyresorufin-*O*-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu River, Rio de Janeiro, Brasil. *Chemosphere*, 54: 1613-1618.
- PFEIFFER, W. C.; FISZMAN, M.; MALM, O.; AZCUE, J. M. 1986. Heavy metal pollution in the Paraíba do Sul River, Brazil. *Science of the Total Environment*, 58: 73-79.
- RABITTO, I.; ALVES COSTA, J. R. M.; AKAISHI, F. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. 2005. Dietary Pb(II) and TBT (tributyltin) exposures to neotropical fish *Hoplias malabaricus*: histopatological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 147–156.
- RODRIGUEZ-CREA, A.; AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: in evaluation of sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 442-448.

- ROSSO, T. C. A.; NEVES, C. F.; ROSMAN, P. C. C. 1991. O estuário do rio Paraíba do Sul: perspectivas em um cenário de variação do nível do mar. In: *Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos 9 & Simpósio Luso-Brasileiro de Hidráulica e Recursos Hídricos*, vol. 5: 578–586. Editora da ABRH 3, Rio de Janeiro.
- SCHMITT, C. J.; DETHLOFF, G. M. editors. 2005. Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: Selected Methods for Monitoring Chemical Contaminants and their Effects in Aquatic Ecosystems. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Columbia, (MO): Information and Technology Report USGS/BRD. 81 pp.
- SINDEMAN, C. J. In: SINDERMAN C. J., Editor. 1996. *Ocean pollution effects on living resources and humans*. CRC Press, Boca Raton, pp 247-255.
- SLOOFF, W.; VAN KREIJL, C. F.; BAARS, A. J. 1983. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology*, 4: 1–14.
- STEGEMAN, J. J.; WOODIN, B. R.; SINGH, H.; OLEKSIK, M. F.; CELANDER, M. 1997. Cytocromes P450 (CYP) in tropical fishes: catalytic activities, expression of multiple CYP proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fishes from Bermuda. *Comparative Biochemistry and Physiology, C 116*: 61-75.
- STENTIFORD, G. D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B. P.; JONES, G.; GREEN, M.; FEIST, S. W. 2003. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. USA. *Marine Environmental Research*, 55: 137-159.
- STEPHENSON, E.; SVAVARSSON, J.; STARVE, J.; ERICSON, G.; ADOLFSON-ERICI, M.; FÖRLIN, L. 2000. biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the south-west coast of iceland. *Aquatic Toxicology*, 48: 431– 442
- STINE, K. E.; BROWN, T. M. 1996. Biotransformation of Xenobiotic, In: *Principles of Toxicology*. Lewis Publishers, p. 259, New york.
- SWAMI, K.; NARANG, A. S.; NARANG, R. S.; EADON, G. A. 1992. Thermally induced formation of pcd and pcdf from tri- and tetrachlorobenzene in dielectric fluids. *Chemosphere*, 24(12): 1845-1853.
- TYLER, A.V.; DUNN, R. S. 1976. Ration, growth, and measures of somatic and organ condition in relation to meal frequency in winter flounder, pseudopleuronectes americanus, with hypotheses regarding population homeostasis. *Journal Fisheries Research Board of Canada*, 33: 63-75.
- TOMMASI, L. R. 1985. Resíduos de praguicidas em águas e sedimentos de fundo do sistema estuarino de Santos (SP). *Ciência e Cultura*, 37(6): 1001-10012.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.
- WEGE, G. J.; ANDERSON, R. O. 1978. Relative weight (Wr): a new index of condition for largemouth bass. Pages 79-91 In G. D. Novinger and J. G. Dillard, editors. *New approaches to the management of small impoundments*. American Fisheries Society. North Central Division, Special Publication 5, Bethesda, Maryland .
- WHO (World Health Organization (1993) *Polychlorinated biphenyls and terphenyls* (2<sup>nd</sup> edition). *Environmental Health Criteria* 140, International Programme on Chemical Safety (IPCS), WHO, Geneva, pp. 82.

WHYTE, J. J.; JUNG, R. E.; SCHIMITT, C. J.; TILLITT, D. E. 2000. Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, 30: 347-570.

## **Capítulo II**

### **Bioindicadores da condição de saúde de três espécies de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul, Brasil.**

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi usar bioindicadores fisiológicos inespecíficos (Índice hepatossomático - IHS e Fator de Condição - FC) de exposição a poluentes orgânicos persistentes (POPs) em peixes para a avaliação da presença destes xenobióticos em um grande rio tropical do sudeste do Brasil. A hipótese a ser testada é a de que os locais que recebem maior aporte de poluição difusa apresentam maiores concentrações de poluentes químicos xenobióticos, e, portanto, devem apresentar maiores valores destes índices em relação às áreas de referência. Os peixes foram coletados em 10 locais do rio Paraíba do Sul e maiores tributários, em dois períodos (Verão/Úmido *versus* Inverno/Seco) entre dezembro de 2002 e novembro de 2003. Os locais 1 (Paraitinga/Paraibuna) e 4 (Rio Preto) foram selecionados como locais de referência devido à inexistência de grandes centros urbanos-industriais, com o entorno do rio sendo usado basicamente em atividades de agricultura extensiva. Os Peixes capturados foram imediatamente anestesiados em banho de gelo e em seguida sacrificados, tendo sido medidos, pesados e dissecados para retirada do fígado, que foi pesado em separado. Os maiores IHS para as três espécies foram registrados nos locais 3 (rio Paraíba do Sul - Barra Mansa/Volta Redonda) e 6 (rio Piabanha), localizados próximos a grandes centros urbanos que poderiam estar contribuindo para introdução de xenobióticos. Sazonalmente, os maiores IHS ocorreram no Inverno/Seco. Por outro lado, os menores valores do Fator de Condição ocorreram no local 1 (local de referência) para *G. brasiliensis*, e os maiores no local 3. Sazonalmente, os maiores FC foram registrados no Verão/Úmido. Tais resultados corroboram a hipótese de que o aumento tanto do IHS quanto do Fator de Condição indicam sinais de estresse ambiental, com o IHS refletindo melhor a avaliação ambiental nos locais estudados. Diferenças sazonais entre estes dois índices sugerem que o IHS é um indicador mais consistente da qualidade ambiental, haja vista sua menor variação em função de entradas de material alóctone no período das chuvas.

**Palavras-chave:** Bioindicadores, FC, IHS, peixes, rio.

## ABSTRACT

The aim of this work is to use the inespecific physiological bioindicators Hepatosomatic Index (HSI) and Condition Factor (CF) to assess the presence of Persistent Organic Pollutants (POPs) in a large tropical river of Southeastern Brazil, using fish species. The tested hypothesis is that river sites near to entrance of diffuse pollution show higher concentration of xenobiotics, and have fish with higher index values compared with reference or least altered sites (reference). Fishes were collected at 10 sites in the Paraíba do Sul (PSR) river and main tributaries, in two seasons (summer/wet *versus* winter/dry) between December 2002 and November 2003. Sites 1 (Paraitinga/Paraibuna river) and 4 (Preto river) were selected as reference sites due to non-existence of large urban-industrial centers nearby, with the drainage area being used basically by extensive agricultural activities. Fishes collected were immediately anesthetized in ice bath and killed, measured, weighted and dissected for removing liver that were weighted. Higher HSI for the three fish species were recorded at sites 3 (PSR at Barra Mansa/Volta Redonda) and 6 (Piabanha river), both located near to large urban centers that could be contributing to large introduction of xenobiotics. Seasonally, higher HSI occurred in winter/dry season. On the other hand, lower Condition Factor was recorded at site 1 (Reference) for *G. brasiliensis*, and the highest at site 3. Seasonally, higher CF was recorded in summer/wet season. Such results corroborate the hypothesis that increasing HSI and CF indicate signals of environmental stress, with HSI reflecting in a better way environmental evaluation for the studied sites, since its comparatively lower variation according to entrance of alloctone materials during the rainfall season.

**Key words:** Bioindicators, CF, HSI, fishes, river.

## 1 INTRODUÇÃO

A integridade biótica é freqüentemente refletida pela saúde dos organismos que residem em um determinado ecossistema. Em ecossistemas aquáticos, os peixes são considerados bons indicadores da saúde do sistema (ADAMS et al. 1993). Quando a ictiofauna é exposta a poluentes químicos lipossolúveis persistentes, tais como bifenilas policloradas (BPCs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e dioxinas, tais como diclorodifeniltricloroetano (DDT) e tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD), alterações nas populações e comunidades deste ecossistema podem ocorrer. Neste contexto, a determinação de parâmetros biológicos selecionados, que são conhecidos por variar em resposta aos efeitos tóxicos de poluentes, vem sendo constantemente recomendada para avaliar o estado de saúde ambiental de ecossistemas aquáticos. Estes parâmetros biológicos são conhecidos como indicadores biológicos ou bioindicadores (VIARENGO et al. 2000).

Os bioindicadores vêm sendo utilizados como importantes ferramentas na utilização em programas de avaliação e manejo de sistemas aquáticos e podem ser avaliados a partir de mudanças celulares, alterações bioquímicas, moleculares ou fisiológicas em um organismo, indicando exposição aos efeitos de poluentes ambientais. Os bioindicadores em nível de órgãos, notadamente o Índice hepato-somático (IHS) (VAZZOLER 1996), estão freqüentemente relacionados à exposição a diversos contaminantes (GOEDE & BARTON 1990). Segundo CASARETT et al. (1991), o fígado é o principal órgão envolvido no processo de biotransformação de químicos xenobióticos, e com isso tal exposição pode gerar um aumento no tamanho do fígado por hipertrofia (aumento no tamanho), hiperplasia (aumento no número de hepatócitos), ou ambos (GOEDE & BARTON 1990; HINTON & LAUREN 1990). Freqüentemente o IHS é utilizado para avaliar o tamanho relativo do fígado, sendo expresso pelo peso do fígado como porcentagem do peso corporal total (FACEY et al. 1999).

Outra forma de avaliar o efeito dos poluentes é a partir dos bioindicadores individuais (ARIAS et al. 2007), com o Fator de Condição (LE CREN 1951) sendo um índice freqüentemente usado para estudos da biologia do peixe, fornecendo informações importantes relacionadas ao estado fisiológico, baseado no princípio de que indivíduos de um dado comprimento exibem maior peso quando estão em melhor condição (DE SILVA et al. 1998; FITZGERALD et al. 1998; VILA-GISPERT & MORENO-AMICH 2001). Alguns autores (LE CREN 1951; BOLGER & CONNOLLY 1989; BRAGA 1986; 1993; BRAGA & ANDRADE 2005) afirmam que o Fator de Condição implica alterações de bem estar das populações de peixes ao longo do ciclo sazonal. Desta forma, a variação deste índice durante o ano tem sido usada como um dado adicional para estudos de reprodução e ciclos sazonais de processos alimentares. Neste contexto, o estudo comparativo de populações distintas permite avaliar a qualidade dos ambientes nos quais o animal vive (BRAGA 1986; BOLGER & CONNOLLY 1989).

Por outro lado, segundo alguns autores (WEGE & ANDERSON 1978; LEHTONEN & JOKIKOKKO 1995) um aumento no Fator de Condição, assim como no Índice hepato-somático, podem também sinalizar efeitos deletérios de um estressor. Ainda segundo esses autores, embora a interpretação geral seja a de que um grande peso relativo ao comprimento indique uma condição de saúde (para o organismo individual), a presença de poucos indivíduos maiores e mais robustos pode significar uma condição anormal ou de desequilíbrio ao nível de população ou comunidade. Um estresse no ambiente natural pode ter um efeito sobre a saúde e condição total do peixe. Portanto, o Fator de Condição pode ser empregado como um bioindicador integrativo.

O rio Paraíba do Sul, situado no Sudeste do Brasil, é responsável pelo abastecimento de água de várias cidades do Estado do Rio de Janeiro e para 90% da população Metropolitana do grande Rio, a partir da transposição de 160 m<sup>3</sup>/s de suas águas para o Sistema Light-Cedae. Porém o histórico de poluição da bacia do rio Paraíba do Sul vem ocorrendo desde o século XVI, com a abertura de caminhos ao longo de suas margens e o conseqüente povoamento durante o ciclo do ouro. A degradação agravou-se no século XVII, durante o ciclo da cana de açúcar, responsável pela devastação de boa parte da cobertura vegetal, seguida pelo ciclo do café nos séculos XVIII e XIX. A partir da década de 1950 iniciou-se o desenvolvimento industrial (PASIN 1988) e a conseqüente expansão urbana, além da construção de barragens para a produção de energia hidrelétrica. Atualmente as margens do rio Paraíba do Sul são ocupadas por áreas urbanas, áreas de pastagens, cana de açúcar na parte inferior e indústrias. Tais indústrias são principalmente dos ramos têxteis, metalúrgicos, de celulose, petróleo, petroquímica, química e mecânica.

Outras importantes atividades antrópicas que contribuem para o crescente aumento e concentração de poluentes neste sistema são as grandes plantações de arroz no trecho médio superior, particularmente no município de Canas, e a construção de barragens para geração de energia elétrica ao longo de seu percurso. Segundo AMORIM (1998), o maior problema que aflige as áreas urbanas do Vale do Paraíba é constituído pela contaminação das águas do rio Paraíba do Sul, pelos esgotos sanitários e disposição inadequada de resíduos industriais. Cerca de 1 bilhão de litros de esgotos sanitários, praticamente sem tratamento, são lançados por dia, nos rios da bacia do rio Paraíba do Sul, além dos efluentes industriais, muitas vezes tóxicos, e de toda a espécie de lixo que a própria população atira em suas águas. Tais problemas ambientais agravam a qualidade das águas, contribuindo para a degradação da qualidade da Bacia, que é de extrema importância para o desenvolvimento da região do Vale do Paraíba.

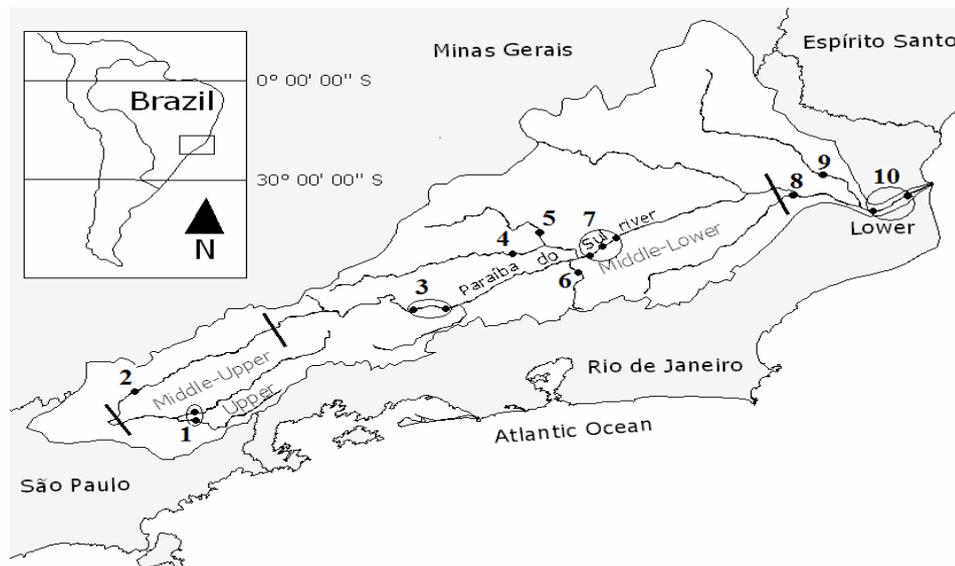
O objetivo deste estudo foi o de utilizar bioindicadores fisiológicos inespecíficos (Índice hepato-somático (IHS) e Fator de Condição (FC)) de exposição a compostos químicos xenobióticos, em três espécies de peixes (*Geophagus brasiliensis*, *Hypostomus affinis* e *Hypostomus auroguttatus*) para a avaliação da presença de poluentes orgânicos persistentes (POPs) em 10 locais ao longo da bacia do rio Paraíba do Sul em dois períodos sazonais (Verão/Úmido *Versus* Inverno/Seco). A hipótese a ser testada é a de que os locais com maior entrada de efluentes urbanos, industriais e agrícolas (poluição difusa) apresentem maior presença de poluentes químicos xenobióticos, registradas pelos maiores Índice hepato-somático (IHS) em relação às áreas de referência. E complementado com o Fator de Condição (FC).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de estudo

A bacia do rio Paraíba do Sul (Figura 1) abrange três dos quatro estados da região Sudeste: São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Formando-se em São Paulo, na Serra da Bocaina, a 1800 m de altitude no encontro do rio Paraitinga com o rio Paraibuna Paulista; a maioria de seus principais tributários vêm de Minas Gerais, e sua foz localiza-se na cidade de São João da Barra, no Estado do Rio de Janeiro, onde deságua no Oceano Atlântico. A bacia do rio Paraíba do Sul encontra-se entre as latitudes 20°26' e 23°39'Sul e as longitudes de 41° e 46°30'Oeste, apresentando uma área total de cerca de 55.500 km<sup>2</sup> e uma extensão de 1.150 km. Ao todo suas águas são utilizadas por mais de 20 milhões de pessoas para os mais diversos fins: indústria, agricultura, energia elétrica através da construção de várias represas ao longo do seu curso, consumo, lazer, pesca, preservação da fauna e flora.

Os locais de estudo (Figura 1) foram: 1 – Paraitinga/Paraibuna (local de referência); 2 – São José dos Campos; 3 – Barra Mansa/Volta Redonda; 4 – rio Preto (local de referência); 5 – rio Paraibuna (MG); 6 – rio Piabanha; 7 – (Três Rios/Anta/Sapucaia); 8 – rio Grande; 9 – rio Muriaé; 10 – Campos/São João da Barra.



**Figura 1.** Bacia do rio Paraíba do Sul com os 10 locais de coleta. Locais inseridos nos círculos foram tomados em conjunto.

### 2.2 Coletas dos peixes

Os peixes foram coletados entre dezembro de 2002 e novembro de 2003, em 10 locais ao longo da bacia do rio Paraíba do Sul, utilizando-se redes de espera e tarrafa. Alguns locais foram tomados em conjunto, seguindo-se critérios de proximidade. Foram selecionados indivíduos de uma faixa de tamanho entre 13 e 27 cm para *G. brasiliensis* (Tabela 1), entre 19 e 37 cm para *H. affinis* (Tabela 2) e entre 19 e 30 cm para *H. auroguttatus* (Tabela 3). Nesta

faixa de tamanho, todos os peixes são adultos visando minimizar variações fisiológicas decorrentes de fases do crescimento.

Imediatamente após a captura os peixes foram pesados em balança eletrônica portátil *Acculab* VI-600 e tomados os comprimentos totais, em seguida os indivíduos foram anestesiados em banho de gelo e posteriormente sacrificados através de secção transversal, os órgãos da cavidade celomática foram cuidadosamente retirados e o fígado foi pesado em balança eletrônica portátil *Acculab* VI-200.

**Tabela 1.** Número de peixes examinados, por local, estação do ano, tamanho e estágio de maturação sexual de *Geophagus brasiliensis*. N = número de indivíduos. Comprimento: Min – Máx. Sexo/Estádio de maturação: F = Fêmeas; FM = Fêmeas maduras; M = Machos.

<i>G. brasiliensis</i> / Verão úmido				<i>G. brasiliensis</i> / Inverno seco			
Local	N	Comprimento (cm)	Sexo / Est. Mat.	Local	N	Comprimento (cm)	Sexo / Est. Mat.
1	3	16.5-18.0	F	4	1	22.0	F
2	3	17.0- 22.0	F	5	4	14.5–17.5	F
6	1	20.5	F	8	2	19.5–20.5	F
1	4	15.0-17.0	FM	9	2	18.0	F
3	10	16.5-19.0	FM	10	1	18.5	F
6	7	14.0–19.6	FM	1	9	14.0-19.0	FM
8	5	15.0-18.0	FM	3	5	16.0-22.0	FM
9	4	18.0–20.5	FM	4	2	15.0-20.0	FM
10	2	20.0	FM	5	5	14.0-16.0	FM
1	3	17.5–20.0	M	7	6	13.0-17.0	FM
3	11	17.0–23.5	M	8	5	14.0-20.0	FM
6	4	14.5-23.0	M	9	5	17.0–20.5	FM
8	6	15.0-21.0	M	10	3	17.0-19.0	FM
9	6	17.5–27.0	M	1	9	16.5-20.0	M
10	4	16.5-20.0	M	3	10	15.0-25.0	M
				4	7	21.0–25.5	M
				5	11	13.0–24.5	M
				7	11	14.5-21.0	M
				8	1	23.0	M
				9	3	21.0-22.0	M

**Tabela 2.** *Hypostomus affinis* nos diferentes períodos sazonais com as respectivas áreas, número de indivíduos, faixas de comprimento, sexo e estádios de maturação sexual. N = número de indivíduos. Comprimento: Min – Máx. Sexo/Estádio de maturação: F = Fêmeas; FM = Fêmeas maduras; M = Machos.

<i>H. affinis</i> / Verão úmido				<i>H. affinis</i> / Inverno seco			
Local	N	Comprimento (cm)	Sexo / Est. Mat.	Local	N	Comprimento (cm)	Sexo / Est. Mat.
5	2	24.5-26.5	F	1	1	25.5	F
10	1	28.5	F	3	1	24.5	F
1	4	19.5-30.0	FM	7	1	23.0	F
3	2	26.5-27.0	FM	1	6	18.0-28.5	FM
5	1	26.5	FM	3	4	26.5-35.5	FM
6	2	30.5-31.5	FM	7	1	29.5	FM
10	2	24.5-28.5	FM	1	3	23.0-31.0	M
1	1	26.5	FM	2	4	24.0-32.0	M
3	2	31.0-37.0	M	3	8	31.0-37.0	M
5	7	23.5-31.5	M	7	2	17.0-18.5	M
6	5	26.0-33.5	M				
10	7	20.5-27.0	M				

**Tabela 3.** *Hypostomus aurogutatus* nos diferentes períodos sazonais com as respectivas áreas, número de indivíduos, faixas de comprimento e estádios de maturação sexual. N = número de indivíduos. Comprimento: Min – Máx. Sexo/Estádio de maturação: F = Fêmeas; FM = Fêmeas maduras; M = Machos.

<i>H. aurogutatus</i> / Verão úmido				<i>H. aurogutatus</i> / Inverno seco			
Local	N	Comprimento (cm)	Sexo / Est. Mat.	Local	N	Comprimento (cm)	Sexo / Est. Mat.
3	3	24.0-27.0	F	4	1	19.5	F
4	1	28.0	F	5	3	25.0-29.0	F
3	5	23.0-28.0	FM	4	1	24.0	FM
4	1	22.0	FM	5	1	27.0	FM
5	3	23.0-25.0	FM	7	2	29.5-30.0	FM
3	1	25.0	M	4	4	26.0-27.0	M
4	6	24.5-29.0	M	5	3	25.5-28.0	M
5	4	20.0-27.0	M	7	5	21.0-25.0	M

### 2.3 Tratamento dos dados

Os locais 1 e 4 foram selecionados como locais de referência devido à pouca presença de indústrias e agricultura intensiva em áreas próximas a esses rios. Para minimizar a influência do sexo e do estágio de maturação sexual as sub-populações foram comparadas considerando-se estes fatores em separado, além disso, também foram feitas análises comparando-se os diferentes sexos nas mesmas áreas e períodos sazonais.

O Índice hepato-somático foi calculado através do percentual do peso do fígado em relação ao peso do corpo, de acordo com a fórmula:  $IHS = (\text{Peso do fígado (g)} / \text{Peso total (g)}) * 100$ , (VAZZOLER, 1996).

O Fator de Condição foi expresso pela fórmula:  $FC = (\text{Peso total} / \text{Comprimento total}^3) * 100$ . Os dados foram transformados e comparados com ANOVA entre os 10 locais e os dois períodos sazonais, seguida pelo teste “*a posteriori*” de diferenças de médias de Tukey ao nível de confiança de 95% ( $P < 0.05$ ) para determinação de que médias foram significativamente diferentes.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Índice hepato-somático (IHS)

Machos e fêmeas maduras de *Geophagus brasiliensis* apresentaram no verão os maiores IHS nos locais 3 (Barra Mansa/Volta Redonda) e 6 (rio Piabanha) (Tabela 4). Diferenças significativas foram detectadas entre os maiores valores no local 3 em relação aos locais 8 (rio Grande), 9 (rio Muriaé) e 10 (Campos/São João da Barra) para fêmeas maduras, e em relação aos locais 8 e 10 para machos (Tabela 4). Tanto machos quanto fêmeas maduras também apresentaram diferenças significativas com maiores valores no local 6 em relação ao local 8 (Tabela 4). No inverno, machos também apresentaram maiores valores para o local 3 em relação aos dois locais tomados como referência (1 - Paraitinga/Paraibuna e 4 - rio Preto) e em relação ao local 5 (rio Paraibuna - MG) (Tabela 4).

Machos de *Hypostomus affinis* apresentaram no verão os maiores valores de IHS para o local 6 em relação aos locais 5 e 10 (Campos/São João da Barra) enquanto fêmeas ovadas de *H. aurogutatus* apresentaram maiores valores para o local 3 em relação ao local 5 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Comparações dos valores do Índice hepato-somático entre os locais nos diferentes períodos sazonais por espécie, sexo e estágio de maturação sexual (para as fêmeas). \*\* $P < 0.001$  – Altamente significativo; \* $P < 0.05$  – Significativo.

Espécie	Período sazonal	Sexo	IHS		Tukey	N
			F	P		
<i>G. brasiliensis</i>	Verão	Fêmeas M.	9.133	0.000**	3>8, 9, 10; 6>8	32
<i>G. brasiliensis</i>	Verão	Machos	5.674	0.001**	3>8,10; 6>8	34
<i>G. brasiliensis</i>	Inverno	Machos	5.429	0.001**	3>1, 4, 5	51
<i>H. affinis</i>	Verão	Machos	12.00	0.000**	6>5, 10	21
<i>H. aurogutatus</i>	Verão	Fêmeas M.	5.875	0.039*	3>5	8

Sazonalmente, foram feitas comparações apenas para dois locais: 9 (rio Muriaé) e 4 (rio Preto). Fêmeas maduras de *G. brasiliensis* no local 9 e machos de *H. aurogutatus* no local 4, apresentaram os maiores IHS no Inverno/Seco (Tabela 5).

**Tabela 5.** Comparações sazonais do Índice hepato-somático considerando-se as espécies, o sexo e o estágio de maturação sexual (para as fêmeas). Períodos sazonais: 1 = Verão Úmido; 2 = Inverno Seco. \*\* $P < 0.001$  – Altamente significativo; \* $P < 0.05$  – Significativo.

Espécie	Local	Sexo	IHS		Tukey	N
			F	P		
<i>G. brasiliensis</i>	9	Fêmeas M.	7.1862	0.03151*	2>1	9
<i>H. aurogutatus</i>	4	Machos	13.713	0.00602*	2>1	10

### 3.2 Fator de Condição

*Geophagus brasiliensis* machos, fêmeas e fêmeas ovadas apresentaram tanto no verão quanto no inverno menores valores do Fator de Condição para o local 1 (local de referência), com diferenças significativas em relação aos locais 2 (São José dos Campos), 3, 6, 7 (Três Rios/Anta/Sapucaia), 8, 9 e 10 (Tabela 6).

**Tabela 6.** Comparações dos valores do Fator de Condição entre os locais nos diferentes períodos sazonais considerando a espécie, sexo e estágio de maturação sexual (para as fêmeas). \*\* $P < 0.001$  – Altamente significativo; \* $P < 0.05$  – Significativo.

Espécie	Período sazonal	Sexo	Fator de Condição		Tukey	N
			F	P		
<i>G. brasiliensis</i>	Verão	Fêmeas	8.457	0.044*	2>1	6
<i>G. brasiliensis</i>	Verão	Machos	4.162	0.006**	3, 6, 9, 10>1	36
<i>G. brasiliensis</i>	Inverno	Fêmeas M.	5.321	0.000**	3>1, 7, 8; 9>1	40
<i>G. brasiliensis</i>	Inverno	Machos	4.856	0.001**	3, 7>1	51

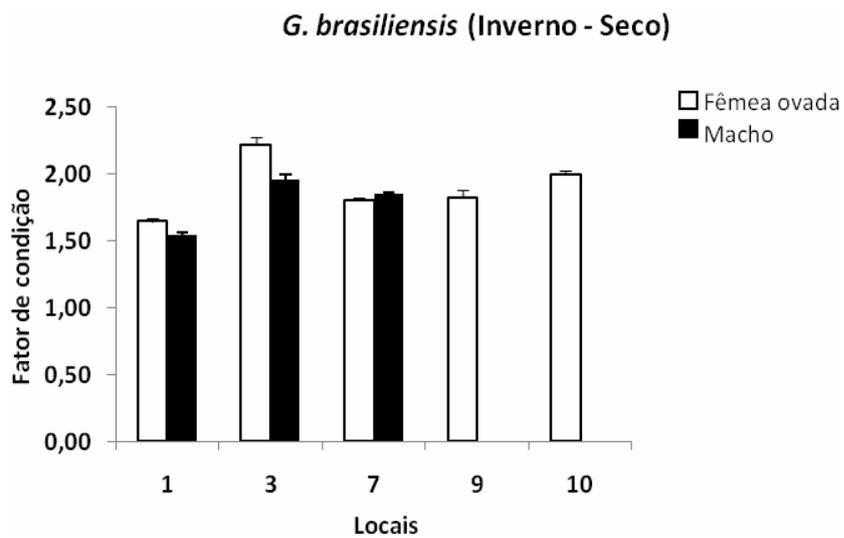
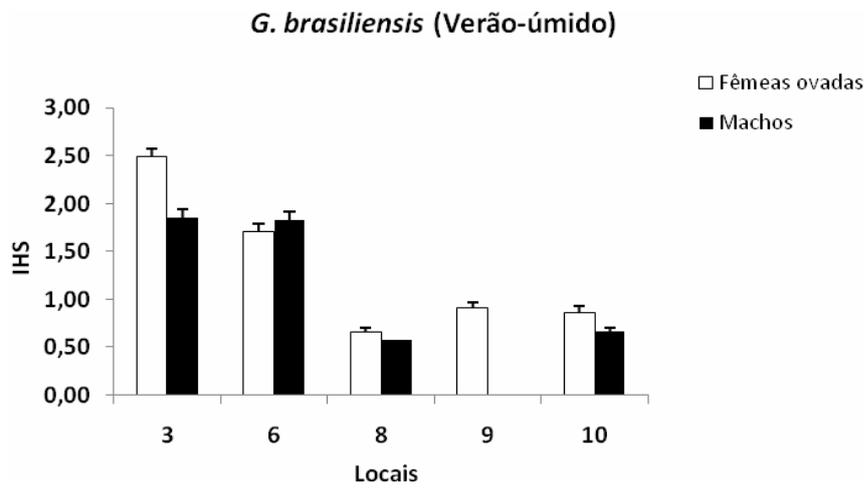
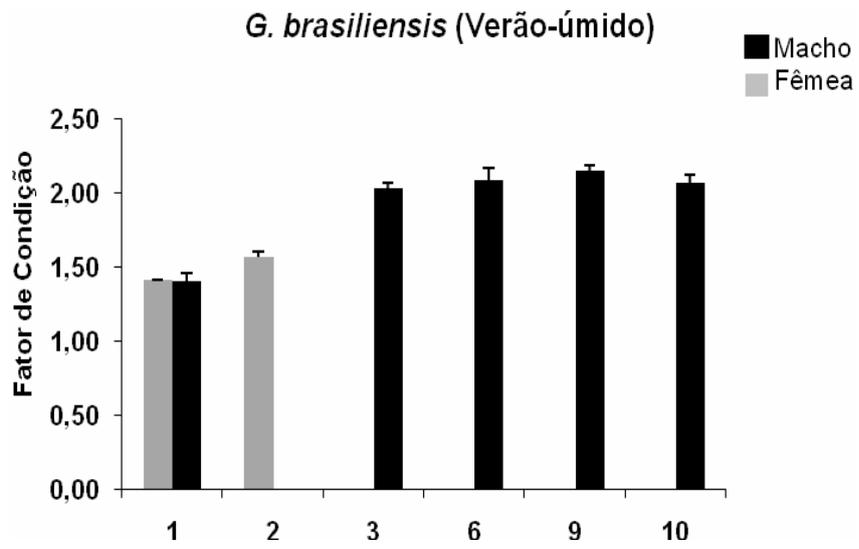
Sazonalmente, foram feitas comparações apenas para três locais: 9 (rio Muriaé), 4 (rio Preto – local de referência) e 1 (Paraitinga/Paraibuna – local de referência). Machos de *G. brasiliensis* no local 10, machos de *H. aurogutatus* no local 4 e fêmeas maduras de *H. affinis* no local 1 apresentaram os maiores valores do FC no Verão Úmido (Tabela 7).

**Tabela 7.** Comparações sazonais do Fator de Condição, considerando-se as espécies, os sexos e o estágio de maturação sexual (para as fêmeas). Períodos sazonais: 1 = Verão úmido; 2 = Inverno seco. \*\* $P < 0.001$  – Altamente significativo; \* $P < 0.05$  – Significativo

Espécie	Local	Sexo	Fator de Condição		Tukey	N
			F	P		
<i>G. brasiliensis</i>	9	Machos	7.0148	0.03301*	1>2	9
<i>H. aurogutatus</i>	4	Machos	47.573	0.00012**	1>2	10
<i>H. affinis</i>	1	Fêmeas M.	18.689	0.01242*	1>2	10

### 3.3 Diferenças entre os sexos

Diferenças entre os sexos (Figura 2) foram analisadas no verão para o Fator de Condição em *G. brasiliensis* no local 1 – fêmeas vs machos – e para o IHS nos locais 3, 6, 8 e 10 – fêmeas maduras vs macho; e no inverno para o Fator de Condição com a mesma espécie nos locais 1, 3 e 7 – fêmeas maduras vs machos. Essas análises não revelaram diferenças significativas ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Diferenças entre os sexos para o IHS e FC para cada espécie e período sazonal.

## 4 DISCUSSÃO

Maiores valores de IHS foram consistentemente registrados nos peixes provenientes de locais próximos a grandes concentrações urbano-industriais, como foi o caso do local 3 (Barra Mansa/Volta Redonda) (Tabela 4), onde se destaca o complexo siderúrgico de Volta Redonda; uma única exceção foi registrada para machos de *H. affinis* no verão, onde o local 6 (rio Piabanha), que também recebe elevada carga de efluentes provenientes da cidade de Petrópolis, e possui 2 represas para geração de energia hidrelétrica ao longo de seu curso, apresentou os maiores valores de IHS (Tabela 4). O rio Paraíba do Sul percorre no Estado do Rio de Janeiro áreas de extensa urbanização, recebendo despejos de efluentes domésticos e industriais, que são lançados diretamente neste sistema sem tratamento prévio, sendo o trecho considerado de maior nível de poluição entre Barra Mansa e Barra do Piraí (COSTA & NEVES 1993; PFEIFFER et al.1986), representado neste trabalho pelo local 3 (Barra Mansa/Volta Redonda). Segundo o projeto: RIO PARAÍBA DO SUL – VALE VIDA (2000), somente a Companhia Siderúrgica Nacional (CSN), localizada em Volta Redonda, libera 55 toneladas diárias de descargas de poluentes, sendo que 300 kilos são fenóis, cianetos e metais pesados, representando a maior carga de poluentes da bacia do rio Paraíba do Sul.

SHEAHAN et al. (2002) utilizando “truta arco-íris” no rio Aire, UK, verificaram que os maiores valores do Índice hepato-somático foram significativamente maiores nos locais controles ou à montante da entrada de poluentes, do que nos sites à jusante da entrada de poluentes de uma estação de tratamento de esgotos. FACEY et al. (2005) compararam os valores de IHS em Burlington Harbor, Vermont antes e após a melhoria no tratamento de efluentes, utilizando “rock bass” *Ambloplites rupestris* e verificaram uma diferença significativa ( $P < 0.05$ ) nos valores deste índice, com o período após a melhoria do tratamento tendo apresentado IHS comparativamente menores. Segundo esses autores, tais resultados sugerem que o estresse fisiológico na população de rock bass tem diminuído em função da redução à exposição aos poluentes.

Sazonalmente, o Índice hepato-somático (IHS) apresentou diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) com maiores valores no inverno em relação ao verão (Tabela 5), padrão contrário ao verificado para os valores sazonais do Fator de Condição (Tabela 7). A maior concentração dos contaminantes químicos, devido à menor vazão de água no rio Paraíba do Sul no período de Inverno/Seco, gerando uma menor proporção de diluição talvez seja a explicação para os maiores valores do Índice hepato-somático nesse período em relação ao verão, quando são registrados os maiores fluxos devido às maiores cargas pulviométricas. SANTIAGO (2006) estudando a biologia reprodutiva do “pacu” *Myleus micans* no rio São Francisco na região de Três Marias (MG) também encontrou maiores valores do Índice hepato-somático no período de inverno em machos. SCOTT & PANKHURST (1992) *apud* SANTIAGO (2006) demonstraram que em vários estádios do ciclo reprodutivo dos machos de teleósteos, o fígado não influencia na maturação dos testículos, diferentemente das fêmeas. SOUZA (2005) utilizando o ensaio cometa e frequência de ocorrência de micronúcleos e de anormalidades nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Perciforme, Cichlidae), mesma família de *G. brasiliensis*, para avaliar a presença de poluentes no rio Paraíba do Sul em São José dos Campos também verificou maiores concentrações de contaminantes no período de Inverno/Seco em relação ao Verão/Úmido. WILHELM FILHO et al. (2001) estudando a influência do período sazonal e da poluição nas defesas antioxidantes de *Geophagus brasiliensis* detectou um aumento no Índice hepato-somático nos peixes coletados locais poluídos em relação ao local de referência, porém estes mesmos autores não encontraram uma diferença clara em relação ao grau de contaminação entre os diferentes períodos sazonais.

O Fator de Condição apresentou diferenças significativas apenas para a espécie *G. brasiliensis*, tendo o local 1 (local de referência) apresentado os menores valores nos dois períodos sazonais analisados para ambos os sexos (machos, fêmeas e fêmeas maduras) (Tabela 6). Por outro lado, o local 3 (Barra Mansa/Volta Redonda) apresentou os maiores valores em três de quatro análises (machos e fêmeas maduras no verão e machos no inverno) (Tabela 7). E ainda as fêmeas no verão apresentaram maiores valores no local 2 (São José dos Campos) em relação ao local 1 (local de referência). Tais resultados somados ao já aqui exposto para o IHS verificado neste trabalho corroboram com a hipótese de que um aumento tanto no IHS quanto no FC podem sinalizar efeitos de um estressor (WEGE & ANDERSON 1978; LEHTONEN & JOKIKOKKO 1995).

Elevados valores de Fator de Condição têm sido encontrados em “white sucker” (*Catostomus commersoni*) e “redbreast sunfish” (*Lepomis auritus*) para locais poluídos com sistemas de tratamento de efluentes (MCMASTER et al. 1991; ADAMS et al. 1992a ). Segundo AMORIM (1998), com relação à poluição hídrica de origem industrial, apenas 18 do total de indústrias presentes na Bacia do rio Paraíba do Sul, concentradas principalmente ao longo do trecho da Rodovia Presidente Dutra, entre Jacareí e Guaratinguetá (SP), são responsáveis por 85% dos despejos lançados nas águas dos rios. A cidade de São José dos Campos localiza-se entre estas cidades. De acordo com a Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB 1992), a cidade de São José dos Campos tem a maior potência de poluição comparada com algumas outras cidades localizadas no trecho médio superior da bacia do rio Paraíba do Sul, enquanto que o local 1 (local de referência), menos alterado, apresentou os menores valores deste índice em todas as análises.

De acordo com JENKINS (2004), muitos estressores biológicos e físicos, juntamente com estressores químicos, podem impactar negativamente organismos aquáticos assim como a vida selvagem dependente da água. Estes estressores ambientais podem ser naturais, como as variações diárias de temperatura, ou antropogênicos como os contaminantes, efluentes térmicos ou modificações físicas no meio ambiente. As diferenças nos valores do Fator de Condição podem ocorrer por influência de mais de uma variável, muitas vezes não mensurada (LE CREN 1951).

Uma diminuição no Fator de Condição (FC), no Índice hepato-somático (IHS), ou ambos é considerado por alguns autores como sendo um reflexo da depleção nas reservas de energia porque esses índices são positivamente relacionados ao conteúdo de músculo total e de energia no fígado havendo, portanto, uma ligação lógica entre essa depleção de reservas de energia e problemas potenciais à saúde para o peixe (LAMBERT & DUTIL 1997; GOEDE & BARTON 1990). Entretanto, apesar da idéia geral de que de que indivíduos com maior peso em um dado comprimento estão em melhor condição, este bem estar, neste sentido, tem sido mais relacionado a como o animal aproveita os recursos disponíveis existentes em uma determinada época do ano, ou seja, variando diretamente com a nutrição (TYLER & DUNN 1976; BRAGA 1986), do que com a presença de poluentes xenobióticos no ambiente, que por sua vez pode fazer o Fator variar em uma ou outra direção, saindo do alcance normal em resposta a exposição química. Elevado Fator de Condição tem sido encontrado em “white sucker” (*Catostomus commersoni*) e “redbreast sunfish” (*Lepomis auritus*) para locais poluídos com sistemas de tratamento de efluentes (ADAMS et al. 1992a; MCMASTER et al. 1991). E menor Fator de Condição tem sido visto em “white sucker” para locais com elevadas concentrações de misturas de metais e em “Atlantic cod” (*Gadus morhua*) expostos a petróleo (MUNKITTRICK & DIXON 1988; MILLER et al. 1992; KICENIUK & KHAN 1987). Nossos resultados concordaram mais com o primeiro caso, desde que o local 3 (Barra Mansa/Volta Redonda), que como já foi citado neste trabalho é considerado o trecho de maior nível de poluição, apresentou os maiores valores para o Fator de Condição em três de quatro análises que indicaram diferenças significativas ( $P < 0.05$ ).

Quanto à variação sazonal, as três espécies examinadas apresentaram diferenças significativas nos valores do FC ( $P < 0.05$ ). Machos de *G. brasiliensis* e *H. auroguttatus* dos locais 9 (rio Muriaé) e 4 (rio Preto – local de referência), respectivamente, e fêmeas ovadas de *H. affinis* do local 1 (Paraitinga/Paraibuna – local de referência) apresentaram maior FC no período do verão úmido. O regime de chuvas no Brasil apresenta uma sazonalidade marcante evidenciando uma estação de verão chuvoso e outra de inverno seco que acontece em épocas diferentes de acordo com a localização geográfica (FIGUEROA & NOBRE 1990). Além da variação mensal da chuva, seu ciclo diurno também varia espacialmente (ANGELIS et al. 2004) e isso pode afetar as concentrações das variáveis físico-químicas presentes nos rios. Uma interpretação prudente do FC deve considerar que os fatores de condição podem variar sazonalmente devido a mudanças na atividade alimentar e disponibilidade de nutrientes (JENKINS 2004). De acordo com TEIXEIRA et al. (2005) em estudos realizados ao longo de toda a extensão do rio Paraíba do Sul, foi verificado que no verão as maiores pluviosidades carregam para o rio maior quantidade de material alóctone, aumentando a disponibilidade de alimento; em áreas de intensa atividade humana, perturbações podem ser causadas por picos de pluviosidade, devido ao aumento do material em suspensão. Neste contexto, a maior disponibilidade de nutrientes, assim como de materiais em suspensão no verão úmido pode estar colaborando para a diferença significativa ( $P < 0.05$ ) para o Fator de Condição, com maiores valores para este período em relação ao inverno seco. Provavelmente a chuva esteja carregando também maior quantidade de poluentes oriundos da indústria e agricultura para o rio neste período. WOLFF (2007) em estudo realizado em dois locais do rio das Pedras, Guaparuava PR, utilizando *Astyanax sp* também encontrou menores valores do FC no período do inverno. O mesmo autor atribui tal resultado à menor variedade e disponibilidade de alimentos neste período devido à menor entrada de material alóctone no rio. Além disso, LIMA-JUNIOR & GOITEIN (2005) utilizando *Pimelodus maculatus*, uma espécie de peixe Siluriforme, mesma ordem de duas das três espécies utilizadas neste estudo também observaram que, para o rio Piracicaba, a variação sazonal do FC não está diretamente relacionada ao desenvolvimento gonadal, e que os indivíduos apresentam maiores índices de condição corporal após períodos de intensa atividade alimentar.

Segundo JENKINS (2004) na análise do Fator de Condição devem ser consideradas as diferenças espaciais devido às diferenças nas sub-populações, assim como os estádios de maturação sexual, quando a energia é transferida dos processos somáticos para os processos gonadais, e as diferenças de sexo. Porém, neste trabalho nenhuma das comparações entre os sexos considerando-se os mesmos indivíduos para o mesmo local apresentaram diferenças significativas ( $P < 0.05$ ), tanto para o Fator de Condição quanto para o Índice hepato-somático (Figura 2). Em conclusão, os dados do presente trabalho apontam os locais mais industrializados apresentando peixes com maiores IHS e FC, o que corrobora a hipótese de que um aumento no FC também pode sinalizar efeitos deletérios de estressores nas populações.

## 5 CONCLUSÕES

1. A hipótese de que um aumento tanto do Fator de Condição quanto do Índice hepato-somático podem sinalizar efeitos deletérios de um estressor foi corroborada no presente estudo, uma vez que locais próximos a maiores entradas de efluentes apresentaram tanto maiores FC quanto IHS. No presente estudo, os pólos industriais de Volta Redonda/Barra Mansa, rio Piabanha e São José dos Campos foram, dos 10 locais pesquisados, os mais alterados de acordo como os bioindicadores utilizados.
2. O Índice hepato-somático apresentou maiores valores no inverno seco em relação ao verão úmido, podendo estar sugerindo maior concentração de poluentes xenobióticos no período de inverno seco, quando as menores vazões acarretam maiores concentrações dos estressores.
3. O local de referência 1 (Paraitinga/Paraibuna) apresentou os menores valores do Fator de Condição em todas as situações analisadas, sugerindo melhores condições deste local quanto à presença de poluentes xenobióticos, o que constitui uma outra abordagem deste índice.
4. Peixes expostos a poluentes químicos podem apresentar maiores valores do FC, indicando menor qualidade ambiental em relação à poluição, diferindo da interpretação deste índice quanto à melhor qualidade ambiental relacionada à maior disponibilidade alimentar onde os maiores valores são, ao contrário, associados à melhor qualidade ambiental.

## 6 REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. M.; CRUMBY, W. D.; GREELEY, M. S.; JR. SHUGART, L. R.; SAYLOR, C.F. 1992a. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 243: 347-60.
- ADAMS, S. M.; BROWN, A. M.; GOEDE, R.W. 1993. A quantitative health assessment index for rapid evaluation of fish condition in the field. *Transactions of the American Fisheries Society*, 122: 63-73.
- AMORIM, D. S. 1998. *Qualidade das águas do rio Paraíba do Sul no Vale do Paraíba*. Dissertação (Mestrado em Planejamento Urbano), Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.
- ANGELIS, C. F.; MCGREGOR, G. R.; KIDD, C. 2004. A 3 year climatology of rainfall characteristics over tropical and subtropical South America based on Tropical Rainfall Measuring Mission Precipitation Radar data. *International Journal of Climatology*, 24: 385 – 399.
- ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; DE ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. 2007. Use of bioindicators and monitoring pesticides contamination in streams and Rivers. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12(1): 61-72.
- BOLGER, T.; CONNOLLY, P. L. 1989. The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. *Journal of Fish Biology*, Southampton; 34: 171-182.
- BRAGA, F. M. S. 1986. Estudo entre fator de condição e relação peso / comprimento para alguns peixes marinhos. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro; 46(2): 339-346.
- BRAGA, F. M. S. 1993. Análise do fator de condição de *Paralichthys brasiliensis* (Perciformes, Sciaenidae). *Revista Unimar*, Maringá; 15(2): 99-115.
- BRAGA, F. M. S. & ANDRADE, P. M. 2005. Distribuição de peixes na microbacia do ribeirão Grande, Serra da Mantiqueira Oriental, São Paulo, Brasil. *Iheringia*, Porto Alegre, 95(2): 121-126.
- CASARETT, L. J.; AMDUR, M. O.; KLAASSEN, C. D.; DOULL, J. 1991. *Toxicology – The Basic Science of Poisons*. McGraw–Hill; pp 89.
- COSTA, G.; NEVES, C. F. 1993. O estuário do Rio Paraíba do Sul. X Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. Associação Brasileira de Recursos Hídricos – ABRH, Gramado, RS. Anais; 2: 31-40.
- DE SILVA, S. S.; GUNASEKERA, R. M.; AUSTIN, C. M.; GRAEME, A. 1998. Habitat related variations in fatty acids of catadromous *Galaxias maculatus*. *Aquatic Living Resources*, 11: 379–385.
- FACEY, D. E.; LECLERC, C.; DUNBAR, D.; ARRUDA, D.; PYZOCHA, L.; BLAZER, V. 1999. Physiological indicators of stress among fishes from contaminated areas of Lake Champlain. Pages 349–359 In T. O. Manley and P. L. Manley, editors. *Lake Champlain in transition: from research toward restoration—water science and application*, 1. American Geophysical Union, Washington, D.C.
- FACEY, D. E.; BLAZER, V.S.; GASPER, M. M.; TURCOTTE, C. L. 2005. Using Fish Biomarkers to Monitor Improvements in Environmental Quality. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17: 263–266.
- FIGUEIROA, S. N.; NOBRE, C. A. 1990. Precipitation distribution over Central and Western tropical South America. *Climanálise*, 5: 36-45.

- FITZGERALD, J. L.; KNOECHEL, R.; MULLINS, C. C. 1998. Observations of temporal and spatial variability in density and relative condition factor of juvenile atlantic salmon (*Salmo salar*) in the Harry's River Drainage System, Insular Newfoundland, from 1987–1997. *Canadian Stock Assessment Secretariat*, Research Document 98/122.
- GOEDE, R. W.; BARTON, B. A. 1990. Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. Pages 93–108 in S. M. Adams, editor. Biological indicators of stress in fish. *American Fisheries Society*, Symposium 8, Bethesda, Maryland.
- GRUBEN, A.; LOPES, D. P.; JOHNSON, R. M. F. 2002. *A Bacia do Rio Paraíba do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais*. Projeto Marca D'água. Relatório preliminar. 78 p.
- HINTON, D. E.; LAUREN, D. J. 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. Pages 17–57 In J. F. MCCARTHY & L. R. SHUGART, editors. *Biomarkers of environmental contamination*; CRC Press, Boca Raton, Florida.
- JENKINS, J. A. *Fish bioindicators of ecosystem condition at the Calcasieu Estuary, Louisiana*: USGS Open-File Report 2004-1323, 47 p.
- JOBLING, S.; SHEAHAN, D.; OSBORNE, J. A.; MATTHIESSEN, P.; SUMPTER, J. P. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to oestrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15: 194-202.
- KICENIUK, J. W.; KHAN, R. A. 1987. Effect of petroleum hydrocarbons on Atlantic cod, *Gadus morhua*, following chronic exposure. *Canadian Journal of Zoology*, 65: 490-4.
- LAMBERT, Y.; DUTIL, J. D. 1997. Condition and energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*) during the collapse of the northern Gulf of St. Lawrence stock. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54: 2388–2400.
- LE CREN, E.D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*, Oxford; 20: 201-219.
- LEHTONEN, H.; JOKIKOKKO, E. 1995. Changes in the heavily exploited vendace (*Coregonus albula* L.) stock in northern Bothnian Bay. *Advanced Limnology*, 46: 379-86.
- LIMA-JUNIOR, S. E.; GOITEIN, R. A. 2005. A variação sazonal da condição corpórea de *Pimelodus maculatus* está relacionada ao desenvolvimento gonadal? In: *Encontro Brasileiro de Ictiologia*, 16., , João Pessoa. Resumos... João Pessoa: Sociedade Brasileira de Ictiologia. p.: 171.
- MCMASTER, M. E.; VAN DER KRAAK, G. J.; PORTT, C. B.; MUNKITTRICK, K. R.; SIBLEY, P. K. SMITH, I. R.; DIXON, D. G. 1991. Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus commersoni*) population exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 21: 199-218.
- MILLER, P. A.; MUNKITTRICK, K. R.; DIXON, D. G. 1992. Relationship between concentrations of copper and zinc in water, sediment, benthic invertebrates, and tissues of white sucker (*Catostomus commersoni*) at metal-contaminated sites. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science*, 49: 978-84.

- MUNKITTRICK, K. R.; DIXON, D. G. 1988. Growth, fecundity, and energy stores of white sucker (*Catostomus commersoni*) from lakes containing elevated levels of copper and zinc. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science*, 45: 1355-65.
- PAPALI, M. A. (Coord.). 2000. Rio Paraíba do Sul Vale Vida. São José dos Campos: UNIVAP.
- PASIN, J. L. 1988. *O Vale do Paraíba: ontem e hoje*. Rio de Janeiro, AC & M, 78p.
- PFEIFFER, W. C.; FISZMAN, M.; MALM, O.; AZCUE, J. M. 1986. Heavy metal pollution in the Paraíba do Sul River, Brasil. *Science of the Total Environment*, 58: 73-79.
- PURDOM, C. E.; HARDIMAN, P. A.; BYE, V. J.; ENO, N. C, TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. 1994. Oestrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology*, 8: 275-285.
- QUALIDADE DOS RIOS. Disponível em: [www.cetesb.sp.gov.br/informações ambientais/qualidade-dos-rios/informações-rios.htm](http://www.cetesb.sp.gov.br/informações_ambientais/qualidade-dos-rios/informações-rios.htm). Acesso em: VII-III/2007.
- SANTIAGO, K. B. 2006. *Biologia Reprodutiva do pacu Myleus micans (Lütken, 1875) (Characidae: Serrasalminae) do rio São Francisco, região de Três Marias, Minas Gerais*. (Dissertação, mestrado em engenharia de pesca da Universidade Federal do Ceará, departamento de engenharia de pesca), Fortaleza; 84 p.
- SCOTT, S. G.; PANKHUST, N. W. 1992. Interannual variation in the reproductive cycle of the New Zealand snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider) (Spariidae). *Journal of Fish Biology*, London, 41: 685-696.
- SHEAHAN, D.; CLIFFE, S.; JOBLING, S.; HARRIES, J.; HURST, M.; MORRIS, S.; ROUTLEDGE, E.; SUMPTER, J.; WALDOCK, M. 2002. *The Identification of Oestrogenic Substances in Sewage Treatment Works Effluents. Part II: Industrial Effluents*. Environment Agency, Rio House, Waterside Drive, Aztec West Almondsbury, BRISTOL BS32 4UD. 49 p.
- SOUZA, T. S. 2005. *Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do Rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo, utilizando Oreochromis niloticus (Perciformes, cichlidae) como organismo-teste*. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- SUTTON, S. G.; BULT, T. P.; HAEDRICH, R. L. 2000. Relationships among fat weight, body weight, water weight, and condition factors in wild Atlantic salmon parr. *Transactions of the American Fisheries Society*, 129: 527-538.
- TEIXEIRA, T. P.; PINTO, B. C. T.; TERRA, B. F.; ESTILIANO, E. O.; GRACIA, D.; ARAÚJO, F. G. 2005. Diversidade das assembléias de peixes nas quatro unidades geográficas do rio Paraíba do Sul. *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, 95(4): 347-357.
- TYLER, A. V.; DUNN, R. S. 1976. Ration, growth, and measures of somatic and organ condition in relation to meal frequency in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, with hypotheses regarding population homeostasis. *Journal Fisheries Research Board of Canada*, 33: 63-75.
- VALDEZ DOMINGOS, F. X. 2004. Health status of *Cathorops spixii* (Ariidae) living in an impacted area in Paranaguá Bay, PR, Brasil. *International Congress on the Biology of Fish*. Tropical Hotel Resort, Manaus Brazil, August 1-5, pp 255-259.
- VAZZOLER, A. E. A. M. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM. 169 p.
- VIARENGO, A.; LAFAURIE, M.; GABRIELIDES, G. P.; FABBRI, R.; MARRO, A.; ROMEO, M. 2000. Critical evaluation of an intercalibration exercise undertaken in the framework of the MED POL biomonitoring program. *Marine Environmental Research*, 49: 1-8.

- VILA-GISPERT, A.; MORENO-AMICH R. 2001. Masslength relationship of Mediterranean barbel as an indicator of environmental status in South-west European stream ecosystems. *Journal of Fish Biology*, 59: 824–832.
- WEGE, G. J.; ANDERSON, R. O. 1978. Relative weight ( $W_r$ ): a new index of condition for largemouth bass. Pages 79-91 In G. D. NOVINGER and J. G. DILLARD, editors. *New approaches to the management of small impoundments*. American Fisheries Society; North Central Division, Special Publication 5, Bethesda, Maryland.
- WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; TRIBESS, T. B.; PEDROSA, R. C.; SOARES, C. H. L. 2001. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(6): 719-726.
- WOLFF, L. L. 2007. *Estrutura populacional, reprodução e dinâmica alimentar do lambari Astyanax sp. b (Characidae: Tetragonopterinae) em dois trechos do Rio das Pedras*. (Dissertação, mestrado em Ecologia e Conservação, setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná), Guarapuava – Paraná; 119p.

### **Capítulo III**

## **Biomarcadores e bioindicadores da condição de saúde de *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes, Pimelodidae) no reservatório do Funil, Brasil.**

## RESUMO

O reservatório do Funil recebe através do rio Paraíba do Sul uma crescente entrada de contaminantes xenobióticos provenientes das cidades do Estado de São Paulo, localizado à sua montante configurando poluição difusa de difícil mensuração. A hipótese a ser testada neste trabalho é se o reservatório do Funil funciona como um filtro de poluentes xenobioticos do rio Paraíba do Sul, melhorando a qualidade da água à jusante da represa. Neste trabalho foram usados dois biomarcadores (a atividade de etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD), medida fluorimetricamente na fração S9 hepática, e Frequência de Micronúcleos (MN), observada no citoplasma dos eritrócitos); e três bioindicadores (Índice hepato-somático – IHS, - Índice gonado-somático - IGS -, e Fator de Condição – FC -) em *Pimelodus maculatus*, uma espécie de peixe amplamente distribuída no sistema. Quatro locais do reservatório do Funil foram amostrados: 1 – rio acima do reservatório; 2 – parte superior do reservatório; 3 – parte inferior do reservatório; 4 – rio abaixo do reservatório. Atividade de EROD, Índice hepato-somático e Índice gonado-somático foram os indicadores biológicos que apresentaram diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) entre os locais. A atividade de EROD foi mais baixa no local 2 e mais alta no local 4; IHS foi mais baixo no local 2 e mais alto no local 1; e IGS foi mais baixo no local 4 e mais alto no local 1. De acordo com esses indicadores, a pior condição foi detectada no local 4, sugerindo que as águas que deixam o reservatório provavelmente possuem a maior presença de poluentes organoclorados. Este padrão não concorda com a hipótese de que o reservatório do Funil atua como um filtro para o sistema Paraíba do Sul.

**Palavras-chave:** Biomonitoramento, peixes, poluentes, reservatório.

## ABSTRACT

The Funil reservoir receives a large amount of xenobiotic contaminants from the Paraíba do Sul river (PSR) due the presence of large industrial municipalities in the São Paulo State, located nearby the river before the impoundment. The raised hypothesis is that Funil reservoir acts as a filter for the xenobiotic pollution of the PSR waters, improving river water quality after the dam. Two biomarkers, the ethoxyresorufin-*O*-deethylase activity (EROD), measured as fluorimetricly in S9 hepatic fraction, and Micronuclei Frequency (MN), observed in eritrocits of the cytoplasm, and three bioindicators, Hepatosomatic Index (HSI), Gonadosomatic Index (GSI) and Conduction Factor (FC) were used in *Pimelodus maculatus*, a fish species widely distributed in the system. Four sites were searched: 1 – river upstream the reservoir; 2 – upper reservoir; 3 – lower reservoir; 4 – river downstream the reservoir. EROD activity, hepatosomatic index and gonadosomatic index showed significant difference among the sites ( $P < 0.05$ ). EROD activity was lower at site 2 and higher at site 4; HSI was lower at site 2 and higher at site 1; and GSI was lower at site 4 and higher at site 1. According to these indicator, the lower conduction was detected at site 4, suggesting that waters downstream the reservoir probably have organochloride pollutants. This pattern do not confirm the hypothesis that Funil reservoir acts as a filter for the Paraíba do Sul river.

**Key-word:** Biomonitoring, fishes, pollutants, reservoir.

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das atividades agrícolas e industriais tem conduzido à síntese de compostos químicos, sobretudo orgânicos, cujas configurações estruturais envolvem átomos ou grupos funcionais raramente ou nunca encontrados naturalmente, com o objetivo de se obter propriedades únicas como a estabilidade térmica ou atividade biológica. Uma vez introduzidos no ambiente, tais compostos, denominados xenobióticos, podem se tornar poluentes caso determinem efeitos indesejáveis em consequência de sua toxicidade e concentração. Esta, por sua vez, depende de sua distribuição e transformação nos diferentes compartimentos ambientais (HUTZINGER & VEERKAMP 1981).

Medidas diretas de poluentes orgânicos fornecem informações detalhadas com respeito à distribuição espacial de contaminação (WOODHEAD et al. 1999), mas possui pouca indicação a respeito dos impactos biológicos destes compostos. Os recentes avanços no campo da ecotoxicologia têm fornecido um número de “biomarcadores” (parâmetros moleculares, celulares e/ou fisiológicos que significam exposição a, ou danos incorridos pelos poluentes ambientais) que calculam o impacto desses compostos tóxicos sobre a saúde dos organismos aquáticos expostos. O uso integrado desses biomarcadores tem sido sugerido como um efetivo meio de determinar o impacto da poluição no ambiente aquático (MC CARTHY & SCHUGART, 1990; REYNOLDS et al. 2003).

Segundo WALKER et al. (2001), um biomarcador é uma variação induzida por estressores em componentes ou processos celulares ou bioquímicos, estruturas ou funções que é mensurável em um sistema ou amostragem biológica, tal como uma variação nos flúidos no corpo da célula, tecidos ou órgãos dentro de um organismo; respostas enzimáticas e produção de metabólitos são exemplos de biomarcadores (VAN DER OOST et al. 2003), que podem ser relacionados com exposição a, ou efeitos tóxicos do ambiente (ADAM et al. 2001). De acordo com outros autores (MOORE & SIMPSON 1992; PACHECO & SANTOS 2002), a informação fornecida por cada biomarcador individualmente é de limitada relevância, devido à grande probabilidade de interpretações incorretas; por isso, biomarcadores são melhor usados como baterias selecionadas de testes mais do que individualmente. Já os bioindicadores são respostas aos efeitos ambientais que ocorrem aos maiores níveis de organização biológica que o sub-organismo, e eles podem ser medidos a níveis individuais, de população (sucesso reprodutivo, mortalidade, distribuição de tamanho, redução na abundância e biomassa), de comunidade (produção primária, interrupção do ciclo de nutrientes) ou mesmo a nível de ecossistemas (WALKER et al. 2001); medidas biométricas e mudanças na composição específica podem ser considerados como bioindicadores (LAM & WU 2003). Biomarcadores e bioindicadores são largamente usados para determinar a resposta de um organismo a agentes estressores, biomarcadores são mais específicos e com maior variabilidade de respostas comparados aos bioindicadores (ADAMS et al. 2001; WALKER et al. 2001).

A indução do citocromo P450 – monooxigenase dependente medida como atividade de EROD é um sensível indicador de exposição a poluentes em peixes (STEGEMAN & LECH 1991; STEGEMAN et al. 1997). Neste contexto, atividade de EROD tem sido usada como uma sensível sonda catalítica para determinar as respostas indutivas do sistema citocromo P450 em peixes (GOKSØYR & FÖRLIN 1992). Os mais potentes indutores para esta isoforma são os poluentes do grupo das bifenilas policloradas (BPCs), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) e dioxinas (e. g. tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) e diclorodifeniltricloroetano (DDT)) (JUNG et al. 2001; SCHLENK & DI GIULIO 2002). A indução da família CYP1A é remediada pelo receptor Aryl hidrocarboneto (AhR) (BILLIARD 2002). Seguindo sua interação com substâncias xenobióticas, é levado para o núcleo, onde ele é a causa do aumento da expressão dos genes para CYP1A e,

subseqüentemente, do aumento da síntese de proteínas deste citocromo. Muitos dos efeitos tóxicos de dibenzo-*p*-dioxinas cloradas (PCDDs) e PCBs co-planares mostram-se dependente de sua alta afinidade de ligação e subseqüente ativação do AhR (VAN DEN BERG et al. 1998). O modelo da atividade de CYP1A é a enzima etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD), que possui a capacidade para converter substratos em produtos demonstrando fluorescência, que pode então ser medida. Por isso, a atividade de EROD no fígado de peixes tem sido largamente utilizada como biomarcador de contaminação aquática por poluentes industriais tanto em águas continentais quanto em ambientes marinhos (NARBONNE et al. 1991; HAASCH et al. 1993; PARENTE et al. 2004; KIRBY et al. 2007).

Outro importante biomarcador utilizado neste trabalho foi a Frequência de Micronúcleos (MN), um dos métodos mais usados para se avaliar a genotoxicidade em sistemas aquáticos, tem sido extensivamente utilizado em espécies de peixes (AL-SABTI & METCALFE 1995; ÇAVAŞ & ERGENE GOZU-KARA 2005a, b). Apesar de mais simples do que a atividade de EROD, este método também é considerado confiável e sensível (AL-SABTI & METCALFE 1995). Micronúcleos são biomarcadores em nível celular quando a exposição do peixe a compostos genotóxicos pode causar a fragmentação de cromossomos, atrasos de cromossomos no momento da anáfase da mitose devido à falta do centrômero, dano, ou um defeito na citocinese.

Um dos bioindicadores a nível de órgão utilizados neste trabalho foi o Índice hepatossômico (IHS). Este índice também tem sido extensivamente utilizado como bioindicador de exposição a contaminantes (GOEDE & BARTON 1990). Devido à importância do fígado no processo de detoxificação, a exposição a contaminantes pode levar a um aumento no tamanho do fígado por hipertrofia (aumento no tamanho), hiperplasia (aumento no número) de hepatócitos (GOEDE & BARTON 1990); ou ambos. Estudos avaliando o tamanho relativo do fígado de peixes de locais contaminados e de referência freqüentemente utilizam o IHS, que expressa o peso do fígado como uma porcentagem do peso total do corpo (FACEY et al. 1999).

Outro índice organo-somático é o Índice gonado-somático (IGS). O IGS integra uma categoria de indicadores que fornece informação estrutural, mais do que funcional a respeito da saúde e estágio de maturação gonadal. Há evidência de que a maioria das espécies de animais sofre ciclo reprodutivo e, freqüentemente, variação no tamanho gonadal é observado através do ciclo (DE VLAMING et al. 1981). Conseqüentemente, calculando o peso gonadal como uma porcentagem do peso do corpo tem rotineiramente sido usado para se determinar a maturidade reprodutiva, assim como acessar mudanças gonadais em resposta a dinâmicas ambientais (e.g., mudanças sazonais) ou estresse exógeno (e. g., exposição a contaminantes). Há evidência significativa que exposição a vários poluentes ambientais pode resultar em alterações gonadais tais como diminuição do IGS, mudanças morfológicas, ou ambos.

O bioindicador com maior nível de organização utilizado neste trabalho foi o Fator de Condição, que é um bioindicador a nível de organismo. O Fator de Condição (LE CREN 1951) é um indicador quantitativo do grau de hígidez ou de bem estar do peixe, refletindo condições alimentares recentes. Ele é uma proporção do peso em relação ao comprimento; sendo uma medida indireta das reservas de energia do peixe. Algum estresse no ambiente natural pode ter um efeito na condição e saúde total do peixe, portanto, o Fator de Condição pode ser empregado como um bioindicador integrativo (SUTTON et al. 2000). Desde que começou a operar em 1969, o reservatório do Funil vem recebendo poluentes xenobióticos oriundos de efluentes domésticos e industriais das grandes cidades localizadas no Estado de São Paulo, maior pólo industrial da América Latina - situado à sua montante - dentre as quais se destacam os municípios de Jacarei, São José dos Campos, Taubaté, e Guaratinguetá. Nestas regiões estão localizadas grandes indústrias do ramo do petróleo, petroquímica, química e mecânica (ARAÚJO & NUNAN 2005). Além do mais, o cultivo de

arroz em grandes áreas no Município de Canas pode estar contribuindo para a contaminação do rio Paraíba do Sul por xenobióticos através da liberação de fertilizantes e pesticidas (resultados de trabalho ainda não publicado), agravando a poluição do reservatório do Funil por poluentes orgânicos. Apesar de não haver uma captação direta nesta represa, as águas que saem do Funil são desviadas para o sistema Ribeirão das Lajes-Guandu através da captação na represa de Santa Cecília (situada a jusante do reservatório do Funil). Essa captação representa cerca de 80 % da água consumida por mais de 14 milhões de pessoas no Grande Rio e adjacências; portanto, as águas que saem do reservatório do Funil têm contribuição direta sobre a qualidade da água consumida por essa população.

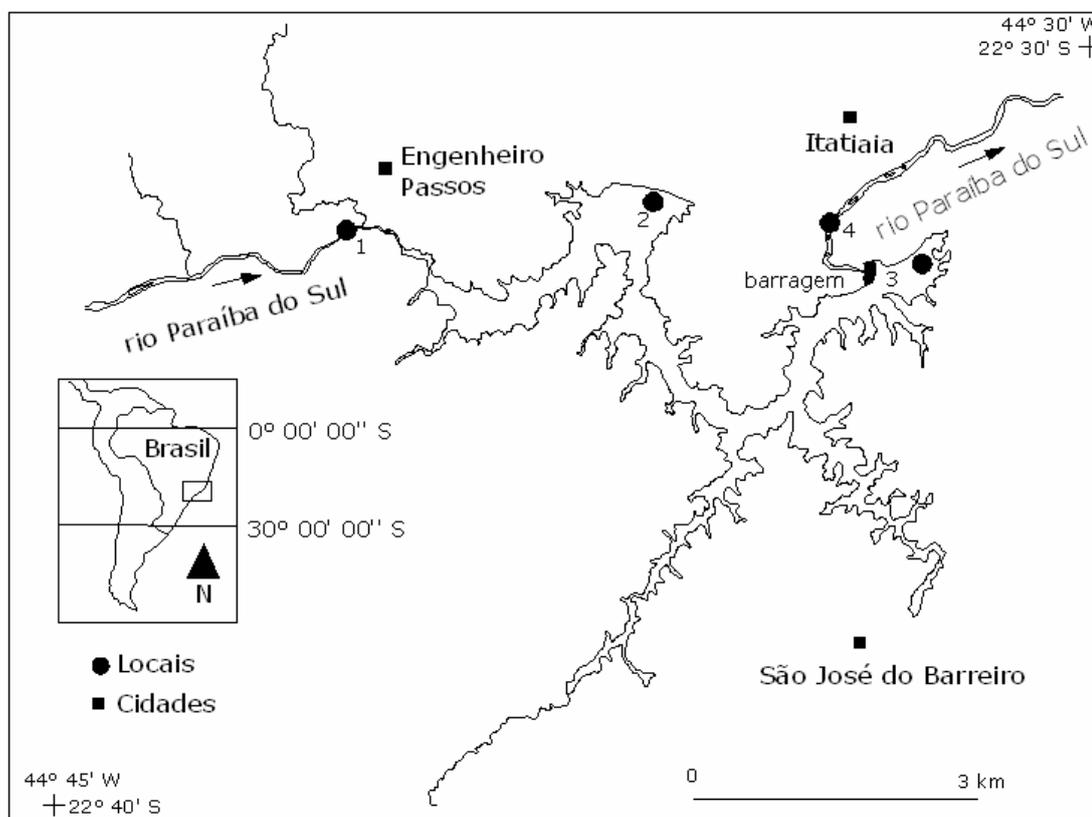
Segundo KAPLLER (2003) em países menos desenvolvidos grandes reservatórios funcionam como sistemas de tratamento de esgoto. Aeração natural resolve os problemas apenas parcialmente e muitos poluentes tendem a se acumular nos sedimentos. E ainda de acordo com (KLAPPER 1998) *Apud* BRANCO (2002), o reservatório do Funil atua como um filtro natural para poluentes e sedimentos, melhorando a qualidade da água rio abaixo.

O objetivo deste estudo é avaliar a qualidade ambiental ao longo de um perfil longitudinal do sistema rio Paraíba do Sul-reservatório do Funil, através de biomarcadores e bioindicadores em uma espécie de peixe Siluriforme de ampla distribuição, tanto do rio como no ambiente represado. Será testada a hipótese de que o reservatório funcione como filtro das águas que chegam do rio Paraíba do Sul com elevado nível de poluição, e que a situação a jusante do reservatório é de melhor qualidade quando comparada com a montante. Para isto, serão feitas as seguintes perguntas: 1. Existe diferenças nos biomarcadores e bioindicadores entre os locais amostrados que indique gradiente de poluição? 2. Os marcadores / indicadores e a espécie de peixe utilizada são eficientes para indicação de alterações ambientais? 3. O reservatório do Funil melhora a qualidade das águas do rio Paraíba do Sul?

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de estudo

O reservatório do Funil (Figura 1) localiza-se no Estado do Rio de Janeiro, na divisa com o Estado de São Paulo, no Município de Resende entre as coordenadas (22°30'S, 44°45'W; 44°30'W, altitude 440 m), onde represa o rio Paraíba do Sul no seu trecho médio. O rio Paraíba é o principal contribuinte da água que entra no sistema, que também tem contribuição de dois tributários: Santana e Lages. O reservatório apresenta uma superfície de 40 km<sup>2</sup>, profundidade média de 22 m, profundidade máxima de 70 m e volume total de 890 × 10<sup>6</sup>m<sup>3</sup>. O tempo de retenção é de 10 a 50 dias, de acordo com a estação do ano. A Temperatura varia de 23°C a 32°C, a pluviosidade é maior no período de verão chuvoso que não coincide como a cota do reservatório.



**Figura 1.** Mapa do reservatório do Funil com destaque para os quatro locais de estudo.

## 2.2 Coleta de dados

A espécie de estudo *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 foi escolhida por ser abundante no reservatório do Funil. Esta espécie possui hábito alimentar onívoro com tendência à carnivoria e apresenta hábito bentônico. As coletas foram realizadas em quatro locais, separadas da seguinte forma: local 1 – rio acima do reservatório; local 2 – parte superior do reservatório; local 3 – parte inferior do reservatório; local 4 – rio abaixo do reservatório. Estas coletas foram realizadas em novembro de 2006, período em que as fêmeas dessa espécie devem estar sexualmente maduras. Para a captura foram utilizadas redes de espera. Em cada local foram coletados 10 indivíduos adultos. Os peixes foram sexados, medidos, e para as fêmeas foi determinado macroscopicamente o estágio de maturação sexual. O comprimento total médio entre todos os espécimes foi de 25.93 cm, variando entre 17 e 34.5 cm (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de indivíduos, tamanho, sexo e estágio de maturação das fêmeas de *P. maculatus* examinados. FM = fêmeas maduras; F = fêmeas imaturas; M = machos.

Local	N	Comprimento (cm)	Sexo / Estádio de Maturação
1	10	25.5-31.0	FM
2	7	20.5-31.5	FM
2	3	18.7-28.5	F
3	4	27.0-34.5	FM
3	3	17.5-19.0	F
3	3	17.0-18.5	M
4	8	20.0-31.0	F
4	2	24.5-26.0	M

Os indivíduos foram pesados em balança eletrônica portátil *Acculab* VI-600 ou VI-200 e tomados os comprimentos totais e padrão. Os peixes foram anestesiados em banho de gelo e posteriormente dissecados para a retirada dos órgãos. O sexo foi determinado através de inspeção das gônadas, após incisão da cavidade celomática, os órgãos da cavidade abdominal foram cuidadosamente retirados e o fígado pesado em balança eletrônica portátil - *Acculab* VI-200, embalado em papel laminado previamente identificado, e rapidamente congelado em galão portátil de nitrogênio líquido (-192 °C) até a chegada ao laboratório.

## 2.3 Produtos Químicos

O substrato (etoxiresorufina), o produto da reação (resorufina),  $\beta$ -NADP, glicose-6-fosfato, glicose-6-fosfatodesidrogenase, albumina sérica bovina e o reagente de Bradford foram todos comprados de Sigma Chemical Company, St Louis MO, USA. TRIS,  $MgCl_2$  e outros sais foram de classe analítica e fornecidos por Merck SA Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil.

## **2.4 Trabalho de laboratório**

### **2.4.1 Biomarcadores**

#### **2.4.1.1 Determinação da Atividade Enzimática – EROD**

##### **2.4.1.2 Preparação da fração citosólica (S9) hepática**

Os fígados foram colocados em placa de Petri e descongelados em banho de gelo para a preparação da fração S9. A homogeneização de cada fígado foi realizada à temperatura de 4°C - em homogeneizadores de vidro do tipo Potter-Elvehjem com pistilo de teflon - em solução contendo TRIS 50mM, sacarose 250mM, EDTA 100mM e glicerol 20% num volume correspondente a 4 vezes o seu peso, a uma velocidade angular de aproximadamente 1200 rpm. O homogeneizado foi, em seguida, levado à centrifugação (*Eppendorf*®5804R) à 4°C e 9000g por 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante de cada amostra foi filtrado em gaze e transferido para 3 criotubos.

##### **2.4.1.3 Determinação da concentração de proteínas na fração S9**

Para a dosagem de proteínas totais na fração S9 usou-se o método colorimétrico descrito por Bradford et al. (1976), adaptado para microplaca, utilizando o corante Azul de Coomassie G-250 e leitura de densidade ótica (DO) a 595 nm (espectrofotômetro de microplaca Molecular Devices - Spectra Max Plus 384). As curvas de calibração foram realizadas com albumina sérica bovina – BSA Sigma Chemical Co - 1,4 mg/ml diluída em solução tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2) para se obter concentrações adequadas. Para determinação da concentração de proteínas na fração S9, esta foi diluída 1:30 e colocado 5 µl de amostra diluída na microplaca. Em seguida foram adicionados 250µl de reagente de *Bradford* – Merck em cada poço da microplaca. Cada valor de densidade ótica foi convertido em concentração de proteína, empregando-se a curva padrão. Foram feitas correções para cada fator de diluição, e as concentrações de proteína na fração S9 calculadas como a média obtida (média final) a partir do valor de cada réplica e expressas como mg de proteína / ml de S9. As determinações foram realizadas em triplicata considerando um coeficiente máximo de variação de 10%.

##### **2.4.1.4 Determinação da Atividade enzimática - EROD**

A determinação da atividade de EROD foi realizada em espectrofluorímetro de microplaca. Inicialmente, foi adicionado em cada poço tampão fosfato de potássio dibásico. Em seguida, a cada poço foi adicionado volume exato da fração S9 para a obtenção de 25 microgramas de proteínas totais por poço e o substrato. A microplaca foi, então, encubada por 2 minutos a 30°C e a reação iniciada pela adição de um sistema regenerador de elétrons em cada poço. A reação ocorreu durante 10 minutos, quando foi terminada pela adição de acetonitrila nos poços. O produto final, resorufina, foi quantificado em espectrofotômetro (Em: 550; Ex: 582).

##### **2.4.1.5 Determinação da Frequência de Micronúcleos (MN)**

No momento da dissecação dos peixes adicionou-se uma gota de sangue periférico de cada indivíduo em lâminas para microscopia devidamente identificadas e fez-se o esfregaço sanguíneo. As lâminas foram mantidas em estantes à temperatura ambiente até que estivessem secas.

Em laboratório, a coloração das lâminas foi feita com Giemsa por 6 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente até que o excesso de corante tivesse sido retirado completamente. Após a secagem das lâminas, os eritrócitos dos peixes foram observados ao microscópio óptico Olympus BX 45 no aumento final de 1000 vezes (imersão). Foram examinadas 1000 células em cada lâmina.

Foram consideradas apenas hemácias nucleadas com membranas nucleares e citoplasmáticas intactas. Os micronúcleos foram considerados como os corpúsculos que em relação ao núcleo apresentaram aproximadamente 1/3 do seu tamanho, estando nitidamente separados, com bordas distinguíveis, mesma cor e refringência.

#### **2.4.2 Bioindicadores**

Foram calculados três bioindicadores: Índice hepato-somático (IHS), Índice gonado-somático (IGS) e Fator de Condição (FC), através das seguintes equações:

$IHS = (\text{Peso do fígado} / \text{Peso total}) * 100$ ;  $IGS = (\text{Peso da gônada} / \text{Peso total}) * 100$ ;  $FC = (\text{Peso total} / \text{Comprimento padrão}^3) * 100$ .

#### **2.4.3 Análises estatísticas**

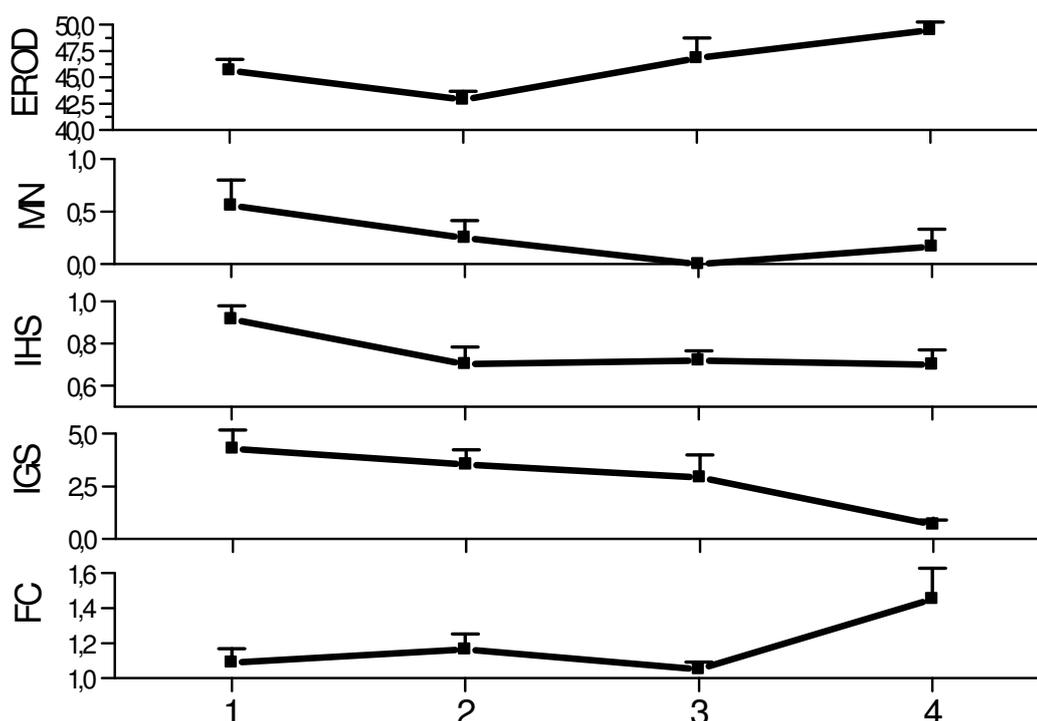
As médias dos biomarcadores e dos bioindicadores foram comparadas entre os quatro locais através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste “a posteriori” de Tukey ( $P < 0.05$ ) para determinação de que médias foram significativamente diferentes.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade de EROD mostrou os mais baixos valores para local 2 e os mais altos valores para o local 4 ( $P<0.05$ ) (Tabela 2, Figura 2). Vários estudos têm demonstrado um aumento na atividade de EROD em peixes expostos a diferentes poluentes, como HPAs, BPCs, e TCDDs (VAN DER WEIDEN et al. 1992; GADAGBUI et al. 1996; PACHECO & SANTOS 1998). Indução de atividade de EROD hepática foi também encontrada tanto nos microsossomos quanto na fração S9 do fígado de tilapia *Oreochromis niloticus* capturados em áreas poluídas (BAINY et al. 1999; PARENTE et al. 2004). Entretanto, informações a respeito de diferenças na atividade de EROD de peixes expostos a poluentes através de um perfil longitudinal de um reservatório são escassas.

**Tabela 2.** Diferenças entre os locais para os diferentes marcadores / indicadores biológicos. \*\* $P<0.001$  – Altamente significativo; \* $P<0.05$  – Significativo.

Marc. / Ind.	F	P	Tukey
EROD	4.9716	0.00300**	4>2
MN	2.0565	0.12870	NS
HIS	3.2001	0.03684*	1>2
IGS	4.6533	0.00787**	1>4
FC	2.8466	0.05109	NS



**Figura 2.** Gráficos com os valores dos cinco marcadores / indicadores em cada local.

Os maiores valores de indução no local 4 ( $49,47 \pm 3,75$ ) (média  $\pm$  desvio padrão; medidos em pmol res/mg prot/min) - rio Paraíba do Sul a jusante da barragem -, em relação aos valores do local 2 ( $42,87 \pm 4,14$ ) (média  $\pm$  desvio padrão) - início do reservatório - (Figura 2) podem sugerir que as águas do rio Paraíba do Sul após o Reservatório do Funil apresentam maiores níveis de contaminação por xenobióticos do que as que adentram ao reservatório. Tal fato pode ser uma consequência da própria natureza tanto estrutural quanto operacional da barragem do reservatório. Segundo PINTO (2001) óleo Ascarel - uma mistura de congêneres de BPCs - foi anteriormente empregada como um fluido insulador na maioria dos transformadores usados no Rio de Janeiro e adjacências. Devido à inadequada estocagem sob condições de céu aberto, o tempo leva à corrosão de containers de ascarel desse modo causando um vazamento de BPCs no solo e corpos d'água. Adicionalmente, este desperdício químico local pode ter produzido uma quantidade substancial de dibenzo-dioxinas-policloradas e furanos (PINTO 2001) *Apud* (PARENTE et al. 2004). De maneira geral, as aplicações mais importantes dos BPCs em termos de tonelagem foram os óleos de transformadores e os condensadores (DE VOOGT & BRINKMAN 1989). Em óleos de transformadores, os BPCs foram misturados com clorobenzenos (principalmente triclorobenzenos e tetraclorobenzenos) como solventes (SWAMI et al. 1992; DE VOOGT & BRINKMAN 1989). Segundo ALBERS (1995) HPAs podem ser introduzidos no ambiente através da geração de energia hidrelétrica.

As diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nos valores de EROD apresentadas entre os locais 4 (rio abaixo do reservatório) e 2 (parte superior do reservatório) também poderiam ser explicadas, em parte, pelas diferenças na quantidade de gordura visceral entre os indivíduos das diferentes sub-populações. De acordo com ALURU et al. (2004) ocorre uma redistribuição dos contaminantes lipofílicos dos depósitos de lipídio para tecidos críticos. O modo de ação do BPC pode envolver um impacto direto nas atividades da enzima ou impactar indiretamente pelo impingendo na mudança de energia no tecido do animal (VIJAYAN et al. 1997). Portanto, se houvesse uma quantidade muito maior de gordura visceral nos indivíduos

do local 4 em relação aos do local 2, essa diferença poderia estar colaborando para os maiores valores de indução do primeiro. Contudo, a pouca diferença nos valores deste parâmetro (2,93g e 2,55g, locais 4 – maior indução - e 2 – menor indução –, respectivamente), diminui essa possibilidade.

Um fator que pode estar colaborando para os menores valores de atividade de EROD no local 2 é a grande ocorrência de fêmeas ovadas neste local (70%). É bem conhecido que atividade de EROD em fêmeas sexualmente maduras é mais baixo do que em fêmeas imaturas ou fêmeas desovadas (ELSKUS et al. 1992), e que este fenômeno é ligado aos elevados níveis do hormônio sexual estrogênio e sua habilidade em atuar como supressor de P450/EROD (GRAY et al. 1991; SAKAMOTO et al. 2003). E tem sido registrado que fêmeas maduras sexualmente durante a produção do ovo e no período de desova têm níveis muito baixos, ou não induzíveis de CYP1A que foi associado com um alto nível de estrogênio, embora em machos maduros a indução de CYP1A tenha alcançado os maiores valores (FORLIN & HAUX 1990). Porém, neste trabalho todos os indivíduos coletados no local 1 foram de fêmeas maduras, e este local não apresentou diferença significativa quanto aos valores de atividade de EROD em relação ao local 4 (Tabela 1). Por outro lado, os baixos valores de expressão de atividade de monooxigenase hepática no local 2 também podem ser devido à possível concentração dos poluentes neste site tornando-o um ambiente de exposição crônica a xenobióticos, por isso, uma aumentada atividade de EROD pode ter sido mascarada. Neste contexto, de acordo com alguns autores (ELSKUS et al. 1999; NACCI et al. 1999; BRAMMELL et al. 2004), peixes que vivem em habitats cronicamente contaminados desenvolvem resistência a poluentes. Esses peixes falham em expressar elevados níveis de CYP1A quando expostos a compostos indutores.

De acordo com SCOTT & SLOMAN (2004) os diferentes padrões de alterações, inerentes a cada composto e a cada organismo, possibilitam que o efeito de uma variedade de substâncias possa ser distintamente avaliado em diversos organismos através de uma resposta integrada dos mesmos a diferentes poluentes presentes no ambiente, já que tais efeitos são precedidos por mudanças sub-letais em moléculas e células.

Entre os bioindicadores o IHS apresentou os maiores valores para o local 1 (rio antes do reservatório) com diferença significativa em relação local 2 (parte superior do reservatório), que apresentou os menores valores (Tabela 2, Figura 2). Os menores valores de IHS no local 2 coincidem com os menores valores de EROD que, como já foi visto, também apresentaram os menores valores neste local. Tais resultados quanto ao IHS, que é dos índices organo-somáticos, um dos mais frequentemente associados com exposição a contaminantes (ADAMS & MCLEAN 1985), sugerem que o local 1 seja o mais alterado por poluentes, enquanto que os menores valores observados para o local 2 insinuam menores concentrações de químicos xenobióticos neste local. Alguns autores utilizando o IHS registraram maiores valores deste índice em locais mais alterados (ADAMS & RYON 1994; KARELS et al. 1998; VAN DER OOST et al. 1996; BILLIARD & KHAN 2003). Por outro lado, segundo (FACEY et al. 2005; VIJAYAN et al. 2006) a redução no IHS pode ser devido à diminuição no tamanho do fígado devido a uma menor armazenagem de gordura mais do que uma melhora da qualidade ambiental. Os mesmos autores relacionam a menor armazenagem de gordura com uma menor disponibilidade alimentar. Entretanto, como já foi discutido neste trabalho, o local 2 é o que apresenta o maior aporte de nutrientes, portanto, a acentuada diminuição do valor de IHS neste local provavelmente não está relacionada à carência alimentar.

Muitos estudos dos efeitos de sistemas de tratamento de efluentes da produção de papéis registram um concomitante aumento no IHS em peixe com alta atividade de EROD (BANKEY et al. 1994; HUUSKONEN & LINDSTRÖM-SEPPA 1995; LARSSON et al. 1988). Tipicamente, aumentos no peso do fígado seguindo exposição ao receptor agonista, aril hidrocarboneto (Ah), é devido a uma proliferação do retículo endoplasmático liso como um

resultado da síntese aumentada de proteínas relacionadas ao CYP1A (LARSSON et al. 1988). Neste contexto, os resultados deste trabalho mostraram o local 2 com menores valores tanto de IHS quanto de atividade de EROD. Por outro lado, a maior expressão de CYP1A verificada para o local 4 não foi acompanhada pelo IHS, que apresentou os maiores valores para o local 1. Provavelmente os valores da atividade de monooxigenase hepática no local 1 não acompanharam os do IHS devido às influências do estágio de maturação. O fato de todos os indivíduos coletados no local 1 serem de fêmeas ovadas provavelmente contribuiu para a menor expressão de CYP 1A neste site, já que o citocromo P450 está envolvido na síntese de hormônios e outros esteróides, o que pode significar um maior comprometimento deste sistema nos períodos reprodutivos (PEDROSA et al. 2001). Este fato poderia explicar, em parte, a menor expressão da isoforma CYP4501A no local 1 em relação ao local 4, considerando que no primeiro o sistema citocromo P450, como um todo, estaria envolvido em processos metabólicos basais. Por isso uma aumentada atividade de enzimas de biotransformação de xenobióticos no local 1 pode ter sido mascarada pelos aumentos fisiológicos que são associados com o status reprodutivo (isto é particularmente verdade no caso de fêmeas devido ao aumento na síntese de vitelogenio (VTG)) (SEPÚLVEDA et al. 2004).

Neste contexto, uma redução no IGS e prejuízo no desenvolvimento gonadal (crescimento e patologias estruturais) têm sido registrados em resposta a inseticidas organofosfato em fêmeas de “striped catfish” (*Mystus vittatus*) (CHOUDHURY et al. 1993). SAKAMOTO et al. (2003) estudando a indução do citocromo P450 e status de alteração gonadal em (*Cyprinus carpio*) associado com a descarga de efluentes contaminados por dioxinas para o rio Hikiji, Japão encontraram que o IGS para fêmeas do local contaminado foram 2.1 vezes mais baixo do que para fêmeas do local de referência. SEPÚLVEDA et al. (2004) avaliando os efeitos de sistemas de tratamento de efluentes de papel (BKME) nos parâmetros reprodutivos de *Micropterus salmoides floridanus* observaram relação inversa entre VTG e IGS e atividade de EROD em fêmeas.

Tais resultados concordam com os verificados para o IGS neste trabalho, onde os maiores valores deste índice foram verificados para o local 1 e os menores para o local 4, que apresentou os maiores valores de atividade de EROD, reforçando a possibilidade de que o local 4 apresente maior presença de compostos xenobióticos. Além do mais, o fato de não ter ocorrido nenhuma fêmea madura no local 4 também pode sugerir que estes poluentes possam estar associados com efeitos antiestrogênicos nesta espécie. De acordo com GRAY et al. (1991) o estrogênio é o mais potente agente endógeno que afeta a atividade de CYP1A. E tem sido registrado que fêmeas sexualmente maduras durante a produção do ovo e desova têm um nível de CYP1A muito baixo, não induzível, que foi associado com alto nível de estrogênio, embora em um macho maduro a indução de CYP1A alcançou os maiores valores (FORLIN & HAUX 1990). Um dos principais papéis do estrogênio, um dos hormônios esteróides de maior importância, é de estimular o fígado a produzir a proteína da gema, vitelogenio, que é então incorporado no desenvolvimento do ovócito e é responsável pelo maior aumento no peso gonadal nas fêmeas.

Segundo alguns autores (STEGEMAN et al. 1992; BAINY 1993) é necessário clareza na interpretação dos resultados, de forma que seja possível diferenciar resultados devidos à exposição aos contaminantes de oscilações fisiológicas normais. Neste sentido, de considerável interesse em toxicologia aquática é se alterações na atividade de EROD hepática são relacionadas a mudanças nas funções reprodutivas ou outras funções fisiológicas. Múltiplos caminhos para possíveis efeitos toxicológicos têm sido sugerido desde que o papel biológico da CYP1A inclui o metabolismo de compostos xenobióticos, assim como também, a síntese e degradação de compostos endógenos, tais como esteróides e compostos derivados de esteróides, ácidos graxos, e seus derivados (SAKAMOTO et al. 2003). Numerosos estudos

têm registrado alterações nas concentrações de hormônios esteróides em peixes expostos a poluentes industriais e a alteração foi diretamente conectada com a interrupção da função reprodutiva (MCMASTER et al. 1991; MUNKITTRICK et al. 1992).

Cada um dos indicadores acima possui vantagens e desvantagens, mas analisá-los juntos pode ajudar a superar o ponto fraco individual de algum teste. Individualmente, os biomarcadores e bioindicadores podem fornecer apenas informações limitadas quanto aos efeitos de estressores ambientais. Entretanto, quando usados juntos, os indicadores biológicos utilizados neste trabalho podem fornecer um relato mais holístico da saúde do animal e, por extensão, do ambiente.

Neste contexto, o fato do local 4 ter apresentado maiores valores de atividade de EROD e menores valores de IGS pode ser um indicativo de maior presença de xenobióticos antiestrogênicos neste local, já que para ambos os indicadores tais resultados estão geralmente associados a piores condições ambientais, o que pode significar que as águas que saem do reservatório estão mais poluídas por compostos xenobióticos do que as que nele adentram, e isso pode significar tanto um risco para as populações de *P. maculatus* e outras espécies de peixes no rio Paraíba do Sul a jusante do reservatório, como para a saúde das pessoas que utilizam essas águas para consumo. Tais resultados podem ser decorrência da própria estrutura e funcionamento da barragem, que pode estar sendo responsável pela liberação de poluentes organoclorados tais como BPCs e HPAs durante o processo de produção de energia hidrelétrica. Por outro lado, os maiores valores de IHS no local 1 sugerem o contrário, pois os maiores valores deste índice geralmente estão relacionados a maiores efeitos tóxicos causados por poluentes. Os menores valores tanto de IHS quanto de EROD para o local 2 podem estar significando menor quantidade de poluentes neste site, esta situação possivelmente deva-se aos efeitos remediadores do processo de fotólise que deve ser maior neste local devido à sua topografia, após uma grande curva, o que diminui o fluxo das águas, aumentando o tempo de exposição destas aos raios solares, o que pode estar contribuindo para a diminuição da toxicidade de alguns poluentes orgânicos no início do reservatório. Por outro lado, pelo mesmo motivo o local 2 pode ser onde os poluentes orgânicos primeiramente se acumulam, já que substâncias lipofílicas associam-se ao material particulado, especialmente ao sedimento, o que pode ter tornado este local um habitat de exposição crônica, fazendo com que os peixes que vivem ali tenham desenvolvido resistência a poluentes e não expressem a indução de CYP1A.

Tais resultados não concordam com a hipótese de que o Reservatório do Funil serve como um filtro para contaminantes organoclorados das águas do rio Paraíba do Sul da região a montante para a jusante da represa.

## 4 CONCLUSÕES

1. Os maiores valores de atividade de EROD e menores valores de IGS no local 4 sugerem que as águas que saem do reservatório do Funil possuem maior quantidade de poluentes organoclorados do que as que adentram ao reservatório, e que tais poluentes podem estar prejudicando a reprodução de *Pimelodus maculatus* neste local, já que muitos desses compostos possuem propriedades antiestrogênicas.
2. Os menores valores de atividade de EROD e IHS no local 2 podem ser o resultado da grande presença de fêmeas maduras, ou então da possibilidade dos peixes que habitam este local terem adquirido resistência à poluição devido à exposição crônica e por isso expressem pouca indução de CYP1A.
3. A indução da atividade de EROD hepática é um efetivo marcador de poluentes xenobióticos em *P. maculatus* e pode estar associado com efeitos antiestrogênicos nesta espécie.
4. O uso integrado de diferentes biomarcadores e bioindicadores mostrou-se eficiente para avaliação da qualidade ambiental do reservatório do Funil.
5. O reservatório do Funil não serve como um filtro para contaminantes organoclorados das águas do rio Paraíba do Sul da região a montante para jusante da represa.

## 5 REFERÊNCIAS

- ADAM, S.; PAWERT, M.; LEHMANN, R.; ROTH, B.; MÜLLER, E.; TRIEBSKORN, R.; 2001. Physicochemical and morphological characterization of two small polluted streams in southwest Germany. *Journal of Aquat Ecosystem Stress and Recovery*, 8: 179–94.
- ADAMS, S. M.; MCLEAN, R. B. 1985. Estimation of largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacepede, growth using the liver somatic index and physiological variables. *Journal of Fish Biology*, 26: 111-26.
- ADAMS, S. M.; RYON, M. G. 1994. A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant-related stress on fish populations. *Journal of Aquatic Ecosystem and Health*, 3: 15-25.
- ALBERS, P. H. 1995. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J. (Eds.). *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton: Lewis publishers. p. 330-355.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343: 121–135.
- ALURU, N.; JØRGENSEN, E. H.; MAULE, A. G.; VIJAYAN, M. M. 2004. PCB disruption of the hypothalamus-pituitary-interrenal axis involves brain glucocorticoid receptor downregulation in anadromous Arctic charr. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 287: R787–R793.
- ARAÚJO, J. R. S.; NUNAN, G. W. 2005. *Ictiofauna do rio Paraíba do Sul: danos ambientais e sociais causados por barragens, hidrelétricas e poluição no trecho fluminense*. CPDMA-ALERJ.
- BAINY, A. C. D. 1993. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. *Ciência e Cultura*, 45: 10-11.
- BAINY, A. C. D.; Woodin, B. R.; Stegeman, J. J. 1999. Elevated levels of multiple cytochrom P450 forms in tilapia from Billings reservoir-São Paulo, Brazil. *Aquatic Toxicology*, 44: 289–305.
- BANKEY, L. A.; Van Veld, P. A.; Borton, D. L.; LaFleur, L.; Stegeman, J. J.; 1994. Responses of cytochrome P4501A in freshwater fish exposed to bleached kraft mill effluent in experimental stream channels. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, 52: 439–447.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- BRAMMELL, B. F.; PRICE, D. J.; BIRGE, W. J.; ELSKUS, A. A. 2004. Apparent lack of CYP1A response to high PCB body burdens in fish from a chronically contaminated PCB site. *Marine Environmental Research*, 58: 251–255.
- BILLIARD, S. M.; HAN, M. E.; FRANKS, D. G.; PETERSON, R. E.; BOLS, N. C.; HODSON, P. V. 2002. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). *Comparative Biochemistry and Physiology, Pt B* 133: 55-68.
- BILLIARD, S. M.; KHAN, R. A., 2003. Chronic stress in cunner, *Tautoglabrus adspersus*, exposed to municipal and industrial effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 9–18.
- ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GOZUKARA, S., 2005a. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*, 74: 264–271.

- ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GOZUKARA, S., 2005b. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46: 64–70.
- CHOUDHURY, C.; RAY, A.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, S. 1993. Non-lethal concentrations of pesticide impair ovarian function in the freshwater perch, *Anabas testudineus*. *Environmental Biology of Fishes*, 36: 319–24.
- DE VLAMING, V. L.; GROSSMAN, G.; CHAPMAN, F. 1981. On the use of gonadosomatic index. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 73A: 31–9.
- DE VOOGT, P.; BRINKMAN, U. A. TH. 1989. Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. In: *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxines and related products*. Kimbrough, R.D., Jensen, A.A., [Eds] Topics in environmental health, Vol.4. Publ. By Elsevier Science Publishers B.V.: 3–29
- ELSKUS, A. A.; STEGMAN, J. J.; PRUELL, R. J. 1992. Endogenously-mediated pretranslational suppression of cytochrome P4501A in PCB-contaminated flounder. *Marine Environmental Research*, 34: 97–101.
- ELSKUS, A. A.; MONOSSON, E.; MCELROY, A. E.; STEGMAN, J. J.; WOLTERING, D. S. 1999. Altered CYP1A expression in *Fundulus heteroclitus* adults and larvae: a sign of pollutant resistance? *Aquatic Toxicology*, 45: 99–113.
- FACEY, D. E.; LECLERC, C.; DUNBAR, D.; ARRUDA, D.; PYZOCHA, L.; BLAZER, V. 1999. *Physiological indicators of stress among fishes from contaminated areas of Lake Champlain*. Pages 349–359 In MANLEY, T. O. and MANLEY, P. L. editors. Lake Champlain in transition: from research toward restoration—water science and application, 1. American Geophysical Union, Washington, D.C.
- FACEY, D. E.; BLAZER, S. V.; GASPER, M. M.; TURCOTTE, L. C. 2005. Using Fish Biomarkers to Monitor Improvements in Environmental Quality. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17: 263–266.
- FORLIN, L.; HAUX, C. 1990. Sex differences in hepatic cytochrome P-450 monooxygenase activities in rainbow trout during an annual reproductive cycle. *Journal of Endocrinology*, 124: 207–213.
- GADAGBUI, B. K. M.; ADDY, M.; GOKSØYR, A. 1996. Species characteristics of hepatic biotransformation enzymes in two tropical freshwater teleosts, tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mudfish (*Clarias anguillaris*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114C: 201–211.
- GOEDE, R. W.; BARTON, B. A. 1990. Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. Pages 93–108 In Adams, S. M. editor. *Biological indicators of stress in fish*. American Fisheries Society, Symposium 8, Bethesda, Maryland.
- GOKSØYR, A.; FÖRLIN, L. 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology, and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 22: 287–311.
- GRAHAM, R. S.; KATHERINE, A. S. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, 68: 369–392.
- GRAY, E. S.; WOODIN, B. R.; STEGEMAN, J. J. 1991. Sex differences in hepatic monooxygenases in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and scup (*Stenotomus chrysops*) and regulation of P450 forms by estradiol. *Journal of Experimental Zoology*, 259: 330–342.
- HAASCH, M. L.; PRINCE, R.; WEJKSNORA, P. J.; COOPER, K. R.; LECH, J. J.; 1993. Caged and wild fish: induction of hepatic cytochrome-P450 (CYP1A1) as an environmental biomonitor. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 885–895.

- HUTZINGER, O.; VEERKAMP, W. 1981. Xenobiotic chemicals with pollution potential. *In: Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds*. Eds. LEISINGER, T.; COOK, A. M.; HÜTTER, R.; NUESCH, J. FEMS Symposium. N° 12. Academic Press. pp. 3-45
- HUUSKONEN, S.; LINDSTRÖM-SEPPA, P. 1995. Hepatic cytochrome P4501A and other biotransformation activities in perch (*Perca fluviatilis*): the effects of unbleached pulp mill effluents. *Aquatic Toxicology*, 31: 27–41.
- JUNG, D. K.; KLAUS, T.; FENT, K.; 2001. Cytocrome P450 induction nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes, and binary mixtures in fish hepatoma cell line PLHC-1. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 149-159.
- KARELS, A. E.; SOIMASUO, M.; LAPPIVAARA, J.; LEPPANEN, H.; AALTONEN, T.; MELLANEN, P.; OIKARI, A. O. J. 1998. Effects of EFC-bleached kraft mill effluent on reproductive steroids and liver MFO activity in populations of perch and roach. *Ecotoxicology*, 7: 123-132.
- KIRBY, M. F.; SMITH, A. J.; ROOKE, J.; NEALL, P.; SCOTT, A. P.; KATSIADAKI, I. 2007. Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquatic Toxicology*, 81: 233–244.
- KLAPPER, H. 1998. Water quality problems in reservoirs of Rio de Janeiro, Minas Gerais and São Paulo. *International Review of Hydrobiology*, 83: Special Issue: 93–102.
- KLAPPER, H. 2003. Technologies for lake restoration. *Journal of Limnology*, 62(Suppl. 1): 73-90.
- LAM, P. K. S.; WU, R. S. S. 2003. Use of biomarkers in environmental monitoring. Japan: STAP workshop on the use of bioindicators, biomarkers and analytical methods for the analysis of POPs in developing countries.
- LARSSON, A.; ANDERSSON, T.; FÖRLIN, L.; HARDIG, J. 1988. Physiological disturbances in fish exposed to bleached kraft mill effluents. *Water Science and Technology*, 20: 67–76.
- LE CREN, E. D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology, Oxford*, 20: 201-219.
- MCCARTHY, J. F.; SCHUGART, L. R., 1990. Biological Markers of Environmental Contamination. pp 3-14 *In: (MCCARTHY, J. F., & SCHUGART, L. R., Eds). Biological Markers of Environmental Contaminants*. Lewis, Boca Raton, FL.
- MCMASTER, M. E.; VAN DER KRAAK, G. J.; PORTT, C. B.; MUNKITTRICK, K. R.; SIBLEY, P. K.; SMITH, I. R.; DIXON, D. G. 1991. Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus commersoni*) population exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 21: 199–218.
- MOORE, M. N., SIMPSON, M. G. 1992. Molecular and cellular pathology in environmental impact assessment. *Aquatic Toxicology*, 22: 313-22.
- MUNKITTRICK, K. R.; VAN DER KRAAK, G. J.; MCMASTER, M. E.; PORTT, C. B. 1992. Response of hepatic MFO activity and plasma sex steroids to secondary treatment of bleached kraft pulp mill effluent and mill shutdown. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11: 1427–1439.
- NACCI, D.; COIRO, L.; CHAMPLIN, D.; JAYARAMAN, S.; MCKINNEY, R.; GLEASON, T. R.; MUNNS, W. R.; SPECKER, J. L.; COOPER, K. R. 1999. Adaptations of wild populations of the estuarine fish *Fundulus heteroclitus* to persistent environmental contaminants. *Marine Biology*, 134: 9–17.

- NARBONNE, J. F.; GARRIGUES, P.; RIBERA, D.; RAOUX, C.; MATHIEU, A.; LEMAIRE, P.; SALAUN, J. P.; LAFAURIE, M. 1991. Mixed function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean sea. *Comp. Biochem. Physiol. C: Environmental Toxicology and Pharmacology*, 100: 37–42.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A., 1998. Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40: 71–76.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A. 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla Anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53: 331-347.
- PARENTE, T. E.; DE-OLIVEIRA, A. C.; SILVA, I. B.; ARAUJO, F. G.; PAUMGARTTEN, F. J. 2004. Induced alkoxyresorufin-O-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere*, 54: 1613-1618.
- PEDROSA, R. C. 2001. Biomonitoramento do estuário do rio Itajaí-açu/SC utilizando a indução do citocromo P450 e Glutadiona S – Transferase como biomarcadores. In: ROSANE B. C. DE MORAES, MIRIAN A. C. CRAPEZ, WOLFGANG C. PFEIFFER, MARCOS FARINA, VALÉRIA L. TEIXEIRA, AFONSO C. D. BAINY. (Org.). Efeitos de poluentes em organismos marinhos. São Paulo: *Ciência e Arte*, v., p. 35-48.
- PINTO, E.M., 2001. *Principais dificuldades de gerenciamento de resíduos industriais no estado do Rio de Janeiro. O caso CENTRES - Centro Tecnológico de Resíduos, localizado no município de Queimados*. MSc thesis. Federal Fluminense University, Niterói, RJ, Brazil, 133 pp.
- REYNOLDS, W. J.; FEIST, S. W.; JONES, G. J.; LYONS, B. P.; SHEAHAN, D. A.; STENTIFORD, G. D. 2003. Comparison of biomarker and pathological responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) induced by ingested polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination. *Chemosphere*, 52: 1135-1145.
- SAKAMOTO, K. Q.; NAKAI, K.; AOTO, T.; YOKOYAMA, A.; USHIKOSHI, R.; HIROSE, H.; ISHIZUKA, M., KAZUSAKA, A., FUJITA, S., 2003. Cytochrome P450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan. *Chemosphere*, 51: 491–500.
- SCHLENK, D.; DI GIULIO, R. T. 2002. Biochemical responses as indicators of aquatic ecosystem health. In: MARCHALL ADAMS, s (Ed.): *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*. AFS, Bethesda, pp. 14-17
- SEPÚLVEDA, M. S.; GALLAGHER, E. P., WISER, C. M., GROSS, T. S., 2004. Reproductive and biochemical biomarkers in largemouth bass sampled downstream of a pulp and paper mill in Florida. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 431-440.
- STEGEMAN, J. J.; LECH, J. J. 1991. Cytocrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environmental Health Perspectives*, 90: 101-109.
- STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R. T. FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. 1992. Molecular responses to enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGET, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE, J. R.; BERGMAN, H. L. (Eds.) *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. Chelsea: SETAC/Lewis Publishers, p. 235-335.

- STEGEMAN, J. J.; WOODIN, B. R.; SINGH, H.; OLEKSIK, M. F.; CELANDER, M. 1997. Cytochromes P450 (CYP) in tropical fishes: catalytic activities, expression of multiple CYP proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fishes from Bermuda. *Comparative Biochemistry and Physiology, C* 116: 61–75.
- SUTTON, S. G.; BULT, T. P. HAEDRICH, R. L. 2000. Relationships among fat weight, body weight, water weight, and condition factors in wild Atlantic salmon parr: *Transactions of the American Fisheries Society*, 129: 527-538.
- SWAMI, K.; NARANG, A. S.; NARANG, R. S.; EADON, G. A. 1992. Thermally induced formation of PCDD and PCDF from tri- and tetrachlorobenzene in dielectric fluids. *Chemosphere*, 24(12): 1845-1853.
- VAN DEN BERG, M.; BIRNBAUM, L.; BOLSVELD, A. T. C.; BRUNSTRÖM, B.; COOK, P.; FEELEY, M.; GIESY, J. P.; HANBERG, A.; HASEGAWA, R.; KENNEDY, S. W.; KUBIAK, T.; LARSEN J. C.; VAN LEEUWEN, F. X. R.; DIJEN, L. A. K.; NOLT, C. PETERSON, R. E.; POELLINGER, L.; SAFE, S.; SCHRENK, D.; TILLIT, D.; TYSKLIND, M.; YOUNES, M.; WAERN, F.; ZACHAREWISKI, T. 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 106: 775-792.
- VAN DER OOST, R.; OPPERHUIZEN, A.; SATUMALAY, K.; HEIDA, H.; VERMEULEN, N. P. E. 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquatic Toxicology*, 35(1): 21-46.
- VAN DER OOST, R.; BEBER, J.; VERMEULEN, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57–149.
- VAN DER WEIDEN, M. E. J.; VAN DER KOLK, J.; BLEUMINK, R.; SEINEN, W.; VAN DER BERG, M. 1992. Concurrence of P450 1A1 induction and toxic effects alter administration of a low dose of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 24: 123–142.
- VIJAYAN, M. M.; PEREIRA, C.; FORSYTH, R. B.; KENNEDY, C. J.; IWAMA, G. K. 1997. Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with  $\beta$ -naphthoflavone. *Life Sciences*, 61: 117–127.
- VIJAYAN, M. M.; ALURU, N.; MAULE, G. A.; JØRGENSEN, H. E. 2006. Fasting Augments PCB Impact on Liver Metabolism in Anadromous Arctic Char. *Toxicological Sciences*, 91(2): 431–439.
- WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. 2001. editors. *Principles of ecotoxicology*. 2nd ed. Nueva York, USA: TAYLOR & FRANCIS; p. 163–78.
- WOODHEAD, R. J.; LAW, R. J.; MATTHIESSEN, P. 1999. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in surface sediments around England and Wales, and their possible biological significance. *Marine Pollution Bulletin*, 38(9): 773-790.

## Capítulo IV

**Efeitos da beta-naftoflavona e dimetilbenzoantraceno no metabolismo hepático de *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae), e frequência de ocorrência de micronúcleos**

## RESUMO

Os efeitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) tais como beta-naftoflavona (BNF) e dimetilbenzoantraceno (DMBA) foram investigados separadamente em uma espécie de peixe tropical (*Geophagus brasiliensis*). Os peixes foram expostos por 3 dias a 50 mg/Kg via injeção intraperitoneal (i. p.). No dia 3 de exposição a atividade de etoxiresorufina-*O*-desetilase mostrou-se significativamente elevada no grupo tratado com BNF em relação ao grupo controle (não tratado), e no mesmo período a Frequência de Micronúcleos mostrou-se significativamente elevada no grupo tratado com DMBA em relação ao grupo controle. Tais resultados sugerem uma modulação da BNF no metabolismo de biotransformação em *G. brasiliensis*, expressa como aumento da atividade de EROD hepática; assim como a modulação do DMBA na genotoxicidade da espécie, expressa como aumento da Frequência de Micronúcleos (MN). Concluímos que *Geophagus brasiliensis* é uma espécie apropriada para estudos de biomonitoramento em países tropicais.

**Palavras chave:** Biomarcadores, CYP1A, EROD, peixes.

### ABSTRACT

Effects of polycyclic hydrocarbons aromatics (HPAs) such as  $\beta$ -naphthoflavone (BNF) and dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) were investigated in *Geophagus brasiliensis*, a specie widely distributed in brazilian rivers. Fishes were exposed during 3 days to 50 mg/Kg via intraperitoneal injection (i. p.). In the day 3 of exposure ethoxyresorufin-*O*-deethylase activity was significantly high in the group treated with BNF compared with the control group, while the Micronuclei Frequency was significantly high in the group treated with DMBA compared with the control group. Such results suggest that modulation of BNF occur in biotransformation metabolism, indicated by increasing hepatic EROD activity. Modulation of DMBA in genotoxicity was indicated by increasing Micronuclei Frequency (MN). *Geophagus brasiliensis* showed to be a specie suitable for biomonitoring studies in tropical areas.

**Key words:**  $\beta$ -naphthoflavone, CYP1A, dimethylbenz(a)anthracene, EROD, *Geophagus brasiliensis*, micronuclei.

## 1 INTRODUÇÃO

Organismos aquáticos, sabidamente peixes, vivendo em ambientes contaminados com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) podem absorver estes compostos da água através da guelra e pela ingestão de sedimentos ou alimentos contaminados (VARANASI et al. 1989). Contaminação por HPAs é um dos principais problemas ambientais porque além de bioconcentrarem-se em muitos animais aquáticos (CONNEL 1990), eles possuem propriedades mutagênicas (MYERS et al. 1991) e carcinogênicas (GRIMMER 1983; STEIN et al. 1990).

Em anos recentes, tem havido um aumento na preocupação sobre a possível degradação de ambientes aquáticos por poluição química. Isto tem levado a um aumento nos esforços para compreender a relação causal entre: exposição a contaminantes e efeitos biológicos mensuráveis em organismos aquáticos (DE FLORA et al. 1991). O uso de peixes como organismos em programas de monitoramento ambiental e em pesquisas investigando a resposta ao insulto tóxico é agora bem estabelecido. Entretanto, ainda há uma brecha importante no corrente conhecimento concernente à medida dos biomarcadores e sua ligação com os níveis de contaminantes no ambiente (GOKSØYR et al. 1996). Tal deficiência mostra-se particularmente grave em países tropicais em desenvolvimento, onde estudos tanto de biomonitoramento quanto dos efeitos da exposição a contaminantes em espécies de peixes nativas são escassos.

A síntese das isoformas específicas do citocromo P450 tal como o citocromo P450 1A é bem associada com atividades como etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) e mostrou-se como sendo especificamente modulada (induzida ou inibida) em fígado de peixes pelos (HPAs) (STEGEMAN & KLOEPPER-SAMS 1987). A biotransformação de químicos lipofílicos a compostos mais solúveis em água é um requisito para sua detoxificação e excreção em invertebrados e em peixes (GOKSØYR & FÖRLIN, 1992). Particularmente, a indução do sistema enzimático citocromo P450 (CYP450), uma superfamília de hemoproteínas estruturalmente e funcionalmente relacionadas capazes de se ligar e metabolizar uma variedade de classes de produtos químicos (BEND 1994; LIVINGSTONE 1998; STEGEMAN & LIVINGSTONE 1998), tem sido sugeridas como um sistema de alerta inicial para se avaliar a exposição a algumas classes de contaminantes químicos como hidrocarbonetos clorados e policlorados (HAASH et al. 1993).

Essas enzimas de biotransformação participam também do metabolismo endógeno e são geralmente divididas em duas fases: fase I, onde grupos funcionais são adicionados ou expostos no composto parental, nesta fase desenvolvem-se em sua maioria reações de oxidação e hidrólise e, em alguns casos, reações de redução, e as reações de fase II, onde as moléculas endógenas são conjugadas ao produto da fase I ou diretamente ao xenobiótico. Os produtos finais são mais polares, solúveis em água, e menos reativos podendo ser excretados do organismo (VAN DER OOST et al. 2003). Entretanto, em alguns casos o metabólito produzido é mais reativo (tóxico) do que a substância original, sendo que o sistema enzimático citocromo P450 é o principal envolvido neste processo (STINE & BROWN 1996). Uma isoforma específica, CYP1A, é largamente usada como biomarcador em aplicações ecotoxicológicas desde que ela está envolvida na biotransformação de contaminantes ambientais bem conhecidos (GOKSØYR & FÖRLIN 1992). Neste contexto, a expressão da enzima CYP1A, medida com atividade de EROD tem sido empregada como um índice de resposta primária para avaliar os efeitos biológicos destes poluentes em peixes (STEGEMAN & LECH 1991; PACHECO & SANTOS 1997, 1998) e é agora largamente utilizada como uma ferramenta de biomonitoramento em estudos de campo (STEGEMAN

1995; VAN DER OOST et al. 1996b, 1997; BAINY et al. 1999; BARRA et al. 2001; PARENTE et al. 2004; KIRBY et al. 2007).

O teste de micronúcleo (MN) em eritrócito de peixes tem sido aplicado para avaliar o impacto genotóxico de poluentes ambientais tanto sob condições de campo quanto de laboratório, revelando interessantes correlações com a exposição a um número de agentes físicos e químicos (AL-SABTI & METCALFE 1995; GUSTAVINO et al. 2001). Frequência de micronúcleos (MN) é considerada como sendo um dos métodos mais usados para a avaliação da genotoxicidade em sistemas aquáticos, e tem sido extensivamente aplicado em espécies de peixes (AL-SABTI & METCALFE 1995; ÇAVAŞ & ERGENE GÖZÜKARA 2005a, b). Atividades mutagênicas em ambientes aquáticos têm sido determinadas em estudos citogenéticos pela detecção *in vivo* de MN (HOOFTMAN & DE RAAT 1982; DAS & NANDA 1986).

Medidas tais como atividade de EROD e frequência de MN pode fornecer uma ferramenta útil quando considerando exposições de curto-período a químicos tais como HPAs.

Os contaminantes investigados neste trabalho, beta-naftoflavona (BNF), e dimetilbenzoantraceno (DMBA) são modelos indutores de P4501A e sua habilidade em aumentar a atividade de EROD hepática tem sido registrada em várias espécies de peixes de clima temperado (SCHULTZ & SCHULTZ 1982; HENDRICKS et al. 1985; FONG et al. 1983; RAZA et al. 1995; GRAVATO & SANTOS 2002; MARIA et al. 2002).

A beta-naftoflavona é um derivativo sintético de uma ampla classe de compostos flavonóides que ocorrem naturalmente (VYAS et al., 1983), é um forte tipo de HPA indutor de atividade de EROD hepática (STEGEMAN et al. 1987; PACHECO & SANTOS 1998). O dimetilbenzoantraceno é um dos compostos pertencente a esta mesma classe de poluentes, e é considerado como um dos mais carcinogênicos. Ele é extremamente eficiente para induzir tumores em espécies de mamíferos e seu mecanismo de bioativação e interação com o DNA em sistemas de mamíferos tem sido extensivamente estudada (BAIRD & DIPPLE 1997; DIPPLE et al. 1983, 1984; DEVANESAN et al. 1993). Dimetilbenzoantraceno também se mostrou altamente tumorigênica em “truta arco-íris” (*Onchorhynchus mykiss*) (FONG et al. 1993; REDDY et al. 1995).

O presente trabalho objetivou investigar a indução do sistema de monooxigenase dependente P450, medida como atividade de EROD, assim como grau de genotoxicidade medido pela Frequência de Micronúcleos (MN) em uma espécie de peixe tropical nativa *Geophagus brasiliensis*, após 3 dias de exposição a diferentes compostos de HPAs, BNF e DMBA, separadamente via injeção intraperitoneal (i.p.) com o objetivo de avaliar a adequabilidade de *G. brasiliensis* para estudos de biomonitoramento a esta classe de poluentes químicos.

A hipótese a ser testada é se ocorrerá um aumento na atividade de EROD, assim como de Frequência de Micronúcleos (MN) em *G. brasiliensis* no dia 3 de exposição, constatando aumento da expressão de CYP1A e mutações celulares decorrentes de alterações moleculares e celulares, respectivamente, em função da exposição à HPAs, caracterizando esta espécie de peixe como adequada para estudos de biomonitoramento a esta classe de poluentes em países tropicais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais teste

Espécimens de *G. brasiliensis* (QUOY & GAIMARD 1824), capturados no rio Preto, no município de Santa Rita do Jacutinga (MG), pesando entre 44,6-238,9 g (Tabela 1), foram transportados em uma caixa d'água de 500 litros com água aerada. Em laboratório foram aclimatados por uma semana em tanques de 700 litros com água corrente, aerada e declorificada naturalmente. A temperatura média da água foi de 24°C (23 – 25°C) e o fotoperíodo foi natural. Todos os indivíduos foram alimentados duas vezes ao dia com “pellets” de ração para peixes.

**Tabela 1.** Grupo, peso, comprimento, sexo e peso do fígado dos indivíduos.

Grupo	Peso (g)	Comp. (cm)	Sexo	Peso do fígado
CONT. 1	66.00	17.5	M	1.70
CONT. 2	65.42	16.0	FM	1.63
CONT. 3	149.15	20.4	FM	1.60
CONT. 4	48.72	14.5	M	1.17
CONT. 5	100.23	18.7	FM	1.55
CONT. 6	95.96	18.5	M	1.74
BNF 1	168.60	22.00	M	3.36
BNF 2	69.27	16.50	FM	1.38
BNF 3	88.65	18.00	M	1.14
BNF 4	50.93	15.00	F	0.55
DMBA 1	238.91	25.00	M	3.66
DMBA 2	186.20	23.50	M	3.24
DMBA 3	44.60	14.50	M	0.25
DMBA 4	124.70	20.00	M	0.73

### 2.2 Tratamento

Posteriormente os animais foram divididos em três grupos (controle, tratados com beta-naftoflavona BNF, e tratados com dimetilbenzoantraceno DMBA), o grupo controle não recebeu nenhum tratamento e os indivíduos foram mortos no dia 0, quando os outros peixes foram tratados. Os dois grupos tratados receberam uma quantidade de 50 mg/kg de apenas um dos poluentes via injeção intraperitoneal (i.p.), e cada grupo foi colocado em tanques separados. Após 3 dias os peixes tratados foram sacrificados por decaptação, após terem sido anestesiados com banho de gelo, e os fígados foram retirados de forma rápida e cuidadosa, embalados em papel laminado previamente identificados e armazenados em galão de nitrogênio líquido (-192 °C) até a chegada ao laboratório, onde foram transferidos para um freezer (-80 °C) até a realização das análises.

### 2.3 Preparação da fração microssomal

Para a realização das análises os fígados foram descongelados em banho de gelo, homogeneizados em homogeneizadores do tipo Potten-Elverjem com pistilo de teflon em solução contendo (Tris 100mM, KCl 25 mM pH 7,4) num volume correspondendo a 4 vezes o seu peso. Os homogeneizados foram, em seguida, centrifugados a 9000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 100000g por 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi, então, desprezado e o pellet ressuspense em tampão Tris e novamente centrifugado a 100000g por 1 hora a 4°C. O pellet foi ressuspense em 2 ml de tampão para congelamento (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 100mM pH 7,4) e armazenado em congelador - 70°C até a dosagem de proteínas.

## **2.4 Determinação da concentração de proteínas na fração S9**

Para a dosagem de proteínas totais na fração S9 usou-se o método colorimétrico descrito por BRADFORD et al. (1976), adaptado para microplaca, utilizando o corante Azul de Coomassie G-250 e leitura de densidade ótica (DO) a 595 nm (espectrofotômetro de microplaca Molecular Devices - Spectra Max Plus 384). As curvas de calibração foram realizadas com albumina sérica bovina – BSA Sigma Chemical Co - 1,4 mg/ml diluída em solução tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2) para se obter concentrações adequadas. Para determinação da concentração de proteínas na fração S9, esta foi diluída 1:30 e colocado 5 µl de amostra diluída na microplaca. Em seguida foram adicionados 250µl de reagente de *Bradford* – Merck em cada poço da microplaca. Cada valor de densidade ótica foi convertido em concentração de proteína, empregando-se a curva padrão. Foram feitas correções para cada fator de diluição, e as concentrações de proteína na fração S9 calculadas como a média obtida (média final) a partir do valor de cada réplica e expressas como mg de proteína / ml de S9. As determinações foram realizadas em triplicata considerando um coeficiente máximo de variação de 10%.

## **2.5 Determinação da Atividade enzimática - EROD**

A determinação da atividade de EROD foi realizada em espectrofluorímetro de microplaca. Inicialmente, foi adicionado em cada poço tampão fosfato de potássio dibásico. Em seguida, a cada poço foi adicionado volume exato da fração S9 para a obtenção de 25 microgramas de proteínas totais por poço e o substrato. A microplaca foi, então, encubada por 2 minutos a 30°C e a reação iniciada pela adição de um sistema regenerador de elétrons em cada poço. A reação ocorreu durante 10 minutos, quando foi terminada pela adição de acetonitrila nos poços. O produto final, resorufina, foi quantificado em espectrofotômetro (Em:550, Ex:582).

## **2.6 Produtos Químicos**

BNF, DMBA, o substrato (etoxiresorufina), o produto da reação (resorufina),  $\beta$ -NADP, glicose-6-fosfato, glicose-6-fosfatodesidrogenase, albumina sérica bovina e o reagente de Bradford foram todos comprados de Sigma Chemical Company, St Louis MO, USA. TRIS, MgCl<sub>2</sub> e outros sais foram de classe analítica e fornecidos por Merck SA Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil.

## **2.7 Procedimentos para micronúcleos**

O teste de MN foi desenvolvido em eritrócitos de *G. brasiliensis*. O resultado final de cada grupo foi expresso como o valor médio (%). Foram consideradas para contagem apenas hemácias nucleadas com membranas nucleares e citoplasmáticas intactas. Os micronúcleos foram considerados como os corpúsculos que em relação ao núcleo apresentaram até 1/3 do seu tamanho, estando nitidamente separados, com bordas distinguíveis, mesma cor e refração.

## **2.8 Análises estatísticas**

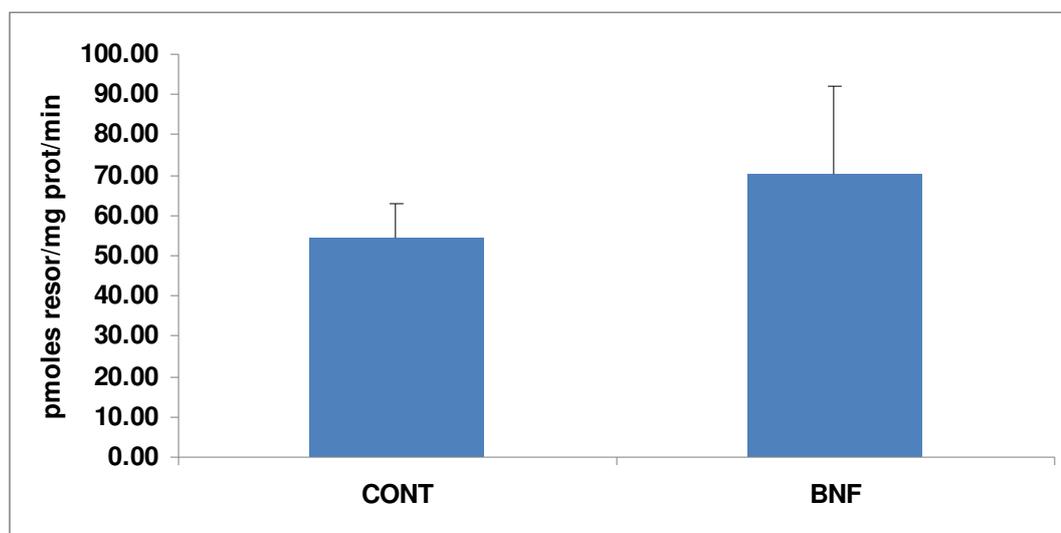
As médias dos 3 grupos (controle; tratado com BNF; tratado com DMBA) foram comparadas através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste “a posteriori” de Tukey ( $P < 0.05$ ) para determinação de que médias foram significativamente diferentes.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado um aumento significativo ( $P<0.05$ ) na indução de atividade de EROD hepática no grupo tratado com (50 mg/kg) de BNF ( $73.70\pm 21.65$ ) (média±desvio padrão; medidas em pmoles res/mg prot/min) em relação ao grupo controle ( $54.33\pm 8.78$ ) no dia 3 após a exposição (Tabela 2, Figura 1). Esse resultado é suportado por estudos prévios em *Dicentrarchus labrax* (VIARENGO et al. 1997a; NOVI et al. 1988; JAKSIC et al. 1998) tratados por diferentes injeções intraperitoniais de BNF, onde um aumento na atividade de EROD hepática foi observado. De acordo com NOVI et al. (1998), uma injeção de (80 mg/kg) de BNF induziu um significativo aumento da atividade de EROD hepática em sea bass após uma exposição de 1 dia, alcançando seu máximo após 3 dias de exposição.

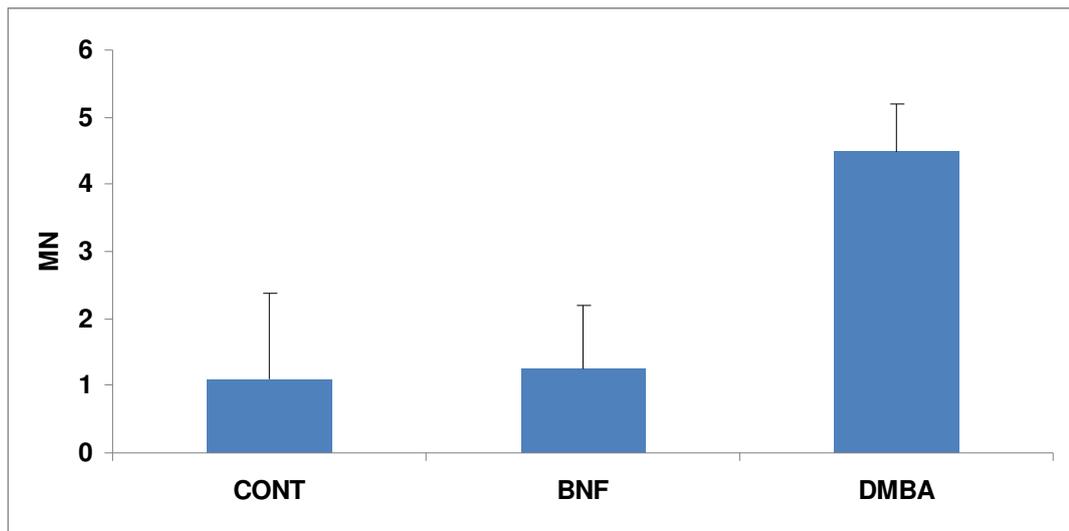
**Tabela 2.** Diferenças estatísticas dos biomarcadores nos diferentes grupos. CONT = controle; BNF = tratado com beta-naftoflavona; DMBA = tratado com DMBA. \*\* $P<0.001$  – Altamente significativo; \* $P<0.05$  – Significativo.

Marc.	ANOVA		TUKEY
	F	P	
EROD	5.4306	0.03096*	BNF>CONT.
MN	7.2351	0.00868**	DMBA>CONT.; BNF



**Figura 1.** Atividade de EROD nos diferentes grupos: controle (CONT.) e tratado com beta-naftoflavona (BNF). Medidos em (pmoles res/mg prot/min).

TELES et al. (2001) também detectaram um significativo aumento da atividade de EROD de 4 a 72 horas em *Anguilla Anguilla* após exposição a BNF dissolvida na água, porém uma frequência inalterada de anormalidades nucleares eritrocíticas (ENA), incluindo MN, no dia 3 após exposição a este poluente. Por outro lado, alguns autores encontraram que a indução de CYP1A pode gerar compostos intermediários reativos (STEGEMAN & HAHN 1994; VARANASI et al. 1985) e os conseqüentes efeitos genotóxicos e/ou carcinogênicos (TUVIKENE et al. 1999). Neste contexto, a indução de CYP1A em *G. brasiliensis* expostos a BNF não parece estar relacionada a efeitos genotóxicos, já que também não houve aqui, no mesmo período, um aumento significativo na Frequência de Micronúcleos (Tabela 2, Figura 2).



**Figura 2.** Frequência de MN nos diferentes grupos: controle (CONT), tratado com beta-naftoflavona (BNF), e tratado com dimetilbenzoantraceno (DMBA).

Outros autores (PACHECO & SANTOS 2002), ao utilizarem BNF em (*Anguilla anguilla*), em diferentes períodos de tempo (3, 6 e 9 dias) também verificaram que seus ensaios genotóxicos revelaram uma frequência inalterada de MN no dia 3 após exposição a este poluente, demonstrando a inabilidade do mesmo em induzir danos genéticos neste período de tempo. Porém, no dia 6 um abrupto aumento de MN foi encontrado, demonstrando alta genotoxicidade. A explicação dada pelos autores para este fato foi que o processo de detoxificação em (*A. anguilla*), nomeadamente a conjugação do metabólito na fase II, assim como o sistema de reparo do DNA foram eficientes durante um menor esforço de tempo, 3 dias, evitando o dano de DNA e aparecimento de ENA. Tendo o mecanismo de detoxificação protetor tornado-se exausto ou ineficiente ao final do sexto dia de exposição, permitindo a expressão de genotoxicidade como ENA. Portanto, o fato de não ter havido um aumento significativo da Frequência de Micronúcleos em *G. brasiliensis* sob a ação de BNF no dia 3 de exposição não significa que tal poluente não seja genotóxico para esta espécie.

Já a resposta da Frequência de Micronúcleos (MN) em *Geophagus brasiliensis* expostos a DMBA foi claramente diferente. Um aumento significativo ( $P < 0.01$ ) na Frequência de Micronúcleos foi observada após 3 dias de exposição a este poluente (Tabela 2, Figura 2). Este aumento pode ser devido à natureza eletrofílica deste composto e sua conseqüente capacidade de se ligar a adutores de DNA. De acordo com CHENG et al. (1988a,b) a região baía do diol epóxido de DMBA é um metabólito eletrofílico altamente reativo que se liga ao DNA. Outros estudos mostraram ainda que o DMBA ligou-se ao DNA hepático de juvenis de truta *in vivo* (SCHNITZ & O'CONNOR 1992) e ao DNA de embriões de truta *in vivo* (FONG et al. 1993). E ainda, já é sabido que o metabolismo de DMBA pode resultar na formação de metabólitos reativos que se ligam a proteínas (LAMBARD et al. 1991) ou ao DNA (CUSACK et al. 1989).

Estudos utilizando BNF em *G. brasiliensis* em diferentes comprimentos de tempo são necessários para se examinar de forma mais abrangente o potencial genotóxico deste poluente na espécie. Além disso, posteriores estudos visando a caracterização das interações da BNF e do DMBA com células de *G. brasiliensis* também são necessários para fornecer informações mais esclarecedoras sobre os mecanismos de bioativação e reparo de DNA nesta espécie.

## 4 CONCLUSÕES

1. BNF pode modular o metabolismo de biotransformação em *G. brasiliensis*, expresso como aumento da atividade de EROD hepática. Este aumento não parece estar relacionado a efeitos genotóxicos nesta espécie. Contudo, mais estudos devem ser realizados utilizando-se BNF por maiores períodos de tempo para se avaliar melhor a toxicodinâmica deste poluente em *G. brasiliensis*.
2. DMBA pode modular a genotoxicidade em *G. brasiliensis*, expressa como aumento da Frequência de Micronúcleos. Este aumento pode estar relacionado à natureza eletrofílica deste composto e sua conseqüente capacidade de se ligar a adutores de DNA.
3. *Geophagus brasiliensis* mostrou-se uma espécie adequada para estudos de biomonitoramento a HPAs em países tropicais, especialmente considerando sua larga distribuição geográfica.

## 5 REFERÊNCIAS

- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343: 121–135.
- BAIRD, W. M.; DIPPLE, A. 1997. Photosensitivity of DNA-bound 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene. *International Journal of Cancer*, 20: 427-431.
- BAINY, A. C. D.; Woodin, B. R.; Stegeman, J. J. 1999. Elevated levels of multiple cytochrom P450 forms in tilapia from Billings reservoir-São Paulo, Brazil. *Aquatic Toxicology*, 44: 289–305.
- BARRA, R.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; ORREGO, R.; PARRA, O.; GAVILAN, J. F. 2001. Bioavailability of PAHs in the Biobio river (Chile): MFO activity and biliary fluorescence in juvenile *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*, 45: 439– 44.
- BEND, J. R. 1994. Estimation of induction of enzymes that metabolize xenobiotics in vitro and in vivo. In: RENZONI, A.; MATTEI, N.; LARI, L.; FOSSI, M. C. editors. Contaminants in the environment. Boca Raton, FL: Lewis Publishers/CRC Press; 93–101.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-54.
- ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. 2005a. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*, 74: 264–271.
- ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. 2005b. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46: 64–70.
- CHENG, S. C.; PRAKASH, A. S.; PIGOTT, M. A.; HILTON, B. D.; LEE, H.; HARVEY, R. G.; DIPPLE, A. 1988a. A metabolite of the carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene that reacts predominantly with adenine residues in DNA. *Carcinogenesis*, 9: 1721–1723.
- CHENG, S. C.; PRAKASH, A. S.; PIGOTT, M. A.; HILTON, B. D.; ROMAN, J. M.; LEE, H.; HARVEY, A. G.; DIPPLE, A. 1988b. Characterization of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-adenine nucleoside adducts. *Chemistry Research Toxicology*, 1: 216–221.
- CONNEL, D. W. 1990. Bioaccumulation of xenobiotics compounds. Boca Raton, FL: CRC Press.
- CUSACK, M.; BURNETT, A. K.; MORRISON, V. M.; CRAFT, J. A. 1989. Meta-bolic activation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene: Role of cytochrome P-450 isoenzymes in the formation of DNA and protein adducts in vitro. *Biochemical Society Transactions*, 17: 1014–1015.
- DAS, R. K., NANDA, N. K. 1986. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutation Research*, 175: 67-71.
- DEVANESAN, P. D.; RAMAKRISHNA, N. V.; PADMAVATHI, N. S.; HIGGINBOTHAM, S.; ROGAN, E. G.; CAVALIERI, E. L.; MARSCH, G. A.; JANKOWIAK, R.; SMALL, G. J. 1983. Identification and quantitation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts formed in mouse skin. *Chemistry Research Toxicology*, 6: 364-371.

- DE FLORA, S.; BAGNASCO, M.; ZANACCHI, P. 1991. Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutation Research*, 258: 285–320.
- DIPPLE, A.; PIGOTT, M.; MOSCHEL, R.; CONSTANTINO, N. 1983. Evidence that binding of 7,12-dimethylbenz-(a)-anthracene to DNA in mouse embryo cell cultures results in extensive substitution of both adenine and guanine residues. *Cancer Research*, 43: 4132-4135.
- DIPPLE, A.; PIGOTT, M. A.; BIGGER, A. H.; BLAKE, D. M. 1984. 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-DNA binding in mouse skin: response of different mouse strains and effects of various modifiers of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 5: 1087-1090.
- FONG, A. T.; DASHWOOD, R. H.; CHENG, R.; MATHEWS, C.; FORD, B.; HENDRICKS, J. D.; BAILEY, G. S. 1993. Carcinogenicity, metabolism, and Ki-ras proto-oncogene activation by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in rainbow trout embryos. *Carcinogenesis*, 14: 629-635.
- GOKSØYR, A.; FÖRLIN, L., 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 22: 287–312.
- GOKSØYR, A.; BEYER, J.; EGAAS, E.; GRØSVIK, B.; HYLLAND, K.; SANDVIK, M.; SKAARE, J. 1996. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 33: 36–45.
- GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. 2002.  $\beta$ -Naphthoflavone liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities induction in juvenile *Dicentrarchus labrax* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52: 69-74.
- GRIMMER, G. 1983. Environmental carcinogens: polycyclic aromatic hydrocarbons. Boca Raton, FL: CRC Press.
- GUSTAVINO, B.; SCORNAJENGI, K. A.; MINISSI, S.; CICCOTTI, E. 2001. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (telostei, pisces) by X-rays and colchicine. *Mutation Research*, 494: 151–159.
- HAASCH, M. L.; PRINCE, R.; WEJKSNORA, P. J.; COOPER, K. R.; LECH, J. J. 1993. Caged and wild fish: induction of hepatic cytochrome P-450 (CYP1A1) as an environmental biomonitor. *Environment Toxicology and Chemistry*, 12(6): 885–95.
- JAKŠIĆ, Ž.; BIHARI, N.; MÜLLER, W. G.; ZAHN, R. K.; BATEL, R. 1998. Modulation of cytochrome P4501A in sea bass liver by model substances and seawater extracts. *Aquatic Toxicology*, 40: 265–273.
- KIRBY, M. F.; SMITH, A. J.; ROOKE, J.; NEALL, P.; SCOTT, A. P.; KATSIADAKI, I. 2007. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquatic Toxicology*, 81: 233–244.
- LAMBARD, S. E.; BURNETT, A. K.; WOLF, C. R.; CRAFT, J. A. 1991. The role of specific cytochromes P450 in the formation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene–protein adducts in rat liver microsomes in vitro. *Biochemistry and Pharmacology*, 42: 1529–1535.
- LIVINGSTONE, D. R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 120: 43– 9.
- MARIA, V. L.; CORREIA, A. C.; SANTOS, M. A. 2002. *Anguilla anguilla* L. biochemical and genotoxic responses to benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53: 86–92.

- MIRANDA, L. M.; HENDERSON, M. C.; WILLIAMS, D. E.; BUHLER, D. R. 1997. *In vitro* metabolism of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene by rainbow trout liver microsomes and trout P450 isoformas. *Toxicology Applied Pharmaceutical*, 142: 123-132.
- MYERS, M. S.; LANDAHL, J. T.; KRAHN, M. M.; MCCAIN, B. B. 1991. Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. West Coast. *Environmental Health Perspective*, 90: 7-15.
- NOVI, S.; PRETTI, C.; COGNETTI, A. M.; LONGO, V.; MARCHETTI, S.; GERVASI, P. G. 1998. Biotransformation enzymes and their induction by  $\beta$ -naphthoflavone in adult sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology*, 41: 63-81.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A. 2002. Naphthalene and  $\beta$ -naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. *Environment International*, 28: 285-293.
- PARENTE, T. E.; DE-OLIVEIRA, A. C.; SILVA, I. B.; ARAUJO, F. G.; PAUMGARTTEN, F. J. 2004. Induced alkoxyresorufin-O-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere*, 54: 1613-1618.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A. 1998. *Anguilla anguilla* L. liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities induction by cyclophosphamide and PAHs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40: 71-6.
- RAZA, H.; OTAIBA, A.; MONTAGUE, W. 1995.  $\beta$ -naphthoflavone-inducible cytochrome P4501A1 activity in liver microsomes of the marine safi fish (*Siganus canaliculatus*). *Biochemical Pharmacology*, 50(99): 1401-1406.
- REDDY, A.; CHENG, R.; HENDRICKS, J.; BAILEY, G. 1995. Comparative tumorigenicity and Ki-ras activation by dibenzo(a,1)pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]ntracene in rainbow trout. *Proceedings of the American Association of Cancer Research*, 36: 966.
- SCHNITZ, A. R.; O'CONNOR, J. M. 1992. In vivo DNA/RNA adduction of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and benzo(a)pyrene (BaP) in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Environmental, Pathology, Toxicology and Oncology*, 11: 229-233.
- STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 87-206.
- STEGEMAN, J. J.; KLOEPPER-SAMS, P. J. 1987. Cytochrome P-450 isozymes and monooxygenase activity in aquatic animal. *Environmental Health Perspectives*, 17: 87-95.
- STEGEMAN, J. J. 1995. Diversity and regulation of cytochrome P450 in aquatic organisms. In: ARINC, E.; SCHENKMAN, J. B.; HODGSON, E. editors. Molecular aspects of oxidative drugs metabolizing enzymes: their significance in environmental toxicology, chemical carcinogenesis and health. NATO ASI Series. Series H: *Cell Biology*, 90: 135-158.
- STEGEMAN, J. J.; LIVINGSTONE, D. R. 1998. Forms and functions of cytochrome P450. *Comparative Biochemistry and Physiol, Part C Pharmacol Toxicol*, 121: 1-3.
- STEGEMAN, J. J.; WOODIN, B. R.; SINGH, H.; OLEKSIK, M. F.; CELANDER, M. 1997. Cytochrome P450 (CYP) in tropical fishes: catalytic activities, expression of multiple CYP proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fishes from Bermuda. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 116: 61-75.

- STEIN, J. E.; REICHERT, W. L.; NISHIMOTO, M.; VARANASI, U. 1990. Overview of studies on liver carcinogenesis in English sole from Puget Sound, evidence for a xenobiotic chemical etiology II. Biochemical studies. *Science of the Total Environment*, 94: 51–69.
- STINE, K. E.; BROWN, T. M. 1996. Biotransformation of Xenobiotic, In: *Principles of Toxicology*. Lewis Publishers, p. 259, New York.
- TELES, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. 2003. *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin-*O*-deethylation, glutathione-S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and  $\beta$ -naphthoflavone. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 98–107.
- TUVIKENE, A.; HUUSKONEN, S.; KOPONEN, K.; RITOLA, O.; MAUER, U.; LINDSTROM-SEPPE, P. 1999. Oil shale processing as a source of aquatic pollution: monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish. *Environmental Health Perspective*, 107: 745–752.
- VAN DER OOST, R.; GOKSØYR, A.; CELANDER, M.; HEIDA, H.; VERMEULEN, N. P. E. 1996b. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology*, 35: 21–46.
- VAN DER OOST, R.; VINDIMIAN, E.; VAN DEN BRINK, P. J.; SATUMALAY, K.; HEIDA, H.; VERMEULEN, N. P. E. 1997. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): III. Statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 39: 45–7.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57–149.
- VARANASI, U.; REICHERT, W. L.; STEIN, J. E.; BROWN, D. W.; SANBORN, H. R. 1985. Bioavailability and biotransformation of aromatic hydrocarbons in benthic organisms exposed to sediment from an urban estuary. *Environmental Science & Technology*, 19: 836–841.
- VARANASI, U.; STEIN, J. E.; NISHIMOTO, M. 1989. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In: Varanasi, U. (Ed.), *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 93–149.
- VIARENGO, A.; BETTELLA, E.; FABBRI, R.; BURLANDO, B.; LAFAURIE, M. 1997a. Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: role of GSH in the reduction of heavy metal effects. *Marine Environmental Research*, 43: 1–11.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho objetivou avaliar a qualidade ambiental do rio Paraíba do Sul e do reservatório do Funil utilizando uma bateria de biomarcadores e bioindicadores em quatro espécies de peixes nos diferentes períodos sazonais (Inverno/Seco *versus* Verão Úmido). Além disso, foi realizado um bioensaio em uma das espécies (*Geophagus brasiliensis*) para um melhor conhecimento sobre suas respostas bioquímicas e celulares frente à exposição a poluentes xenobióticos.

No capítulo I foram utilizados biomarcadores (EROD e MN) e bioindicadores (IHS, IGS, e FC) para a avaliação da qualidade das águas do trecho médio-inferior da bacia do rio Paraíba do Sul quanto à presença de poluentes xenobióticos. Os resultados demonstraram que dos locais analisados os locais: 2, 4, 6, e 7 (Volta Redonda, Três Rios, rio Paraíba mineiro e rio Piabanha), respectivamente, são os que possivelmente apresentam maiores presenças de xenobióticos. Porém, no local 1 (reservatório do Funil), as coletas foram realizadas dentro do reservatório, onde pode estar ocorrendo processo de remediação por fotólise. Essa possibilidade foi levantada no capítulo III, onde foi sugerida uma possível maior presença de xenobióticos nas águas que saem deste reservatório, através da detecção de maiores valores de atividade de EROD e menores valores de IGS em *P. maculatus* no local de coleta situado a jusante da barragem, comparando-se o mesmo com o rio Paraíba do Sul a montante do reservatório, com o início do reservatório, e com o local próximo à barragem. Tais resultados foram atribuídos à própria natureza da estrutura e funcionamento da barragem para fins de geração de energia hidrelétrica, que podem estar utilizando e/ou produzindo alguns compostos organoclorados, tais como BPCs e HPAs (DE VOOGT & BRINKMAN 1989; SWAMI et al. 1992; ALBERS 1995; PINTO 2001).

Portanto, de acordo com os resultados do capítulo III, se for considerado a qualidade das águas que saem do reservatório do Funil, este local também pode ser considerado como um dos mais críticos do trecho médio-inferior quanto à presença de químicos xenobióticos. Além disso, esses mesmos resultados não concordam com a hipótese de que o reservatório do Funil funcione como um filtro de poluentes, melhorando a qualidade das águas do rio Paraíba do Sul a jusante (KLAPPER 1998). E ainda, considerando-se que os indivíduos foram coletados em um dos períodos de reprodução da espécie (novembro), os baixos valores do IGS verificados nas espécies coletadas no rio Paraíba do Sul a jusante do reservatório do Funil podem servir como um sinal de alerta de que a provável grande presença de xenobióticos neste local pode também estar impactando negativamente as populações desta espécie neste local, já que alguns destes compostos possuem propriedades antiestrogênicas. Estudos feitos com peixes expostos especificamente a sistema de tratamento de efluentes (BKME), por exemplo, têm demonstrado que os mesmos apresentam baixas concentrações de hormônios reprodutivos circulando, tamanho gonadal reduzido, aumento para a idade de maturação sexual, ovos pequenos, e reduzida expressão das características sexuais secundárias comparados aos peixes dos locais de referência (ANDERSSON et al. 1988; MCCASTER et al. 1996; MUNKITTRICK et al. 1998).

Um objetivo secundário do capítulo I foi o de comparar as respostas de duas espécies de peixe (*Geophagus brasiliensis* e *Pimelodus maculatus*), que possuem hábitos alimentares diferentes (*G. brasiliensis* é onívoro preferencialmente bentóforo, e *P. maculatus* é detritívoro preferencialmente carnívoro) para se saber se respondem da mesma maneira à exposição a poluentes xenobióticos nos mesmos locais. Apesar de não termos conseguido capturar indivíduos de *P. maculatus* em todos os locais em que foram coletados os espécimens de *G. brasiliensis*, e ter havido problemas técnicos com os fígados dos indivíduos de *P. maculatus* do local 6 (rio Paraíba (MG)), contudo, nos três locais onde foram feitas as análises de

atividade de EROD hepática para ambas as espécies: 1, 4 e 7, reservatório do Funil, Três Rios e rio Piabanha, respectivamente, foi constatado o mesmo padrão de indução, tendo as subpopulações coletadas no rio Piabanha apresentado os maiores valores, seguidas das do canal principal do rio Paraíba do Sul na cidade de Três Rios, e com os menores valores de indução para as subpopulações das duas espécies tendo sido verificado para o reservatório do Funil. Entretanto, para todos os 3 locais as subpopulações de *G. brasiliensis* apresentaram valores mais elevados de indução, sugerindo ser esta espécie mais apropriada para estudos de biomonitoramento no rio Paraíba do Sul em relação a *P. maculatus*. Trabalhos de bioensaio devem ser realizados em *P. maculatus* para se avaliar sua adequabilidade para estudos de biomonitoramento.

O capítulo II teve por objetivo verificar a qualidade ambiental da bacia do rio Paraíba do Sul utilizando dois bioindicadores (IHS e FC) em dois períodos sazonais (Inverno/seco vs Verão/úmido) utilizando três espécies de peixes (*G. brasiliensis*, *Hypostomus affinis* e *Hypostomus auroguttatus*). Os resultados deste capítulo demonstraram que os locais provavelmente mais contaminados por poluentes na bacia do rio Paraíba do Sul, dentre os examinados foram: São José dos Campos, Barra Mansa, Volta Redonda, e rio Piabanha. Os três últimos corroborando com os resultados do capítulo I para o trecho médio-inferior da bacia do rio Paraíba do Sul. Em relação aos períodos sazonais, os resultados do capítulo II demonstraram que os poluentes na bacia do rio Paraíba do Sul apresentaram uma tendência a se concentrar mais no período do inverno/seco, tal fato provavelmente deve-se à menor diluição dos contaminantes neste período em relação ao verão chuvoso.

Outro fato interessante no capítulo II foi a concordância de seus resultados com a hipótese de que um aumento tanto do IHS quanto do FC pode também ser um indicio de menor qualidade ambiental (WEGE & ANDERSON 1978; LEHTONEN & JOKIKOKKO 1995), Já que maiores valores de ambos os índices foram detectados para alguns dos locais com maiores alterações urbano-industriais. Em relação ao Fator de Condição, apesar da idéia geral de que indivíduos com maior peso em um dado comprimento estão em melhor condição, este bem estar tem sido relacionado diretamente à disponibilidade alimentar (TYLER & DUNN 1976 *Apud* SCHMITT & DETHLOFF 2005; BRAGA 1986). Entretanto, a presença de poluentes xenobióticos no ambiente pode fazer o Fator de variar em uma ou outra direção, saindo do alcance normal em resposta a exposição química. Para peixes expostos à contaminantes têm sido registrados tanto elevados valores do Fator de Condição (MCMASTER et al. 1991; ADAMS et al. 1992a), quanto uma diminuição do mesmo (KICENIUK & KHAN 1987). Os resultados tanto do capítulo II quanto do capítulo I concordam com o primeiro caso, desde que elevados valores do Fator de Condição em ambos os capítulos foram verificados em locais mais alterados.

Interpretar respostas obtidas em campo representa um desafio devido à complexidade das interações dos diversos poluentes entre si e com os organismos a eles expostos e suas respectivas respostas bioquímicas e fisiológicas. Por isso, a utilização de uma bateria de biomarcadores e bioindicadores proporciona uma visão mais holística dos efeitos dos contaminantes sobre a saúde do peixe, o que permite uma avaliação mais realista das condições do ambiente estudado.

Estudos de laboratório também fornecem subsídios para uma melhor compreensão dos resultados obtidos em campo uma vez que detectam as respostas bioquímicas de uma espécie em nível específico. Dentro desta perspectiva justifica-se a realização dos estudos apresentados no capítulo IV, que trata da exposição de *G. brasiliensis* a diferentes poluentes organoclorados (BNF e DMBA), pertencentes à classe dos HPAs, amplamente presentes em ecossistemas aquáticos (VAN DE OOST 1996a; IRWIN et al. 1997; WOODHEAD et al. 1999).

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

1. Dos locais analisados neste trabalho quanto à presença de xenobióticos, os que apresentaram o pior quadro foram: rio Piabanha, rio Paraibuna (MG), Três Rios, Volta Redonda e São José dos Campos. O que confirma a hipótese de que locais com grandes centros urbano-industriais apresentam maiores concentrações de poluentes químicos.
2. Peixes expostos crônicamente a diversas classes de poluentes químicos podem apresentar maiores valores do FC, podendo significar pior qualidade ambiental. O que é contrário ao geralmente aceito quanto à avaliação da qualidade ambiental relacionada à presença de nutrientes, onde os maiores valores deste índice são tomados como melhor qualidade ambiental.
3. No rio Paraíba do Sul o período de inverno/seco parece ser o que ocorre os maiores níveis de concentração de xenobióticos, possivelmente isso se deve ao menor volume de água e conseqüentemente menor proporção de diluição dos poluentes neste período em relação ao verão/úmido.
4. O reservatório do Funil não serve como um filtro para xenobióticos das águas do rio Paraíba do Sul da região a montante para jusante da represa. Além disso, provavelmente a estrutura da barragem, assim como as operações para a produção de energia hidrelétrica podem estar liberando poluentes no rio Paraíba do Sul a jusante do reservatório, o que pode estar comprometendo as populações de *P. maculatus* neste local, já que muitos desses compostos possuem propriedades antiestrogênicas.
5. O uso integrado dos diferentes biomarcadores e bioindicadores mostrou-se eficiente para a avaliação da qualidade ambiental da bacia do rio Paraíba do Sul e do reservatório do Funil, contribuindo para um diagnóstico mais completo sobre a saúde dos peixes expostos a xenobióticos nesses locais.
6. *Geophagus brasiliensis* é uma espécie adequada para estudos de biomonitoramento.

## 8 REFERÊNCIAS

- ADAM, S.; PAWERT, M.; LEHMANN, R.; ROTH, B.; MÜLLER, E.; TRIEBSKORN, R. 2001. Physicochemical and morphological characterization of two small polluted streams in southwest Germany. *Journal of Aquatic Ecosystems Stress and Recovery*, 8: 179–94.
- ADAMS, S. M.; GIESY, J. P.; TREMBLAY, L. A.; EASON, C. T. 2001. The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on biomarkers in ecotoxicology. *Biomarkers*, 6(1): 1–6.
- ADAMS, S. M.; MCLEAN, R. B. 1985. Estimation of largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacépède, growth using the liver somatic index and physiological variables. *Journal of Fish Biology*, 26: 111–26.
- ADAMS, S. M.; SHEPARD, K. L.; GREELEY, M. S. JR.; JIMENEZ, B. D.; RYON, M. G.; SHUGART, L. R.; MCCARTHY, J. F. 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research*, 28: 459–64.
- ALI, M.; SREEKRISHNAN, T. R. 2001. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Advances in Environmental Research*, 5: 175–196.
- ANDERSSON, T.; FÖRLIN, L.; HÄRDIG, J.; LARSSON, Å. 1988. Biochemical and physiological disturbances in fish inhabiting coastal waters polluted with bleached kraft mill effluents. *Marine Environmental Research*, 24: 233–236.
- ANTUNES, P.; GIL, O. 2004. PCB and DDT contamination in cultivated and wild sea bass from Ria de Aveiro, Portugal. *Chemosphere*, 54: 1503–1507.
- BAINY, A. C. D.; WOODIN, B. R.; STEGEMAN, J. J. 1999. Elevated levels of multiple cytochrom P450 forms in tilapia from Billings reservoir-São Paulo, Brazil. *Aquatic Toxicology*, 44: 289–305.
- BARRA, R.; NOTARIANNI, V.; GENTILLI, G. 2001. Biochemical biomarker responses and chlorinated compounds in the fish *Leusciscus cephalus* along a contaminant gradient in a polluted river. *Bulletin Environmental and Contamination Toxicology*, 66: 582–90.
- BEHRENS, A.; SEGNER, H. 2005. Cytochrome P4501A induction in brown trout exposed to small streams of an urbanised area: results of a five-year-study. *Environmental Pollution*, 136: 231–42.
- BRAGA, F. M. S. 1986. Estudo entre fator de condição e relação peso / comprimento para alguns peixes marinhos. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro; 46(2): 339–346.
- BULGER, A. J.; DOLLOFF, C. A.; COSBY, B. J.; ESHLEMAN, K. N.; WEBB, J. R.; GALLOWAY, J. N. 1995. The “Shenandoah National Park: Fish in sensitive habitats” (SNP: FISH) project. An integrated assessment of fish community responses to stream acidification. *Water Air Soil Pollution*, 85: 309–14.
- CARVALHO, C. E. V.; TORRES, J. P. M. 2002. The ecohydrology of the Paraíba do Sul river, Southeast Brazil. In MCCLAIN, M. E. (ed), *The Ecohydrology of South American Rivers and Wetlands*. The IAHS Series of Special Publications, Venice, Italy: 179–191.
- CHELLAPPA, S.; HUNTINGFORD, F. A.; STRANG, R. H. C.; THOMSON, R. Y. 1995. Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology*, 47: 775–87.
- CHAMBERS, J. E. 1979. Induction of microsomal mixedfunction oxidase system components in striped mullet by short-term exposure to crude oil. *Toxicology Letters*, 4: 227–230.

- CRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoa, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research (Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis)*, 491: 39-44.
- DE VLAMING, V. L.; GROSSMAN, G.; CHAPMAN, F. 1981. On the use of gonadosomatic index. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 73A: 31-39.
- DE VOOGT, P.; BRINKMAN, U. A. TH. 1989. Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. In: Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxines and related products. Kimbrough, R.D., Jensen, A.A., [Eds] Topics in environmental health, Vol.4. Publ. By Elsevier Science Publishers B.V.: 3-29
- DICKERSON, R. L.; HOOPER, M. J.; GARD, N. W.; COBB, G. P.; KENDALL, R. J. 1994. Toxicological foundations of ecological risk assessment: Biomarker development and interpretation based on laboratory and wildlife species. *Environmental Health Perspectives*, 102(12): 65-69.
- EGGENS, M. L.; BERGMAN, A.; VETHAAK, A. D.; VAN DER WEIDEN, M.; CELANDER, M.; BOON, J. P. 1995b. Cytochrome P4501A indices as biomarkers of contaminant exposure: result of a field study with plaice (*Pleuronectes platessa*) and flounder (*Platichthys flesus*) from the southern North Sea. *Aquatic Toxicology*, 32: 211-225.
- FABACHER, D. L.; BAUMANN, P. C. 1985. Enlarged livers and hepatic microsomal mixed-function oxidase components in tumor-bearing brown bullheads from a chemically contaminated river. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 4: 703-10.
- FACEY, D. E.; BLAZER, S. V.; GASPER, M. M.; TURCOTTE, L. C. 2005. Using Fish Biomarkers to Monitor Improvements in Environmental Quality. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17: 263-266.
- FEEMA – Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente. 1999. *Análises de Micropoluentes Orgânicos em Águas e Sedimento, Rio Paraíba do Sul, Trecho Resende – Vargem Alegre*. Rio de Janeiro, 18p.
- FILLMAN, G.; READMAN, J. W.; TOLOSA, I.; BARTOCCHI, J.; VILLENEUVE, J. P.; CATTINI, C.; MEE, L. D. 2002. Persistent organochlorine residues in sediments from the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 122-133.
- FLETCHER, G. L.; KING, M. J.; KICENIUK, J. W.; ADDISON, R. F. 1982. Liver hypertrophy in winter flounder following exposure to experimentally oiled sediments. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 73C: 457-62.
- GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; AOYAMA, I.; LUO, R.; GAGNON, C.; COUILLARD Y.; CAMPBELL, P.; SALAZAR, M. 2002. Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. *Environmental Toxicology*, 17: 149-159.
- GALLAGHER, E. P.; DI GIULIO, R. T. 1989. Effects of complex waste mixtures on hepatic monooxygenase activities in brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*). *Environmental Pollution*, 62: 113-28.
- GALLOWAY, B. J.; MUNKITTRICK, K. R.; CURRIE, S.; GRAY, M. A.; CURRY, R. A.; WOOD, C. S. 2003. Examination of the responses of slimy sculpin (*Cottus cognatus*) and white sucker (*Catostomus commersoni*) collected on the St. John River (Canada) downstream of pulp and paper mill, and sewage discharges. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 2898-2907.
- GALLOWAY, T. S.; BROWN, R. J.; BROWNE, M. A.; DISSANAYAKE, A.; LOWE, D.; JONES, M. B. 2004. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environmental Science and Technology*, 38: 1723-1731.
- GOKSØYR, A.; FÖRLIN, L. 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology, and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 22: 287-311.

- GRIFFITHS, D.; KIRKWOOD, R. C. 1995. Seasonal variation in growth, mortality and fat stores of roach and perch in Lough Neagh, Northern Ireland. *Journal of Fish Biology*, 47: 537-54.
- HAASCH, M. L.; PRINCE, R.; WEJKSNORA, P. J.; COOPER, K. R.; LECH, J. J. 1993. Caged and wild fish: induction of hepatic cytochrome-P450 (CYP1A1) as an environmental biomonitor. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 885-895.
- HARSHBARGER, J. C.; CLARK, J. B., 1990. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North-America. *Science of the Total Environment*, 94(1-2): 1-32.
- HICKIE, B. E.; DIXON, D. G. 1987. The influence of diet and pre-exposure on the tolerance of sodium pentachlorophenate by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquatic Toxicology*, 9: 343-53.
- HOOFTMAN, R. N., DE RAAT, W. K. 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow, *Umbra pygmaea* by ethyl methane sulphate. *Mutation Research*, 104: 147-152.
- ILIOPOULOU-GEORGUDAKI, J.; KANTZARIS, V.; KATHARIOS, P.; KASPIRIS, P.; GEORGIADIS, T.; MONTESANTOU, B. 2003. An application of different bioindicators for assessing water quality: a case study in the rivers Alfeios and Pineios (Peloponnisos, Greece). *Ecology Industrial*, 2: 345-60.
- IRWIN, R. J.; VANMOUWERIK, M.; STEVENS, L.; SEESE, M. D.; BASHAM, W. 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, CO. (Distributed within the Federal Government as an electronic document (projected public availability on the internet or NTIS: 1998)).
- KARR, J. R.; ALLAN, D.; BENKE, A. C. 2000. River conservation in the United States and Canada: Science, Policy, and Practice. In: BOON, P. J.; DAVIS, B. R.; PETTS, G. E. (eds). *Perspectives on River Conservation: Science, Policy, and Practice*. John Wiley. Chichester: Global 35 pp
- KHAN, R. A. 2003a. Stress-related bioindicator anomalies in feral male winter flounder (*Pleuronectes americanus*) exposed to effluent from two pulp and paper mills in Newfoundland. *Bulletin Environmental and Contamination Toxicology*, 70: 401-407.
- KHAN, R. A. 2003b. Health of flatfish from localities in Placentia Bay, Newfoundland, contaminated with petroleum and PCBs. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 44: 485-492.
- KICENIUK, J. W.; KHAN, R. A. 1987. Effect of petroleum hydrocarbons on Atlantic cod, *Gadus morhua*, following chronic exposure. *Canadian Journal of Zoology*, 65: 490-4.
- KIRBY, M. F.; SMITH, A. J.; ROOKE, J.; NEALL, P.; SCOTT, A. P.; KATSIADAKI, I. 2007. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquatic Toxicology*, 81: 233-244.
- KLAPPER, H. 1998. Water quality problems in reservoirs of Rio de Janeiro, Minas Gerais and São Paulo. *International Review of Hydrobiology*, 83: Special Issue: 93-102.
- LAM, P. K. S.; WU, R. S. S. 2003. Use of biomarkers in environmental monitoring. Japan: STAP workshop on the use of bioindicators, biomarkers and analytical methods for the analysis of POPs in developing countries. December 10-12, Sci & Tech Adv Panel and Global Env Facility, Ministry of Environment, Japan.
- LEHTONEN, H.; JOKIKOKKO, E. 1995. Changes in the heavily exploited vendace (*Coregonus albula* L.) stock in northern Bothnian Bay. *Advances in Limnology*, 46: 379-86.

- LIMA-JUNIOR, S. E.; GOITEIN, R. A. 2005. A variação sazonal da condição corpórea de *Pimelodus maculatus* está relacionada ao desenvolvimento gonadal? In: *Encontro Brasileiro de Ictiologia*, 16., , João Pessoa. *Resumos...* João Pessoa: *Sociedade Brasileira de Ictiologia*. p.: 171.
- MCCASTER, M. E.; VAN DER KRAAK, G. J.; MUNKITTRICK, K. R. 1996. An epidemiological evaluation of the biochemical basis for steroid hormonal depressions in fish exposed to industrial wastes. *Journal Great Lakes Researchs*, 22: 153-171.
- MENEZES, N. A.; WEITZMAN, S. H.; OYAKAWA, O. T.; DE LIMA, F. C. T.; CASTRO, R. M. C.; WEITZMAN, M. J. 2007. *Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais*. São Paulo: Museu de zoologia – Universidade de São Paulo, 408 p.
- MÖLLER, H. 1985. A critical review on the role of pollution as a cause of fish diseases. In: Ellis AE, editor. *Fish and Shellfish Pathology*. New York: Academic Press. p 169-82.
- MUNKITTRICK, K. R.; MCMASTER, M. E.; MCCARTHY, L. H.; SERVOS, M. R.; VAN DER KRAAK, G. J. 1998. An overview of recent studies on the potential of pulp mill effluents to alter reproductive parameters in fish. *Journal of Toxicological Environmental Health*, 1: 347-371.
- OERTEL, N.; SALÁNKI, J. 2003. Biomonitoring and bioindicators in aquatic ecosystems. In: Ambasht RS, Ambasht NK, editors. *Modern trends in applied aquatic ecology*. Nueva York, USA: Kluwer Academic; p. 219–46.
- OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; MAUTARI, K. C.; NOLASCO, J. C. 2006. *Peixes de riachos da Mata Atlântica nas unidades de conservação do Vale do Rio Ribeira do Iguape no Estado de São Paulo*. São Paulo: Editora Neotrópica.
- PARENTE, T. E.; DE-OLIVEIRA, A. C.; SILVA, I. B.; ARAUJO, F. G.; PAUMGARTTEN, F. J. 2004. Induced alkoxyresorufin-*O*-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere*, 54: 1613-1618.
- PARKS, L. G.; LAMBRIGHT, C. S.; ORLANDO, E. F.; GUILLETTE Jr.; L.J.; ANKLEY, G. T.; GRAY Jr.; L. E. 2001. Masculinization of female mosquitofish in kraft mill effluent-contaminated Fenholloway river water is associated with androgen receptor agonist activity. *Journal of Toxicological Sciences*, 62: 257–267.
- PFEIFFER, W. C.; FISZMAN, M.; MALM, O.; AZCUE, J. M. 1986. Monitoring heavy metals pollution by the critical pathway analysis in the Paraíba do Sul river. *Science of the Total Environment*, 58: 73-79.
- PINTO, E.M., 2001. Principais dificuldades de gerenciamento de resíduos industriais no estado do Rio de Janeiro. O caso CENTRES - Centro Tecnológico de Resíduos, localizado no município de Queimados. MSc thesis. Federal Fluminense University, Niteroi, RJ, Brazil, 133 pp.
- POELS, C. L. M.; VAN DER GAAG, M. A.; VAN DE KERKHOFF, J. F. J. 1980. An investigation into the long-term effects of Rhine water on rainbow trout. *Water Research*, 14: 1029-35.
- QUALIDADE DOS RIOS. Disponível em: <[www.cetesb.sp.gov.br/informações\\_ambientais/qualidade-dos-rios/informações-rios.htm](http://www.cetesb.sp.gov.br/informações_ambientais/qualidade-dos-rios/informações-rios.htm)>. Acesso em: VII-III/2007.
- REYNAUD, S., DESCHAUX, P. 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquatic Toxicology*, 77: 229–238.
- SABOROWSKI, R.; BUCHHOLZ, R. 1996. Annual changes in the nutritive state of North Sea dab. *Journal of Fish Biology*, 49: 173-94.

- SAKAMOTO, K. Q.; NAKAI, K.; AOTO, T.; YOKOYAMA, A.; USHIKOSHI, R.; HIROSE, H.; ISHIZUKA, M., KAZUSAKA, A., FUJITA, S., 2003. Cytochrome P450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan. *Chemosphere*, 51: 491–500.
- SCHMITT, C. J.; DETHLOFF, G. M. editors. 2005. Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: Selected Methods for Monitoring Chemical Contaminants and their Effects in Aquatic Ecosystems. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Columbia, (MO): Information and Technology Report USGS/BRD. 81 pp.
- SCHMITT, C. J.; HINCK, J. E.; BLAZER, V. S.; DENSLOW, N. D.; DETHLOFF, G. M., BARTISH, T. M.; COYLE, J. J.; TILLITT, D. E. 2005. Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Rio Grande and its U.S. tributaries: spatial and temporal trends. *Science of the Total Environment*, 350: 161–193.
- SEPÚLVEDA, M. S.; JOHNSON, W. E.; HIGMAN, J. C.; DENSLOW, N. D.; SCHOEB, T. R., GROSS, T. S. 2002b. An evaluation of biomarkers of reproductive function and potential contaminant effects in Florida largemouth bass (*Micropterus salmoides floridanus*) sampled from the St Johns River. *Science of the Total Environment*, 289: 133–144.
- SEPÚLVEDA, M. S.; GALLAGHER, E. P.; WISER, C. M., GROSS, T. S. 2004. Reproductive and biochemical biomarkers in largemouth bass sampled downstream of a pulp and paper mill in Florida. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 431–440.
- STEGEMAN, J. J.; WOODIN, B. R.; SINGH, H.; OLEKSIK, M. F.; CELANDER, M. 1997. Cytochromes P450 (CYP) in tropical fishes: catalytic activities, expression of multiple CYP proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fishes from Bermuda. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C 116: 61–75.
- SWAMI, K.; NARANG, A. S.; NARANG, R. S.; EADON, G. A. 1992. Thermally induced formation of PCDD and PCDF from tri- and tetrachlorobenzene in dielectric fluids. *Chemosphere*, 24(12): 1845-1853.
- TYLER, A. V.; DUNN, R. S. 1976. Ration, growth, and measures of somatic and organ condition in relation to meal frequency in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, with hypotheses regarding population homeostasis. *Journal Fisheries Research Board of Canada*, 33: 63-75.
- UNEP – United Nations Environment Programme. Disponível em <<http://www.chem.unep.ch/pops/>> Acesso em: XIV-I/2008.
- VAN DER OOST, R.; BEBER, J.; VERMEULEN, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacol*, 13: 57–149.
- VAN DER OOST, R.; OPPERHUIZEN, A.; SATUMALAY, K.; HEIDA, H.; VERMEULEN, N. P. E. 1996a. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): I. Bioaccumulation: biota–sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquatic Toxicology*, 35: 21– 46.
- VIJAYAN, M. M.; ALURU, N.; MAULE, G. A.; JØRGENSEN, H. E. 2006. Fasting Augments PCB Impact on Liver Metabolism in Anadromous Arctic Char. *Toxicological Sciences*, 91(2): 431–439.
- WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. 2001. editors. *Principles of ecotoxicology*. 2nd ed. Nueva York, USA: Taylor & Francis; p. 163–78.

- WEGE, G. J.; ANDERSON, R. O. 1978. Relative weight (W<sub>r</sub>): a new index of condition for largemouth bass. Pages 79-91 In G. D. NOVINGER and J. G. DILLARD, editors. *New approaches to the management of small impoundments*. American Fisheries Society; North Central Division, Special Publication 5, Bethesda, Maryland.
- WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B.; BLAISE, C. 1996. Comparing the presence, potency and potential hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27(2): 116-139.
- WOODHEAD, R.; LAW, R.; MATTHIESSEN, P. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments around England and Wales, and their possible biological significance. *Marine Pollution Bulletin*, 38: 773-790.
- YOSHIDA, R.; OGAWA, Y. 2000. Oxidative stress induced by 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: an application of oxidative stress markers to cancer risk assessment of dioxins. *Industrial Health*, 38: 5-14.