

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA - MBT

**Expressão gênica em acari-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*) (Castelnau,
1855) exposto a sedimento contaminado por petróleo.**

Dulcilene Pereira Martins

MANAUS – AM

2011

Dulcilene Pereira Martins

Expressão gênica em acari-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*) (Castelnaud, 1855) exposto a sedimento contaminado por petróleo.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luis Val (INPA/UEA)

Coorientadora: Prof(a). Dra. Nislanha Ana dos Anjos (INPA)

MANAUS – AM

2011

PARECER

Os membros da Banca Examinadora, designada pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, reuniram-se para realizar a arguição da dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata Dulcilene Pereira Martins, sob o título “Expressão gênica em acari-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*) (Castelnau, 1855) exposto a sedimento contaminado por petróleo”, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Após análise do referido trabalho e arguição da candidata, os membros são de parecer pela APROVAÇÃO da dissertação.

Manaus, 14 de setembro de 2011.

Dr. Adalberto Luis Val
Presidente da Banca e Orientador

Dra. Helena Camarão Telles Ribeiro
UEA – Membro Titular

Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val
INPA - Membro Titular

FICHA CATALOGRÁFICA

M386e Martins, Dulcilene Pereira

Expressão gênica em acari-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*) (Castelnau, 1855) exposto a sedimento contaminado por petróleo. / Dulcilene Pereira Martins. – Manaus/AM: Universidade do Estado do Amazonas, 2011. xix, 55p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2011. Orientador: Dr. Adalberto Luis Val. (INPA/UEA). Coorientadora: Dra. Nislanha Ana do Anjos (INPA)

1. Expressão gênica 2. *Pterygoplichthys pardalis* 3. Petróleo 4. FSA 5. Sedimento 6. *ahr* 7. *cypla* 8. *gst* I. Título

CDU: 604

Ficha catalográfica elaborada por

Maria Eliana N. Silva – CRB- 11/248

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Processos decorrentes de um derramamento de petróleo em meio aquático06
- Figura 2:** Exemplar juvenil de acari-bodó *P. pardalis* proveniente do Lago do Catalão, Careiro da Várzea (AM)13
- Figura 3:** Lago do Catalão, município do Careiro da Várzea (AM). Captura dos exemplares juvenis de *P. pardalis*15
- Figura 4:** Extração da fração solúvel do petróleo: recipiente utilizado na separação da FSA (A), adição de água destilada (B), petróleo (C) e agitação em agitador sem aquecimento (D)16
- Figura 5:** Coleta de sedimento de área controle no rio Urucu utilizando draga coletora. A área de coleta encontrava-se à uma hora de distância do Porto Urucu, a montante no rio Urucu17
- Figura 6:** Tanques de concreto revestido com azulejo, acabamento em epóxi e ralo de inox (A), tanques com os experimentos já montados, da esquerda para direita controle, tratamentos 1, 2 e 3 (B)18
- Figura 7:** Amostras de RNA de 12 exemplares de *P. pardalis*, 1 a 6 exemplares do controle e 7 a 12 exemplares expostos a concentração de 0,243% da FSA do petróleo de Urucu24
- Figura 8:** Normalização da expressão do gene *ahr* em exemplares de *P. pardalis* expostos ao sedimento contaminado com 0, 0,243, 0,971 e 3,885% de FSA do petróleo de Urucu e controle. Não houve diferença significativa entre os grupos e com o controle ($S0,05$). n=6. Valores apresentados como média e erro padrão da média26

Figura 9: Normalização da expressão do gene *cyp1a* em exemplares de *P. pardalis* expostos ao sedimento contaminado com 0, 0,243, 0,971 e 3,885% de FSA do petróleo de Urucu e controle. Letras diferentes (a e b) indicam diferença significativa entre os grupos ($S0,05$). n=6. Valores apresentados como média e erro padrão da média26

Figura 10: Normalização da expressão do gene *gst* em exemplares de *P. pardalis* expostos ao sedimento contaminado com 0, 0,243, 0,971 e 3,885% de FSA do petróleo de Urucu e controle. Letras diferentes (a e b) indicam diferença significativa entre os grupos ($S0,05$). n=6. Valores apresentados em forma de média e erro padrão da média27

LISTA DE ABREVIATURAS

ahr – Aryl Hydrocarbon Receptor
AM – Amazonas
ANE – Anormalidades Nucleares Eritrocíticas
ANOVA – Análise de variância
ARNT – Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator
BOGPM – Base de Operações Geólogo Pedro de Moura
C – Controle
Cd – Cádmiio
cDNA – DNA complementar
CL₅₀ – Concentração média letal
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cr – Cromo
cyp1a – Citocromo P450 família 1A
Cu – Cobre
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
T1 – Tratamento 1
T2 – Tratamento 2
T3 – Tratamento 3
EROD – Ethoxyresorufin O-deethylase
FIA – Fração Insolúvel em Água do petróleo
FSA – Fração Solúvel em Água do Petróleo
GLP – Gás Liquefeito de Petróleo
gst – Glutathione-s-transferase
h - Hora
HNO₃ – Ácido Nítrico
HPA – Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HSP90 – Heat Shock Protein 90
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LEEM – Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular
min - Minuto
mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro
Mn – Manganês
N – Nitrogênio

NCBI - National Center for Biotechnology Information
Ni – Níquel
O – oxigênio
OD – Oxigênio dissolvido
Pb – Chumbo
pb – Pares de base
PCB – Bifenil policlorado
PCR – Reação em cadeia da polimerase
pH – Potencial hidrogeniônico
PHAHs – Hidrocarbonetos aromáticos poli-halogenados
REMAN – Refinaria Isaac Sabbá
rpm – Rotação por minuto
RNA – Ácido ribonucléico
RT-PCR – Transcriptase reversa – Reação em cadeia da polimerase
S – Enxofre
Se – Selênio
SMG – Serviço Mineralógico do Brasil
T – Temperatura
TAE – Tampão Tris-acetato
UFAM – Universidade Federal do Amazonas
USEPA - United States Environmental Protection Agency
V – Vanádio
XRE – Xenobiotic Region Enhancer

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDAS

cm - Centímetro

kg - Kilograma

km – Kilômetro

km² – Kilômetro quadrado

L – Litro

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mm - Milímetro

mg/L – Miligrama por litro

m³ – Metro cúbico

m³/s – Metro cúbico por segundo

ng - Nanograma

nm - Nanômetro

°C – Grau Celsius

µg/L – Micrograma por litro

µg/µL – Micrograma por microlitro

µL - Microlitro

µM - Micromolar

µm - Micrômetro

U – Unidade

U/µL – Unidade por microlitro

RESUMO

O ecossistema aquático é um dos que mais sofre os impactos causados por poluentes de origem antrópica. O petróleo é um dos principais poluentes ambientais. A fração solúvel do petróleo (FSA) é a que causa maior impacto negativo no meio ambiente e é considerada a de maior importância para estudos toxicológicos. Vários marcadores moleculares vêm sendo testados em peixes da Amazônia para detecção dos efeitos do petróleo. *Pterygoplichthys pardalis* é uma espécie demersal nativa da Amazônia e que está distribuída entre outras na região de Urucu, onde está localizada a Base de Operações Geólogos Pedro de Moura (BOGPM), local de intensa exploração de petróleo. Assim, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a expressão dos genes *ahr*, *cyp1a* e *gst* em *P. pardalis* exposto e não exposto a sedimento contaminado com a FSA do petróleo de Urucu. Os peixes foram expostos por 96 horas a sedimentos contaminados com 0,243, 0,971 e 3,885% de FSA do petróleo de Urucu. Para análise molecular dos genes foi utilizada a técnica RT-PCR, com *primers* degenerados. Como controle constitutivo foi utilizada a *-actina*. A expressão gênica foi avaliada por densitometria com auxílio do programa computacional Image J. Os resultados mostraram que *cyp1a* e *gst* apresentaram aumento de expressão com o aumento da concentração da FSA do petróleo em sedimento. Os resultados de expressão gênica mostraram, ainda, que o *cyp1a* pode ser considerado como um marcador molecular em potencial para ambientes contaminados com FSA do petróleo. A espécie *P. pardalis* se apresentou como um bom bioindicador de qualidade ambiental no biomonitoramento em áreas de exploração de petróleo, como a BOGPM.

PALAVRAS-CHAVE: Expressão gênica, *Pterygoplichthys pardalis*, petróleo, FSA, sedimento, *ahr*, *cyp1a*, *gst*.

ABSTRACT

Petroleum is one of the principal pollutants of aquatic ecosystems worldwide and one with the largest environmental impact. The water soluble fraction of petroleum (WSF) is the most toxic component, and thereby the most important for toxicological studies. Various molecular markers have been tested on Amazonian fish to detect the contaminating effects of petroleum. *Pterygoplichthys pardalis* is a demersal fish species native to the Amazon, found in many regions including the region of the Urucu River, where petroleum is extracted on a large scale at the Pedro Moura Geological Base. The main objective of this study was to evaluate gene expression of *ahr*, *cyp1a* and *gst* in *P. pardalis* exposed to sediment contaminated with Urucu oil WSF. The fish were exposed for 96 hours to sediments contaminated with 0.243, 0.971 and 3.885% of Urucu WSF. For molecular analysis the RT-PCR technique was applied with degenerated primers, while *-actina* was utilized as the constitutive control. Gene expression was evaluated by densitometry, using the software program Image J. The results demonstrated that expression of *cyp1a* and *gst* increased with increased concentrations of Urucu oil WSF in the sediments. Most importantly, *cyp1a* showed great potential as a molecular marker in aquatic environments contaminated with WSF. Furthermore, *P. pardalis* proved a worthwhile fish species for monitoring environmental quality of aquatic systems in areas of petroleum extraction, like the Pedro Moura Geological Reserve in the Urucu region of the Amazon.

KEYWORDS: Gene expression, *Pterygoplichthys pardalis*, crude oil, WSF, sediment, *ahr*, *cyp1a*, *gst*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 O ambiente amazônico	01
1.2 Ictiofauna amazônica	02
1.3 O petróleo na Amazônia	03
1.4 Província petrolífera de Urucu	03
1.5 Petróleo: seus componentes e sua toxicidade	04
1.6 Bioindicadores e biomarcadores de contaminação ambiental	09
2. OBJETIVOS	12
2.1 Geral	12
2.2 Específicos	12
3. METODOLOGIA	13
3.1 Espécie de estudo: <i>Pterygoplichthys pardalis</i>	13
3.2 Exposição dos exemplares de <i>P. pardalis</i> ao sedimento contaminado com FSA do petróleo de Urucu	14
3.2.1 Obtenção dos exemplares de <i>P. pardalis</i>	14
3.2.2 Obtenção da FSA do petróleo	15
3.2.3 Obtenção e contaminação do sedimento com a FSA do petróleo de Urucu	16
3.3 Análise da expressão dos genes <i>ahr</i> , <i>cyp1a</i> e <i>gst</i> em <i>P. pardalis</i> exposto ao sedimento contaminado com a FSA do petróleo de Urucu	19
3.3.1 RT-PCR (Amplificação por Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase)	19
3.4 Análises estatísticas	21
3.5 Sequenciamento dos genes <i>-actina</i> , <i>ahr</i> , <i>cyp1a</i> e <i>gst</i>	22
4 RESULTADOS	23
4.1 Experimento de exposição de <i>P. pardalis</i> ao sedimento contaminado com FSA do petróleo de Urucu	23
4.2 Análise da expressão dos genes <i>ahr</i> , <i>cyp1a</i> e <i>gst</i> em <i>P. pardalis</i> exposto ao sedimento contaminado com a FSA do petróleo de Urucu	24
4.3 Sequenciamento dos genes <i>-actina</i> , <i>ahr</i> , <i>cyp1a</i> e <i>gst</i>	27
5 DISCUSSÃO	31

direção dos ventos e das ondas do meio aquático auxiliam na *lise* das moléculas dos componentes do óleo em pequenas gotículas (0,01-1mm de diâmetro) as quais são retiradas da coluna d'água até serem degradadas pela ação bacteriana, processo conhecido como biodegradação. O petróleo também apresenta componentes prejudiciais aos organismos que vivem em contato com o sedimento do fundo, pois parte do óleo sofre sedimentação, afetando a comunidade bentônica sendo absorvida pela biota que a compõe (KINGSTON, 2002).

A fração solúvel do petróleo (FSA) é a principal causadora de impactos no meio ambiente aquático a partir de compostos derivados do petróleo, pois os componentes iniciais do petróleo sofrem várias transformações químicas, que podem potencializar os efeitos adversos, afetando todo o ecossistema aquático (ZIOLLI, 1999).

Em ambiente marinho, os efeitos de um derramamento de petróleo podem persistir por muitos anos. Em ambientes lênticos, como manguezais e restingas, esses efeitos podem permanecer por décadas. Isso dependerá de uma série de fatores como, por exemplo, a composição do petróleo. Porém, na maioria das vezes a recuperação ambiental ocorre entre 2 e 10 anos. Os efeitos da contaminação pelo petróleo em um ecossistema podem ser tanto imediatos quanto em longo prazo, denominados de exposição aguda ou crônica, respectivamente (KINGSTON, 2002).

KATSUMITI et al. (2006), avaliando os efeitos morfológicos em peixes que habitavam uma área no Paraná, onde houve vazamento de óleo de uma refinaria, verificou que após cinco anos do acidente, os indivíduos apresentaram infiltrações leucocitárias, centros eosinofílicos e neoplasias em seus fígados. O autor mencionou, ainda, que nas brânquias dos organismos foram visualizados aneurismas, fusões nas lamelas secundárias, proliferação celular e deslocamento de epitélio.

A presença de vários componentes do petróleo em ambiente aquático causa efeitos adversos em peixes, tendo influência desde o nível molecular até o nível populacional (revisto por ANJOS, 2008). Muitos trabalhos vêm sendo realizados tendo em vista a preocupação com o impacto que um derramamento de petróleo pode causar no meio ambiente aquático. PAUKA (2007) cita que os componentes do petróleo são capazes de causar danos em diferentes níveis de organização biológica, como alterações no comportamento reprodutivo e alimentar, danos cromossômicos, celulares, entre outros. MATSUO (2004) menciona que muitos dos componentes do petróleo apresentam potenciais efeitos carcinogênicos ou genotóxicos para a biota e, dependendo dos metabólitos e a taxa de absorção desses compostos, seus efeitos podem ser muito mais graves.

Em estudo realizado por KOCHHANN (2010), avaliando o efeito de concentrações subletais do petróleo de Urucu, a toxicidade das frações solúvel (FSA) e insolúvel (FIA), bem como o efeito mecânico dessa fração na superfície da coluna d'água, sobre o peixe amazônico tambaqui (*Colossoma macropomum*), verificou que a exposição da espécie a FSA do petróleo causa alterações nos parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais. Porém, a FIA apresenta maior toxicidade do que a FSA, pois a FSA é rapidamente volatilizada. Vale ressaltar que *C. macropomum* é uma espécie que apresenta RSA (Respiração Aérea na Superfície), ficando mais exposta ao óleo presente na superfície da água, podendo interferir na capacidade de sobrevivência e afetar na estrutura de sua população.

Em peixes teleósteos a FSA do petróleo causa alterações estruturais nas lamelas respiratórias de suas brânquias (DIMICHELE e TAYLOR, 1978). Além de danos estruturais podem, ainda, ocorrer lesões hiperplásicas envolvendo células da mucosa que comprometem as trocas gasosas, dificultando a respiração desses organismos, resultando em hipoxia, podendo levá-los à morte (SPIES et al., 1996).

Algumas espécies de peixes amazônicos necessitam capturar oxigênio na interface água-ar ou diretamente da atmosfera, para realizar suas trocas gasosas (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995). Os efeitos decorrentes do óleo cru que permanece na coluna d'água podem impedir esta atividade. Em espécies que apresentam respiração aérea facultativa (como o acari-bodó) e obrigatória (como o pirarucu) ocorre uma exposição maior ao óleo cru do epitélio responsável pelas trocas gasosas, o que resulta em danos teciduais e comprometimento da regulação iônica (TORREBLANCA et al., 1987). Em estudos realizados com duas espécies amazônicas, *Hoplosternum littorale* e *Colossoma macropomum*, expostas ao petróleo de Urucu foi observado uma redução significativa de cerca de 80% na concentração do oxigênio dissolvido (OD) no sangue (VAL e ALMEIDA-VAL, 1999).

Em trabalho realizado por BRUST et al. (2005) acerca dos efeitos do petróleo em *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), foi observado o aparecimento de Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ANE) causadas por danos genotóxicos. Em trabalho realizado por ANJOS (2008) com embriões de *Danio rerio* expostos à fração solúvel do petróleo, nas concentrações de 0,39%, 1,56% e 6,25% por 48 horas, foram observados efeitos teratogênicos, tais como redução de pigmentação, edemas pericardiais e redução nos batimentos cardíacos. A autora avaliou os efeitos químicos do petróleo de Urucu no nível celular e molecular em embriões de peixes sendo, portanto, utilizada a fração solúvel, tendo em vista que a fração insolúvel apesar de ser tóxica representaria mais uma barreira física do que química.

Diariamente os organismos estão expostos a ação de xenobióticos, podendo ser desde suplementos alimentares a poluentes ambientais. A biotransformação destes xenobióticos pelo organismo é realizada através de enzimas específicas que atuam na eliminação desses compostos (SILVA et al., 2003). A detecção e avaliação do dano que estes xenobióticos podem causar nos organismos dão origem ao estudo de biomarcadores que indiquem os efeitos da exposição a compostos do petróleo, por exemplo.

1.6 Bioindicador e biomarcadores de contaminação ambiental

Os efeitos que os poluentes ambientais podem causar nos peixes podem se manifestar em diferentes níveis tróficos, causando, ainda, danos a tecidos e órgãos, mudanças comportamentais, interferindo no crescimento, desenvolvimento e causando alterações fisiológicas. Os peixes são bons indicadores (bioindicadores) dos estressores ambientais, como os poluentes (ADAMS, 1990). As respostas biológicas que os peixes apresentam a estes poluentes podem ser utilizadas para se avaliar danos iniciais causados a estes organismos e estas respostas são denominadas de biomarcadores. Assim, os biomarcadores indicam exposição e/ou efeito tóxico destes contaminantes presentes no meio ambiente, sendo ferramentas importantíssimas que podem ser utilizadas no biomonitoramento para se avaliar a qualidade do ecossistema aquático (WALKER et al., 1996). Como monitores de exposição, os biomarcadores podem responder somente poluentes biológicos que estejam disponíveis no ambiente e como monitores de efeito podem integrar efeito de vários estressores auxiliando na avaliação dos mecanismos de ação destes (ADAMS, 1990).

Além de se apresentarem como biomarcadores de exposição e efeito (ADAMS, 1990) existe uma terceira subdivisão, biomarcadores de susceptibilidade que são utilizados para indicar respostas a exposição de organismos a xenobióticos. Os biomarcadores **de exposição** incluem as enzimas antioxidantes, a concentração de metalotioneína, entre outros; os **de efeito** incluem medidas bioquímicas, fisiológicas, alterações em tecidos ou nos fluídos corporais, danos a saúde ou doença, incluindo dano no DNA; e biomarcadores **de susceptibilidade** que incluem fatores genéticos e mudanças em receptores, que podem alterar a susceptibilidade do organismo ao xenobiótico (NRC, 1997; WHO, 1993; revisto por ANJOS, 2008).

A maioria dos xenobióticos é submetida à biotransformação em duas fases, o que irá depender da sua estrutura. As reações da fase I incluem oxidação, redução e hidrólise desses compostos, introduzindo grupos funcionais, geralmente hidroxila, à molécula do xenobiótico.

Muitos compostos, nesta fase, são convertidos a metabólitos altamente reativos (bioativação). Um exemplo de enzima que atua nesta fase é a CYP1A. Já as reações de fase II são geralmente de detoxificação e envolve a conjugação de metabólitos com um substrato endógeno, podendo ser glutatona, sulfato, glicose, acetato e outros, realizada por enzimas transferases. Esse processo irá tornar os metabólitos hidrofílicos, o que facilita sua excreção pelo organismo. Um exemplo de enzima que atua na reação de fase II é a glutatona-S-transferase (GST) (SILVA et al., 2003).

Atualmente vários marcadores biológicos vêm sendo utilizados em peixes da Amazônia, principalmente marcadores moleculares como, por exemplo, *ahr*, *cyp1a* e *gst*. ANJOS et al. (2011), em trabalho realizado com *Astronotus ocellatus* e *Danio rerio*, analisaram a expressão de sete genes marcadores, entre eles *ahr*, *cyp1a* e *gst*, genes estes relacionados à contaminação ambiental, inclusive exposição ao petróleo. OLIVEIRA (2010), trabalhando com potenciais biomarcadores para efeito do petróleo e HPAs em *Colossoma macropomum*, analisou a expressão dos genes *cyp1a* e *gst*.

AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) - É um biomarcador em potencial, pois é sensível a exposição aguda e crônica ao petróleo. Está presente no citoplasma da célula e representa um mecanismo de resposta a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Quando inativos esses receptores estão associados a duas proteínas HSP90 (*heat shock protein*). Quando os peixes absorvem os HPAs esses receptores se desligam das proteínas e se ligam aos HPAs, formando um complexo AhR+HPAs, que por intermédio de um translocador ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear translocator*) chega ao núcleo celular. O complexo AhR+HPAs+ARNT se liga a uma região promotora XRE (*xenobiotic region enhancer*) ocorrendo assim a transcrição, resultando na expressão de genes, como o *cyp1a*, que por sua vez também é um biomarcador em potencial (HAHN, 1998).

CYP1A – O citocromo P450 da subfamília 1A (CYP1A) é um sistema que apresenta isoformas, que respondem a diversos poluentes orgânicos, quali e quantitativamente. Trata-se de uma família de genes induzidos em vertebrados: CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 (BAYNE et al., 1999). Na subfamília do citocromo P450 estão enzimas de biotransformação de alguns compostos inclusive de HPAs. As enzimas do citocromo P450 apresentam papel importante no metabolismo de vários xenobióticos, catalisando as reações de detoxificação e bioativação. São proteínas predominantes no retículo endoplasmático do tecido hepático (SILVA et al., 2003). Em relação à expressão gênica, o gene *cyp1a* normalmente se expressa em células epiteliais de vários órgãos, como: células endócrinas, tecido nervoso, nas brânquias, no rim, no fígado, etc. Porém, a maior atividade deste gene, se comparado aos demais órgãos, ocorre

no fígado (SARASQUETE et al., 1999), pois é neste órgão que é realizada a maior parte das reações enzimáticas, incluindo o metabolismo dos HPAs (HEATH, 1995). A CYP1A é extremamente sensível aos HPAs, porém uma desvantagem é que seu mecanismo de indução pode sofrer influência de variáveis como sexo e estágio reprodutivo (STEGEMAN, 1993). Em ambiente natural, a expressão do *cypla* pode sofrer influência de vários fatores que podem interferir na interpretação dos dados. Estes fatores vão desde temperatura, estação do ano, nível hormonal, estágio de desenvolvimento do organismo, até mistura complexas de xenobióticos (SARASQUETE e SEGNER, 2000). No entanto, esse sistema tem se mostrado altamente promissor quando utilizado como marcador de contaminação ambiental, sendo utilizado em vários trabalhos, tanto de exposição em laboratório quanto em monitoramento ambiental de áreas contaminadas (ANJOS, 2008; ANJOS et al., 2011; OLIVEIRA, 2010; PAUKA, 2007).

GST (Glutathione-S-transferase) – São dímeros protéicos apresentando massa molecular típica de 50 kDa (EDWARDS et al., 2000). É uma enzima de biotransformação que atua no processo de detoxificação, podendo ser induzida em organismos aquáticos pela presença de xenobióticos, sugerida como bioindicadora de exposição a HPAs entre outros compostos (HEATH, 1995; TELES et al., 2003). A atividade da GST tem sido descrita no fígado e em outros órgãos animais, apresentando função detoxificante (SHEEHAN et al., 2001). Esse é o maior grupo de enzimas detoxificantes e tem sido identificadas em procariontes, leveduras, plantas, moluscos, crustáceos, insetos, anfíbios, mamíferos e peixes. Sua estimulação envolve reações de conjugação na presença de glutathione (DA SILVA, 2004). Sete classes de GSTs são descritas: alfa (α), pi (π), sigma (σ), teta (θ), kapa (κ) e zeta (ζ). E, entre as GSTs, a GST teta (GSTT) é descrita como a mais antiga, sendo considerada como ancestral a todas as outras GSTs (SILVA et al., 2003). Em relação à expressão gênica, alguns autores sugerem que a indução da expressão do *gst* provavelmente possa ser regulada pelo AhR (revisito por VAN DER OOST et al., 2003).

A partir das características mencionadas dos genes *ahr*, *cypla* e *gst* estes foram selecionados para serem analisados em exemplares de *P. pardalis* expostos ao sedimento contaminado com FSA do petróleo de Urucu.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a sensibilidade de uma espécie demersal do peixe amazônico acari-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*) exposto a sedimento contaminado com a fração solúvel do petróleo (FSA) de Urucu, por meio da análise da expressão gênica.

2.2 Específicos

Avaliar se há relação entre o aumento da expressão dos genes *ahr*, *cyp1a* e *gst*, em tecido hepático de *P. pardalis*, com o aumento da concentração de FSA do petróleo de Urucu em sedimento;

Indicar dentre os genes *ahr*, *cyp1a* e *gst* qual o marcador molecular mais sensível a exposição à FSA do petróleo de Urucu;

Obter as sequências específicas dos genes *ahr*, *cyp1a* e *gst* para *P. pardalis*.

Tabela 1. Condições experimentais dos tanques para exposição dos exemplares de *P. pardalis*.

Tanques	Sedimento (kg)	FSA (L)	Água (L)	FSA%	CL ₅₀ %
C	10,345	0	144,000	0	0
T1	10,345	0,700	143,300	0,243	3,125
T2	10,345	2,800	141,200	0,971	12,5
T3	10,345	11,190	132,810	3,885	50

A FSA do petróleo de Urucu agiu no sedimento por 4 horas. Após esse período, cada tanque foi cheio com água de poço artesiano, com uma mangueira fina e com cuidado para não ressuspender na água toda a FSA contida no sedimento.

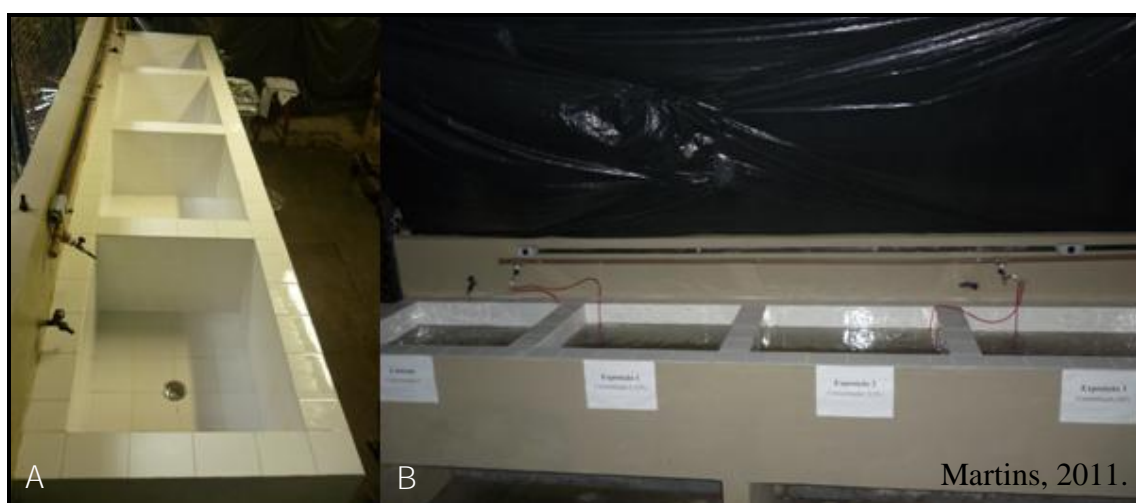


Figura 6. Tanques de concreto revestido com azulejo, acabamento em epóxi e ralo de inox (A), tanques com os experimentos já montados, da esquerda para direita controle, tratamentos 1, 2 e 3 (B).

A alimentação dos peixes foi suspensa 48 horas antes da transferência aos tanques experimentais. Em cada tanque foram colocados seis exemplares de *P. pardalis* (n=6) totalizando 24 indivíduos. O experimento teve duração de 96 horas e foram obtidos os parâmetros físico-químicos da água como, pH, oxigênio dissolvido e temperatura nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

Após a exposição aos sedimentos contaminados com FSA por 96 horas foram retiradas amostras de tecido hepático de cada indivíduo para análise de expressão gênica. As amostras foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer* - 80°C até o momento da extração de RNA total.

Análise da concentração de metais no sedimento - Ao final do experimento foram obtidas 16 amostras de sedimento, sendo 4 de cada tanque (C, T1, T2 e T3) (n=4), envoltas em Parafilm® e armazenadas em recipientes plásticos de 80 mL, protegidos com papel alumínio e mantidas em temperatura ambiente até o momento das análises. Nas amostras foram analisadas concentrações dos metais Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e V. Os sedimentos foram transferidos para uma placa de *Petri* previamente descontaminada em HNO₃ 10% por 24 horas, obtendo-se o peso úmido e, em seguida, levado a estufa com circulação mecânica 320E (FANEM®) por 48 horas até a completa ausência de umidade.

Após a secagem, o sedimento foi macerado com auxílio de cadinho e pistilo de porcelana até textura de pó. Foram obtidos 3 g de sedimento seco macerado, dissolvidos em 100 mL de HNO₃ 10% em um erlenmeyer de 250 mL e levado ao agitador (TECNAL) por 24 horas para homogeneização. A mistura foi passada em filtro de 0,45 µm e retirado 1 mL para análise em espectrofotômetro de absorção atômica Analyst 800, modo chama (Perkin Elmer).

3.3 Análise da expressão dos genes *ahr*, *cyp1a* e *gst* em *P. pardalis* exposto ao sedimento contaminado com a FSA do petróleo de Urucu

3.3.1 RT-PCR (Amplificação por Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase)

Para a expressão dos genes *ahr*, *cyp1a* e *gst* foi utilizada a técnica RT-PCR e como controle constitutivo foi utilizado a *-actina*. Foram utilizados *primers* degenerados de *-actina*, *ahr* e *cyp1a*, cedidos gentilmente pelo Dr. Stefan Scholz do Centro de Pesquisa Ambiental – Leipzig, Alemanha e Dra. Nislanha dos Anjos do LEEM/INPA – Manaus, Brasil. O *primer* da GST, específico para *Collossoma macropomum* (tambaqui), foi cedido gentilmente pela Dra. Christiane Oliveira da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Extração de RNA - A extração de RNA total de fígado foi realizada conforme o protocolo do reagente TRIzol® (Invitrogen™) com modificações. Foi retirado aproximadamente 25 mg de tecido e colocado em um microtubo de 2 mL novo e autoclavado, ao qual foi adicionado 300 µL de reagente TRIzol® para digestão do tecido e centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado, transferido para um novo tubo autoclavado de 1,5 mL e adicionado 100 µL de Clorofórmio 100% para separação de DNA, proteínas e RNA. A mistura foi vortexada e centrifugada a 12000 rpm por

15 minutos a 4°C, em seguida retirado o sobrenadante, transferido para um novo tubo de 1,5 mL e adicionado 250 µL de álcool isopropílico para facilitar a precipitação do RNA.

A mistura foi agitada levemente por inversão manual por 20 segundos e centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado permanecendo somente o *pellet*. Foram adicionados 500 µL de etanol 75% e misturado por inversão manual por 30 segundos. Posteriormente, foi centrifugada a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C, descartado o álcool completamente e adicionado 30 µL de Water Nuclease-free (Fermentas Life Sciences®) para ressuspender o RNA.

Verificação da concentração e integridade do RNA - A concentração do RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a 260/280 nm. A qualidade e integridade dos RNAs foram verificadas por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,5% em tampão MOPS (1X) e visualizadas em transiluminador L-Pix (Loccus Biotecnologia®). Foram extraídas 24 amostras de RNA total, sendo seis do controle (C) e seis de cada tratamento (T1, T2 e T3).

Tratamento com DNase - Todas as amostras foram tratadas com DNase utilizando o kit DNase I (Invitrogen™) seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações, a fim de que fosse retirado qualquer vestígio de DNA. Em um microtubo de 0,2 mL foi adicionado 1 µL de tampão de DNase (10X), 1 µg de RNA total, 1 µL de DNase I, completando com Water Nuclease-free até um volume final de 10 µL e incubado em gelo por 15 min, após esse período foi adicionado 1 µL de solução de EDTA para inativação da DNase, dado um *spin* rapidamente (2 seg) e levado ao termociclador por 5 min a 65°C. Após a digestão com Dnase as amostras foram quantificadas, verificadas suas integridades e armazenadas em *freezer* -80°C até o momento da obtenção do DNA complementar (cDNA).

Síntese do DNA complementar (cDNA) - Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit Revertaid H-1st strand cDNA Synth (Fermentas Life Sciences), seguindo recomendações do fabricante com algumas modificações. Em um tubo de 200 µL novo e autoclavado, as amostras de 1 µg foram diluídas em 10 µL de Water Nuclease-Free ficando na concentração de 0,1 µg/µL. Em seguida, foi adicionado 1 µL de Oligo dT, 1 µL de dNTP Mix 10 mM e incubado a 65°C por 5 minutos. Após a incubação foi adicionado 4 µL de tampão 5X, 2 µL de DTT 0,1 mM e 2 µL de Inibidor Ribonuclease (20U/µL) e incubado a 37°C por 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em gelo, adicionado 1 µL de Transcriptase Reversa (200U) e incubadas a 37°C por 50 minutos, estendendo-se por mais 15 min a 70°C e resfriadas em gelo. Logo após a síntese de cDNA foi realizada a PCR.

PCR utilizando os primers de *-actina, ahr, cyp1a* e *gst* - Foi realizado um gradiente de temperatura, a fim de se obter a melhor temperatura de anelamento dos *primers* utilizados. Para cada um dos quatro *primers* (*-actina, ahr, cyp1a* e *gst*) foram testadas seis temperaturas diferentes. A PCR foi realizada utilizando-se o kit PCR Master Mix (2X) (Fermentas Life Sciences®), seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações. Estas consistiram em adicionar 12,5 µL de Master Mix, 1 µL de *primer forward* (10 µM), 1 µL de *primer reverse* (10 µM), 8,5 µL de Water Nuclease-free e 2 µL de cDNA para um volume total de 25 µL. A mistura foi levada ao termociclador Veriti (Applied Biosystems™) com os seguintes programas: 1ª etapa - 95°C por 2 min, 2ª etapa - 30 ou 40 ciclos de 95°C por 30 seg e 72°C por 45 seg (o n°. de ciclos nesta etapa variou conforme o tamanho do fragmento) e a 3ª etapa – extensão final a 72°C por 10 min. As temperaturas de anelamento dos *primers* referentes aos genes foram: 61°C (*-actina*), 62°C (*ahr*), 47°C (*cyp1a*) e 59°C (*gst*).

Após a RT-PCR, 10 µL do produto foram utilizados para eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE (1X), visualizadas e fotografadas em transiluminador (L-Pix/Loccus Biotecnologia®) para verificar a qualidade e a integridade do produto de PCR.

As análises de expressão gênica foram realizadas com auxílio do programa computacional Image J, que determina a expressão dos genes por densitometria a partir do número de *pixels* da imagem das bandas de interesse no gel. Os valores obtidos no programa foram trabalhados em uma planilha de cálculo, realizando a normalização dos genes *ahr, cyp1a* e *gst* em relação ao controle constitutivo *-actina*.

3.4 Análises estatísticas

Os resultados obtidos no programa Image J foram trabalhados numa planilha de dados e manuseados para obtenção da média e do erro padrão da média. As análises estatísticas da expressão dos genes *ahr, cyp1a* e *gst* foram realizadas com auxílio do programa Sigma Stat v3.5. O nível de significância aceito nos testes estatísticos foi de $p \leq 0,05$. A significância das diferenças entre as médias dos tratamentos foi determinada por análise de variância (ANOVA, *one way*), seguida de teste de Tukey, quando pertinente.

3.5 Sequenciamento dos genes *-actina, ahr, cyp1a* e *gst*.

Reação de sequenciamento - Para o sequenciamento foi realizada RT-PCR, usando-se 3 µL do produto para eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE (1X), sendo visualizada sua integridade e qualidade no transiluminador L-Pix e 1 µL para quantificação no NanoDrop. Os 21 µL do produto da RT-PCR foram purificados no E-Gel System (Invitrogen™) segundo protocolo do fabricante. O purificado foi quantificado e utilizado na reação de sequenciamento, que consistiu em adicionar 1,5 µL de tampão Big Dye, 3,0 µL do produto purificado (equivalente a 50 a 100 ng), 1,0 µL do *primer forward* ou *reverse*, 1,0 µL de Big Dye v3.1 (Applied Biosystems™) e adicionado Water Nuclease-free para um volume final de 10 µL. A reação foi levada ao termociclador com o seguinte programa: 1ª etapa - 95°C por 2 min, 2ª etapa - 30 ou 40 ciclos de 95°C por 30 seg e 72°C por 45 seg e a 3ª etapa – extensão final a 72°C por 10 min, verificando a temperatura de anelamento de cada *primer*. Este processo é necessário para a retirada de restos de *primers* e DNA genômico da reação de sequenciamento.

Precipitação das amostras para sequenciamento - Para a precipitação das amostras foram adicionados à reação de sequenciamento 40 µL de isopropanol 70%, incubando-se a placa por 15 min no escuro e centrifugando-a a 3000 rpm por 45 min a 19°C. O sobrenadante foi descartado invertendo-se a placa cuidadosamente para não perder as amostras. Foram adicionados 200 µL de etanol 65% e centrifugado a 3000 rpm por 10 min. Novamente o sobrenadante foi descartado, invertendo-se a placa com cuidado e dado *spin* com a placa invertida na centrífuga a 8000 rpm sem a septa. Posteriormente, foi levada a estufa a 37°C por 1 h para completa evaporação do etanol.

As amostras foram ressuspendidas com 10 µL de formamida Hi-Di, desnaturada a 95°C por 5 minutos no termociclador e levado ao sequenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems™), onde foram obtidas as sequências dos genes com auxílio de um *software* do próprio aparelho.

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando o algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). A finalidade foi verificar a homologia das sequências obtidas dos genes de interesse com o banco de sequências de nucleotídeos (BLASTn) de peixes.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento de exposição de *P. pardalis* ao sedimento contaminado com a FSA do petróleo de Urucu

Para confirmação da exposição de *P. pardalis* ao sedimento contaminado por compostos presentes na FSA do petróleo de Urucu, foram realizadas análises de HPAs na FSA (antes da sua adição ao sedimento) e metais no sedimento (após a exposição dos exemplares de *P. pardalis* por 96h).

Para confirmação da presença de HPAs na FSA extraída do petróleo de Urucu foram analisados três que compõem o petróleo de Urucu, os quais apresentaram as seguintes concentrações: $2,95 \pm 0,01$ $\mu\text{g/mL}$ de antraceno, $33,53 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$ de fenantreno e $3,83 \pm 0,01$ $\mu\text{g/mL}$ de fluoreno (média \pm erro padrão da média).

As análises dos metais (Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e V) nas amostras de sedimento coletadas ao final do experimento de exposição, mostraram resultados bem expressivos. As maiores concentrações foram para os metais Cr, Cu e Pb que apresentaram resultados acima dos limites permitidos pelo CONAMA 357/2005. O Cu encontrava-se quase oito vezes acima do limite ($69,80 \pm 1,43$ $\mu\text{g/L}$), seguido do Cr ($62,93 \pm 0,83$ $\mu\text{g/L}$) e do Pb ($15,24 \pm 0,11$ $\mu\text{g/L}$). Os demais metais (Mn, Ni e V) apresentaram concentrações dentro do limite permitido (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações de Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e V em amostras de sedimento contaminado com FSA do petróleo de Urucu (n=4) utilizados para exposição de *P. pardalis* por 96 horas. C=controle, T1=0,243% , T2=0,971% e T3=3,885% da FSA do petróleo de Urucu. Os valores estão expressos em $\mu\text{g/L}$, como forma de média e erro padrão da média.

Grupo	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	V
C	$53,30 \pm 0,60$	$47,90 \pm 1,55$	$56,15 \pm 2,70$	$20,14 \pm 0,80$	$13,77 \pm 0,08$	$52,95 \pm 2,19$
T1	$55,43 \pm 1,44$	$61,80 \pm 4,59$	$60,46 \pm 3,93$	$19,08 \pm 0,53$	$15,24 \pm 0,11$	$57,80 \pm 0,64$
T2	$58,92 \pm 3,01$	$48,64 \pm 1,11$	$55,00 \pm 2,13$	$19,30 \pm 1,88$	$14,50 \pm 0,40$	$61,17 \pm 4,80$
T3	$62,93 \pm 0,83$	$69,80 \pm 1,43$	$54,50 \pm 1,06$	$23,10 \pm 1,55$	$15,08 \pm 0,18$	$69,94 \pm 0,50$

Nos experimentos de exposição de *P. pardalis* ao sedimento contaminado com as concentrações subletais da FSA do petróleo, não houve mortalidade em nenhum dos

Tabela 5: Confirmação dos genes *ahr*, *-actina*, *cyp1a* e *gst*. Busca de homologias das sequências nucleotídicas obtidas com sequências nucleotídicas existentes no banco de dados (*GenBank*) do NCBI. pb=número de pares de base das sequências do banco de dados.

Espécie	Gene	Acesso NCBI	Pb	% de homologia
<i>Carassius auratus</i>	<i>ahr2</i>	FJ554572.1	3377	74
<i>Danio rerio</i>	<i>ahr2</i>	BC163711.1	4435	73
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Ahrb</i>	NM_001124252.1	4150	69
<i>Salmo salar</i>	<i>ahr2b</i>	NM_001123556.1	4451	77
<i>Takifugu rubripes</i>	<i>ahr1b</i>	NM_001037959.1	2565	80
<i>Astronotus ocellatus</i>	<i>-actin</i>	EU553593	1628	94
<i>Common carp</i>	<i>-actin</i>	M24113.1	1879	90
<i>Danio rerio</i>	<i>-actin2</i>	BC067566.1	1780	92
<i>Hemibarbus mylodon</i>	<i>-actin1</i>	EF554924.1	1769	88
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>-actin</i>	AJ438158.1	1879	100
<i>Astronotus ocellatus</i>	<i>cyp1a</i>	EU553595	834	90
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	<i>cyp1a</i>	HQ659503.1	2488	100
<i>Larimichthys crocea</i>	<i>cyp1a</i>	GQ281041.1	2598	100
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>cyp1a</i>	FJ389918.2	2530	98
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	<i>cyp1a</i>	HQ659503.1	2488	98

5. DISCUSSÃO

A maioria dos trabalhos sobre toxicidade do petróleo vem sendo realizada em ambientes temperados, principalmente ambientes marinhos. Na Amazônia, existem poucos trabalhos que avaliam a influência da água contaminada com petróleo e fração solúvel do petróleo (FSA). Porém, este é o primeiro trabalho verificando a influência do sedimento contaminado com a FSA sobre os organismos aquáticos na região.

5.1 Experimento de exposição de *P. pardalis* ao sedimento contaminado com a FSA do petróleo de Urucu

O petróleo é um dos principais contaminantes dos ecossistemas, em particular, dos ecossistemas aquáticos (PEDROZO et al., 2002), onde os organismos mais diretamente afetados são os peixes. Estes organismos em contato com o petróleo e seus derivados podem apresentar disfunções respiratórias, cardíacas, comportamentais, celulares, bioquímicas e reprodutivas (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - USEPA, 1999). Entre os efeitos descritos no tecido hepático dos peixes estão a fibrose, infiltração leucocitária, necrose, neoplasias e lipidoses (AKAISHI et al., 2004). A exposição dos peixes ao petróleo no meio aquático pode ser pelo contato direto, através das brânquias, ou através da ingestão de alimento contaminado (USEPA, 1995).

O petróleo é composto por 75% de hidrocarbonetos (NEFF, 1979), sendo que a quantidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) é da ordem de 40%. De acordo com sua origem, os HPAs podem ser classificados em pirogênicos, que ocorrem através da queima incompleta de combustíveis fósseis, petrogênicos (fósseis) e biogênicos, de ocorrência natural no ambiente (CORDEIRO, 2003), podendo ser através da biossíntese de microrganismos e plantas. Porém, as atividades antropogênicas são as maiores contribuintes de HPAs no ambiente, que pode ocorrer pela queima incompleta de combustíveis fósseis, efluentes industriais lançados no ambiente e atividades da indústria do petróleo (KENNISH, 2004).

São descritos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como poluentes prioritários em estudos de processos de contaminação pela USEPA: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, criseno, dibenzo(a,h)anthraceno, fenantreno, fluoreno, fluoranteno, indeno(1,2,3-cd)pireno, naftaleno, pireno (USEPA, 1989; USEPA, 1995). Neste estudo foram

analisadas as concentrações de antraceno, fenantreno e fluoreno na FSA extraída do petróleo de Urucu. Estes HPAs apresentam 2 (fluoreno e antraceno) ou 3 (fenantreno) anéis benzênicos, sendo classificados como HPAs de baixo peso molecular. Não são considerados carcinogênicos ao homem, mas apresentam significativa toxicidade e outros efeitos adversos em diferentes organismos, como os peixes (HEATH et al., 1993; IRWIN et al., 1997).

Os HPAs são de grande importância ambiental e toxicológica pelas suas propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas, constituindo nos hidrocarbonetos mais tóxicos (SISINNO et al., 2003). Por serem substâncias lipofílicas podem persistir muito mais tempo no meio ambiente e, dependendo das propriedades físico-químicas do composto e do ambiente em questão, podem ser distribuídos nos compartimentos ambientais em diferentes proporções (CLARK, 2003). A persistência dos hidrocarbonetos no meio ambiente vai depender do seu ponto de ebulição, pois quanto maior for a temperatura do seu ponto de ebulição maior será sua permanência no ambiente (WHO, 1982) e, conseqüentemente, maior a disponibilidade aos organismos.

Em estudos realizados com *Colossoma macropomum* exposto ao petróleo e ao HPA benzo(a)pireno, foi observado que ambos são genotóxicos para a espécie após 48 horas de exposição, fato evidenciado pelo aumento na frequência de anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) (OLIVEIRA, 2010). A FSA, fração mais tóxica do petróleo se comparada a fração insolúvel (FIA), é composta por hidrocarbonetos poliaromáticos e alifáticos, como benzeno e tolueno (KINGSTON, 2002).

Os HPAs presentes no petróleo também podem sofrer processo de sedimentação. No ambiente natural, os HPAs apresentam alta adsorção em superfícies e estão frequentemente associados às partículas sólidas. No meio aquático tendem a estar mais concentrados nas partículas do material em suspensão do que na fase líquida e, por isso, apresentam tendência a sedimentar. As concentrações no sedimento podem ser de 100 a 10.000 vezes as concentrações da água (ONUSKA, 1989). O principal mecanismo de eliminação da maioria dos HPAs que estão na coluna d'água é por meio da sedimentação (CNRC, 1983). Este trabalho buscou analisar a influência do sedimento contaminado com a fração solúvel do petróleo sobre a expressão gênica de *Pterygoplichthys pardalis*, pois os sedimentos de fundo do meio aquático são os compartimentos finais de grande parte dos HPAs. É neste compartimento que ocorrem modificações químicas e bioquímicas muito lentas (PAYNE et al., 1988) que se tornam prejudiciais principalmente aos organismos que vivem em contato direto com este compartimento.

Já foi citado que além de hidrocarbonetos, o petróleo é composto por metais que podem causar sérios danos a saúde dos organismos (FAY e MUMTAZ, 1996; KINGSTON, 2002). Estes metais, uma vez no ecossistema aquático, irão se distribuir pelos diversos compartimentos do ambiente, como solo e sedimento, podendo ser absorvidos pelas plantas e animais. Porém, é no sedimento que estes metais irão se concentrar, pois este compartimento do ambiente aquático funciona como um sistema de estoque também destes poluentes (FILGUEIRAS et al., 2004). A espécie *P. pardalis* utilizada neste estudo por ser demersal, vive em contato direto com o sedimento do meio aquático tornando-se mais susceptível aos contaminantes presentes neste compartimento.

Concentrações elevadas de metais afetam principalmente organismos bentônicos ou demersais, pois pode ocorrer a bioconcentração destes contaminantes nos organismos, causando efeito direto na cadeia alimentar aquática (ALEGRE, 2009). A contaminação dos peixes por metais pode ocorrer por meio da ingestão de partículas, seja em solução ou pela alimentação e, conseqüentemente, pela absorção no trato digestório. Outro meio de absorção é pelas brânquias, seja por difusão ou através dos canais de cálcio do epitélio branquial (PHILLIPS e RAINBOW, 1994).

Se os metais forem absorvidos pelo organismo chegam até o sangue, sendo distribuídos para órgãos como o fígado, o rim, e o pâncreas (DE SMET e BLUST, 2001). Conseqüentemente, os metais são transferidos para o rim e fígado, sendo biotransformados por meio de enzimas como a CYP (P450), tornando-se mais hidrossolúveis, o que facilita sua excreção pela pele (através do muco), rim (urina), intestino (fezes) ou pelas próprias brânquias (HEATH, 1995). Mais uma forma contaminação de *P. Pardalis* está relacionado à alimentação a partir de microrganismos aderidos ao substrato do fundo. Também, por ser uma espécie que deposita seus ovos diretamente no fundo, em uma espécie de ninho ou “loca”, torna-se mais susceptível em caso de poluição por metais.

Os metais essenciais ou não essenciais, tóxicos ou não tóxicos, ocorrem naturalmente no ambiente, inclusive no meio aquático. Mas, além de ocorrer naturalmente, estes metais podem ser lançados no meio ambiente por atividades antropogênicas, por exemplo, pela atividade de exploração de petróleo (FRIEL et al., 1987). E alguns metais, mesmo em pequenas concentrações, podem ser tóxicos aos organismos. Neste estudo dos seis metais analisados (Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e V) as concentrações de Cr, Cu e Pb como foi observado estavam acima do permitido por lei. A Tabela 6 mostra os valores máximos de concentrações de metais permitidos, em ambiente de água doce, pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), recomendados para águas de classe 1 e 2, conforme Resolução n° 357/2005,

Artigo 14. Esta resolução dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais, estabelecendo condições e padrões de lançamentos de efluentes.

Tabela 6. Valores máximos permitidos em ambiente de água doce de acordo com a Resolução nº 357 de 2005 do CONAMA, Artigo 14. *Metais essenciais ao metabolismo dos seres vivos; **metais essenciais, porém, em grandes concentrações, tóxicos aos seres vivos; ***metais tóxicos mesmo em pequenas concentrações.

Metais	Valor máximo (µg/L)
Chumbo total***	10,0
Cobre dissolvido**	9,0
Cromo total***	50,0
Manganês total*	100,0
Níquel total***	25,0
Vanádio total***	100,0

O Cr pode se apresentar em dois estados: o cromo III que não é considerado elemento tóxico, mas essencial na dieta humana, pois atua no metabolismo de açúcares e gorduras (ANDERSON, 1987) e, o cromo VI, sendo mais solúvel e mais tóxico, por ser um potente oxidante. O cromo VI atravessa a membrana celular por transporte ativo e, uma vez dentro da célula irá sofrer uma rápida redução para cromo V e cromo IV e, conseqüentemente, cromo III (COHEN et al., 1993). Estudos sugerem que essa redução possa ser causa de danos nos tecidos dos organismos quando exposto a este elemento.

O Cu, apesar de ser um elemento essencial necessário aos processos fisiológicos e bioquímicos (LEHNINGER, 1990), é considerado como um dos metais mais prejudiciais aos peixes, em termo de toxicidade, quando em altas concentrações (LLOYD, 1992; MATSUO et al., 2005). Este metal pode interferir nos processos fisiológicos e causar distúrbios na regulação iônica dos peixes (WOOD, 2001; MATSUO, 2004; MATSUO et al., 2005). Segundo DAMOUS et al. (2002), a concentração de cobre em ambientes aquáticos na Amazônia está abaixo da concentração média mundial.

O Pb é um elemento não essencial aos organismos e ocorre naturalmente no ambiente. Altas concentrações são decorrentes de ações antrópicas (GARCÍA-LESTÓN et al., 2010). É altamente tóxico e geralmente tendo efeito deletério (PATTEE e PAIN, 2002). É um dos metais mais amplamente utilizados na sociedade e é considerado altamente cancerígeno

(COHEN et al., 1996), podendo ser liberado no ambiente através da combustão de derivados do petróleo, como a gasolina, e pelo despejo de efluentes industriais (MIELKE e REAGAN, 1998). Além disso, já foi registrado em peixes que esse elemento causa deficiência e diminui a sobrevivência, afetando as taxas de crescimento, desenvolvimento e metabolismo (EISLER, 1988).

A razão que motivou a utilização da fração solúvel do petróleo neste estudo foi por ser a mais tóxica e por ser a fração que contém componentes que podem sofrer sedimentação, como os HPAs e os metais, contaminando o fundo do ambiente aquático (HEATH, 1995; FREEDMAN, 1999; KINGSTON, 2002), estes compostos uma vez disponíveis, os organismos como os peixes estariam vulneráveis a eles. Assim, utilizando neste estudo o sedimento como substrato e uma espécie de peixe demersal (*P. pardalis*), esta se tornaria mais exposta a estes contaminantes, tendo maior possibilidade de indução da expressão de genes sensíveis aos compostos do petróleo. E o fato de ter sido analisado o tecido hepático de *P. pardalis* foi por ser o órgão onde ocorre a maioria das atividades de biotransformação de compostos xenobióticos nos organismos.

5.2 Análise da expressão dos genes *ahr*, *cyp1a* e *gst* em *P. pardalis* exposto ao sedimento contaminado com a FSA do petróleo de Urucu

Expressão do gene *ahr* – Para o gene *ahr* não foram observadas diferenças significativas entre as condições experimentais testadas. Segundo HESTERMANN et al. (2002), o AhR tem um importante papel no ciclo celular, no remodelamento vascular e no desenvolvimento do fígado. Como já citado, o AhR é um receptor de hidrocarbonetos que localiza-se no citoplasma celular e atua no reconhecimento desses compostos. Auxilia no seu deslocamento até o núcleo celular, se ligando a uma região promotora de determinado gene (HAHN, 1998), podendo estar relacionado com a indução da expressão de genes como *cyp1a* e *gst*. Neste trabalho o gene *ahr* poderia ter sido um bom biomarcador, pois se apresentou sensível a exposição a FSA, porém não houve aumento nem diferença significativa na expressão do *ahr* nos exemplares de *P. Pardalis*. O gene se expressou em todos os exemplares dos tratamentos 1, 2 e 3, inclusive nos do controle. Isso pode estar relacionado a sua alta sensibilidade, o que requer uma análise de sua expressão quando da exposição dos animais a concentrações menores do que aquelas aqui analisadas.

Expressão do gene *cyp1a* - Os HPAs presentes no petróleo, por serem lipofílicos, têm a facilidade de passar pelas membranas celulares, o que permite o acúmulo em diferentes

tecidos como o fígado (ECE, 1997). Quando estes compostos entram no organismo dos peixes, seja pela alimentação ou ingestão de água, induzem uma série de alterações no seu metabolismo, por exemplo, os processos de biotransformação e detoxificação, o que irá consequentemente induzir genes como o *cyp1a* e atividades enzimáticas como da *gst* (OLIVEIRA, 2010).

O citocromo P450 (CYP1A) é uma família multigênica (NELSON et al., 1996). Suas isoformas formam as principais enzimas oxidativas e são induzidas em peixes e outros vertebrados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e hidrocarbonetos aromáticos poli-halogenados (PHAHs) (STEGEMAN e HAHN, 1994), respondendo em níveis ambientais a estes compostos de maneira dose-dependente. A CYP1A é utilizado tanto em análises de campo quanto em laboratório para avaliar exposição e efeito aos HPAs e PHAHs (LORENZANA et al., 1988; STEGEMAN et al., 1991).

Em estudo realizado com o peixe amazônico *Collossoma macropomum* exposto ao HPA naftaleno por 12 e 24 horas foi observado que nos peixes expostos as concentrações de 0,1, 0,3 e 0,9 μ M houve um aumento na expressão do gene *cyp1a*, indicando um efeito dose-dependente (OLIVEIRA, 2010). Neste trabalho foi observado que *P. pardalis* exposto a diferentes concentrações de FSA do petróleo por 96 horas e, como foi analisado, aos HPAs antraceno, fenantreno e fluoreno na FSA utilizada, o gene *cyp1a* apresentou aumento na expressão conforme aumentou a concentração de FSA, indicando um efeito dose-dependente.

O gene *cyp1a* é muito utilizado como biomarcador para indicar e avaliar uma possível contaminação no ambiente aquático e tem se mostrado como uma resposta biológica muito sensível a uma série de fatores estressantes para os organismos aquáticos, como exposição aos HPAs, de forma que tem papel importante no metabolismo desses hidrocarbonetos e na carcinogênese originadas por eles. Já foi observado que em peixes coletados na natureza, em ambientes poluídos, os níveis de *cyp1a* eram expressivos (SARASQUETE e SEGNER, 2000; FENT, 2003). Existem poucos estudos com espécies de peixes de água doce analisando *cyp1a* como marcador molecular, principalmente na Amazônia, pois a maioria dos estudos envolve análise de *cyp1a* em espécies marinhas.

Muitos estudos tem relatado a indução do *cyp1a* em peixes por inúmeros contaminantes. No fígado, a indução do citocromo P450 é citada como um biomarcador em potencial, além de indicar contaminação por HPAs, exposição a bifenilas policloradas (PCB), furanos e dioxinas (GOKSOYR e FÖRLIN, 1992). Em estudo realizado com exemplares de *Cyprinus carpio* coletados no rio Kalamazoo, em Michigan, em uma área contaminada por bifenil policlorado (PCB), observou-se aumento significativo nos níveis de *cyp1a*, o mesmo

ocorrendo em exemplares juvenis expostos em procedimento experimental por quatro meses ao PCB (FISHER et al., 2006). Em outro estudo avaliando a expressão do *cyp1a* em tecido branquial de *Heteropneustes fossilis*, um peixe de água doce, exposto ao HPA benzo(a)pireno aquoso foram verificados altos níveis do *cyp1a* em organismos expostos por 45 dias à concentração ambientalmente relevante de 10 µg/L do HPA (RADHAKRISHNAM, 2010). Em conjunto com outros trabalhos, estes indicam que *cyp1a* pode ser usado como biomarcador para detectar uma série de poluentes ambientais por ser altamente sensíveis a estes agentes estressores.

O gene *cyp1a* geralmente se expressa em tecidos epiteliais de órgãos como: fígado, brânquias, intestino, rim, etc. No entanto, já foi descrito que a sua maior expressão foi em tecido hepático, se comparado a outros órgãos onde o gene se expressa (SARASQUETE et al., 1999). No presente estudo, com a exposição da espécie amazônica *Pterygoplichthys pardalis* às concentrações subletais de FSA do petróleo de Urucu por 96 horas, foi analisada a expressão do gene *ahr*, *cyp1a* e *gst* em tecido hepático, por ser o órgão onde ocorre a maioria dos processos metabólicos dos organismos e por ser o órgão onde ocorre uma maior atividade de *cyp1a*.

Em estudo realizado com a espécie amazônica *Colossoma macropomum*, exposto a FSA e FSA fotomodificada do petróleo de Urucu em laboratório, foi observado que o gene *cyp1a* apresentou uma expressão bastante significativa. Porém, o estudo verificou que nos peixes expostos a FSA fotomodificada a expressão do gene foi bem maior, concluindo que os compostos fotomodificados presentes na FSA do petróleo podem ser mais prejudiciais aos peixes que os compostos não fotomodificados. As análises indicaram o gene *cyp1a* como um biomarcador em potencial para estudos toxicológicos de peixes expostos a FSA do petróleo (OLIVEIRA, 2010).

Outra espécie amazônica analisada foi *Astronotus ocellatus*, com a qual foi realizada uma comparação com o organismo modelo *Danio rerio*. Exemplares destas espécies foram expostos a concentrações subletais de petróleo e FSA do petróleo de Urucu, e tiveram avaliada a expressão de nove genes relacionados à contaminação por xenobióticos, entre eles o *cyp1a*. Tanto nos organismos expostos ao petróleo quanto aos expostos à FSA do petróleo foi observada a indução do gene *cyp1a*. O estudo indicou o gene *cyp1a*, dentre os genes testados, como o melhor marcador molecular de exposição às concentrações subletais de petróleo e FSA do petróleo, pois apresentou aumento da expressão com o aumento da concentração do contaminante (ANJOS, 2008; ANJOS et al., 2011), indicando efeito dose-dependente, resultado também observado neste estudo.

EDWARDS, R.; DIXON, D.P.; WALBOT, V. Plant glutathione s-transferase: enzymes with multiple functions in sickness and health. *Trends in Plant Science*. 5: 193-198. 2000.

EISLER, R. Lead Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review *US Fish and Wildlife Service Rep.* Washington, DC. 85(114). 1988.

ESTEVEES, F.A. *Fundamentos de Limnologia*. Editora: Interciência LTDA. 2^a Ed. Rio de Janeiro, RJ. 602p. 1998.

FAY, R.M.; MUMTAZ, M.M. Development of a priority list of chemical mixtures occurring at 1188 hazardous waste sites, using the Haz-Dat database. *Food and Cheminal Toxicology*. 34: 1163-1165. 1996.

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*. 140/141: 353-365. 2003.

FERREIRA, E.J.G.; ZUANON, J.A.S.; SANTOS, G.M. dos. *Peixes comerciais do médio Amazonas: região de Santarém, Pará*. Brasília, DF: IBAMA. 211p. 1998.

FILGUEIRAS, A.V.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Evaluation of distribution, mobility and binding behaviour of heavy metals in surficial sediments of Louro River (Galicia, Spain) using chemometric analysis: a case study. *Science of the Total Environment*. 330: 115–129. 2004.

FREEDMAN, B. Environmental Ecology. The impacts of pollution and stressors on ecosystem structure and function. *Academic Press*, San Diego, CA. 1989.

FRIEL, N.; LOCHER, S.; REED, A.; ZIMMERMAN, K. *National priorities List Technical Database (dBase III version)*, Rep. n. WP86W00468, Prepared under contract n. 68-01-7054. Mitre Corporation, McLean, VA. 1987.

FISHER, M.A.; MEHNE, C.; MEANS, J.C.; IDE, C.F. Induction of CYP1A mRNA in carp (*Cyprinus carpio*) from the Kalamazoo river polychlorinated biphenyl-contaminated

superfund site and in a laboratory study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 50: 14-22. 2006.

GARCÍA-LESTÓN, J.; MÉNDEZ, J.; PÁSARO, E.; LAFFON, B. Genotoxic effects of lead: An updated review. *Environment International*. 36: 623-636. 2010.

GEORGIADES, E.T.; DANIS, B.; GILLAN, D.C.; DUBOIS, P.H.; TEMARA, A.; HOLDWAY D.H. Effect of crude oil contaminated sediment exposure on cytochrome P450 enzymes in the Australian asteroid *Coscinasterias muricata*. *Chemosphere*. pp.1869-1877. 2006.

GOKSOYR, A.; FORLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*. 22: 287-312. 1992.

HAHN, M.E. The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 121C: 23-53. 1998.

HEATH, J.S.; KOBLIS, K.; SAGER, S.; DAY, C. Risk assessment for total petroleum hydrocarbons. In E.J. Calabrese and P.T. Kostecki, (Eds.), *Hydrocarbon Contaminated Soils*, v3, Lewis Publishers, CRC Press. pp.267-302. 1993.

HEATH, A.G. *Toxicology, Water pollution and fish physiology*. 2.ed. CRC/Lewis publishers, Boca Raton, FL. 357p. 1995.

HESTERMANN, E.V.; STEGEMAN, J.J.; HAHN, M.E. Relationships among the cell cycle, cell proliferation, and aryl hydrocarbon receptor expression in PLHC-I cells. *Aquatic Toxicology*. 58: 201-213. 2002.

IRWIN, R.J.; VANMOUWERIK, M.; STEVENS, L.; SEESE, M.D.; BASHAM, W. *Environmental Contaminants Encyclopedia*. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. Distributed within the Federal Government as an Electronic Document (Projected public availability on the internet or NTIS: 1998). 1997.

KATSUMITI, A.K.F.; SILVA COSTA, G.P.; RANDI, M.A.F.; CESTARI, M.M.; SILVA DE

ASSIS, H.C.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Avaliação do impacto de óleo, cinco anos após o vazamento da refinaria Getúlio Vargas (UM- REPAR/Petrobras), através de biomarcadores de contaminação em *Hyphessobrycon reticulatus* (Ellis, 1911). In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 2006, São Pedro. *Anais*. São Pedro, SP. 221p. 2006.

KENNISH, J.M. Ecology of estuaries: anthropogenic effects. Boca Raton, *CRC Press*. 494p. 2004.

KINGSTON, P.F. Long-term Environmental Impact of Oil Spills. Spill Science & Technology Bulletin. Review. *Elsevier Science Ltd.*, v7, n. 1-2. pp.53-61. 2002.

KLINGE, H. Podzol soils: a source of blackwater rivers in Amazonia. In: H. Lent (Eds.). *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica - Limnologia*. Belém: UFPA, v3. pp.117-125. 1967.

KOCHHANN, D. *Exposição do tabaqui ao petróleo: marcadores fisiológicos, bioquímicos e comportamentais*. 2010. xii+63p. Dissertação de Mestrado – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM. 2010

LEHNINGER, A.L. *Princípios de bioquímica*. Editora: Sarvier, São Paulo, SP. 576p. 1990.

LLOYD, R. *Pollution and freshwater fish*. The Buckland Foundation, Oxford. 176p. 1992.

LOPES, N.P. *Ajustes metabólicos em sete espécies de Siluriformes sob condições hipóxicas: aspectos adaptativos*. 2003. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM. 2003.

LORENZANA, R.M.; HEDSTROM, O.R.; BUHLER, D.R. Localization of cytochrome P-450 in the head and trunk kidney of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 96: 159-1167. 1988.

LOWE-McCONNELL, R.H. *Ecological Studies in Tropical Fish Communities*. Cambridge University Press. 382p. 1987.

MARQUES, J.R.F.; MASCARENHAS, R.E.B; DA SILVA, B.N.R.; MARTINEZ, G.B.; TEIXEIRA, R.N.G.; CAMARÃO, A.P.; LOPES, C.A.C.; DA COSTA, N.A.; LOURENÇO JÚNIOR, J. de B.; COSTA, M.R.; DE CASTRO, A.B.; DUTRA, S.; DE MOURA CARVALHO, L.O.D. O Ambiente das Várzeas e o Uso Sustentável. In. MARQUES, J.R.F.; LOPES, C.A.C.; MARTINEZ, G.B. (Eds.). *Produção Animal nas Várzeas do Rio Amazonas*. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, cap.1. pp.27-82. 2003.

MATSUO, A.Y.O. *Aspectos ecofisiológicos e ecotoxicológicos em espécies da ictiofauna do Rio Negro, Amazônia, com ênfase na regulação iônica*. 2004. 204p. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM. 2004.

MATSUO, A.Y.O.; WOOD, C.M.; VAL, A.L. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquatic Toxicology*. 74: 351-364. 2005.

MIELKE, H.W.; REAGAN, P.L. Soil is an important pathway of human lead exposure. *Environmental Health Perspectives*. 106 (Supl. 1): 217-227. 1998.

MORONI, F.T. *Alterações pos-mortem e aproveitamento tecnológico do músculo de acari-bodó, Liposarcus pardalis (Castelnau, 1855)*. 2006. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - Coordenação de Pesquisa em Tecnologia de Alimentos (CPTA/INPA). 2006.

NEFF, J.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: Sources, fates and biological effects. *Applied Science Publishers Ltd*. Essex, 262p. 1979.

NELSON, D.R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J.J; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D.J.; WATERMAN, M.R.; GOTOH, O.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; GUNSALUS I.C.; NEBERT, D.W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 6: 1-42. 1996.

NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*. 74: 3-9. 1997.

OLIVEIRA, C.P.F. *Biomarcadores moleculares, genotóxicos e enzimáticos de efeitos do petróleo em tambaqui (Colossoma macropomum): subsídios para o monitoramento ambiental na Amazônia*. 2010. 158p. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM. 2010.

ONUSKA, F.I. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. In: AFGHAN, B.K.; CHAU, A.S.Y. (ed.). *Analysis of trace organics in the environment*. Boca Raton: CRC Press. 346p. 1989.

PAYNE, J.F., KICENIUK J., FANCEY L.L., WILLIAMS U., FLETCHER G.L., RAHIMTULA A.E FOWLER B. What Is a Safe Level of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Fish: Subchronic Toxicity Study on Winter Flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 45: 1983-1993. 1988.

PATTEE, O.H.; PAIN, D.J. Lead in the environment. In: HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A. JR.; CAIRNS, J.JR. *Handbook of Ecotoxicology*. Boca Raton, FL. 2 ed. pp.373-408. 2002.

PAUKA, L.M.; *Avaliação dos efeitos embriotóxicos e da biotransformação da fração solúvel do petróleo em água em peixe zebra (Danio rerio ±Hamilton, 1822)*. 2007. 36p. Dissertação de Mestrado em Farmacologia – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2007.

PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M.; CORSEUIL, H.X.; SCHENEIDER, M.R.; LINHARES, M.M. *Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo*. Série Cadernos de Referência Ambiental. Salvador, BA. v12. 229p. 2002.

PETROBRAS. *Província Petrolífera de Urucu*. Disponível em: <<http://www2.petrobras.com.br/minisite/urucu/>> Acesso em: 17/03/2011.

PHILLIPS, D.J.H.; RAINBOW, P.S. Biomonitoring of trace aquatic contaminants. Chapman & Hall. *Alden Press Ltd.*, Oxford. pp.79-132. 1994.

