

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

**EFEITOS SUBLETAIS DA CONTAMINAÇÃO PELA FRAÇÃO SOLÚVEL  
DO ÓLEO DIESEL EM CAVALO-MARINHO (*Hippocampus reidi*)**

**FREDERICO AUGUSTO CARIELLO DELUNARDO**

**VILA VELHA - ES**  
**FEVEREIRO 2017**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

**EFEITOS SUBLETAIS DA CONTAMINAÇÃO PELA FRAÇÃO SOLÚVEL  
DO ÓLEO DIESEL EM CAVALO-MARINHO (*Hippocampus reidi*)**

Tese apresentada à Universidade Vila Velha,  
como pré-requisito do Programa de Pós-  
graduação em Ecologia de Ecossistemas, para  
a obtenção do título de Doutor em Ecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Regina  
Chippari-Gomes

**FREDERICO AUGUSTO CARIELLO DELUNARDO**

**VILA VELHA - ES**  
**FEVEREIRO 2017**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

D331e

Delunardo, Frederico Augusto Cariello  
Efeitos subletais da contaminação pela fração solúvel do  
óleo diesel em cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*) /  
Frederico Augusto Cariello Delunardo – 2017.  
138 f.: il.

Orientadora: Adriana Regina Chippari-Gomes.  
Tese (doutorado em Ecologia de Ecossistemas) -  
Universidade Vila Velha, 2017  
Inclui bibliografias

1. Ecologia. 2. Contaminação. 3. Cavalo – Marinho.  
I. Chippari-Gomes, Adriana Regina. II. Universidade Vila  
Velha. III. Título.

CDD 577

FREDERICO AUGUSTO CARIELLO DELUNARDO

EFEITOS SUBLETAIS DA CONTAMINAÇÃO PELA FRAÇÃO  
SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL EM CAVALO-MARINHO  
(*Hippocampus reidi*)

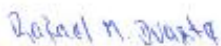
Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Doutor em Ecologia.

Aprovada em 17 de fevereiro de 2017,

Banca examinadora:



Dra. Lilia Pereira de Souza Santos - UFPE



Dr. Rafael Mendonça Duarte - UNESP



Dra. Denise Coutinho Endringer - UVV



Dra. Adriana Regina Chiopari-Gomes - UVV  
Orientadora

## **Dedicatória**

Ao meu pai, o homem mais sábio que conheço.

À minha mãe, por ser simplesmente maravilhosa!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Dra. Adriana Regina Chippari-Gomes, pela competência, apoio incondicional e estímulo durante esses quatro anos do doutorado. Meus sinceros agradecimentos por todos os afagos recebidos desse seu enorme coração de mãe sempre que eu necessitei!

À Fundação de amparo à pesquisa do Estado do Espírito Santo - FAPES, pelo suporte financeiro (Processo 61636509/13), sem o qual este trabalho não seria realizado.

Ao Dr. Levy de Carvalho Gomes, por estar sempre disponível, pelas oportunidades de crescimento, pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha e por ser um espelho de profissionalismo, caráter e ética para mim.

À Universidade Vila Velha - UVV, pela infraestrutura e facilidades proporcionadas. Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Ecologia de Ecossistemas, particularmente àqueles professores que eu tive a oportunidade de conviver mais de perto, cursando suas disciplinas e aprendendo muito, dentro e fora da sala de aula. A toda equipe de transporte da UVV pelo apoio durante as coletas de água e aos funcionários do Complexo Biopráticas, por todo carinho e atenção.

À Dra. Marisa Narciso Fernandes, por acreditar no potencial desse trabalho e mais uma vez abrir as portas do Laboratório de Zoologia e Bioquímica Comparativa (LZBC), permitindo que eu fizesse parte de sua equipe. Pela valiosa contribuição na minha formação profissional e pelo apoio e incentivo em continuar minha jornada acadêmica.

Ao Dr. Adalberto Luis Val e a Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida-Val, pelos grandes ensinamentos e lições durante minha breve, mas enriquecedora passagem pelo Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) e pela imensurável oportunidade de participar da expedição do projeto ADAPTA.

À mestra Maria de Nazaré Paula, por todo o suporte (técnico e emocional) durante o estágio doutoral no LEEM, me fazendo sentir seguro, confiante e em casa!

À banca examinadora, composta pelas Dras. Denise Coutinho Endringer e Lília Pereira de Souza Santos e pelo Dr. Rafael Mendonça Duarte por aceitarem o convite, por disponibilizarem seu precioso tempo para a leitura da tese e pelas contribuições feitas para o melhoramento da mesma.

À equipe do Laboratório de Ictiologia Aplicada - LABPEIXE, pela amizade, convívio e apoio, em especial à Dra. Laila Carine Campos Medeiros e à Dra. Larissa Novaes Simões, que foram verdadeiros anjos, me auxiliando em todas as partes práticas desse trabalho e tornando as longas horas de bancada em momentos agradáveis e prazerosos. Sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido!

À equipe do LZBC, pela rica troca de experiências e conhecimentos, em especial ao Dr. Marcelo Gustavo Paulino, pelo pronto auxílio sempre que precisei, por doar muito de seu tempo na construção e elaboração desse trabalho, pelas discussões científicas, pela sua amizade, carinho e incentivo.

Aos amigos de São Carlos, Dr. Nathan Dias Martins, por abrir as portas de sua casa e por me mostrar com seu inabalável bom humor que o ambiente acadêmico pode ser mais alegre e colorido! E à querida Dra. Diana Amaral Monteiro por toda paciência, carinho e ensinamentos. Cada um à sua maneira se tornou uma referência para mim!

À equipe do LEEM, por me acolherem com tanto carinho, especialmente à Dra. Helen Sadauskas-Henrique e ao Me. Renan Diego Amanajás, por toda atenção dedicada dentro e fora do laboratório e pelos valiosos ensinamentos e colaborações nas análises bioquímicas.

À amiga Dra. Luciana Rodrigues de Souza Bastos, com quem dividi a casa em Manaus, por todo carinho, apoio e paciência. Por me transmitir seus conhecimentos sempre de maneira doce e amorosa! Além de ser um modelo de pesquisador, você se tornou uma irmã da qual eu me orgulho muito!

À minha amada vovozinha Leny Ennes Cariello, por plantar em mim a semente dos mais belos sonhos, por me doar os melhores sentimentos e por ser coração da cabeça aos pés! Você fez a minha vida muito mais doce!

Ao Paulo Henrique Gonzaga, por toda cumplicidade, sabedoria e paciência. Por sempre ter a sua mão estendida, o coração aberto e um sorriso nos olhos! Por ser o meu refúgio nos momentos mais difíceis, por caminhar ao meu lado e ser a minha grande inspiração. Por tudo e ainda mais lhe sou grato, **amo você!**

Ao grande amigo Me. Daniel Melo Rosa, por me ensinar tanto sobre ecologia de peixes, pela confiança, paciência e acolhimento incondicional. Sua amizade vale muito pra mim!

A todos que, apesar de não estarem citados aqui, passaram por minha vida, deixando um pouco de sua luz e contribuindo para o meu amadurecimento!

***“Se quiser ir rápido, vá sozinho. Se quiser ir longe, vá junto.”***

Provérbio Africano



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT .....	14
APRESENTAÇÃO.....	15
Capítulo I - <b>Introdução geral</b> .....	17
INTRODUÇÃO GERAL .....	18
REFERÊNCIAS.....	24
Capítulo II - <b>Abordagem integrada da estrutura branquial de cavalo-marinho (<i>Hippocampus reidi</i>) e alterações histopatológicas observadas após exposição à fração solúvel do óleo diesel</b> .....	35
RESUMO.....	36
1. INTRODUÇÃO .....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
2.1 Morfologia branquial .....	39
2.2 Bioensaio Laboratorial .....	40
2.2.1 Preparo da fração solúvel do óleo diesel (FSD) .....	40
2.2.2 Delineamento experimental .....	41
2.2.3 Quantificação dos hidrocarbonetos presentes na FSD .....	42
2.2.4 Análises histopatológicas .....	43
2.3. Análise Estatística.....	44
3. RESULTADOS .....	46
3.1 Caracterização morfo-funcional das brânquias de <i>Hippocampus reidi</i> .....	46
3.2 Análise química da água.....	53
3.3 Histopatologia branquial .....	54
4. DISCUSSÃO .....	57
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS.....	64

Capítulo III - <b>Efeitos da fração solúvel do óleo diesel em um conjunto de biomarcadores em cavalo-marinho (<i>Hippocampus reidi</i>)</b> .....	73
RESUMO.....	74
1. INTRODUÇÃO .....	75
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	77
2.1 Aquisição e manutenção dos exemplares de <i>Hippocampus reidi</i> .....	77
2.2 Delineamento experimental .....	77
2.3 Quantificações químicas.....	79
2.4 Determinação de metabólitos na bile.....	80
2.5 Biomarcadores bioquímicos.....	80
2.6 Biomarcadores genotóxicos.....	81
2.7 Análises estatísticas .....	82
3. RESULTADOS .....	83
3.1 Análise química da água.....	83
3.2 Metabólitos de HPAs na bile.....	84
3.3 Biomarcadores bioquímicos.....	86
3.4 Biomarcadores genotóxicos.....	88
4. DISCUSSÃO .....	90
5. CONCLUSÃO.....	97
6. REFERÊNCIAS.....	98
Capítulo IV - <b>Efeitos da exposição à fração solúvel do óleo diesel nas respostas osmorregulatórias de cavalo marinho (<i>Hippocampus reidi</i>)</b> .....	112
RESUMO.....	113
1. INTRODUÇÃO .....	114
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	116
2.1 Aquisição e manutenção dos exemplares de <i>Hippocampus reidi</i> .....	116
2.2 Delineamento experimental .....	116
2.3 Quantificações químicas.....	118
2.4 Procedimentos bioquímicos.....	119
2.5 Imunohistoquímica de células ricas em mitocôndria (CRM) nas brânquias.....	119
2.6 Análises estatísticas .....	120
3. RESULTADOS.....	121

3.1 Análise química da água.....	121
3.2 Imunomarcção de células ricas em mitocôndria nas brânquias.....	121
3.3 Atividade das enzimas Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase e H <sup>+</sup> -ATPase nas brânquias .....	125
4. DISCUSSÃO .....	127
5. CONCLUSÃO.....	130
6. REFERÊNCIAS.....	131
Capítulo V - <b>Considerações finais</b> .....	137
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	138

## LISTA DE ABREVIATURAS

BaP - benzo(a)pireno

BTEX - benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno

Ca<sup>2+</sup> - cálcio

CAT - catalase

CI - células indiferenciadas

Cl<sup>-</sup> - cloreto

CM - células mucosas

CPi - células pilares

CPv - células pavimentosas

CRM - células ricas em mitocôndrias

DNA - ácido desoxirribonucléico

EA - exposição aguda

EROs - espécies reativas do oxigênio

ES - exposição subcrônica

FOX – (Ferrous Oxidation-Xylenol orange) método para determinação da lipoperoxidação

FSD - fração solúvel do óleo diesel

GST - glutathione S-transferase

GTA - glutaraldeído

H<sup>+</sup> - íon hidrogênio ou próton

H<sup>+</sup>-ATPase - hidrogênio ATPase

HPAs - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

ID - índice de danos

IL<sub>org</sub> - índice da lesão no órgão

LPO - lipoperoxidação ou peroxidação lipídica

MEV - microscopia eletrônica de varredura

ML - microscopia de luz

MN - mironúcleo

Na<sup>+</sup> - sódio

Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase - sódio potássio ATPase

NKA - sódio potássio ATPase

PAS - Peridic Acid of Schiff

R - recuperação

SOD - superóxido dismutase

## RESUMO

DELUNARDO, Frederico Augusto Cariello, D.Sc., Universidade Vila Velha - ES, fevereiro de 2017. **EFEITOS SUBLETAIS DA CONTAMINAÇÃO PELA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL EM CAVALO-MARINHO (*Hippocampus reidi*).**

Orientadora: Adriana Regina Chippari-Gomes

O óleo diesel é o derivado do petróleo de maior relevância em termos de risco ambiental por ser continuamente lançado nos ambientes costeiros principalmente pela ampla utilização como combustível. Uma vez disponível para os organismos aquáticos, a fração solúvel do óleo diesel (FSD) pode ocasionar sérios distúrbios em diversos níveis biológicos. Diante disso, a presente tese teve como objetivo geral avaliar a dependência do padrão de respostas dos biomarcadores de estresse oxidativo, dos parâmetros osmorregulatórios e das alterações histopatológicas provocadas pela exposição aguda e subcrônica à FSD em uma espécie de cavalo-marinho, assim como avaliar o padrão dessas mesmas respostas após a exposição ao contaminante. O conjunto de biomarcadores, enzimas GST, SOD e CAT hepáticas, a concentração de LPO hepática, a análise de metabólitos de HPAs na bile, os danos no DNA de células do sangue periférico, as enzimas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase branquiais, a imunohistoquímica de células ricas em mitocôndrias, juntamente com as análises morfológicas e histopatológicas das brânquias, se mostraram eficientes em indicar os efeitos agudos e subcrônicos da presença dos hidrocarbonetos em peixes. De modo que foram observados ajustes metabólicos e morfofuncionais no organismo-teste, na tentativa de manutenção homeostática como uma resposta compensatória frente aos danos causados pela exposição ao contaminante e muitas dessas alterações foram atenuadas após o protocolo de recuperação. Além disso, a espécie *Hippocampus reidi*, além de ser uma espécie bandeira na promoção da proteção de ecossistemas aquáticos, também provou ser um excelente organismo bioindicador em estudos ecotoxicológicos.

Palavras chave: Ecotoxicologia, petroderivados, peixe, biomarcadores, recuperação.

## ABSTRACT

DELUNARDO, Frederico Augusto Cariello, D.Sc., Universidade Vila Velha - ES, fevereiro de 2017. **SUBLETAL EFFECTS OF CONTAMINATION BY THE SOLUBLE FRACTION OF DIESEL OIL IN SEAHORSE (*Hippocampus reidi*).**

Orientadora: Adriana Regina Chippari-Gomes

Diesel oil is the petroleum derivative of major relevance in terms of environmental risk because it is continually launched in the coastal environments mainly by the wide use as fuel. Once available for aquatic organisms, the soluble fraction of diesel oil (SFD) can lead to serious disturbances at various biological levels. Therefore, the present thesis aimed to evaluate the dependence of the pattern of responses of biomarkers of oxidative stress, osmoregulatory parameters and histopathological changes caused by acute and subchronic exposure to SFD in a seahorse species, as well as to evaluate the these same responses after exposure to the contaminant. The set of biomarkers, GST, SOD and CAT hepatic enzymes, hepatic LPO concentration, analysis of PAHs metabolites in bile, DNA damage of peripheral blood cells, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-ATPase branchial enzymes, Immunohistochemistry of mitochondria rich cells, together with the morphological and histopathological analysis of the gills, were efficient in indicating the acute and subchronic effects of the presence of hydrocarbons in fish. Thus, metabolic and morphofunctional adjustments were observed in the test organism in the attempt of homeostatic maintenance as a compensatory response to the damages caused by exposure to the contaminant, and many of these alterations were attenuated after the recovery protocol. In addition, the species *Hippocampus reidi*, besides being a flag species in the promotion of protection of aquatic ecosystems, also proved to be an excellent organism bioindicator in ecotoxicological studies.

Key words: Ecotoxicology, petroderivates, fish, biomarkers, recovery.

## APRESENTAÇÃO

Face aos problemas ambientais da atualidade, é necessário o investimento em estudos que visam esclarecer e entender os mecanismos de ação dos hidrocarbonetos de petróleo em peixes, na tentativa de elucidar lacunas ainda não preenchidas a respeito dos potenciais danos dessa classe de contaminantes sobre a ictiofauna e, conseqüentemente, fornecer subsídios para sua preservação, restauração e monitoramento da qualidade ambiental. Diante disso, esta tese de doutorado se baseou na hipótese de que a resposta de um conjunto de biomarcadores na espécie de peixe *Hippocampus reidi* é dependente do tempo de exposição à FSD e está estruturada em cinco capítulos:

No primeiro capítulo, é apresentada uma introdução geral com o intuito de fornecer informações sobre os eventos de contaminação por petróleo e seus derivados, como o óleo diesel no ambiente aquático e o uso de bioindicadores e biomarcadores em programas de monitoramento ambiental, apresentando a espécie modelo utilizado neste estudo: o cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*).

O segundo capítulo recebeu o título de: “Abordagem integrada da estrutura branquial de cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*) e alterações histopatológicas observadas após exposição à fração solúvel do óleo diesel” e se fundamentou na hipótese de que o aparato branquial de *H. reidi* apresenta características peculiares e que a exposição aguda e subcrônica à FSD causam danos histopatológicos nas brânquias desses indivíduos e um período de depuração livre do contaminante é capaz de restaurar tais danos.

O terceiro capítulo recebeu o título de “Efeitos da fração solúvel do óleo diesel em um conjunto de biomarcadores em cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*)” e apresentou como hipótese o fato de que a exposição aguda e subcrônica à FSD alteram os parâmetros de biotransformação e antioxidantes, os níveis de metabólitos de HPAs na bile e a integridade do DNA em *H. reidi* e um período de depuração livre do contaminante é capaz de recuperar tais parâmetros.

O quarto capítulo intitula-se “Efeitos da exposição à fração solúvel do óleo diesel nos parâmetros osmorregulatórios de cavalo marinho (*Hippocampus reidi*)” e se fundamentou na hipótese de que a exposição aguda e subcrônica à FSD alteram os



mecanismos osmorregulatórios nas brânquias de *H. reidi* e que e um período de depuração livre do contaminante é capaz de recuperar tais parâmetros.

Finalizando a tese, o quinto capítulo trata das considerações finais elaboradas com o intuito de resumir aos leitores as principais conclusões desse estudo.

# **Capítulo I**

## **Introdução geral**

## INTRODUÇÃO GERAL

A demanda global por energia tem crescido rapidamente desde meados dos anos de 1970 associadas aos novos padrões modernos de consumo, com destaque para o uso do petróleo como a principal fonte energética mundial e, apesar da existência de formas alternativas de geração de energia, projeções indicam que o uso de combustíveis fósseis será predominante no setor industrial, apoiando o crescimento de países em desenvolvimento e já desenvolvidos (US - EIA, 2011; Gomiero et al., 2015). A alta demanda por produtos petroquímicos tem contribuído para o aumento de eventos de contaminação em ecossistemas aquáticos, particularmente em ambientes marinhos e costeiros, com os derramamentos envolvendo o *Torry Canyon* (1967), *Amoco Cádiz* (1978), *Exxon Valdez* (1989), *Aegean Sea* (1992), *North Cape* (1996), *Nakhodka* (1997), *Erika* (1999), *Prestigie* (2002), *Hebei Spirit* (2007) e, mais recentemente, o *Deepwater Horizon* (2010) como alguns dos exemplos mais proeminentes e impactantes. Este último foi responsável pela liberação de aproximadamente 4,9 milhões de barris de petróleo no golfo do México durante 87 dias, entre os meses de abril e julho de 2010, e é considerado o maior desastre ambiental da história dos Estados Unidos e um dos maiores do mundo (dos Anjos et al., 2011, Hemmer et al., 2011; Milinkovitch et al., 2011 Crone e Tolstoy, 2010).

Ainda que acidentes envolvendo derramamento de petróleo durante o processo de transporte e extração ocorra em todo o mundo, e sejam responsáveis pelo aporte de aproximadamente 1.300.000 toneladas métricas por ano, estima-se que a principal fonte de contaminação que os ecossistemas aquáticos estão sujeitos são os acidentes que ocorrem nas refinarias, terminais ou locais de armazenamento do petróleo, como é o caso do Brasil (Agamy, 2012; Tiburtius et al., 2005; Meniconi et al., 2002). Além disso, resíduos ou produtos da decomposição do petróleo e seus derivados terminam por alcançar o lençol freático podendo persistir por longos períodos (Rodrigues et al., 2010; Sunday et al., 2007).

De todos os derivados do petróleo, o óleo diesel é o mais comumente utilizado em motores de combustão interna e ignição por compressão (motores do ciclo Diesel), sendo empregado como combustível nos mais variados veículos de transporte tanto terrestre como aquático, bem como em diversas máquinas do setor industrial. É um

produto inflamável, tóxico, volátil, límpido, isento de material em suspensão e com odor forte e característico. O óleo diesel é constituído predominantemente por hidrocarbonetos alifáticos contendo de 9 a 28 átomos de carbono na cadeia, e outros compostos que porventura destilam na mesma faixa de temperatura. Outra característica importante do diesel é o alto teor de enxofre, que varia de 0,1 a 0,5% (Fingas and Brown, 2011; Zhang et al., 2003; Neeft et al., 1996; Kennish, 1992). No Brasil, o modelo energético vigente é apoiado, prioritariamente, no transporte de cargas com motores a diesel, por via rodoviária, em detrimento do transporte ferroviário ou fluvial, fazendo com que o óleo diesel seja o derivado propulsor do refino em nosso país, correspondendo a 34 % do barril de petróleo, enquanto que em países desenvolvidos, esta demanda situa-se entre 15 e 25 % do volume total do barril de petróleo. Somente no ano de 2014 foi produzido um total de 311 milhões de barris, um acréscimo de 1 milhão de barris em relação a 2013 (Portal BR, 2015; Portal BR, 2008).

Uma vez que algum derivado do petróleo, como o óleo diesel entra em contato com o ambiente aquático, ele sofre uma série de processos bióticos e abióticos que alteram sua composição física e química, formando a fração solúvel do óleo – FSD (National Academy of Sciences, 2003; Shelton et al., 1999). Entre as intempéries ambientais a que esses compostos estão sujeitos incluem-se os processos de evaporação, dispersão, dissolução, emulsificação, fotodegradação, biodegradação microbiana e sedimentação, sendo que muitos desses processos podem aumentar a biodisponibilidade desses compostos na coluna d'água, e facilitar sua absorção e ingestão pelos organismos aquáticos (Abbriano et al., 2011; Jiang et al., 2010; Faksness et al., 2008). A FSD é considerada mais tóxica do que o óleo diesel derramado originalmente. Isso porque ocorrem mudanças em suas características físico-químicas, que passam a conter principalmente hidrocarbonetos acomodados em água, como os monoaromáticos, frequentemente denominados de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), além de fenóis e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio, enxofre e concentrações traço de metais com o ferro, níquel, cobre e vanádio (Rodrigues et al., 2010; National Academy of Sciences, 2003; Silva et al., 2002 Saeed and Al-Mutairi, 1999; Ali et al., 1994).

A maioria dos hidrocarbonetos são contaminantes persistentes no ambiente aquático devido à sua propriedade hidrofóbica e baixa volatilidade dos compostos com alto peso molecular, além de apresentarem elevada capacidade de se adsorver em partículas suspensas ou matrizes apolares, o que favorece seu acúmulo tanto no sedimento dos ambientes quanto nos tecidos adiposos dos organismos (Lee e Steinert, 2003; Ohnishi e Kawanishi, 2002; Tuvikene, 1995). Uma vez no interior das células, os hidrocarbonetos passam por um processo de biotransformação catalisado pelas enzimas do sistema de monooxigenases de função mista da super família dos Citocromos P450, onde uma série de reações de oxidação, redução, hidrólise e de conjugação, leva à formação de metabólitos altamente reativos (muitas vezes mais tóxicos que os compostos parentais) envolvidos na promoção do estresse oxidativo, o que os torna uma classe particular de contaminantes, uma vez que grande parte da sua toxicidade é atribuída ao mecanismo de desintoxicação da própria célula (Perrichon et al., 2015; Simonato et al., 2011; Oliva et al., 2010; van der Oost et al., 2003).

De acordo com diversos estudos, a exposição de organismos aquáticos a hidrocarbonetos do petróleo e seus derivados pode causar efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (Delunardo et al., 2015; Le Dû-Lacoste et al., 2013; Wessel et al., 2012; Fedato et al., 2010), prejuízo no sucesso reprodutivo devido ao impacto causado durante o recrutamento de populações, uma vez que pode atuar como disruptores endócrinos (Hawliczek et al., 2012; Pollino et al., 2009), alterações nas funções cardio-respiratórias e comportamentais (Le Bihanic et al., 2015; Perrichon et al., 2014; Kochhann et al., 2013), lesões histopatológicas provocadas nos tecidos respiratório e hepático (Brown-Peterson et al., 2015; Delunardo et al., 2013; Agamy, 2013a, b; Simonato et al., 2008), indução de estresse oxidativo (Bettim et al., 2016; Holth et al., 2014; Luís e Guilhermino, 2012; Simonato et al., 2011).

Refletindo a crescente preocupação sobre os efeitos de substâncias químicas no ecossistema em outras espécies, além da espécie humana, surgiu a ecotoxicologia, uma ciência interdisciplinar que se propõe a determinar os efeitos prejudiciais de agentes químicos dentro do contexto da ecologia, incluindo o comportamento e as transformações desses agentes químicos no ambiente, assim como seus efeitos sobre os organismos vivos. Nesse contexto, uma das principais vertentes da ecotoxicologia utiliza ensaios de toxicidade aguda e crônica, com o uso de organismos como

bioindicadores e biomonitores de poluição, seguindo padrões metodológicos estabelecidos por órgãos normativos nacionais e internacionais, como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), United States Environmental Protection Agency (US EPA), European Environment Agency (EEA), entre outros. A toxicidade aguda é definida como efeito de curto prazo, após uma rápida exposição a elevadas concentrações de um contaminante; já a toxicidade crônica é definida como efeitos em longo prazo, geralmente após exposições contínuas e subletais ao contaminante (Beketov e Liess, 2012; Banks et al., 2008; Zagatto e Bertoletti, 2006; NRC, 2003; Walker et al., 1996).

As respostas dos bioindicadores às substâncias tóxicas podem ser definidas como biomarcadores, que de alguma forma são observadas ou medidas, e podem ser avaliados nos níveis fisiológico, bioquímico, histológico e comportamental (van der Oost et al., 2003). Elas são consideradas ferramentas úteis na avaliação ambiental fornecendo os primeiros sinais de contaminação, antes que esses efeitos possam ser detectados nos níveis de população / comunidades, além disso, os biomarcadores podem ser classificados em três tipos: biomarcadores de exposição, de efeito e de suscetibilidade (Guedard et al., 2012; Jakšić et al., 2008; Zagatto e Bertoletti, 2006). Em estudos ecotoxicológicos é recomendada a utilização de um grupo de biomarcadores, uma vez que a avaliação de uma única resposta biológica pode não refletir de forma ampla os danos à saúde dos organismos vivos em função de um determinado ambiente impactado. Dessa forma, o uso concomitante de diferentes biomarcadores é importante para minimizar interpretações errôneas nos casos de situações complexas de poluição (Flamarion et al., 2002; Pacheco e Santos 2001; Minier et al., 2000). Nestes estudos, é importante que seja feita a escolha mais apropriada da espécie indicadora da qualidade do ambiente em estudo (Zorita et al., 2008; Deviller et al., 2005).

Os peixes podem acumular poluentes diretamente da água contaminada ou indiretamente por meio da ingestão de alimentos contaminados, sendo considerados organismos adequados como bioindicadores de toxicidade ambiental, uma vez que eles são considerados componentes relevantes na cadeia trófica, levando energia dos níveis inferiores para os superiores, eles também reagem com sensibilidade a agentes estressores ou mudanças ambientais e a baixas concentrações de xenobióticos presentes no ambiente, as quais poderiam afetar as populações aquáticas (Matsumoto

et al., 2006; Çavas e Ergene-Gözükara, 2005; Walker et al., 1996). Além disso, esses organismos respondem a agentes tóxicos de forma semelhante aos vertebrados superiores, permitindo uma melhor avaliação das substâncias que são potencialmente teratogênicas, mutagênicas e cancerígenas para os seres humanos e têm sido incluídos em vários programas de biomonitoramento ambiental modernos (Arslan et al., 2015; ; Dubansky et al., 2013; Giari e a., 2012; Pathiratne e Hemachandra, 2010).

Os cavalos-marinhos (**Figura 1**) são pertencentes à família Syngnatae, da qual também fazem parte os peixes-cachimbo, cavalos-cachimbos e dragões-marinho. Ocupam principalmente as regiões oceânicas temperadas e tropicais com uma distribuição entre as latitudes 50 ° norte e 50 ° sul, sendo normalmente encontrados em ambientes costeiros, como estuários, recifes, manguezais, costões rochosos, bancos de “capim” marinho (*seagrass*) e praias arenosas (Willadino et al., 2012; Teske e Beheregaray, 2009). Eles são agrupados em um único gênero, *Hippocampus*, caracterizado por sua morfologia corpórea única, com seus grandes olhos, cabeça semelhante à cabeça de um cavalo, posicionada em ângulo reto em relação ao eixo de seu tronco curvilíneo, formado por uma série de anéis ósseos, por sua cauda preênsil, pela presença de uma bolsa incubadora ao longo da linha média dos machos e pela curiosa e peculiar gravidez masculina (Koldewey e Martin-Smith, 2010; Foster e Vincent, 2004; Zhang et al., 2003). Além disso, eles não apresentam nadadeira caudal e nadam na posição vertical, contando com o com o auxílio de uma nadadeira dorsal para a propulsão, e duas nadadeiras peitorais que auxiliam na manobrabilidade, e raramente se aventuram em mar aberto para perseguir presas ou colonizar novas áreas (Porter et al., 2013; Kleiber et al., 2011; Rosa et al., 2005).

Essas características sedentárias, aliadas ao fato de que esses peixes geralmente apresentam baixas densidades populacionais, tornam as populações de cavalos-marinhos particularmente suscetíveis a perturbações antropogênicas e resultam em um aumento da exposição a substâncias tóxicas quando ocorrem eventos de contaminação (Rosa e Alves, 2007; Koldewey, 2005). De modo que, além da exploração para fins comerciais e medicinais, a degradação de seus habitats esteja contribuindo para o declínio de suas populações em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (Koldewey, 2005; Rosa et al., 2005; Vincent, 1996). O que levou à inclusão de todas as espécies de cavalos-marinho a serem listadas no Apêndice II da CITES

(Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e Flora Selvagens em Perigo de Extinção - CITES, 2010), assim como na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (IUCN, 2010), onde são citados como vulneráveis.

Ao longo da costa brasileira, duas espécies de cavalos-marinho são encontradas naturalmente: o *Hippocampus erectus* Perry, 1810 e o *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933. Este último é a espécie mais abundante e sua distribuição ocorre desde o Amapá até o Rio Grande do Sul, sendo a espécie dominante na região Norte e Nordeste, onde são registradas suas densidades mais altas (Rosa et al., 2007). Portanto, esta espécie foi selecionada como bioindicador de contaminação dos ambientes marinhos e estuarinos por petróleo e seus derivados neste estudo. Vale ressaltar que no Estado do Espírito Santo existe a única empresa produtora desta espécie no Brasil (De Mar Company Ltda. ME) dotada de condições necessárias para a alimentação e manutenção dos organismos desde o nascimento até a fase adulta (Hora e Joyeux, 2009), de modo que todos os indivíduos utilizados neste estudo foram comercializados, não impactando a população de cavalos-marinhos residentes na Baía do Espírito Santo, Vitória-ES.



**Figura 1.** Exemplar de *Hippocampus reidi* em aquário de aclimatação.



## REFERÊNCIAS

As referências deste capítulo estão de acordo com as normas do periódico “Ecotoxicology and Environmental Safety”.

Abbriano, R.M., Carranza, M.M., Hogle, S.L., Levin, R.A., Netburn, A.N., Seto, K.L., Snyder, S.M., Franks, P.J.S., 2011. Deepwater Horizon oil spill: a review of the planktonic response. *Oceanography* 24, 294-301.

Agamy, R., 2012. Histopathological liver alterations in juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*) exposed to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 75, 171-179.

Agamy, R., 2013(a). Impact of laboratory exposure to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant on the gills of the juvenile brown spotted grouper (*Epinephelus chlorostigma*): A histopathological study. *Mar. Environ. Res.* 86, 46-55.

Agamy, R., 2013(b). Sub chronic exposure to crude oil, dispersed oil and dispersant induces histopathological alterations in the gills of the juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 92, 180-190.

Ali, L.N., 1994. The dissolution and photodegradation of Kuwait crude oil in seawater. Ph.D. Thesis. University of Plymouth, UK.

Arslan, O.C., Boyacioglu, M., Parlak, H., Katalay, S., Karaaslan, M.A., 2015. Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliaga Bay Turkey. *Mar. Pollut. Bull.* 94, 48-54.

Banks, J.R., Dick, L. K., Banks, H.T., Stark, J. D., 2008. Time-varying vital rates in ecotoxicology: selective pesticides and aphid population dynamics. *Ecol. Model.* 210, 155-160.

Beketov, M.A., Liess, M., 2012. Ecotoxicology and macroecology - Time for integration. Environ. Pollut. 162, 247-254.

Bettim, F.L., Galvan, G.L., Cestari, M.M., Yamamoto, C.I., de Assis, H.C., 2016. Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline. Chemosphere 144, 1467-1474.

Brown, C.E., Fieldhouse, B., Lumley, T.C., Lambert, P., Hollebhone, B.P., 2011. Environment Canada's methods for assessing oil spill treating agents. In: Fingas, M. (Ed.), Oil Spill Science and Technology. Gulf Professional Publishing, Boston, pp. 643-671.

Brown-Peterson, N.J., Krasnec, M., Takeshita, R., Ryan, C.N., Griffitt, K.J., Lay, C., Mayer, G.D., Bayha, K.M., Hawkins, W.E., Lipton, I, Morris, J., Griffitt, R.J., 2015. A multiple endpoint analysis of the effects of chronic exposure to sediment contaminated with Deepwater Horizon oil on juvenile Southern flounder and their associated microbiomes. Aquat. Toxicol. 165, 197-209.

Çavas, T., Ergene-Gözükara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. Aquat Toxicol. 74, 264-71.

CITES - Conservation on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna, 2010. [www.cites.org](http://www.cites.org). June, 2015.

Crone, T.J., Tolstoy, M., 2010. Magnitude of the 2010 Gulf of Mexico oil leak. Science 330, 634-634.

Delunardo, F.A.C., Carvalho, L.R., Silva, B.F., Galão, M., Val, A.L., Chippari-Gomes, A.R, 2015. Seahorse (*Hippocampus reidi*) as a bioindicator of crude oil exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 117, 28-33.

Delunardo, F.A.C., Silva, B.F., Paulino, M.G., Fernandes, M.N., Chippari-Gomes, A.R., 2013. Genotoxic and morphological damage in *Hippocampus reidi* exposed to crude oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 87, 1-9.

dos Anjos, N.A., Schulze, T., Brack, W., Val, A.L., Schirmer, K., Scholz, S., 2011. Identification and evaluation of *cyp1a* transcript expression in fish as molecular biomarker for petroleum contamination in tropical fresh water ecosystems. *Aquat. Toxicol* 103, 46-52.

Deville, G., Palluel, O., Aliaume, C., Asanthi, H., Sanches, W., Franco, N., Blancheton J. P., Casellas, C., 2005. Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 89-97.

Dubansky, B., Whitehead, A., Miller, J.T., Rice, C.D., Galvez, F., 2013. Multitissue molecular, genomic, and developmental effects of the Deepwater Horizon oil spill on resident Gulf Killifish (*Fundulus grandis*). *Environ. Sci. Technol.* 47, 5074-5082.

Faksness, L.G., Brandvik, P.J., Sydnes, L.K., 2008. Composition of the water accommodated fractions as a function of exposure times and temperatures. *Marine. Poll. Bull.* 56, 1746-1754.

Fedato, R.P., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2010. Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. *Mut. Res.* 700, 80-85.

Fingas, M., Brown, C.E., 2011. Oil spill remote sensing: a review. In: Fingas, M. (Ed.), *Oil Spill Science and Technology: Prevention, Response and Clean up*, first ed. Gulf professional Publishing, Burlington, p. 7-48.

Flammarion, P.; Devaux, A.; Nehls, Migeon, B.; Noury, P.; Garric, J., 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 145-153.

Foster, S.J., Vincent, A.C.J., 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *J. Fish Biol.* 65, 1-61.

Gomiero, A., Volpato, E., Nasci, C., Perra, G., Viarengo, A., Dagnino, A., Spagnolo, A., Fabi, G., 2015. Use of multiple cell and tissue-level biomarkers in mussels collected along two gas fields in the northern Adriatic Sea as a tool for long term environmental monitoring. *Marine. Poll. Bull.* 93, 228-244.

Giari, L., Dezfulin, B.S., Lanzoni, M., Castaldelli, G., 2012. The impact of an oil spill on organs of bream *Abramis brama* in the Po River. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 77, 18-27.

Guedard, M.L., Faure, O., Bessoule, J.J., 2012. Soundness of *in situ* lipid biomarker analysis: Early effect of heavy metals on leaf fatty acid composition of *Lactuca serriola*. *Environ. Exp. Bot.* 76, 54-59.

Hawliczek, A., Nota, B., Cenijn, P., Kamstra, J., Pieterse, B., Winter, R., Winkens, K., Hollert, H., Segner, H., Legler, J., 2012. Developmental toxicity and endocrine disrupting potency of 4-azapyrene, benzo[b]fluorene and retene in the zebrafish *Danio rerio*. *Reprod. Toxicol.* 33, 213–223.

Hemmer, M.J., Barron, M.G., Greene, R.M., 2011. Comparative toxicity of eight oil dispersants, Louisiana sweet crude oil (LSC), and chemically dispersed LSC to two aquatic test species. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2244-2252.

Holth, T.F., Eidsvolla, D.P., Farmenb, E., Sandersc, M.B., Martínez-Gómezd, C., Budzinskie, H., Burgeotf, H., Guilherminog, L., Hyllanda, K., 2014. Effects of water accommodated fractions of crude oils and diesel on a suite of biomarkers in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquat. Toxicol.* 154, 240–252.

Hora, M.S.C; Joyeux, J.-C., 2009. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture* 292, 37-41.

IUCN - International Union for Conservation of Nature, 2010. [www.iucn.org](http://www.iucn.org). June, 2015.

Jakšić, Z., Hamer, B., Landeka, N., Batel, R. 2008. Western mosquito fish as a bioindicator of exposure to organochlorine compounds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 426-435.

Jiang, Z.B., Huang, Y.J., Xu, X.Q., Liao, Y.B., Shou, L., Liu, J.J., Chen, Q.Z., Zeng, J.N., 2010. Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. *Acta Ecol. Sin.* 30, 8-15.

Kennish, M.J., 1992. *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects*. Londres: CRC Press, pp. 494.

Kleiber, D., Blight, L.K., Caldwell, I.R., Vincent, A.C.J., 2011. The importance of seahorses and pipefishes in the diet of marine animals. *Rev. Fish Biol. Fish.* 21, 205-223.

Kochhann, D., Brust, S.M.D.A., Domingos, F.X.V., Val, A.L., 2013. Linking hematological, biochemical, genotoxic, and behavioral responses to crude oil in the Amazon fish *Colossoma macropomum* (Cuvier,1816). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 266–275.

Koldewey, h. J., Martin-Smith, k. M., 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture* 302, 131-152.

Koldewey, H., 2005. Seahorses in public aquariums. In: Koldewei, H. (Ed.), *Syngnathid Husbandry in Public Aquariums*. Project Seahorse, London.

Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 544, 43-64.

Le Bihanic, F., Sommard, V., de Lansalut, P., Pichon, A., Grassetta, J., Berradab, S., Budzinski, H., Cousin, X., Morin, B., Cachot, J., 2015. Environmental concentrations of benz[a]anthracene induce developmental defects and DNA damage and impair photomotor response in Japanese medaka larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 321-328.

Le Dû-Lacoste, M., Akcha, F., Dévier, M.-H., Morin, B., Burgeot, T., Budzinski, H., 2013. Comparative study of different exposure routes on the biotransformation and genotoxicity of PAHs in the flatfish species, *Scophthalmus maximus*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 690-707.

Luís, L.G., Guilhermino, L., 2012. Short-term toxic effects of naphthalene and pyrene on the common prawn (*Palaemon serratus*) assessed by a multi-parameter laboratorial approach: mechanisms of toxicity and impairment of individual fitness. *Biomarkers* 17, 275-285.

Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Malagutti, M.I.A., Dias, A.L., Fonseca, I.C., Marin-Morales, M.A., 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips, the genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review. *Genet. Mol. Biol.* 29, 148-158.

Meniconi, M.F.G., Gabardo, I.T., Carneiro, M.E.R., Barbanti, S.M., Silva, G.C., Masone, C.G., 2002. Brazilian oil spills chemical characterization – case studies. *Environ Forensics* 3, 303-321.

Milinkovitch, T., Kanan, R., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., 2011. Effects of dispersed oil exposure on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and the mortality of juvenile *Liza ramada*. *Sci. Total Environ.* 409, 1643-1650.

Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquene, G., Goderoy, D., Burgeot, T., Le Boulenger, F., 2000. Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Mar. Environ. Res.* 50, 373-377.

National Academy of Sciences, 2003. *Oil in the Sea - III; Input, Fates and Effects*. National Academic Press, Washington DC, pp. 93e94.

Neeft, J. P. A., Makkee, M.; Moulijn, J. A., 1996. *Fuel Process. Technol.* 47, 1-69.

NRC, 2003. *Oil in the sea III: Inputs, fates, and effects*. Committee on Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects. National Research Council.

Ohnishi, S., Kawanishi, S., 2002. Double base lesions of DNA by a metabolite of carcinogenic benzo[a]pyrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 778-782.

Oliva, M., Gonzalez De Canales, L.M., Gravato, C., Guilhermino, L., Perales, J.A., 2010. Biochemical effects and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in senegal sole (*Solea senegalensis*) from Huelva estuary (SW Spain). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1843-1851.

Pacheco, M., Santos, M.A., 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 64-75.

Pathiratne, A., Hemachandra, C.K., 2010. Modulation of ethoxyresorufin O-deethylase and glutathione S-transferase activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by polycyclic aromatic hydrocarbons containing two to four rings: implications in biomonitoring aquatic pollution. *Ecotoxicology* 19, 1012-1018.

Perrichon, P., Le Bihanic, F., Bustamante, P., Le Menach, K., Budzinski, H., Cachot, J., Cousin, X., 2014. Influence of sediment composition on PAH toxicity using zebrafish

(*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryo-larval assays. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 13703-13719.

Perrichon, P., Akcha, F., Menach, K.L., Goubeau, M., Budzinski, H., Cousin, X., Bustamante, P., 2015. Parental trophic exposure to three aromatic fractions of polycyclic aromatic hydrocarbons in the zebrafish: Consequences for the offspring. Science of the Total Environment 524–525, 52–62

Pollino, C.A., Georgiades, E., Holdway, D.A., 2009. Physiological changes in reproductively active rainbowfish (*Melanoaenia fluviatilis*) following exposure to naphthalene. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 1265-1270.

Portal BR 2015. Petrobras Distribuidora. Disponível em: <http://www.br.com.br/portalbr>. Acesso em: junho 2015.

Portal BR 2008. Petrobras Distribuidora. Disponível em: <http://www.br.com.br/portalbr>. Acesso em: outubro 2008.

Porter, M.M., Novitskaya, E., Castro-Cesena, A. B., Meyers, M. A., McKittrick, J., 2013. Highly deformable bones: unusual deformation mechanisms of seahorse armor. Acta Biomater. 9, 6763-6770.

Rodrigues, R.V., Miranda-Filho, K.C., Gusmão, E.P., Moreira, C.B., Sampaio, L.A., 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. Sci. Total Environ. 408, 2054-2059.

Rosa, I.L.; Alves, R.R.N., 2007. Pesca e comércio de cavalos-marinhos (Syngnathidae: *Hippocampus*) no Norte e Nordeste do Brasil: subsídios para a conservação e manejo. In: Albuquerque, U.P.de; Alves, A.G.C.; Araújo, T.A. de S. (Org.). Povos e Paisagens. Recife: Núcleo de populações em ecologia e etnobotânica aplicada, pp. 115-134.



Rosa, I. L., Alves, R. R. N., Bonifácio, K. M., Mourão, J. S., Osório, F. M., Oliveira, T. P. R., Nottingham, M. C., 2005. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 1, 1-15.

Saeed, T., Al-Mutairi, M., 1999. Chemical composition of the water-soluble fraction of leaded gasolines in sea water. *Environ. Int.* 25, 117-29.

Shelton, M.E., Chapman, P.J., Foss, S.S., Fisher, W.S., 1999. Degradation of weathered oil by Mixed marine bacteria and the toxicity of Accumulated water-soluble Material to two marine Crustacea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 13-20.

Silva, R.L.B., Barra, C.M., Monteiro, T.C.N., Brilhante, O.M., 2002. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis conseqüências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil, 18. *Cad. Saúde Pública, Rio Jan*, pp. 1599–1607.

Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology* 20, 1400-1410.

Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 112-120.

Sunday, A.A., Matthew, O., Olukayode, O.A., Olakunle, D.T., Olatope, S.O., 2007. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. *World J. Microb. Biot.* 23, 1149-1159.

Teske, P.R., Beheregaray, L.B., 2009. Evolution of seahorses' upright posture was linked to Oligocene expansion of seagrass habitats. *Biol. Lett.* 5, 521-523.

Tiburtius, E.R.L., Peralta-Zamora, P., Emmet, A., Leal, E.S., 2005. Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. *Quim. Nova* 28, 61-64.

Tuvikene, A., 1995. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Ann. Zool. Fenn.* 32, 295-309.

US-EIA, 2011. International Energy Outlook 2011 DOE/EIA-0484, Washington, DC.

van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.

Vincent, A.C.J., 1996. An uncertain future for seahorses. *Mar. Conserv.* 3, 8-9.

Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M., Peakall, D. B., 1996. Principles of Ecotoxicology, London: Taylor Francis, pp.321.

Wessel, N., Ménard, D., Pichavant-Rafini, K., Ollivier, H., Le Goff, J., Burgeot, T., Akcha, F., 2012. Genotoxic and enzymatic effects of fluoranthene in microsomes and freshly isolated hepatocytes from sole (*Solea solea*). *Aquat. Toxicol.* 108, 33–41.

Willadino, L., Souza-Santos, L. P., Mélo, R. C. S., Brito, A. P., Barros, N. C. S., Araújo-Castro, C. M. V., Galvão, D. B., Gouveia, A., Regis, C. G., Cavalli, R. O., 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. *Aquaculture* 360-361, 10-16.

Zagatto, P.A., Bertoletti, E. (Eds.), 2006. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. RIMA Editora, São Carlos, pp.478.

Zhang, J.F., Sen, H., Xu, T.L., Wang, X.R., Li, W.M., Gu, Y.F., 2003. Effects of long term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 234-239.

Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Apraiz, I, Cancio, I., Orbea, A., Soto, M., Marigómez, I., Cajaraville, M P., 2008. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. *Environ. Pollut.* 153, 157-168.

## **Capítulo II**

**Abordagem integrada da estrutura branquial de cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*) e alterações histopatológicas observadas após exposição à fração solúvel do óleo diesel**

## RESUMO

O presente estudo teve por objetivo descrever a morfologia branquial de *Hippocampus reidi* (cavalo-marinho) assim como as possíveis histopatologias encontradas nesse órgão após exposição aguda (12, 24, 48 e 96 h) e subcrônica (168 e 336 h) a 50 % da fração solúvel do óleo diesel (FSD). Adicionalmente, foi realizado um experimento de recuperação, no qual os organismos após exposição a 50 % FSD por 168 h, foram transferidos e mantidos em água do mar por 336 h sem os contaminantes presentes no FSD para avaliar a recuperação do tecido branquial. A anatomia branquial é semelhante ao padrão encontrado em outros peixes, com algumas especializações relacionadas aos hábitos de vida dessa espécie. O aparato branquial se apresenta em forma de tufo com filamentos pequenos e lamelas amplamente projetadas dentro do limitado espaço da câmara branquial. A superfície do epitélio do filamento e das lamelas tem um aspecto rugoso devido à evaginações na superfície apical das células pavimentosas formando uma “crista”. Técnicas de imunohistoquímicas e citoquímicas foram aplicadas e revelaram a presença de células ricas em mitocôndrias presentes exclusivamente na superfície do epitélio lamelar, e a presença de células mucosas PAS positivas na base dos filamentos. As principais histopatologias observadas foram hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, fusão parcial das lamelas, aneurisma e dilatação do canal marginal e basal. Após o experimento de recuperação danos como hipertrofia e hiperplasia foram reparados.

Palavras-chave: Peixe, morfologia branquial, óleo diesel, histopatologia, recuperação.

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação por derivados de petróleo é considerada uma das mais relevantes para a ecotoxicologia aquática, com destaque para o óleo diesel, por sua abrangência como combustível e por seu contínuo risco ambiental envolvendo pequenos e grandes vazamentos (Akaishi et al., 2004; Wilson and LeBlanc, 2000). Os cavalos-marinhos, que naturalmente apresentam baixas densidades populacionais, aliados ao seu hábito sedentário, são particularmente suscetíveis a perturbações antropogênicas, uma vez que permanecem nos habitats alterados, o que resulta em um aumento da exposição a substâncias tóxicas quando ocorrem eventos de contaminação (Rosa e Alves, 2007; Koldewey, 2005; Foster e Vincent, 2004). Além disso, a fração solúvel do óleo diesel (FSD) é considerada mais tóxica do que o óleo diesel derramado originalmente porque ocorrem mudanças em suas características físico-químicas, que passam a conter principalmente as formas acomodadas em água dos hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Além de fenóis e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio, enxofre e concentrações traço de metais com o ferro, níquel, cobre e vanádio (Rodrigues et al., 2010; National Academy of Sciences, 2003; Saeed and Al-Mutairi, 1999; Ali et al., 1994).

Os cavalos-marinhos pertencem à família Syngnathidae, da qual também fazem parte os peixes-cachimbo, cavalos-cachimbo e dragões-marinhos (Willadino et al., 2012). São peixes conhecidos por morfologia corpórea única e pela curiosa e peculiar gravidez masculina (Koldewey e Martin-Smith, 2010; Foster e Vincent, 2004;). Eles não apresentam nadadeira caudal e nadam na posição vertical, permanecendo, a maior parte do tempo, ancorados à vegetação ou outros substratos com sua forte cauda preênsil (Porter et al., 2013; Kleiber et al., 2011; Rosa et al., 2005).

As brânquias dos peixes constituem um órgão multifuncional e que desempenham funções vitais. Elas representam a principal região onde ocorrem as trocas gasosas, como o oxigênio e o dióxido de carbono, são responsáveis pela osmorregulação, equilíbrio ácido-base, pela excreção de produtos metabólicos nitrogenados e alimentação (Hassaninezhada et al, 2014; Dolenc e Kuzir, 2009; Au, 2004). Apesar das células que compõe o epitélio primário e secundário das lamelas branquiais serem constantes e similares, diferenças estruturais e morfológicas têm sido

observadas e estão relacionadas à promoção da eficiência dos mecanismos regulatórios necessários, de acordo com a biologia e história de vida das diferentes classes de peixes (Hwang e Lee, 2007; Wilson e Laurent, 2002).

Uma vez que a superfície das brânquias é a interface primária entre o peixe e o seu ambiente e representa a principal via de absorção de contaminantes pelos organismos aquáticos, investigações morfofuncionais e histopatológicas nesse órgão têm sido reconhecidas como biomarcadores confiáveis na avaliação da exposição dos peixes aos contaminantes em monitoramentos ambientais em todo o mundo, tanto em estudos laboratoriais, como em estudos de campo (Brown-Peterson et al, 2015; Dubansky et al., 2013; Whitehead et al., 2012; Negreiros et al., 2011; Katsumiti et al., 2009; Simonato et al., 2008; Evans et al, 2005; Schwaiger et al., 1997). Diante disso, o objetivo desse trabalho foi descrever a morfologia branquial de *Hippocampus reidi* sob uma abordagem integrada e possíveis alterações morfofuncionais após a exposição à FSD. Assim como verificar uma eventual recuperação de danos ocasionados pela exposição a esse derivado de petróleo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares de *H. reidi* foram adquiridos de um criadouro de cavalos marinhos (De Mar Company Ltda. ME, localizado em Guarapari, ES, Brasil) e os peixes foram aclimatados em laboratório durante 15 dias. Eles foram mantidos em tanques de vidro de 50 L em uma densidade de estocagem inferior a  $1 \text{ g L}^{-1}$  (ABNT, 2011) sob fotoperíodo natural (~ 12:12 horas) e aeração constante. A qualidade da água foi diariamente monitorada para os parâmetros temperatura: 25-25,5 °C; condutividade: 48,6-50  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ; salinidade: 25-25,3 ppt; oxigênio dissolvido: 7.0-7.5  $\text{mg L}^{-1}$  e pH: 8,1-8,2, usando um condutivímetro YSI EC 300, oxímetro YSI OD 200 e um pHmetro YSI ph 100, respectivamente. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, com misidáceos coletados na natureza e congelados, fornecidos pelo próprio criadouro. Todo procedimento experimental foi realizado em conformidade com as normas da Comissão de Bem Estar Animal da Universidade Vila Velha - UVV (número do protocolo: 261/2013).

### 2.1 Morfologia branquial

Após a aclimação, um total de 15 indivíduos adultos de *H. reidi* (nove fêmeas e seis machos, com massa de  $5,77 \pm 0,21 \text{ g}$  e medindo  $9,83 \pm 0,19 \text{ cm}$ ) foi assistematicamente selecionado e anestesiados com uma solução de benzocaína  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ . As brânquias foram removidas e fixadas em glutaraldeído (GTA) 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3). Análises morfométricas foram realizadas a partir das medidas de comprimento e a contagem de cada filamento branquial dos indivíduos utilizando um microscópio estereoscópio (Zeiss, Stemi SV6). Os arcos branquiais de todos os organismos foram separados individualmente e processados simultaneamente para as análises em microscopia de luz (ML) e em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para as análises em ML, amostras de brânquias de cinco organismos foram desidratadas em bateria crescente de etanol (50 a 100 %) e incluídas em parafina histológica a fim de se obter cortes em posição sagital ( $8 \mu\text{m}$ ) ou transversal ( $5 \mu\text{m}$ ), de acordo com a técnica a ser aplicada. Técnicas de imunohistoquímica para a marcação



de células ricas em mitocôndrias (CRM) foram aplicadas de acordo com Paulino et al. (2012) e histoquímica de células mucosas (CM) foram realizadas utilizando um kit comercial (EasyPath, ref. EP-12-20019), segundo orientações do fabricante. Em ambos os casos, as lâminas foram finalizadas usando Entellan<sup>®</sup> e analisadas em microscópio de luz Olympus BX51 com a contagem de CRM no filamento e lamelas (por mm<sup>2</sup> de epitélio) em 25 campos assistemáticos, com auxílio do software Motic Image Plus 2.0. Com relação à quantificação das CM, foi utilizado o software Olympus DP2 - B5W, em 25 campos assistemáticos.

Para as análises em MEV, amostras de brânquias de dez organismos foram desidratadas em bateria crescente de etanol (50 a 100 %). Em seguida, as amostras foram desidratadas em 1,1,1,3,3,3-hexadimetildisilazano (HMDS) a temperatura ambiente até secagem completa. Posteriormente, as amostras foram coladas com cola adesiva de prata (Degusa) em suportes de alumínio apropriados para o microscópio eletrônico de varredura, e foram então observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV FEI Quanta 250) em 2500 x, distância de trabalho de 10 µm e a 20 kV.

## **2.2 Bioensaio Laboratorial**

### **2.2.1 Preparo da fração solúvel do óleo diesel (FSD)**

A simulação de derrame foi realizada em escala laboratorial de acordo com a metodologia proposta por Nicodem et al. (1998). Foi utilizado o óleo diesel automotivo tipo "B" que misturado à água salina (1:4 v/v) em um aquário de vidro que permaneceu exposto durante 24 h a intempéries sob condições tropicais de insolação durante 6 horas com radiação solar direta (das 10 até 16 h) em dias sem nuvens. Após a exposição, foi realizada a extração da fase orgânica e aquosa (FSD 100 %), através de uma torneira localizada na porção inferior do aquário, de modo que não houvesse contato com a fase insolúvel do óleo diesel.

A concentração da fração solúvel utilizada nos bioensaios laboratoriais foi determinada a partir de experimentos prévios, que avaliaram o tempo de sobrevivência de *H. reidi* expostos à diferentes concentrações de FSD durante 14 dias. Para tanto, foram testadas as seguintes concentrações: 25, 50 e 75 % da FSD. Para cada

tratamento foram utilizados seis indivíduos, expostos individualmente em aquários de vidro contendo 6 L de solução, em um sistema semi-estático com renovação total do meio a cada 96 h (os peixes foram transferidos para aquários dispostos imediatamente ao lado, contendo uma nova solução da FSD) e aeração constante. A maior concentração testada que não produziu efeito letal foi a de 50 % da FSD, sendo esta concentração, então, utilizada nos demais experimentos.

### **2.2.2 Delineamento experimental**

Três protocolos experimentais foram realizados para avaliar as alterações histopatológicas em *H. reidi* após exposição à FSD 50 %:

- **Protocolo I:** Exposição aguda (EA) constituída por testes de toxicidade estáticos (sem renovação do contaminante) por 12, 24, 48 e 96 h.
- **Protocolo II:** Exposição subcrônica (ES) constituída por testes de toxicidade semi-estáticos por 168 e 336 h (equivalente a 7 e 14 dias), com renovação total do meio a cada 96 h.
- **Protocolo III:** Recuperação (R) constituído por teste de toxicidade semi-estático à FSD por 168 h, com renovação total do meio a cada 96 h, seguido de um tratamento de depuração total (exposição na ausência do contaminante) por 336 h, totalizando 504 h de duração. A recuperação após 168 h de exposição foi escolhida baseada em um trabalho anterior (Delunardo et al. 2013), onde indivíduos de *H. reidi* foram transferidos para aquários livres do contaminante após exposição aguda de 96 h ao petróleo bruto. Aqui, pretendeu-se avaliar a recuperação após um período maior de exposição, caracterizado por uma exposição subcrônica.

Após a aclimatação, os peixes ( $5,73 \pm 0,16$  g e  $9,71 \pm 0,24$  cm) foram selecionados assistematicamente e transferidos para aquários individuais de vidro (6 L), com aeração constante, onde permaneceram por 24 h antes do início dos experimentos. No início das séries experimentais, três litros da água dos aquários foram cuidadosamente sifonadas e substituída lentamente pela FSD preparada anteriormente (que era então

diluída para 50 %, em água salina nas mesmas condições em que os animais estavam aclimatados). Os aquários foram cobertos com uma película de plástico e tampa de vidro na tentativa de evitar a volatilização dos compostos da FSD. Para cada período amostral dos protocolos I e II foram utilizados oito peixes por tratamento. Cada um dos períodos de exposição foi acompanhado simultaneamente por um grupo controle (água sem contaminante), também constituído por oito peixes expostos individualmente. O mesmo procedimento experimental foi utilizado durante o protocolo III.

Ao final de cada protocolo experimental, os animais foram anestesiados com uma solução de benzocaína 0,1 g L<sup>-1</sup> que foi diluída no aquário (6 L). As brânquias foram removidas e fixadas em glutaraldeído (GTA) 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3). Uma vez que a cada 96 h os animais eram transferidos para aquários contendo uma nova solução de FSD, a quantificação dos hidrocarbonetos ocorreu em amostras de água coletadas nos tempos 0, 12, 24, 48 e 96 h, não sendo amostrados os tempos de 168 e 336 h.

### **2.2.3 Quantificação dos hidrocarbonetos presentes na FSD**

Os hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) foram quantificados por cromatografia gasosa/detector de ionização de chama (Perkin- Elmer Clarus® 500), acoplado ao injetor headspace Turbomatrix HS 40 (Perkin- Elmer). Já os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram analisados por cromatografia gasosa/espectrômetro de massas (Perkin-Elmer Clarus® 500) (APHA, 2005).

Uma alíquota da fração solúvel em água do óleo diesel foi transferida para o frasco de 20 mL com *headspace* para análises de BTEX (Benzeno, etilbenzeno, tolueno e xileno) e 16 PAHs. 10 mL de água ultrapura e 20 mL de uma solução de padrão interno e *surrogate* (5 mg / mL em metanol) foram adicionados. As amostras foram analisadas utilizando cromatografia a gás com injetor automático e amostrador de *headspace* modelo TriPlus (Thermo Scientific) em um cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo Scientific) acoplado a um DSQ usando um espectrômetro de massa II (Thermo Scientific) com as seguintes configurações: incubação de amostra de 24 min a 70 ° C, volume amostral de 1 mL e condições cromatográficas e detecção com base nos métodos EPA 8260. Foram utilizadas as seguintes soluções de referência: VOC

Mixture-Modified AccuStandard Cat M-502 A-R2-10X e VOA Standard Accu Cat M-8240/60-IS/SS-10X. Uma alíquota de amostra foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL, e o volume foi completado com diclorometano. Em seguida, foram adicionados 20 mL de uma solução de padrão interno e *surrogate* Standard Mix / Método 8270-Surrogate Standard (25 mg / mL em diclorometano). As amostras foram analisadas utilizando cromatografia a gás com injetor automático e amostrador de *headspace* modelo TriPlus (Thermo Scientific) em um cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo Scientific) acoplado a um DSQ usando um espectrômetro de massa II (Thermo Scientific) com as seguintes configurações: volume de amostra de 3 mL, modo de injeção *splitless* e as condições cromatográficas e a detecção foram baseadas nos métodos EPA 8270. Foram utilizados os seguintes padrões de referência: Internal Standard Mix Standard AccuCat Z-014J, Method 8270-Surrogate Standard AccuStandard Cat M-8270-SS, Fluoranthene Absolute Cat Standard 70183 e SVOC EPA 525 506 540 Cal Mix Supelco Cat. Foram determinados os seguintes PAHs: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benz [a] antraceno, benzo [b] fluoranteno, benzo [ghi] perileno, benzo [k] fluoranteno, benzo [a] pireno, criseno, dibenzo[a,h] antraceno Fenantreno, fluoreno, indeno (1,2,3-cd) pireno, naftaleno e pireno. A soma da quantidade total de todos estes compostos foi considerada o índice de total de PAHs.

#### **2.2.4 Análises histopatológicas**

Para as análises histopatológicas de brônquias, as amostras foram incluídas em parafina e processadas para microscopia de luz, conforme descrito anteriormente. Em seguida, cortes histológicos foram confeccionadas longitudinalmente (5 µm de espessura). As secções foram imersas durante 5 minutos em xilol 100 %, por duas vezes, para que houvesse a desparafinização, e hidratadas em bateria decrescente de etanol (100 a 50 %), permanecendo 3 minutos em cada concentração. Em seguida, foram coradas com Azul de Toluidina e finalizadas utilizando Entellan<sup>®</sup>. A análise do material e o registro de imagens foram feitos em um microscópio de luz Olympus BX51, utilizando o software Olympus DP2 – B5W.

As análises histopatológicas nas brônquias foram classificadas por um escore (Sc), dependendo da distribuição da lesão no órgão, onde: (1) indica ausência de ocorrência; (2) ocorrência rara; (3) pouca ocorrência; (4) moderada ocorrência; (5)

severa ocorrência (lesões difusas). Também foi determinado um fator de importância (Fi) da lesão, que indica como tal alteração afetaria a função do órgão e sua relação com a sobrevivência do peixe. As alterações estão descritas na **Tabela 1**, onde: (1) representa lesões reversíveis e com mínima importância patológica; (2) lesões reversíveis quando o agente estressor é neutralizado e então, moderada importância patológica, e (3) lesões geralmente irreversíveis e de extrema importância patológica. Para cada alteração foi determinado um índice da lesão no órgão (ILorg), que é a multiplicação do fator de importância (Fi) da lesão pelo valor do escore (Sc):  $ILorg = Fi \times Sc$ ; sendo este expresso em porcentagem da variação em relação ao grupo controle, como proposto por Bernet et al. (1999), e modificado por Paulino (2015).

**Tabela 1.** Alterações histopatológicas em brânquias e fator de importância (Fi) em relação ao órgão e organismo, de acordo com Bernet et al. (1999), adaptado por Paulino (2015).

<b>Alterações em brânquias</b>	<b>Fi</b>
Aneurisma (canal marginal apical e basal e redes capilares)	1
Células pilares (constricção/rupturas/dilatação do canal marginal)	1
Congestão/Hiperemia/Hemorragia	1
Descolamento epitélio lamelar e edemas	1
Fusão parcial de lamelas	1
Hipertrofia do epitélio lamelar	1
Proliferação de células cloreto na lamela	1
Proliferação de células mucosas	1
Atrofia celular	2
Fusão total de lamelas	2
Hiperplasia do epitélio	2
Ruptura do epitélio	2
Necrose celular (focal/total)	3

1 = mínima importância patológica; 2 = moderada importância patológica e 3 = extrema importância patológica.

### 2.3. Análise Estatística

A premissa de normalidade foi verificada pelo teste de D'Agostino & Pearson. Os resultados das análises histopatológicas foram obtidos para cada grupo experimental comparado com seu respectivo grupo controle utilizando-se o teste paramétrico t-

Student não pareado. O mesmo teste foi aplicado para confrontar os resultados do grupo recuperação com o grupo exposto por 168 h. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prisma 5.0 e foram considerados significativos valores de  $p \leq 0,001$ .

### 3. RESULTADOS

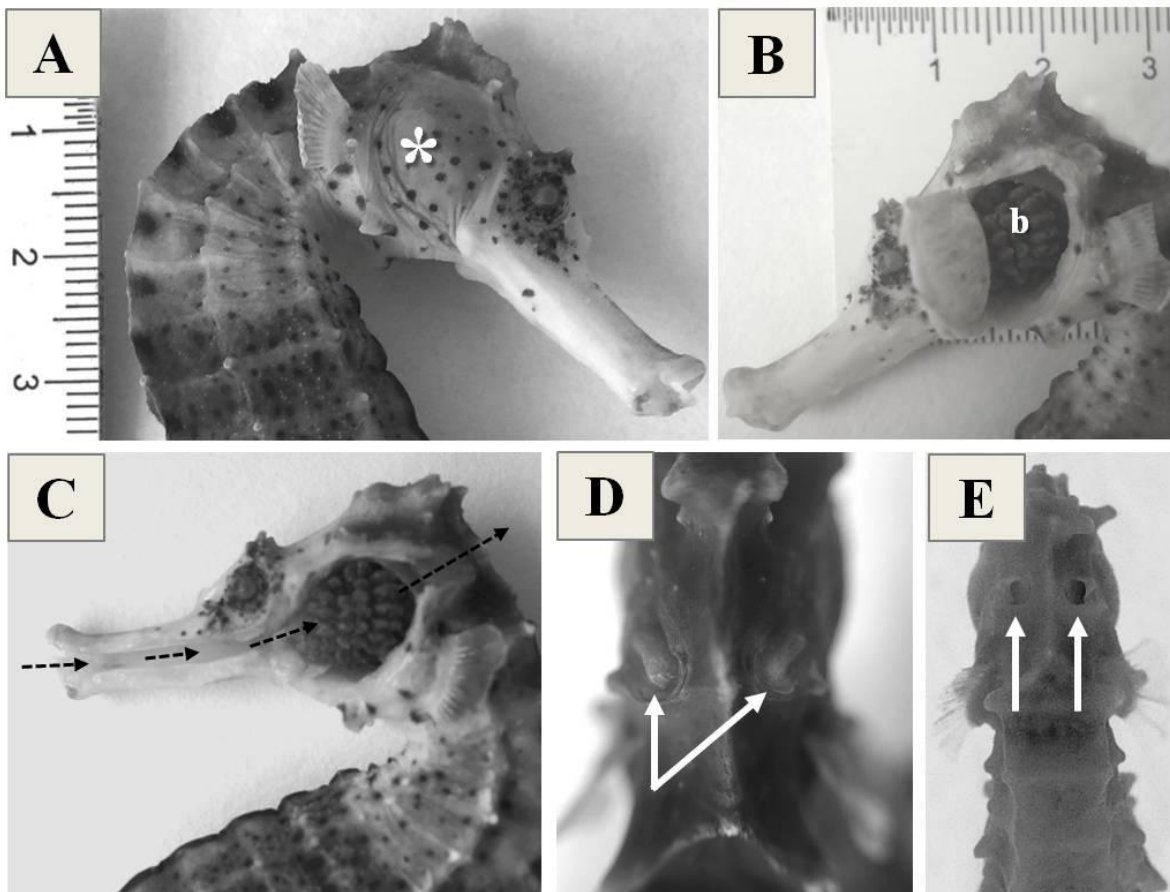
#### 3.1 Caracterização morfo-funcional das brânquias de *Hippocampus reidi*

As brânquias de *H. reidi* são completamente cobertas pelo opérculo que, por sua vez, é fundido à cabeça do animal por meio de uma membrana flexível, e apresenta em sua porção dorsal superior uma pequena abertura que funciona como uma válvula, permitindo a saída da água que entra através da boca e segue pela cavidade buco-faríngea durante a atividade ventilatória (**Figura 1**). De forma geral, o aparato branquial se apresenta em forma de “tufos” ou “cachos” ligeiramente arredondados que ocupam praticamente toda a cavidade opercular e possuem a mesma organização básica de outros teleósteos, sendo constituído de quatro pares de arcos branquiais (**Figura 2**). Todos os arcos branquiais possuem duas hemibrânquias (holobrânquias) que se projetam a partir da barra branquial e se organizam de forma alternada. Notou-se que os arcos branquiais que ocupam as regiões intermediárias da cavidade opercular (2° e 3° arco) apresentam um tamanho ligeiramente maior do que aqueles que se localizam nas extremidades (1° e 4°). Com relação aos rastros branquiais presentes na porção posterior dos arcos branquiais, os mesmos se apresentam como projeções cilíndricas duplamente enfileiradas que variam em número e comprimento, de acordo com o arco branquial ao qual estão inseridos, sem que haja alguma relação aparente entre eles.

A morfometria dos componentes branquiais (número e comprimento dos filamentos) indicou que o número de filamentos em cada holobrânquia varia entre os arcos branquiais (8-10 filamentos/hembrânquia), e que a hemibrânquia posterior do 2° e do 3° arco branquial possui mais filamentos que as hemibrânquias dos demais arcos branquiais (i.e. 10 filamentos/hembrânquia) (**Figura 3**). O comprimento do filamento ao longo do comprimento do arco apresenta um padrão semelhante nas diferentes regiões da hemibrânquia (ventral, mediana e dorsal), e na hemibrânquia anterior os filamentos geralmente são mais longos (**Figura 3**).

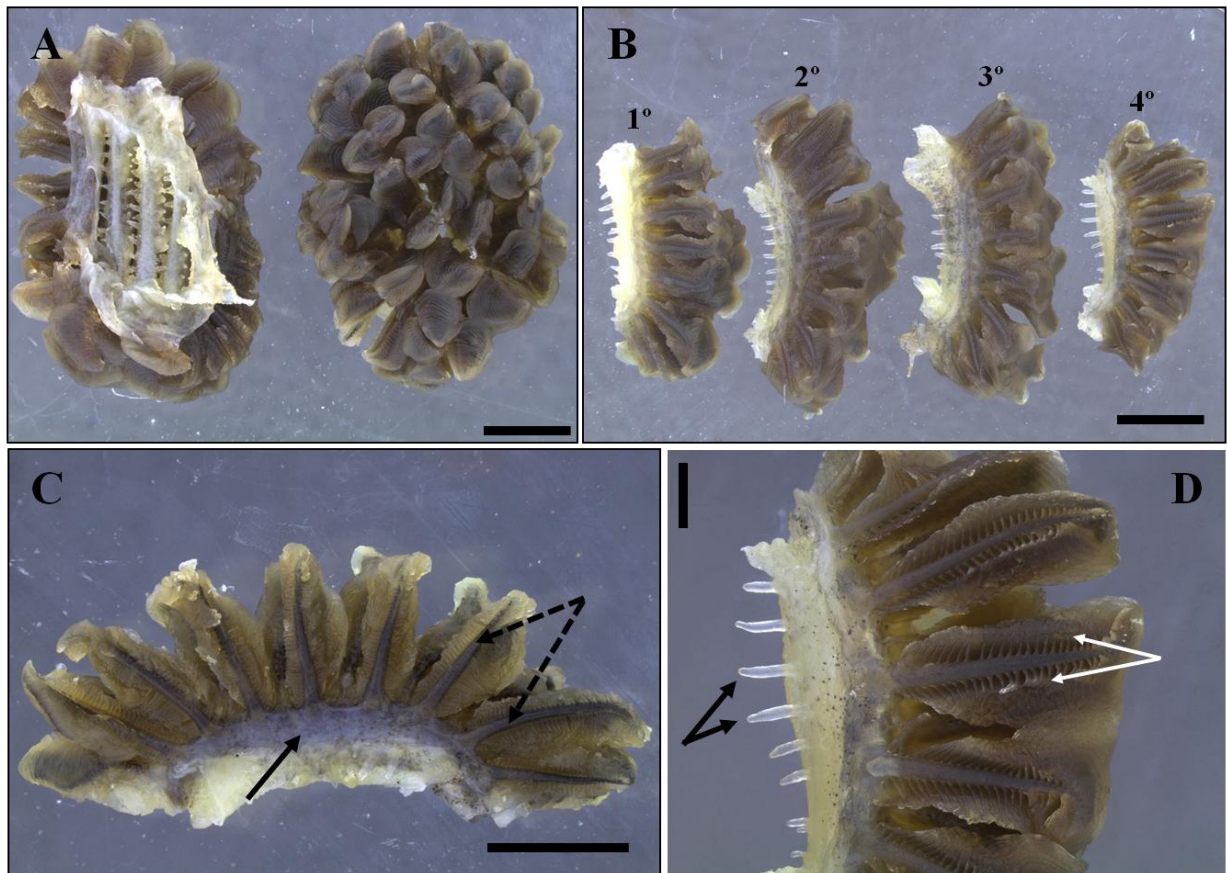
Vistos posteriormente, a partir da cavidade opercular, os filamentos apresentam um formato de pêra, sendo mais delgado nas regiões proximal e distal de seu ponto de inserção nos arcos branquiais, e mais largo na porção mediana (**Figura 4A**). As lamelas apresentam um formato trapezoidal e longo, sendo amplamente projetadas a partir do

seu ponto de inserção nos filamentos, abrangendo uma grande área superficial no interior da câmara branquial.



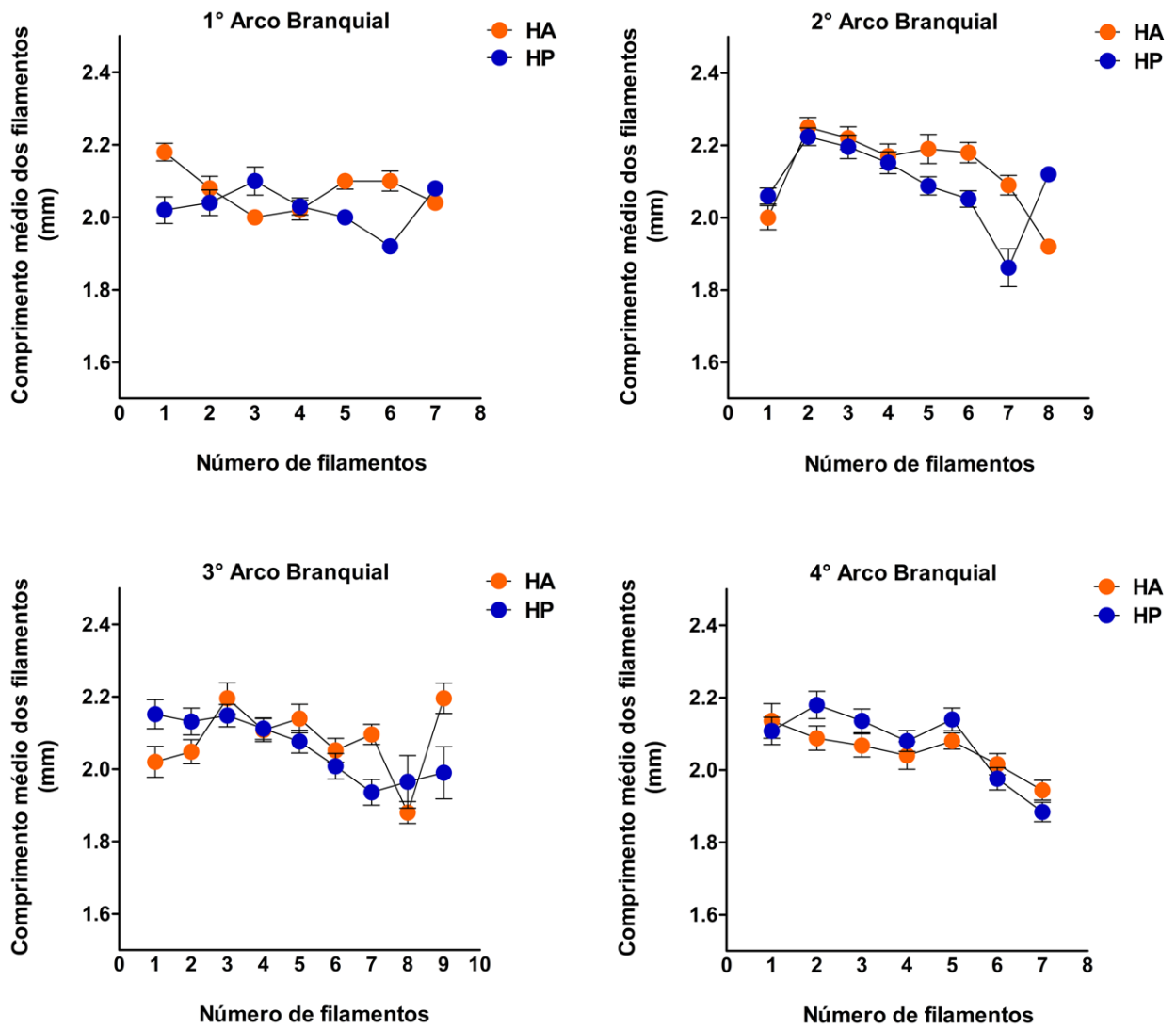
**Figura 1.** Morfologia externa da cavidade opercular de um indivíduo adulto de *Hippocampus reidi*. (A) Região opercular (\*) cobrindo totalmente o aparato branquial; (B) Opérculo seccionado evidenciado os arcos branquiais (b); (C) Sentido do fluxo da água (setas tracejadas) na cavidade buco-opercular. Vista superior da cabeça: (D) poro opercular fechado (setas) e (E) poro opercular aberto (setas).



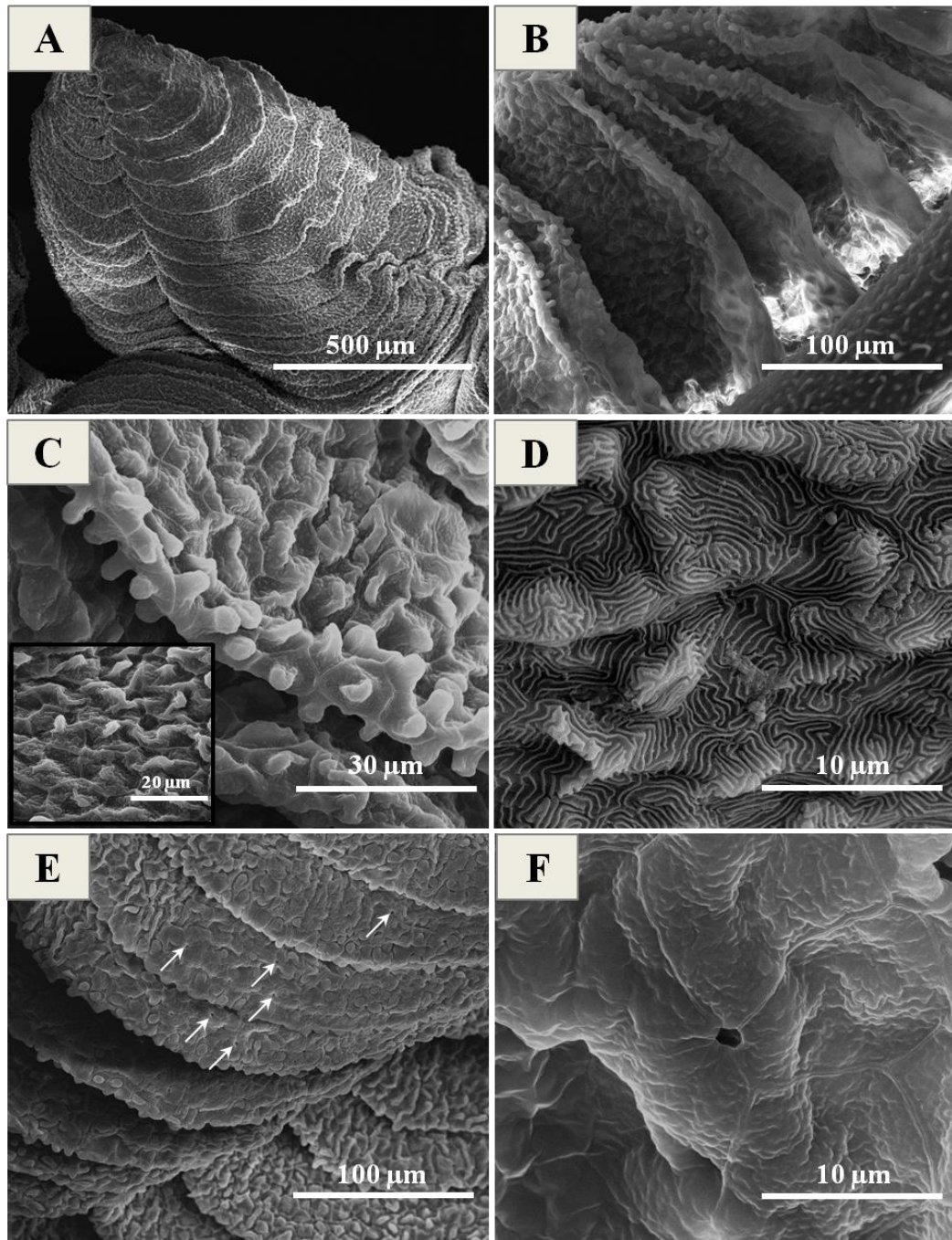


**Figura 2.** Morfologia dos arcos branquiais de um indivíduo adulto de *Hippocampus reidi*. (A) Visão frontal buco-faríngea (esquerda) e posterior opercular (direita) dos quatro arcos branquiais direitos; (B) Arcos branquiais seccionados e separados; (C) Segundo arco branquial mostrando o arco branquial (seta) e filamentos (setas pontilhadas); (D) Detalhe do arco branquial mostrando os rastros branquiais (setas) na região faríngea e filamentos com lamelas (setas brancas) na região opercular.

A superfície epitelial dos filamentos é constituída de células pavimentosas (CPv) poligonais dispostas em mosaico. Cada uma dessas células apresenta microdobras em sua superfície apical, além de uma evaginação mais pronunciada, formando uma “crista”, ou um “pico”, que confere ao tecido um aspecto rugoso. (**Figura 4C e D**). O mesmo padrão rugoso é observado no epitélio lamelar. Além disso, foram observados aberturas de formatos irregulares, distribuídos de maneira aleatória, ao longo da superfície das lamelas. Essas aberturas são formadas a partir da junção de um complexo formado por três a cinco células adjacentes e se localizam entre as bordas das mesmas (**Figura 4E e F**), não tendo sido observados em nenhuma outra parte do aparato branquial.



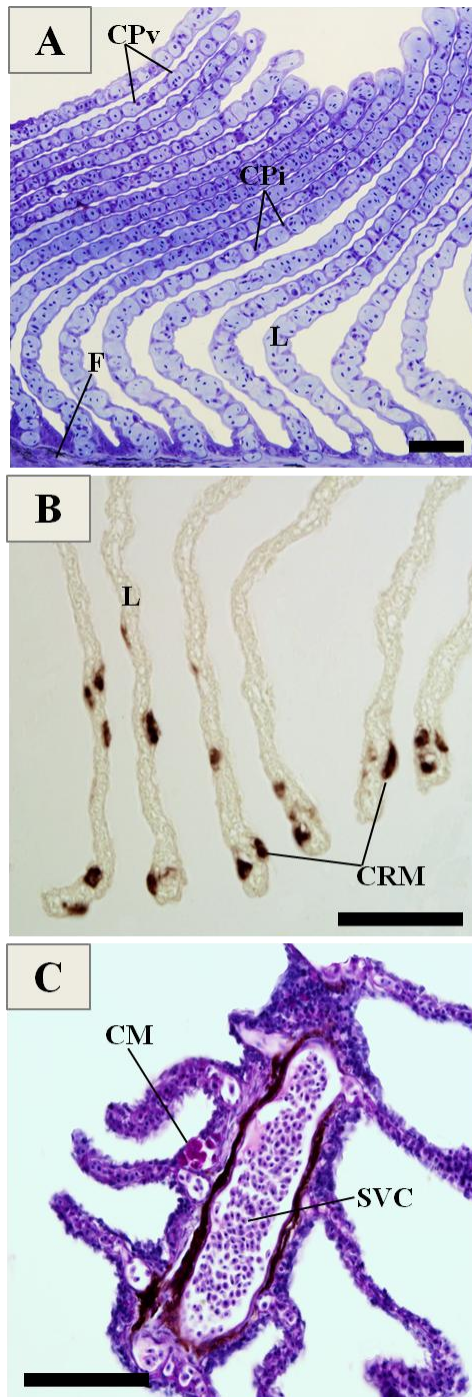
**Figura 3.** Morfometria branquial de 15 indivíduos adultos de *Hippocampus reidi* (massa corporal =  $5,77 \pm 0,21$  g; tamanho =  $9,83 \pm 0,19$  cm). HA = hemibrânquia anterior; HP = hemibrânquia posterior. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.



**Figura 4.** Fotomicroscopia eletrônica de varredura mostrando a superfície dos filamentos e das lamelas de brânquias de *Hippocampus reidi*. (A) Visão frontal do filamento; (B) Células pavimentosas do filamento e das lamelas; (C) Aspecto rugoso da superfície das lamelas. Detalhe das “cristas” observadas na superfície apical das células pavimentosas; (D) Microvilosidades observadas na superfície apical das células pavimentosas das lamelas; (E) Aberturas distribuídas aleatoriamente (setas) na superfície das lamelas; (F) Detalhe da abertura de uma célula rica em mitocôndrias (CRM) observada entre as bordas de quatro células epiteliais adjacentes.

A análise histológica por microscopia de luz (ML) revelou que o epitélio do filamento branquial é formado por multicamadas de células (2 - 3 camadas) e que as principais células que o constituem, desde a região mais basal até a mais superficial, são as células indiferenciadas (CI), as células mucosas (CM) e as células pavimentosas (CPv), que ocupam praticamente toda a superfície epitelial em contato com o meio aquático (**Figura 5A**). As lamelas são formadas por duas camadas de células, sendo que a mais externa é constituída quase em sua totalidade pelas CPv, mas também por células ricas em mitocôndrias (CRM) e a camada mais interna consiste em CI que, quando presentes, recobrem as células pilares (CPi).

As CRM imuno-positivas para a enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) foram encontradas exclusivamente nas lamelas braquiais (**Figura 5B**), e distribuídas aleatoriamente ao longo de toda a extensão do epitélio lamelar. As CM estão distribuídas principalmente nas bordas do filamento branquial, (nas regiões aferente e eferente do filamento), embora também possam ser encontradas raramente no espaço interlamelar. Essas células são grandes, a porção apical projetada na camada mais externa do epitélio branquial e apresentam reação positiva ao corante PAS (**Figura 5C**).



**Figura 5.** (A) Corte transversal do filamento branquial de *Hippocampus reidi* identificando as principais células que constituem a estrutura interna dos filamentos e lamelas; (B) Corte transversal das lamelas evidenciado a distribuição das células ricas em mitocôndrias imuno-positivas para a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase; (C) Corte sagital do filamento evidenciando as células mucosas. CPv = célula pavimentosa; CPi = célula pilar; F = filamento; L = lamela, CRM = célula rica em mitocôndria; CM = célula mucosa; SVC = seio venoso central. Barra de escala: (A), (B) e (C) 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.2 Análise química da água

A concentração de hidrocarbonetos presentes em 50 % da FSD indicou uma maior concentração de BTEX do que de PAHs, sendo o xileno o composto que apresentou a maior concentração entre os hidrocarbonetos monoaromáticos. De modo geral, as concentrações dos hidrocarbonetos não permaneceram estáveis durante os períodos experimentais (**Tabela 2**), havendo degradação ao longo do tempo.

**Tabela 2.** Quantificação por cromatografia gasosa dos hidrocarbonetos monoaromáticos e policíclicos aromáticos (BTEX e HPAs) presentes em 50 % da fração solúvel do diesel (FSD) em diferentes períodos de exposição.

Hidrocarbonetos ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	50 % FSD				
	0 h	12 h	24 h	48 h	96 h
<b>BTEX</b>					
Benzeno	1172,6	25,1	10,9	--	--
Etil-benzeno	1314,21	43,2	19,57	--	--
Tolueno	1813,86	55,91	27,71	--	--
Xileno	2219,51	85,9	52,6	29,1	11,3
<b>BTEX total</b>	6520,18	210,11	110,78	29,1	11,3
<b>HPAs</b>					
Acenaftileno	--	--	--	--	--
Acenafteno	--	--	--	--	--
Antraceno	0,06	0,03	0,02	0,02	--
Benzo(a)antraceno	0,03	0,01	--	--	--
Benzo(b)fluoranteno	--	--	--	--	--
Benzo(k)fluoranteno	--	--	--	--	--
Benzo(a)pireno	--	--	--	--	--
Benzo(ghi)perileno	--	--	--	--	--
Criseno	--	--	--	--	--
Dibenzo[a,h]antraceno	--	--	--	--	--
Fenantreno	0,23	0,12	0,1	0,09	0,04
Fluoranteno	--	--	--	--	--
Fluoreno	0,18	0,12	0,11	0,06	0,05
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	--	--	--	--	--
Naftaleno	29,4	2,98	2	0,94	0,19
Pireno	--	--	--	--	--
<b>HPAs total</b>	29,9	3,35	2,23	1,11	0,28

Limite de quantificação: BTEX  $< 5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; PAHs  $< 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ . -- Abaixo do limite de quantificação. Limite de detecção: BTEX  $< 2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ; PAHs  $< 0,005 \mu\text{g L}^{-1}$

### 3.3 Histopatologia branquial

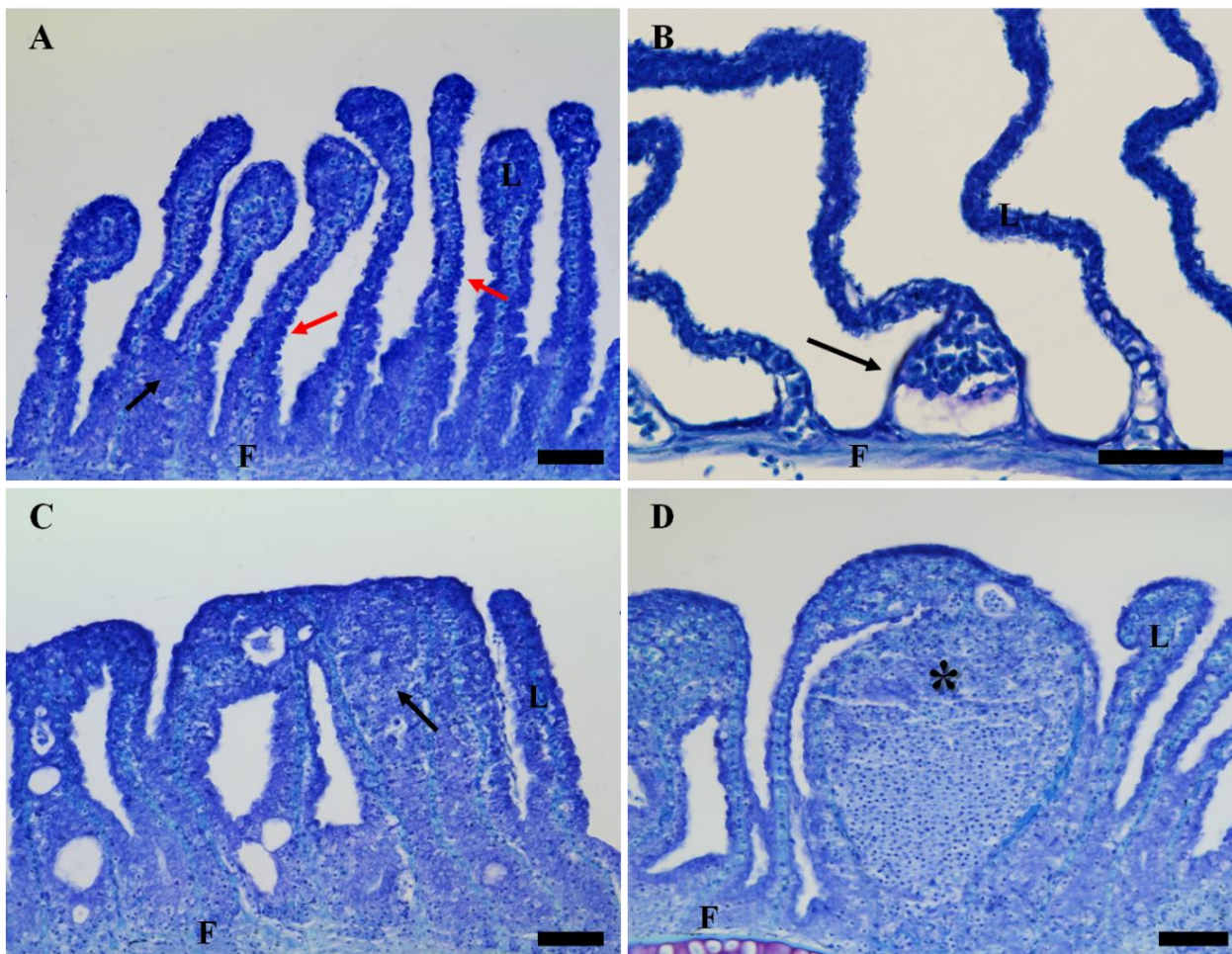
A análise histopatológica revelou que todos os protocolos experimentais resultaram em alterações morfológicas nas brânquias dos indivíduos expostos a FSD 50 %, conforme detalhado pelos valores do  $IL_{org}$  médios na **Tabela 3**. De maneira geral, a hipertrofia do epitélio lamelar foi a patologia mais encontrada, sendo observados aumentos significativos em quase todos os períodos de exposição, à exceção apenas de 12 horas. Durante a exposição aguda (EA), os valores de hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar apresentaram um pico após 48 horas, aumentando 150 % e 125 %, respectivamente, em relação ao controle. Por outro lado, a fusão parcial das lamelas somente foi observada no grupo exposto por 96 horas, com um aumento de 89 % em relação ao controle. A presença do aneurisma e dilatação do canal marginal e basal foi registrada apenas para a exposição subcrônica (ES), com aumento de 75 % e 233 % em relação ao controle para o período de 168 e 336 horas, respectivamente. Nesse período também foi observado o pico dos valores de  $IL_{org}$  médios para todas as demais patologias observadas. Durante o experimento de recuperação houve uma queda significativa dos valores de hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, que diminuíram 58 % e 80 %, respectivamente, quando comparados aos indivíduos expostos por 168 horas. As principais histopatologias observadas se encontram na **Figura 6**.

**Tabela 2.** Índice de lesão (IL<sub>org</sub>) histopatológica média em brânquias de *Hippocampus reidi* expostos à 50 % FSD em diferentes períodos de tempo.

ÍNDICE DE LESÃO HISTOPATOLÓGICA																					
Alterações	Exposições																		Recuperação		
	Aguda									Sub-crônica											
	12 h			24 h			48 h			96 h			168 h			336 h			504 h		
	C	T	%	C	T	%	C	T	%	C	T	%	C	T	%	C	T	%	C	T	%
Aneurisma	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1,8	75*	1	1	0
Atrofia celular	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0
Células pilares (constricção/rupturas)	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0
Congestão/hiperemia/hemorragia	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0
Descolamento do epitélio lamelar e edemas	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0
Dilatação do canal marginal e basal	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1,25	2,62	110*	1,5	5	233*	1	2,1	113*#
Hipertrofia do epitélio lamelar	1	1	0	1	1,5	50*	1	2,5	150*	1,8	3	71*	2	3,4	69*	2,3	5	122*	3,8	4,3	13*#
Hiperplasia do epitélio lamelar	2	2	0	2	2	0	2	4,5	125*	3	6	100*	3,3	6,3	92*	3,3	10	208*	3,8	4,5	20*#
Fusão parcial das lamelas	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1,1	2,1	89*	1	2,8	175*	1,1	4,3	278*	1,3	3,1	150*#
Fusão total das lamelas	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0
Proliferação de células cloreto	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0
Proliferação de células mucosa	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0
Necrose celular	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0
Ruptura do epitélio lamelar	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0

% do grupo exposto em relação ao grupo controle. \* Diferença significativa ( $p \leq 0,001$ ) em relação ao grupo controle dentro de um mesmo período de exposição. # Diferença significativa em relação ao grupo exposto por 168 h. C = grupo controle; T = grupo teste.





**Figura 6.** Histopatologias branquiais observadas em *Hippocampus reidi* após exposição água e subcrônica a 50 % fração solúvel do diesel. (A) Hiperplasia (seta preta), hipertrofia (setas vermelhas); (B) dilatação do canal basal (seta); fusão parcial das lamelas (seta); (D) Aneurisma (\*). F = filamento; L = lamela; Barra de escala: 20  $\mu$ m.

## 4. DISCUSSÃO

Estudos sobre morfologia branquial de cavalos-marinhos são bastante escassos e aqueles que abordam os Syngnathidae, de maneira geral, datam do século passado, ou anteriores a esse período (Prein e Kunzmann, 1987; Rauther, 1925; Ryder, 1882; Retzius, 1835). Dessa forma, o presente estudo trás uma abordagem integrada a cerca do aparato branquial de *H. reidi*, por meio da utilização de um conjunto de técnicas mais avançadas de captura de imagens e de marcação e identificação das células (imunohistoquímica e citoquímica), contribuindo com informações adicionais que visam contribuir para o esclarecimento da biologia e da preservação dessa espécie, bem como para entender os mecanismos de ação dos contaminantes nas brânquias dos peixes.

Ao contrário de alguns pesquisadores que relataram a presença de uma pseudo-brânquia precedendo o primeiro arco branquial em alguns membros da família Syngnathidae (Prein e Kunzmann, 1987), pertencentes inclusive ao gênero *Hippocampus* (Rauther, 1925) e aos estágios iniciais do desenvolvimento (fase planctônica) da espécie *H. reidi* (Noveli et al., 2015), tal estrutura não foi observada na fase adulta desses indivíduos. Uma das hipóteses para este resultado seria a de que o desenvolvimento dessa estrutura durante os primeiros dias de vida possa ter alguma influência para a otimização da captura de presas que, segundo Foster e Vincent (2004), mudam à medida que os animais crescem. Dessa forma, a pseudo-brânquia torna-se cada vez mais vestigial, ao ponto de não ser mais observada na fase adulta.

Análises morfométricas, como as que levam em consideração as medidas das dimensões físicas das brânquias são ferramentas úteis e fornecem dados complementares a cerca das funções de trocas gasosas, iônicas e equilíbrio ácido-base nas brânquias de peixes (Evans et al., 2005; Claiborne et al., 2002; Hughes, 1984). De forma geral, o número total de filamentos é extremamente baixo, mesmo quando comparado a outras espécies bentônicas e/ou de mobilidade reduzida (Hughes, 1984; Hughes e Morgan, 1973; Hughes, 1966). Entretanto, o arranjo e forma dos filamentos branquiais de *H. reidi* são similares aos de outros Syngnathidae (Rauther, 1925). O notável formato de tufos dos filamentos é resultado principalmente de sua estrutura curta e “achatada” e de suas lamelas amplamente projetadas, mas que,

comparativamente à outros peixes, apresenta uma área superficial mais compacta (Munshi e Singh, 1968; Hughes, 1966). Essas peculiaridades são consideradas características adaptativas à sua estrutura corporal e biologia e estão diretamente relacionadas ao seu estilo de vida (Prein e Kunzmann, 1987).

Em Syngnathidae, a ventilação branquial é realizada principalmente pela ação da bomba de sucção opercular, em detrimento da bomba de pressão buco-faríngea, que desempenha um papel menos importante devido ao formato relativamente longo de sua boca em formato tubular (Hughes, 1966). De fato, indivíduos como *H. reidi*, dependem quase que totalmente da eficácia desse mecanismo constituído pelo fechamento e abertura de uma pequena abertura opercular localizada na região posterior-superior de sua cabeça, possibilitando a passagem da água através da cavidade buco-faríngea para irrigar o sistema de lamelas amplamente projetadas no interior da cavidade opercular, de forma que este possa cumprir com suas funções osmorregulatórias e respiratórias. Esse mecanismo mostra-se perfeitamente adequado ao seu modo de vida estacionário e pelágico (Rosa et al., 2005; Foster e Vincent, 2004); entretanto, também os tornam suscetíveis em caso de estresse ambiental como a contaminação antrópica.

Nos peixes, o epitélio que reveste os filamentos e as lamelas secundárias além de formar uma barreira entre os ambientes externo e interno, desempenha um papel importante em funções cruciais para a sobrevivência dos animais como trocas gasosas e ionorregulação (Evans et al., 2005; Claiborne et al., 2002). O epitélio branquial dos indivíduos de *H. reidi* é constituído pelos mesmos tipos de células indiferenciadas e diferenciadas que caracterizam o epitélio dos demais peixes: células pavimentosas (CPv), células pilares (CPi), células mucosas (CM) e células ricas em mitocôndrias (CRM). Recobrando praticamente toda a superfície epitelial, tanto dos filamentos, quanto das lamelas e incluindo o espaço interlamelar, estão as CPvs. Essas células, assim como a de outros peixes, apresentam em sua superfície apical uma série de interdigitações, que tem a função de aumentar a superfície funcional do epitélio branquial, atuando na hidrodinâmica do fluxo de água ao produzir microturbulências otimizando o processo de trocas gasosas (Evans et al., 2005). Entretanto, em *H. reidi*, existe a presença de uma evaginação mais proeminente formando uma “crista” nas células, o que confere um aspecto extremamente rugoso ao tecido epitelial. Até o

presente momento, não há relato na literatura da presença dessa “crista” na superfície apical das células epiteliais de brânquias de cavalos-marinhos ou outros peixes. Já as microdobras ou microvilosidades presentes nessas células, provavelmente, tem a função de aumentar a superfície funcional do epitélio branquial, atuando tanto na retenção do muco na superfície branquial, quanto na hidrodinâmica do fluxo de água (Evans et al., 2005).

O emprego de técnicas citoquímicas PAS-positivas evidenciou que as CMs, presentes principalmente nas bordas externa e interna do filamento branquial de *H. reidi*, sintetizam mucosubstâncias neutras. O muco secretado pelas CMs na superfície branquial é considerado uma proteção importante contra lesões abrasivas por materiais sólidos em suspensão na água, assim como poluentes, e também desempenham um importante papel na regulação iônica (Singh e Banerjee, 2008; Roberts e Powell, 2005; Ledy et al., 2003). Os cavalos-marinhos têm como hábito permanecer ancorados a substratos próximos do assoalho marinho, portanto, estão sujeitos às exposições de partículas e de sedimentos que são normalmente resuspensos pela atividade de outros organismos que ali vivem. Desse modo, as CMs presentes no filamento branquial desempenham um papel importante na produção de muco para a lubrificação, proteção física e microbiológica.

Com relação aos mecanismos de transporte iônico existentes no epitélio branquial, as CRMs são consideradas essenciais devido ao papel que desempenham na manutenção da homeostase iônica, estando diretamente envolvidas na secreção de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$  em teleósteos marinhos, além da manutenção da regulação ácido-base e da excreção de amônia (Hwang et al. 2011; Evans, 2005).

Em todos os organismos analisados, a distribuição das CRM imuno-positivas para NKA ocorreu exclusivamente no epitélio das lamelas secundárias, não sendo observadas no filamento ou na região interlamelar. Estudos em brânquias têm demonstrado diferenças na distribuição das CRM-NKA em teleósteos eurialinos (Hwang e Lee, 2007), podendo ocorrer apenas no epitélio dos filamentos branquiais (Lin et al., 2004; Uchida et al., 2000; Lee et al., 1996, tanto no epitélio dos filamentos quanto nas lamelas (Paulino et al., 2012; Chen et al., 2004; McCormick et al., 2003; Varsamos et al., 2002; 2006; Uchida et al., 1996), sendo raramente encontradas apenas na superfície das lamelas (Evans et al., 2005). Uma das hipóteses sugeridas por alguns

pesquisadores para a ocorrência das células nas lamelas é a sua migração a partir dos filamentos (Hirai et al., 1999; Dang et al., 1999). De fato, alguns pesquisadores têm relatado a presença de CRMs nas lamelas de alguns teleósteos de água doce como mecanismo adaptativo para garantir as necessidades funcionais de captação iônica sob determinadas condições ambientais (Evans et al., 2005; Katoh e Kaneko, 2003; Varsamos et al., 2002; Fernandes e Perna-Martins, 2002; Seidelin et al., 2000). A presença das CRM-NKA na superfície das lamelas coincide com as prováveis aberturas dos canais observados pelo MEV nessa mesma região, e corroboram com as observações feitas por Prein e Kunzmann (1987) em peixes-cachimbos, o que permite inferir que a ocorrência de CRMs encontradas aleatoriamente e exclusivamente nas lamelas seja o padrão de distribuição desse tipo celular em Syngnathidae.

Análises de cromatografia gasosa indicaram que a solução teste com 50% da FSD apresentou uma maior concentração de BTEX em relação aos HPAs, semelhante a resultados anteriores relatados por outros pesquisadores trabalhando com frações solúveis de derivados de petróleo (Bettim et al., 2016; Simonato et al., 2011). Isso provavelmente se dá devido ao baixo peso molecular de seus compostos, o que os tornam acomodados em água (Pedrozo et al., 2002), e também explica o fato de suas concentrações não permanecerem estáveis durante o período de amostragem, já que são bastante voláteis. De modo que o benzeno, que representa a molécula mais simples, juntamente com o tolueno e o etilbenzeno (Silva, 2002), não foram quantificados após 24 h. No que diz respeito aos HPAs, a sua solubilidade em água está relacionada tanto à quantidade de anéis benzênicos quanto à angularidade de suas moléculas e, dessa forma, os compostos de elevado peso molecular tendem a ser menos solúveis (Bettim, et al., 2016). Isso explica o fato de que o naftaleno, com apenas dois anéis aromáticos, e baixo peso molecular, apresentar a maior solubilidade em água, sendo o HPA com o maior valor detectado e permanecendo quantificável durante todo o período de amostragem, apesar de diminuir gradativamente suas concentrações ao longo do tempo.

A análise histopatológica das brânquias de *H. reidi* demonstrou que os hidrocarbonetos presentes na FSD podem causar danos neste tecido, e que tais danos podem levar à perda da função do órgão. Alterações como hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, assim como fusão parcial das lamelas, são classificadas como

alterações de caráter proliferativo (Agamy, 2013 a). Esse padrão de resposta representa um mecanismo de proteção e ocorre com o intuito de diminuir o espaço interlamelar reduzindo a entrada de xenobióticos no organismo; entretanto, um aumento significativo da hiperplasia das células do epitélio lamelar pode resultar no aumento da distância entre a água e o sangue, ou na fusão parcial ou total das lamelas, provocando perturbações respiratórias e diminuindo a superfície respiratória que, por sua vez, influencia a eficácia das trocas gasosas e causa um desequilíbrio hidroeletrólítico (Paulino et al., 2012; Sakuragui et al., 2003; Fernandes e Mazon, 2003). Resultados semelhantes foram encontrados por Simonato et al. (2008) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos à FSD por diferentes períodos de tempo, assim como Akaishi et al. (2004), que descreveu a ocorrência dessas alterações após exposição aguda do peixe de água doce *Astyanax* sp. a fração solúvel do petróleo. Porém, essas modificações na morfologia branquial não representam uma resposta específica à contaminação por agentes petroquímicos, já tendo sido relatada para outros compostos químicos, incluindo pesticidas e metais (Giari et al., 2012).

As alterações morfológicas de caráter circulatório observadas foram a dilatação do canal marginal e basal e o aneurisma. A combinação desses distúrbios provavelmente foi induzida pela perda da capacidade de suporte das células pilares. O colapso desse sistema prejudica a integridade vascular, fazendo com que um grande volume de sangue seja liberado e force a lamela secundária a se expandir (Hassaninezhad et al., 2014; Agamy, 2013 a). Outros estudos relataram a ocorrência de distúrbios circulatórios em brânquias de peixes expostos experimentalmente ao petróleo e seus derivados (Brown-Peterson et al., 2015; Delunardo et al., 2013; Simonato et al., 2008; Agamy 2013 a, b; Negreiros et al., 2011), assim como em animais coletados em áreas próximas à refinarias (Giari et al., 2012; Katsumiti et al., 2009; Khan, 2003,1998; Haensly et al, 1982). Essas são consideradas uma forma grave de lesão e refletem os efeitos deletérios diretos da exposição à xenobióticos sobre o tecido branquial, ao invés de representarem uma resposta compensatória aos poluentes (Simonato et al., 2008; Mallatt, 1985;). Além disso, os indivíduos que apresentam essas alterações tornam-se mais vulneráveis em situações como as de fuga para escapar de algum possível predador ou mesmo a captura de alimento, uma vez que este tipo de histopatologia pode vir a comprometer a capacidade respiratória do organismo.

Uma visão geral das histopatologias encontradas em cada protocolo experimental revelou que durante a exposição aguda a 50 % da FSD todas as alterações encontradas são as de caráter proliferativo/progressivo, e representam a primeira manifestação adaptativa do organismo frente ao estresse causado pelo contaminante (Fernandes e Mazon, 2003). Após a exposição subcrônica, adicionalmente, foi verificada também a presença de alterações circulatórias, reforçando o fato de que a exposição por um período superior à FSD implica em consequências diretas na estrutura morfofuncional das brânquias, e que pode levar a prejuízos no *fitness* ecológico dessa espécie, como a captura de presas, reprodução entre outros. Por outro lado, quando os animais foram transferidos para água livre de contaminante, todas as alterações mostraram-se reversíveis, com algumas apresentando valores inferiores até dos que os observados após exposição aguda. O que demonstra que o período de recuperação se mostrou capaz de reverter os danos histológicos, ao contrário de resultados publicados anteriormente, onde indivíduos de *H. reidi* permaneceram 168 h em recuperação após serem expostos a 10 mL. L<sup>-1</sup> durante 96 h, não tendo sido observada a recuperação das histopatologias (Delunardo et al., 2013). Assim, sugere-se que a exposição sub-crônica à FSD é capaz de alterar morfofuncionalmente as brânquias de *H. reidi*, podendo levar ao comprometimento da homeostase desses organismos por períodos que vão além do tempo de exposição e que a regressão desses danos é um processo lento.

## 5. CONCLUSÃO

As brânquias de *Hippocampus reidi* apresentam a mesma organização básica encontradas nos demais teleósteos. Entretanto, algumas características peculiares como a descrição das “cristas” formadas por evaginações da superfície apical das CPVs, assim como a presença de CRMs exclusivamente no epitélio das lamelas foram encontradas nessa espécie. A FSD constituída majoritariamente por BTEX foi capaz de alterar a morfologia do epitélio branquial logo nas primeiras 24 h de exposição, seguindo progressivamente para exposição subcrônica. Após o protocolo de recuperação, as alterações foram atenuadas, entretanto, um período superior de depuração após contaminação é necessário para a restauração total do tecido branquial.



## 6. REFERÊNCIAS

As referências deste capítulo estão de acordo com as normas do periódico  
“Aquatic Toxicology”

ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011. Ecotoxicologia aquática-Toxicidade aguda- Método de ensaio com peixes NBR 15088.

Agamy, R., 2013(a). Impact of laboratory exposure to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant on the gills of the juvenile brown spotted grouper (*Epinephelus chlorostigma*): A histopathological study. Mar. Environ. Res. 86, 46-55.

Agamy, R., 2013(b). Sub chronic exposure to crude oil, dispersed oil and dispersant induces histopathological alterations in the gills of the juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 92, 180-190.

Au, D.W.T., 2004. The application of histocytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. Mar. Pollut. Bull. 48, 817-834.

Akaishi, F.M., Silva de Assis, H.C., Jakobi, C.G., Eiras-Stoffela, D.R., St-Jean, S.D., Courtenay, S.C., Lima, E.F., Wagener, A.L.R., Scofield, A.L., Oliveira Riberio, C.A., 2004. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after water waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46, 244-253.

Ali, L.N., 1994. The dissolution and photodegradation of Kuwait crude oil in seawater. Ph.D. Thesis. University of Plymouth, UK.

APHA., 2005. Standard methods for the examination of water and waste water, 21<sup>st</sup> edn. American Public Health Association, Washington, DC.

Bettim, F.L., Galvan, G.L., Cestari, M.M., Yamamoto, C.I., de Assis, H.C.S., 2016. Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline. *Chemosphere* 144, 1467-1474.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish. Dis.* 22, 25-34.

Brown-Peterson, N.J., Krasnec, M., Takeshita, R., Ryan, C.N., Griffitt, K.J., Lay, C., Mayer, G.D., Bayha, K.M., Hawkins, W.E., Lipton, I, Morris, J., Griffitt, R.J., 2015. A multiple endpoint analysis of the effects of chronic exposure to sediment contaminated with Deepwater Horizon oil on juvenile Southern flounder and their associated microbiomes. *Aquat. Toxicol.* 165, 197-209.

Chen, C.N., Lin, L.Y., Lee, T.H., 2004. Ionocyte distribution in gills of the Euryhaline milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal, 1775). *Zool. Stud.* 43, 772-777.

Claiborne, J.B., Edwards, S.L., Morrison-Shetlar, A.I., 2002. Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J. Exp. Zool.* 293, 302-319.

Delunardo, F. A. C., Silva, B. F., Paulino, M. G., Fernandes, M. N., Chippari-Gomes, A. R., 2013. Genotoxic and morphological damage in *Hippocampus reidi* exposed to crude oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 87, 1-9.

Dang, Z.C., Lock, R.A.C., Flik, G., Bonga, S.E.W., 1999. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. *Am. J. Physiol.* 277, R320–R331.

Dolenec, M., Kuzir, S., 2009. Anatomy and histology of bony fish gills as a basis of their multiplieroles. *Veterinarska Stanica* 40, 209-217.

Dubansky, B., Whitehead, A., Miller, J.T., Rice, C.D., Galvez, F., 2013. Multitissue molecular, genomic, and developmental effects of the Deepwater Horizon oil spill on resident Gulf Killifish (*Fundulus grandis*). Environ. Sci. Technol. 47, 5074-5082.

Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiol. Rev. 85, 97-177.

Fernandes, M.N., Mazon, A.F., 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. pp. 203-231. In: Val, A.L., Kapoor, B.G. (Eds.), Fish Adaptation. Science Publishers, Enfield, pp.418.

Fernandes, M.N., Moron, S.E., Sakuragui, M.M., 2007. Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function. Pp. 93-120. In: Fernandes, M.N., Glass, M.L., Rantin, F.T., Kapoor, B.G. (Eds.) Fish Respiration and Environment. Enfield, Science Publisher, pp. 392.

Fernandes, M.N., Perna-Martins, S.A., 2002. Chloride cell responses to longterm exposure to distilled and hard water in the gill of the armored catfish, *Hypostomus tietensis* (Loricariidae). Acta. Zool. 83, 321-328.

Foster, S.J., Vincent, A.C.J., 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. J. Fish Biol. 65, 1-61.

Giari, L., Dezfulin, B.S., Lanzoni, M., Castaldelli, G., 2012. The impact of an oil spill on organs of bream *Abramis brama* in the Po River. Ecotoxicol. Environ. Saf. 77, 18-27.

Haensly, W.E., Neff, J.M., Sharp, J.R., Morris, A.C., Bedgood, M.F., Boem, P.D., 1982. Histopathology of *Pleuronectes platessa* L. from Aber Wrac'h and Aber Benoit, Brittany, France: long-term effects of the Amoco Cadiz crude oil spill. *J. Fish Dis.* 5, 365-391.

Hassaninezhada, L., Safahieha, A., Salamata, N., Savaria, A., Majd, N, E., 2014. Assessment of gill pathological responses in the tropical fish yellowfin seabream of Persian Gulf under mercury exposure. *Toxicol. Rep.* 1, 621-628.

Hirai, N., Tagawa, M., Kaneko, T., Seikai, T., Tanaka, M., 1999. Distributional changes in branchial chloride cells during freshwater adaptation in Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Zool. Scr.* 16, 43-49.

Hughes, G.M., 1966. The dimensions of fish gills in relation to their function. *J. Exp. Biol.* 45, 177-195.

Hughes, G.M., Morgan, M., 1973. The structure of fish gills in relation to their respiratory function. *Biol. Rev.* 48,419-475.

Hughes, G.M., 1984. General anatomy of the gills. In *Fish physiology* (Hoar, W.S., Randall, D.J., ed.) Orlando: Academic Press v. XA, pp. 1-72.

Hwang, P.P., Lee, T.H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp. Biochem. Phys. A* 148, 479-497.

Khan, R.A., 1998. Influence of petroleum at a refinery terminal on winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *B. Environ. Contam. Tox.* 61, 770-777.

Katoh, F., Kaneko, T., 2003. Short-term transformation and long-term replacement of branchial chloride cells in killifish transferred from seawater to freshwater, revealed by morphofunctional observations and a newly established 'time-differential double fluorescent staining technique. *J. Exp. Biol.* 206, 4113-4123.

Katsumiti, A., Valdez Domingos, F.X., Azevedo, M., Da Silva, M.D., Damian, R.C., Almeida, M.I.M., Silva de Assis, H.C., Cestari, M.M., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., Freire, C.A., 2009. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish, *Cathorops spixii*, after the Vicuna Oil Spill in a harbor estuarine area in Southern Brazil. *Environ. Monit. Assess.* 152, 209-222.

Koldewey, h. J., Martin-Smith, k. M., 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture* 302, 131-152.

Koldewey, H., 2005. Seahorses in public aquariums. In: Koldewei, H. (Ed.), *Syngnathid Husbandry in Public Aquariums*. Project Seahorse, London. Kleiber, D., Blight, L. K., Caldwell, I. R., Vincent, A. C. J., 2011. The importance of seahorses and pipefishes in the diet of marine animals. *Rev. Fish Biol. Fish.* 21, 205-223.

Lee, T.H., Hwang, P.P., Lin, H.C., Huang, F.L., 1996. Mitochondria-rich cells in the branchial epithelium of the teleost, *Oreochromis mossambicus*, acclimated to various hypotonic environments. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 513-523.

Ledy, K., Giamberini, L., Pihan, J.C., 2003. Mucous cell responses in gill and skin of brown trout *Salmo trutta fario* in acidic, aluminium-containing stream water. *Dis. Aquat. Organ.* 56, 235-240.

Lin, C.H., Tsai, R.S., Lee, T.H., 2004. Expression and distribution of Na, KATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. *Comp. Biochem. Physiol. A* 138, 287-295.

Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42, 630-648.

Mazon, A. F.; Cerqueira, C. C. C.; Fernandes, M. N., 2002. Gill cellular changes induced by cooper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res.* 88, 52-63.

McCormick, S.D., Sundell, K., Bjornsson, B.T., Brown, C.L., Hiroi, J., 2003. Influence of salinity on the localization of Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> -ATPase, Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> /2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the Hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*). J. Exp. Biol. 206, 4575-4583.

Munshi, J.S.D., Singh, B.N., 1968. On the micro-circulatory system of the gills of certain freshwater teleostean fishes. J. Zool. 154, 365-376.

National Academy of Sciences, 2003. Oil in the Sea - III; Input, Fates and Effects. National Academic Press, Washington DC, pp. 93-94.

Negreiros, L.A., Silva, B.F., Paulino, M.G., Fernandes, M.N., Chippari-Gomes, A.R., 2011. Effects of hypoxia and petroleum on the genotoxic and morphological parameters of *Hippocampus reidi*. Comp. Biochem. Physiol. C 153, 408-414.

Novelli, B., Socorro, J.A., Caballero, M.J., Otero-Ferrer, F., Segade-Botella, A., Molina Domínguez, L., 2015. Development of seahorse (*Hippocampus reidi*, Ginsburg 1933): histological and histochemical study. Fish. Physiol. Biochem. 41, 1233-1251

Nicodem, D. E., Guedes, C. L., B. Correa, R. J., 1998. Photochemistry of petroleum I. Systematic study of a Brazilian intermediate crude oil. Mar. Chem. 63, 93-104.

Paulino, M. G., 2015. Efeitos do extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* no teleósteo, *Hoplias malabaricus*. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, Brasil, pp. 167.

Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Fernandes, M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a Neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 80, 6-13.

Pedrozo, M. de F.M., Barbosa, E.M., Corseuil, H.X., Schneider, M.R., Linhares, M.M., 2002. Cadernos de referência ambiental: Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo. Centro de recursos ambientais - CRA, Salvador, BA.

Porter, M. M., Novitskaya, E., Castro-Cesena, A. B., Meyers, M. A., McKittrick, J., 2013. Highly deformable bones: unusual deformation mechanisms of seahorse armor. *Acta. Biomater.* 9, 6763-6770.

Prein, M., Kunzmann, A., 1987. Structural organization of the gills in pipefish (Teleostei, Syngnathidae). *Zoomorphology.* 107, 161-168.

Rauther, M., 1925. Die Syngnathiden des Golfes von Neapel. Faune et Flore del Golfo di Napoli. Monograph no. 36, Berlin, p 365.

Retzius, A., 1835. Anatomische Untersuchungen einiger Theile von *Syngnathus acus* und *Syngnathus ophidion*. *Isis* 5, 395-403.

Roberts, S.D., Powell, M.D., 2005. The viscosity and glycoprotein biochemistry of salmonid mucus varies with species, salinity and the presence of amoebic gill disease. *J. Comp. Physiol. B* 175, 1-11

Rodrigues, R.V., Miranda-Filho, K.C., Gusmão, E.P., Moreira, C.B., Sampaio, L.A., 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci. Total. Environ.* 408, 2054-2059.

Rosa, I. L.; Alves, R. R. N., 2007. Pesca e comércio de cavalos-marinhos (Syngnathidae: *Hippocampus*) no Norte e Nordeste do Brasil: subsídios para a conservação e manejo. In: Albuquerque, U. P. de; Alves, A. G. C.; Araújo, T. A. de S. (Org.). Povos e Paisagens. Recife: Núcleo de populações em ecologia e etnobotânica aplicada, pp. 115-134.

Rosa, I. L., Alves, R. R. N., Bonifácio, K. M., Mourão, J. S., Osório, F. M., Oliveira, T. P. R., Nottingham, M. C., 2005. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 1,1-15.

Ryder, J.A.,1882. A contribution to the development and morphology of the lophobranchiates; (*Hippocampus antiquorum*, the seahorse). *Bull .US. Fish. Comm.* 1882, 191-199

Saeed, T., Al-Mutairi, M., 1999. Chemical composition of the water-soluble fraction of leaded gasolines in sea water. *Environ. Int.* 25, 117-29.

Sakuragui, M.M., Sanches, J.R., Fernandes, M.N., 2003. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 173, 309-317.

Seidelin, M., Madsen, S.S., Blenstrup, H., Tipsmark, C.K., 2000. Time-course changes in the expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase in gills and pyloric caeca of brown trout (*Salmo trutta*) during acclimation to seawater. *Physiol. Biochem. Zool.* 73, 446-453.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Tribskorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J. Aquat. Ecosys. Stress. Recov.* 6, 75-86.

Silva, R.L.B., Barra, C.M., Monteiro, T.C.N., Brilhante, O.M., 2002. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis conseqüências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil, 18. *Cad. Saúde Pública*, Rio Jan, pp. 1599-1607.

Simonato, J.D.,Guedes, C.L.B., Martinez,C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 112-120.



Singh, A.K., Banerjee, T.K., 2008. Toxic effects of sodium arsenate ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) on the skin epidermis of air-breathing catfish *Clarias batrachus* (L.). Veterinarski. Arhiv. 78, 73-88.

Uchida, K., Kaneko, T., Yamauchi, K., Hirano, T., 1996. Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamellae and changes in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. J. Exp. Zool. 276, 193-200.

Uchida, K., Kaneko, T., Miyazaki, H., Hasegawa, S., Hirano, T., 2000. Excellent salinity tolerance of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*): elevated chloride cell activity in the branchial and opercular epithelia of the fish adapted to concentrated seawater. Zool. Sci. 17, 149-160.

Varsamos, S., Diaz, J.P., Charmantier, G., Flik, G., Blasco, C., Connes, R., 2002. Branchial chloride cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) adapted to fresh water, seawater, and doubly concentrated seawater. J. Exp. Zool. 293, 12-26.

Willadino, L., Souza-Santos, L. P., Mélo, R. C. S., Brito, A. P., Barros, N. C. S., Araújo-Castro, C. M. V., Galvão, D. B., Gouveia, A., Regis, C. G., Cavalli, R. O., 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. Aquaculture 360-361, 10-16.

Wilson, J., Laurent, P., 2002. Fish gill morphology: inside out. J. Exp. Zool. 293, 192-213.

Wilson, V.S., LeBlanc, G.A., 2000. Petroleum pollution. Toxicol. Rev. 3, 77-112.

Whitehead, A., Dubansky, B., Bodinier, C., Garcia, T.I., Miles, S., Pilley, C., Raghunathan, V., Roach, J.L., Walker, N., Walter, R.B., Rice, C.D., Galvez, F., 2012. Genomic and physiological footprint of the deepwater horizon oil spill on resident marsh fishes. PNAS 109, 20298-20302.

## **Capítulo III**

**Efeitos da fração solúvel do óleo diesel em um conjunto de biomarcadores em cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*)**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da exposição aguda (12, 24, 48 e 96 h) e subcrônica (168 e 336 h) à fração solúvel do óleo diesel (FSD) diluída em 50 % nos parâmetros de biotransformação, na defesa antioxidante e na integridade do DNA em cavalo-marinho *Hippocampus reidi*. Adicionalmente, foi realizado um experimento de recuperação, onde os organismos permaneceram por 336 h livres do contaminante, após exposição por 168 h a 50 % FSD (totalizando 504 h de exposição). Ao término de cada protocolo experimental foi analisada a concentração de metabólitos tipo pireno, tipo benzo(a)pireno e tipo naftaleno na bile, atividade hepática das enzimas glutathione-S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), os níveis de peroxidação lipídica (LPO) nos hepatócitos, além do ensaio alcalino do cometa e o teste do micronúcleo (MN) no sangue periférico. Foi observado que os protocolos de exposição à FSD afetaram os parâmetros analisados de diferentes formas, sendo que, em geral, os grupos expostos apresentaram valores médios superiores aos seus respectivos controles. Após o experimento de recuperação, os valores médios dos metabólitos de HPAs analisados, da LPO, do ensaio cometa e da frequência de MN foram significativamente inferiores aos indivíduos expostos por 168 h, indicando que o período livre do contaminante foi suficiente para que os biomarcadores avaliados retornassem ao nível observado nos controles. Analisado em conjunto, os biomarcadores selecionados em *H. reidi* provaram ser ferramentas adequadas e complementares na determinação dos primeiros impactos da exposição aguda e subcrônica causada pela contaminação por óleo diesel em peixes, assim como na sua recuperação após um período livre do contaminante.

Palavras-chave: Contaminante; peixe; biomarcadores bioquímicos, biomarcadores genotóxicos, metabólitos; recuperação.

## 1. INTRODUÇÃO

O óleo diesel é o composto derivado do petróleo mais comumente utilizado, merecendo destaque em termos de risco ambiental por ser continuamente lançado nos ambientes costeiros, sejam acidentes envolvendo grandes derramamentos ou pequenos e contínuos vazamentos em tanques de armazenamento (Fingas e Brown, 2011; Tiburtius et al., 2005; Akaishi et al., 2004; Kennish, 1992). Uma vez em contato com o ambiente aquático, óleo diesel sofre uma série de intempéries que alteram suas características físico-químicas, que passam a conter compostos mais voláteis e mais hidrossolúveis (Hansen et al., 2013; Rodrigues et al., 2010;), o que resulta no aumento da sua biodisponibilidade na coluna d'água e facilita sua absorção e ingestão pelos organismos aquáticos (Faksness et al., 2008; Zhang et al., 2003; Neff et al., 2000).

A toxicidade da fração solúvel do diesel - FSD está principalmente relacionada aos hidrocarbonetos monoaromáticos, também chamados BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), além de metais, ácidos naftênicos e alquilfenóis (Vieira et al., 2008; Finotti et al., 2001; Neff et al., 2000), conhecidos por causar efeitos adversos nos organismos. Dessa forma, o monitoramento dos efeitos deletérios dessa classe de contaminantes em ambientes aquáticos é crucial para a conservação dos ecossistemas e seus serviços oferecidos, sendo a utilização de biomarcadores em peixes uma ferramenta de baixo custo na avaliação da saúde ambiental em estágios iniciais de contaminação (Pathiratne e Hemachandra, 2010).

Dentre os biomarcadores bioquímicos mais investigados está a atividade hepática da enzima de detoxificação de xenobióticos e seus respectivos metabólitos, a glutathione-S-transferase (GST) (van der Oost et al., 2003; Rinaldi et al., 2002). Além disso, o processo de metabolização dos compostos presentes na FSD, como os HPAs, pode ativar o "ciclo redox" levando a um aumento das espécies reativas do oxigênio (EROs) que podem causar injúrias celulares (Regoli e Giuliani, 2014; Halliwell, 2011). Na tentativa de neutralizar os danos oxidativos causados aos componentes celulares, um complexo sistema de defesa antioxidante é ativado, encabeçado pela atuação das enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) (Vieira et al., 2012; Dazy et al., 2009). Todavia, quando este mecanismo é superado pelas ações de eventos pró-

oxidantes, as EROs podem reagir com as membranas lipídicas, causando lipoperoxidação (LPO), e até mesmo com o material genético, produzindo danos genotóxicos e/ou mutagênicos que são detectados pelos testes do cometa e do micronúcleo (Nwani et al., 2013; Halliwell, 2011).

Dentre os organismos usados como indicadores biológicos, o cavalo-marinho (*Hippocampus spp.*) tem um apelo de importância ecológica e ecotoxicológica, visto que são importantes elementos para a conservação da biodiversidade marinha, atuando como espécies-bandeira e atraindo a atenção para a necessidade de proteção de ambientes marinhos e das espécies que lá se encontram (Rosa e Alves, 2007; Koldewey, 2005; Foster e Vincent, 2004). No aspecto ecotoxicológico, os cavalos-marinhos apresentam uma característica sedentária (Rosa et al., 2005), o que os torna particularmente suscetíveis às perturbações antropogênicas e resulta em um aumento de sua exposição às substâncias tóxicas quando ocorrem eventos de contaminação.

Apesar de muitos estudos abordarem os efeitos adversos dos compostos presentes na FSD na saúde de organismos aquáticos em testes de toxicidade aguda e crônica (Holth et al., 2014; Hansen et al., 2013; Romero-Lopez et al., 2012; Seuront, 2011; Lüchmann et al., 2011; Rodrigues et al., 2010; Simonato et al., 2008; Mohammed, 2005; Dede e Kaglo, 2001; Neff et al., 2000), são escassos os trabalhos que abordam o potencial de resiliência das respostas adaptativas dos peixes após exposição a esse contaminante. Desse modo o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da exposição aguda e subcrônica à FSD nos parâmetros de biotransformação e antioxidantes, nos níveis de metabólitos de HPAs na bile e na integridade do DNA em *Hippocampus reidi*, além de avaliar uma possível recuperação subsequente da exposição sobre tais parâmetros.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Aquisição e manutenção dos exemplares de *Hippocampus reidi*

Exemplares de *H. reidi* foram adquiridos de um criadouro (De Mar Company Ltda. ME, localizado em Guarapari, ES, Brasil) e os peixes foram aclimatados em laboratório durante 15 dias. Eles foram mantidos em tanques de vidro de 50 L em uma densidade de estocagem inferior a 1 g L<sup>-1</sup> (ABNT, 2011) sob fotoperíodo natural (~ 12:12 horas) e aeração constante. A qualidade da água foi rotineiramente monitorada para os parâmetros temperatura: 25-25,5 °C; condutividade: 48,6-50 µS cm<sup>-1</sup>; salinidade: 25-25,3 ppt; oxigênio dissolvido: 7.0-7.5 mg L<sup>-1</sup> e pH: 8,1-8,2 usando um condutivímetro YSI EC 300, oxímetro YSI OD 200 e um pHmetro YSI ph 100, respectivamente. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, com misidáceos coletados na natureza e congelados, fornecidos pelo próprio criadouro. Todo procedimento experimental foi realizado em conformidade com as normas da Comissão de Bem Estar Animal da Universidade Vila Velha - UVV (número do protocolo: 261/2013).

### 2.2 Delineamento experimental

Foi utilizado o óleo diesel automotivo tipo “B”, adquirido em um posto comercial de abastecimento de combustíveis. A simulação de derrame foi realizada em escala laboratorial de acordo com a metodologia proposta por Nicodem et al. (1998), obtendo dessa forma a fração solúvel do óleo diesel (FSD), que então foi diluída para 50 % com água salina de origem natural e utilizada nos bioensaios laboratoriais.

Essa concentração de trabalho foi determinada a partir de experimentos prévios (dados não publicados) que avaliaram o tempo de sobrevivência de *H. reidi* expostos em diferentes concentrações de FSD durante 14 dias. Foram testadas as seguintes concentrações: 25%, 50 % e 75 %. Para cada tratamento foram utilizados seis indivíduos, expostos individualmente em aquários de vidro contendo 6 L de solução em sistema semi-estático com renovação total do meio a cada 96 h e aeração constante. A maior concentração testada que não produziu efeito letal foi a de 50 % da FSD.

Após aclimatação, 112 peixes ( $5,73 \pm 0,16$  g e  $9,71 \pm 0,24$  cm) foram selecionados aleatoriamente e transferidos para aquários individuais de vidro (6 L) onde permaneceram por 24 h antes do início dos experimentos, realizado a partir de três protocolos experimentais:

- **Protocolo I:** Exposição aguda (EA) constituída por testes de toxicidade estáticos (sem renovação do contaminante) por 12, 24, 48 e 96 h.
- **Protocolo II:** Exposição subcrônica (ES) constituída por testes de toxicidade semi-estáticos por 168 e 336 h (equivalente a 7 e 14 dias), com renovação total do meio a cada 96 h.
- **Protocolo III:** Recuperação (R) constituído por teste de toxicidade semi-estático à FSD por 168 h, com renovação total do meio a cada 96 h, seguido de um tratamento de depuração total (exposição na ausência do contaminante) por 336 h, totalizando 504 h de duração. A recuperação após 168 h de exposição foi escolhida baseada em um trabalho anterior (Delunardo et al. 2013), onde indivíduos de *H. reidi* foram transferidos para aquários livres do contaminante após exposição aguda de 96 h ao petróleo bruto. Aqui, pretendeu-se avaliar a recuperação após um período maior de exposição, caracterizado por uma exposição subcrônica.

No início das séries experimentais, três litros da água dos aquários foram cuidadosamente sifonadas e substituída lentamente pela FSD preparada anteriormente (que se encontrava então diluída para 50 %). Os aquários foram cobertos com uma película de plástico e tampa de vidro para evitar a volatilização dos compostos da FSD. Para cada período amostral dos protocolos I e II foram utilizados oito peixes por tratamento. Cada um dos períodos de exposição foi acompanhado simultaneamente por um grupo controle (água sem contaminante), também constituído por oito peixes expostos individualmente. O mesmo ocorreu para o protocolo III. O grupo controle foi amostrado simultaneamente ao seu respectivo grupo exposto ao término dos experimentos.

Ao final de cada protocolo experimental, os animais foram anestesiados com uma solução de benzocaína  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ . Em seguida, amostras de sangue periférico foram

extraídas de cada peixe por punção caudal, utilizando seringas heparinizadas, para análises dos parâmetros genotóxicos, como o Ensaio Cometa e o teste do Micronúcleo (MN). Após a extração, as amostras de sangue foram armazenadas em microtubos mantidos protegidos da luz e conservados em gelo até o momento do uso. Após isso, os animais foram eutanasiados por secção medular para retirada do fígado e vesícula biliar, que foram imediatamente armazenadas em freezer -80 °C para as análises de biomarcadores bioquímicos, e para a quantificação dos HPAs tipo pireno, tipo benzo(a)pireno e tipo naftaleno presentes na bile. Amostras de água foram coletadas nos tempos 0, 12, 24, 48 e 96 h para a quantificação dos hidrocarbonetos.

### 2.3 Quantificações químicas

Os hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) foram quantificados por cromatografia gasosa/detector de ionização de chama (Perkin- Elmer Clarus® 500), acoplado ao injetor headspace Turbomatrix HS 40 (Perkin- Elmer). Já os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram analisados por cromatografia gasosa/espectrômetro de massas (Perkin-Elmer Clarus® 500) (APHA, 2005).

Uma alíquota da fração solúvel em água do óleo diesel foi transferida para o frasco de 20 mL com *headspace* para análises de BTEX (Benzeno, etilbenzeno, tolueno e xileno) e 16 PAHs. 10 mL de água ultrapura e 20 mL de uma solução de padrão interno e *surrogate* (5 mg / mL em metanol) foram adicionados. As amostras foram analisadas utilizando cromatografia a gás com injetor automático e amostrador de *headspace* modelo TriPlus (Thermo Scientific) em um cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo Scientific) acoplado a um DSQ usando um espectrômetro de massa II (Thermo Scientific) com as seguintes configurações: incubação de amostra de 24 min a 70 ° C, volume amostral de 1 mL e condições cromatográficas e detecção com base nos métodos EPA 8260. Foram utilizadas as seguintes soluções de referência: VOC Mixture-Modified AccuStandard Cat M-502 A-R2-10X e VOA Standard Accu Cat M-8240/60-IS/SS-10X. Uma alíquota de amostra foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL, e o volume foi completado com diclorometano. Em seguida, foram adicionados 20 mL de uma solução de padrão interno e *surrogate* Standard Mix / Método8270-Surrogate Standard (25 mg / mL em diclorometano). As amostras foram analisadas



utilizando cromatografia a gás com injetor automático e amostrador de *headspace* modelo TriPlus (Thermo Scientific) em um cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo Scientific) acoplado a um DSQ usando um espectrômetro de massa II (Thermo Scientific) com as seguintes configurações: volume de amostra de 3 mL, modo de injeção *splitless* e as condições cromatográficas e a detecção foram baseadas nos métodos EPA 8270. Foram utilizados os seguintes padrões de referência: Internal Standard Mix Standard AccuCat Z-014J, Method 8270-Surrogate Standard AccuStandard Cat M-8270-SS, Fluoranthene Absolute Cat Standard 70183 e SVOC EPA 525 506 540 Cal Mix Supelco Cat. Foram determinados os seguintes PAHs: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benz [a] antraceno, benzo [b] fluoranteno, benzo [ghi] perileno, benzo [k] fluoranteno, benzo [a] pireno, criseno, dibenzo[a,h] antraceno Fenantreno, fluoreno, indeno (1,2,3-cd) pireno, naftaleno e pireno. A soma da quantidade total de todos estes compostos foi considerada o índice de total de PAHs.

#### **2.4 Determinação de metabólitos na bile**

A determinação dos metabólitos de hidrocarbonetos do petróleo na bile foi realizada por meio da técnica de medidas fixas de fluorescência (fixed fluorescence - FF) de acordo com Krahn et al. (1986) para metabólitos tipo pireno, e de acordo com Lin et al. (1996) para metabólitos tipo naftaleno e tipo benzo(a)pireno (BaP). Para a quantificação, o 1-OH pireno foi utilizado como padrão para os metabólitos de BaP e pireno, enquanto para os metabólitos de naftaleno o 1-naphthol foi utilizado como padrão. Os metabólitos de BaP e Pireno foram expressos em  $\mu\text{grama.mg proteina}^{-1}$ , enquanto os metabólitos de naftaleno foram expressos em  $\text{mg.mg proteina}^{-1}$ .

#### **2.5 Biomarcadores bioquímicos**

Foi mensurada a atividade hepática de glutiona S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a concentração da lipoperoxidação (LPO). Para as análises de CAT e LPO as amostras do tecido hepático foram pesadas e homogeneizadas (1:4 massa:volume) em tampão tris-base 20 mM (pH 7,6) 1 mM de

EDTA, 1mM de dithiothreitol, 500 mM de Sucrose e 150 mM de KCL. Para a análise da atividade das enzimas SOD e GST foi mantida a proporção de 1:10.

A atividade da GST (E.C. 2.5.1.18) foi determinada segundo método descrito por Keen et al. (1976), a partir da reação de conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathiona reduzida (GSH), catalisada pela GST e monitorada pelo aumento da absorbância em 340 nm. A atividade da GST foi expressa em  $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$ .

A atividade da SOD (E.C. 1.15.1.1) foi determinada segundo a metodologia descrita por McCord e Fridovich (1969), medida por meio da inibição da taxa de redução do citocromo C pelo radical super\u00f3xido ( $\text{O}_2 \cdot^-$ ) por meio do sistema xantina/xantina oxidase a 550 nm. A atividade da SOD foi expressa em  $\text{U SOD} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$ .

A atividade da CAT (E.C. 1.11.1.6.) foi mensurada, segundo a metodologia descrita por Beutler (1975), medida pela avaliação do decréscimo cont\u00ednuo da concentração de per\u00f3xido de hidrog\u00e9nio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 240 nm. A atividade da CAT foi expressa em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$ .

A peroxidação lip\u00eddica foi quantificada pelo m\u00e9todo FOX ("Ferrous Oxidation-Xylenol orange") como descrito por Jiang et al. (1991). O m\u00e9todo FOX \u00e9 baseado na oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  (sulfato ferroso amoniacal -  $\text{FeSO}_4$ ) a  $\text{Fe}^{+3}$  pelos hidroper\u00f3xidos em meio \u00e1cido na presen\u00e7a de um pigmento complexador de  $\text{Fe}^{+3}$ , o alaranjado de xilenol, detect\u00e1vel em 560 nm. A concentra\u00e7\u00e3o de LPO foi expressa como  $\mu\text{mol}$  de hidroper\u00f3xido de cumeno. $\text{mg prote\u00edna}^{-1}$ .

Para todas as an\u00e1lises, o teor de prote\u00edna total ( $\text{mg prote\u00edna}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ ) foi determinado utilizando o m\u00e9todo de Bradford (1976) em um espectrofot\u00f4metro a 595 nm, usando albumina bovina ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) como padr\u00e3o.

## **2.6 Biomarcadores genot\u00f3xicos**

O Ensaio cometa em meio alcalino foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Tice et al. (2000). Todas as lâminas foram analisadas em teste cego e a magnitude do dano no DNA foi quantificada de acordo com a extens\u00e3o da migra\u00e7\u00e3o do DNA, determinada visualmente em 100 nucle\u00f3ides selecionados aleatoriamente, e n\u00e3o

sobrepostos, por peixe. Foram analisadas duas lâminas para cada peixe (Monteiro et al., 2011) em microscópio óptico em resolução de 400 X. O dano no DNA foi classificado em quatro classes de acordo com Kobayashi et al. (1995) da seguinte forma: (0) sem dano aparente; (1) cauda curta menor do que o diâmetro do nucleóide; (2) comprimento da cauda entre 1-2 vezes o diâmetro do nucleóide; (3) comprimento da cauda duas vezes maior que o diâmetro do nucleóide. O índice de danos (ID) foi obtido pela multiplicação do número de nucleóides em cada classe pela classe de danos e variou entre 0 (não danificado) a 300 (dano máximo). Esses valores demonstram os danos apresentados nos tratamentos de acordo com Heuser et al. (2008).

O teste do micronúcleo (MN) foi executado seguindo a metodologia proposta por Al-Sabti e Metcalfe (1995). Um total de 1000 eritrócitos por lâmina (duas lâminas por peixe) foi analisado em microscópio óptico em resolução de 1000 X com auxílio de óleo de imersão e as médias das frequências de MN encontradas para cada grupo experimental foram calculadas e expressas por 1000 células (‰). As lâminas foram analisadas em teste cego e sempre pelo mesmo observador. Inclusões citoplasmáticas redondas ou ovais, com contorno nítido, apresentando diâmetro menor do que 1/3 do núcleo principal, com cor e estrutura semelhante à cromatina e completamente separado do núcleo principal foram considerados MN (Kirsch-Volders et al., 2000).

## **2.7 Análises estatísticas**

A premissa de normalidade foi verificada pelo teste de D'Agostino & Pearson. Os resultados obtidos para cada grupo experimental foram comparados com seu respectivo grupo controle utilizando-se o teste paramétrico t-Student não pareado, ou seu correspondente não paramétrico Mann-Whitney. Os grupos expostos foram comparados entre si por meio de uma análise de variância (ANOVA) e pós teste de Bonferroni, ou seu correspondente não paramétrico Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prisma 5.0 e foram considerados significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Análise química da água

A concentração de hidrocarbonetos presentes em 50 % FSD indicou que a concentração de BTEX totais no início do experimento era de 6520,18  $\mu\text{g L}^{-1}$ , apresentando níveis 218 vezes superiores à concentração de HPAS totais, que eram de 29,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  (**Tabela 1**). Além disso, foi verificado que as concentrações observadas para todos os hidrocarbonetos quantificados não permaneceram estáveis durante os períodos de amostragem, diminuindo progressivamente.

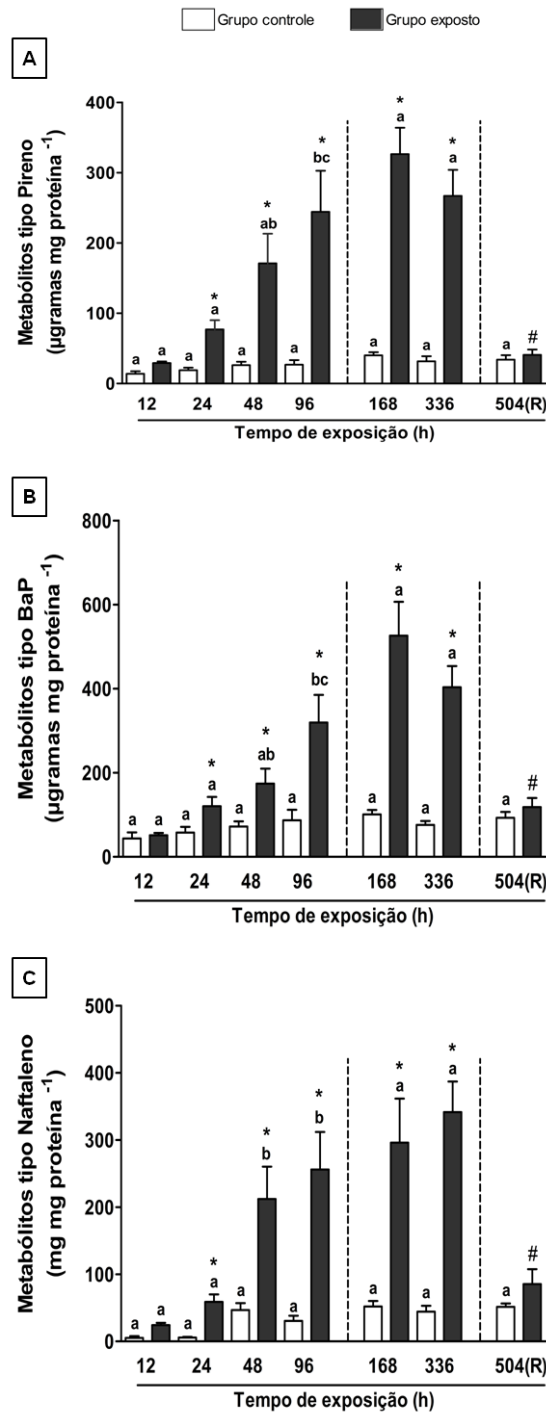
**Tabela 1.** Quantificação por cromatografia gasosa dos hidrocarbonetos monoaromáticos e policíclicos aromáticos (BTEX e HPAs) presentes em 50 % da fração solúvel do diesel (FSD) em diferentes períodos de exposição.

Hidrocarbonetos ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	50 % FSD				
	0 h	12 h	24 h	48 h	96 h
<b>BTEX</b>					
Benzeno	1172,6	25,1	10,9	--	--
Etil-benzeno	1314,21	43,2	19,57	--	--
Tolueno	1813,86	55,91	27,71	--	--
Xileno	2219,51	85,9	52,6	29,1	11,3
<b>BTEX total</b>	6520,18	210,11	110,78	29,1	11,3
<b>HPAs</b>					
Acenaftileno	--	--	--	--	--
Acenafteno	--	--	--	--	--
Antraceno	0,06	0,03	0,02	0,02	--
Benzo(a)antraceno	0,03	0,01	--	--	--
Benzo(b)fluoranteno	--	--	--	--	--
Benzo(k)fluoranteno	--	--	--	--	--
Benzo(a)pireno	--	--	--	--	--
Benzo(ghi)perileno	--	--	--	--	--
Criseno	--	--	--	--	--
Dibenzo[a,h]antraceno	--	--	--	--	--
Fenantreno	0,23	0,12	0,1	0,09	0,04
Fluoranteno	--	--	--	--	--
Fluoreno	0,18	0,12	0,11	0,06	0,05
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	--	--	--	--	--
Naftaleno	29,4	2,98	2	0,94	0,19
Pireno	--	--	--	--	--
<b>HPAs total</b>	29,9	3,35	2,23	1,11	0,28

Limite de quantificação: BTEX < 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; PAHs < 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$ . -- Abaixo do limite de quantificação. Limite de detecção: BTEX < 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; PAHs < 0,005  $\mu\text{g L}^{-1}$

### 3.2 Metabólitos de HPAs na bile

As concentrações dos metabólitos tipo pireno, benzo(a)pireno e naftaleno analisadas na bile de *H. reidi* apresentaram tendências semelhantes em todos os protocolos experimentais (**Figura 1A, B e C**). Durante a exposição aguda, com exceção do tempo de exposição de 12 h, todos os demais períodos apresentaram valores significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) aos seus respectivos controles. Aumentos significativos na concentração dos metabólitos tipo pireno foram observados entre os tempos de 12 h e 96 h (8,3 vezes,  $p = 0,0025$ ) e 24 h e 96 h (3,2 vezes,  $p = 0,0143$ ) (**Figura 1 A**). Para os metabólitos tipo benzo(a)pireno, também foram observados aumentos entre os tempos de 12 h e 96 h (6,2 vezes,  $p = 0,0012$ ) e 24 h e 96 h (2,6 vezes,  $p = 0,0123$ ) (**Figura 1 B**). As concentrações de metabólitos tipo naftaleno apresentaram aumentos entre os tempos de 12 h e 48 h (8,7 vezes,  $p = 0,0016$ ), 12 h e 96 h (10,5 vezes,  $p = 0,0010$ ), 24 h e 48 h (3,5 vezes,  $p = 0,0078$ ) e 24 h e 96 h (4,3 vezes,  $p \leq 0,0039$ ). Durante a exposição subcrônica aos grupos expostos por 168 h e 336 h foi observado aumento de 8,1 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) e 8,4 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) para metabólitos tipo pireno, 5,2 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) e 5,3 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) para metabólitos tipo benzo(a)pireno e 5,7 vezes ( $p = 0,0024$ ) e 7,7 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) para metabólitos tipo naftaleno, em relação aos seus respectivos grupos controles (**Figura 1A, B e C**). Com relação ao protocolo de recuperação, verificou-se uma diminuição ( $p \leq 0,05$ ) de 8 vezes, 4,4 vezes e 3,5 vezes respectivamente, na concentração dos metabólitos tipo pireno, benzo(a)pireno e naftaleno na bile quando comparados com os grupos expostos por 168 h (**Figura 1A, B e C**).



**Figura 1.** Concentração de metabólitos tipo pireno (A), BaP (B) e naftaleno (C) analisadas em fígado de *Hippocampus redi* expostos à fração solúvel do diesel (FSD) diluída 50 % em diferentes protocolos experimentais. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os períodos de exposição dentro de um mesmo grupo experimental (controle ou exposto). \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle dentro de um mesmo período de exposição. # indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o grupo exposto por 168 h e o grupo do protocolo experimental de recuperação (R).

### 3.3 Biomarcadores bioquímicos

A exposição aguda e subcrônica a 50 % da FSD afetou os biomarcadores bioquímicos em *H. reidi* de maneiras distintas, de forma que as respostas significativas indicaram um aumento da atividade destes biomarcadores, porém, em diferentes períodos de exposição. (**Tabela 2**). Não foi observada diferença significativa entre os grupos controles de nenhum protocolo experimental para todos os biomarcadores bioquímicos. Quando comparado com os respectivos grupos controle, a atividade da SOD apresentou um incremento de 1,6 vezes ( $p = 0,0016$ ) e 1,2 vezes ( $p = 0,0054$ ) após 12 h e 336 h de exposição, respectivamente. Durante exposição aguda foram observadas diferenças significativas entre os tempos de 12 h e 48 h ( $p = 0,0002$ ), 12 h e 96 h ( $p = 0,0002$ ), 24 h e 48 h ( $p \leq 0,0001$ ) e 24 h e 96 h ( $p = 0,0036$ ). A atividade da CAT foi 2 vezes superior ( $p = 0,0008$ ) ao seu controle somente após 12 h, e a exposição aguda revelou diferenças entre os tempos de 12 h e 24 h ( $p = 0,0172$ ) e 12 h e 96 h ( $p = 0,0188$ ). A atividade da GST não diferiu entre os grupos experimentais e os grupos controle para nenhum protocolo experimental. No que diz respeito à concentração de LPO, foi observado um aumento de 1,5 vezes ( $p = 0,0004$ ) após 48 h, 1,5 vezes ( $p = 0,014$ ) após 96 h, 1,6 vezes ( $p = 0,0003$ ) após 168 h e 2,1 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) após 336 h em relação aos seus respectivos grupos controle. Além disso, foram observadas diferenças entre os tempos de 12 h e 24 h ( $p \leq 0,0001$ ), 12 h e 96 h ( $p \leq 0,0001$ ) e 48 h e 96 h ( $p = 0,0054$ ) durante a exposição aguda. A análise dos biomarcadores bioquímicos após o protocolo experimental de recuperação apontou que somente a concentração de LPO apresentou uma redução significativa em relação ao exposto por 168 h ( $p = 0,0224$ ).

**Tabela 2.** Atividade enzimática da glutathiona S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e concentração da peroxidação lipídica (LPO) no fígado de *Hippocampus redi* expostos à 50 % da fração solúvel do diesel (FSD) em diferentes protocolos experimentais.

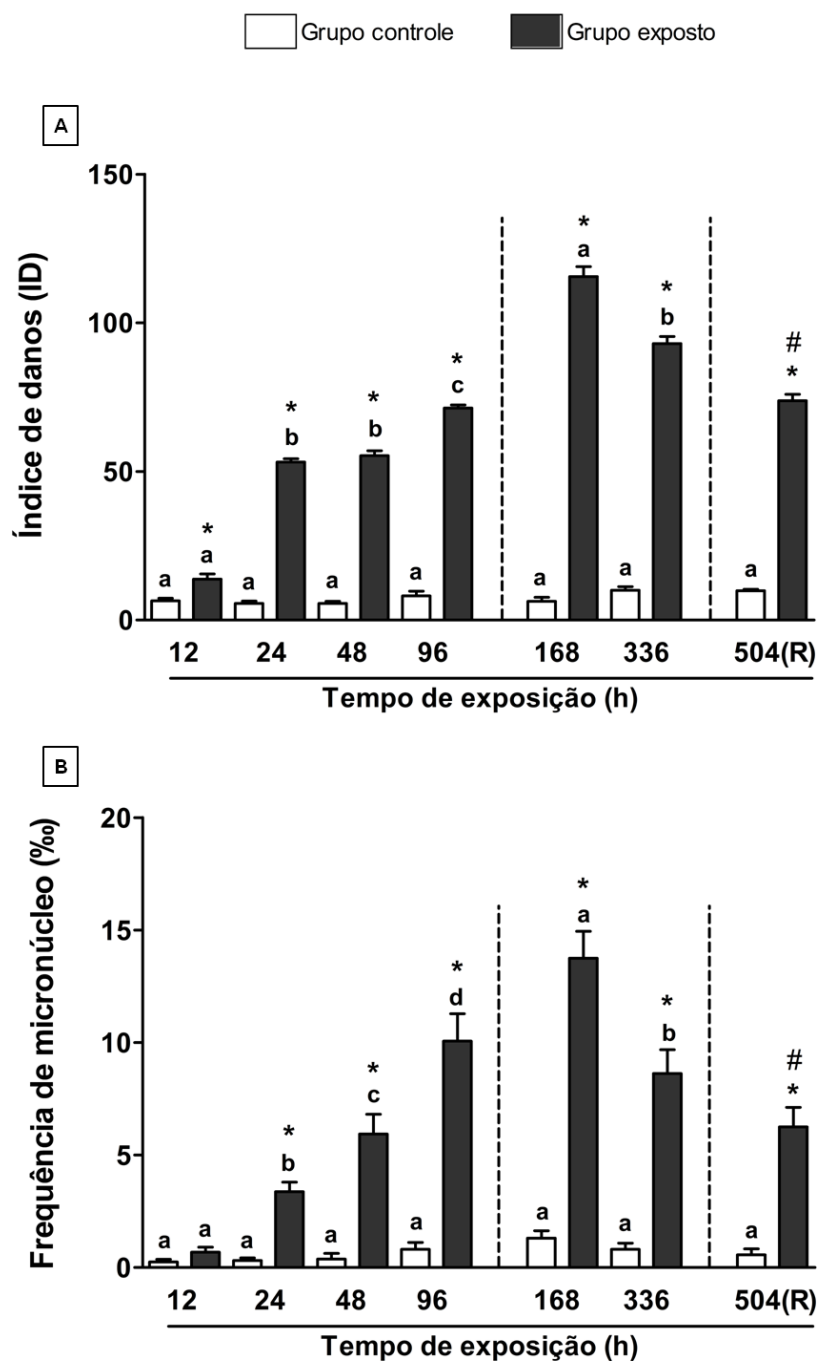
Tempo	Exposição	Tratamento	Biomarcadores Bioquímicos			
			Biotransformação	Antioxidantes		Peroxidação lipídica
			GST U mg proteína <sup>-1</sup>	SOD U SOD min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	CAT μmol H <sub>2</sub> O min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	LPO μmol CHP mg proteína <sup>-1</sup>
12 h	aguda	Controle	3,09 ± 0,35 <sup>a</sup>	450,9 ± 22,94 <sup>a</sup>	127,7 ± 12,11 <sup>a</sup>	259,2 ± 18,76 <sup>a</sup>
	aguda	50 % FSD	4,66 ± 0,65 <sup>a</sup>	700,6 ± 59,97 <sup>*c</sup>	258,0 ± 28,16 <sup>*a</sup>	263,2 ± 20,25 <sup>a</sup>
24 h	aguda	Controle	3,36 ± 0,41 <sup>a</sup>	481,4 ± 30,98 <sup>a</sup>	191,3 ± 33,22 <sup>a</sup>	347,1 ± 57,66 <sup>a</sup>
	aguda	50 % FSD	3,07 ± 0,40 <sup>ab</sup>	563,6 ± 26,47 <sup>bc</sup>	160,5 ± 22,53 <sup>b</sup>	471,7 ± 33,09 <sup>bc</sup>
48 h	aguda	Controle	3,74 ± 0,42 <sup>a</sup>	400,0 ± 20,04 <sup>a</sup>	131,5 ± 14,20 <sup>a</sup>	265,9 ± 20,72 <sup>a</sup>
	aguda	50 % FSD	4,50 ± 0,24 <sup>a</sup>	383,6 ± 21,44 <sup>ab</sup>	164,5 ± 10,81 <sup>ab</sup>	390,1 ± 17,10 <sup>*ab</sup>
96 h	aguda	Controle	4,58 ± 0,82 <sup>a</sup>	466,1 ± 16,61 <sup>a</sup>	187,3 ± 23,47 <sup>a</sup>	396,1 ± 36,45 <sup>a</sup>
	aguda	50 % FSD	5,20 ± 0,57 <sup>ac</sup>	404,4 ± 37,06 <sup>ab</sup>	151,0 ± 28,82 <sup>bc</sup>	587,3 ± 57,50 <sup>*c</sup>
168 h	subcrônica	Controle	4,04 ± 0,36 <sup>a</sup>	371,6 ± 18,79 <sup>a</sup>	128,4 ± 16,77 <sup>a</sup>	332,8 ± 15,72 <sup>a</sup>
	subcrônica	50 % FSD	3,72 ± 0,26 <sup>a</sup>	343,5 ± 30,30 <sup>a</sup>	125,3 ± 13,56 <sup>a</sup>	551,1 ± 39,67 <sup>*a</sup>
336 h	subcrônica	Controle	4,57 ± 0,42 <sup>a</sup>	391,7 ± 21,29 <sup>a</sup>	158,7 ± 30,63 <sup>a</sup>	411,2 ± 35,16 <sup>a</sup>
	subcrônica	50 % FSD	5,87 ± 0,69 <sup>b</sup>	479,2 ± 8,394 <sup>*b</sup>	176,3 ± 14,76 <sup>a</sup>	865,0 ± 45,94 <sup>*b</sup>
504 h	recuperação	Controle	4,58 ± 0,65	479,1 ± 47,64	169,7 ± 14,46	330,9 ± 42,24
	recuperação	50 % FSD	4,62 ± 0,61	499,7 ± 79,91	131,9 ± 18,05	390,0 ± 48,69 <sup>#</sup>

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os períodos de exposição dentro de um mesmo grupo experimental (controle ou exposto). \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle dentro de um mesmo período de exposição. # indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o grupo exposto por 168 h e o grupo do protocolo experimental de recuperação (504 h).



### 3.4 Biomarcadores genotóxicos

Os resultados referentes às frequências de quebras na fita de DNA, verificados por meio do índice de danos (ID) durante o protocolo de exposição aguda revelaram aumentos de 2,1 vezes ( $p = 0,0008$ ) após 12 h, 9,6 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) após 24 h, 9,8 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) após 48 h e 8,8 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) após 96 h, em relação aos seus respectivos grupos controle (**Figura 2A**). Ainda com relação à exposição aguda, foram encontradas diferenças entre os tempos de 12 h e 24 h ( $p \leq 0,0001$ ), 12 h e 48 h ( $p = 0,0002$ ), 12 h e 96 h ( $p \leq 0,0001$ ), 24 h e 96 h ( $p \leq 0,0001$ ) e 48 h e 96 h ( $p \leq 0,0001$ ). O mesmo padrão de respostas foi observado para a frequência de MN, com exceção do período de 12 h que não diferiu estatisticamente de seu grupo controle. Quando os demais tratamentos foram comparados com seus respectivos grupos controle, foi observado um aumento na frequência de MN na ordem de 10,9 vezes ( $p \leq 0,0001$ ), 15,5 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) e 12,5 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) após 24 h, 48 h e 96 h, respectivamente. Além disso, verificou-se que as frequências de MN se intensificaram na medida em que aumentava o período de exposição, indicando uma relação tempo-dependente (**Figura 2B**). Durante o protocolo de exposição subcrônica, verificou-se que o período de 168 h foi responsável pelo pico de danos observados tanto para o ensaio cometa quanto para o teste do MN, aumentando 18,3 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) e 10,5 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) em relação aos seus respectivos grupos controle. Adicionalmente, foi observado que após 336 h esses valores apresentam uma significativa regressão quando comparados com os grupos expostos por 168 h, com os valores de ID diminuindo 1,6 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) e MN diminuindo 1,6 vezes ( $p = 0,0031$ ) (**Figura 2A e B**). Com relação ao protocolo de recuperação, o mesmo apontou que, apesar dos valores obtidos pela técnica do cometa e do MN estarem 11,1 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) e 7,5 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) superiores aos seus respectivos grupos controle, ainda assim, ambos foram significativamente diferentes ( $p \leq 0,0001$ ) daqueles expostos por 168 h (**Figura 2A e B**).



**Figura 2.** Índice de danos (A) e frequência de micronúcleos (B) em células sanguíneas de *Hippocampus redi* expostos à fração solúvel do diesel (FSD) diluída 50 % em diferentes protocolos experimentais. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os períodos de exposição dentro de um mesmo grupo experimental (controle ou exposto). \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle dentro de um mesmo período de exposição. # indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o grupo exposto por 168 h e o grupo do protocolo experimental de recuperação (R).

## 4. DISCUSSÃO

Este estudo investigou uma gama de biomarcadores amplamente utilizados em estudos de ecotoxicologia aquática (metabólitos de HPAs na bile, atividade das enzimas GST, SOD, CAT, concentração de LPO e danos no material genético em células sanguíneas por meio do ensaio cometa e teste MN) em cavalos-marinho, uma espécie bioindicadora neotropical de importância ecológica e econômica (Chen et al., 2015; Dabrowska et al., 2014; Simonato et al., 2011; Koldewey and Martin-Smith, 2010; van der Oost et al., 2003). Os peixes foram expostos a 50 % da FSD por 12, 24, 48 e 96 h (exposição aguda), e 168 e 336 h (exposição subcrônica). Adicionalmente, foi realizado um experimento de recuperação, onde os organismos permaneceram por 336 h livres do contaminante, após exposição por 168 h a 50 % FSD (totalizando 504 h de exposição).

Uma vez disponibilizado no ambiente aquático, os compostos como os hidrocarbonetos contidos na FSD são facilmente absorvidos pelos peixes através de suas brânquias devido ao seu elevado coeficiente de partição octanol/água ( $K_{ow}$ ), o que favorece sua rápida transferência da água para compartimentos lipofílicos (Sette et al., 2013). No presente estudo, apesar da diminuição da concentração dos BTEX e dos HPAs totais na água em função dos períodos de exposição (12, 24, 48 e 96 h), foi observado um aumento da concentração dos metabólitos dos HPAs na bile de *H. reidi* em função desses mesmos tratamentos. A análise da concentração dos metabólitos de HPAs na bile é uma medida extremamente sensível no qual reflete a absorção e a metabolização desses compostos pelos peixes (Aas et al., 2000). Sendo que, de acordo com Gagnon and Holdway (1998), os metabólitos de HPAs podem ser encontrados na bile cerca de 1000 vezes mais concentrado do que no ambiente externo.

O processo de metabolização e eliminação dos HPAs inicia-se com a adição de grupamentos eletrofílicos como o  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-COOH$  à sua molécula, com o intuito de aumentar sua solubilidade em água. Esta etapa é denominada “ativação” e é catalisada por enzimas de biotransformação de fase I, como o citocromo P450 ou CYP1A (Martins et al., 2013; Sette et al., 2013; Orbea et al., 2002). Os metabólitos formados nas reações de fase I são então conjugados com substratos endógenos (fase II) pela ação das transferases, como a GST, convertendo-os em um conjugado não

reativo e hidrossolúvel, facilitando assim sua eliminação (Martins et al., 2013; Sette et al., 2013; Schlenk et al., 2008). A atividade da GST não foi afetada em nenhum dos protocolos experimentais, indicando que a FSD não induziu a atividade dessa enzima em *H. reidi*, ou ainda que a capacidade de conjugação enzimática com os hidrocarbonetos presentes na FSD foi insuficiente. Sabe-se que outras enzimas de biotransformação de fase II como as glucuronosiltransferases ou as sulfotransferases podem contribuir significativamente, ou ainda dominar a capacidade de conjugação com certos substratos, e é provável que essa via metabólica alternativa tenha contribuído para a fraca atuação da GST durante o experimento (Silva et al., 2013; van der Oost et al., 2003; Willett et al., 2000). Embora a atividade dessa enzima possa ser induzida pela ativação do receptor aril hidrocarboneto (AhR), existem evidências de que ela não seja tão facilmente indutível quanto o sistema de fase I de biotransformação (van der Oost et al., 2003), e que a exposição a hidrocarbonetos pode causar tanto o incremento (Sadauskas-Henrique et al., 2017; Bettim et al., 2016; Han et al., 2014; Oliva et al., 2010; Vieira et al., 2008) quanto a inibição da atividade dessa enzima (Delunardo et al., 2015; Silva et al., 2013; Luís e Guilhermino, 2012; Palanikumar et al., 2012; Kerambrun et al., 2012). De fato, Delunardo et al. (2015) observaram uma inibição dose-dependente da GST em *H. reidi* expostos a diferentes concentrações de petróleo bruto durante 96 h, o que permite inferir que, nesta espécie, talvez a atividade da GST não seja a principal via de metabolização de hidrocarbonetos. Similarmente aos resultados obtidos neste trabalho, Holth et al. (2014) não observaram respostas significativas da atividade da GST em *Gadus morhua* expostos à fração solúvel do petróleo e a fração solúvel do óleo diesel entre uma e três semanas.

Muitas vezes, o processo de biotransformação de xenobióticos pode gerar compostos altamente reativos, em um processo denominado de bioativação. Geralmente, esse processo leva à formação de metabólitos eletrofílicos altamente reativos, como as quinonas e *diole*-epóxidos, que são diretamente envolvidos na promoção do estresse oxidativo (Lee e Steinert, 2003; van der Oost et al., 2003; Ohnishi e Kawanishi, 2002). Tal fato torna os HPAs uma classe particular de contaminantes, uma vez que grande parte da sua toxicidade é atribuída ao mecanismo de desintoxicação da própria célula (Oliva et al., 2010; van der Oost et al., 2003).

Os hidrocarbonetos contidos no petróleo e seus derivados são substâncias químicas pró-oxidantes cuja biotransformação e ativação do “ciclo redox” geram espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por sua vez, são consideradas desafios bioquímicos para peixes expostos a esses contaminantes (Regoli e Giuliani, 2014; Regoli et al., 2011). Na linha de frente do mecanismo de defesa contra as injúrias provocadas pelas EROs estão as enzimas superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). A SOD catalisa a dismutação do íon superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, que por sua vez serão decompostos em água e oxigênio pela atividade da CAT (Vieira et al., 2012; Dazy et al., 2009).

No presente estudo, a atividade hepática da SOD e da CAT foi significativamente aumentada após 12h, quando comparadas com seus respectivos controles. É provável que esta indução tenha ocorrido em função de uma alta produção de íons superóxido decorrente da exposição à FSD, já que não houve indução significativa da GST neste período e, portanto, é possível sugerir que a produção de EROS não poderia advir desses processos metabólicos. Estes resultados indicam a sensibilidade dessas enzimas à poluição por óleo e seus derivados, atuando como biomarcadores adequados no monitoramento de estágios iniciais de contaminação de ecossistemas aquáticos, corroborando com estudos prévios (Nogueira et al., 2011; Zhang et al., 2004;). Entretanto, apesar da CAT atuar neutralizando os radicais superóxidos gerados pela ação da SOD (Lushchak, 2011), o incremento da atividade da SOD após 336 h de exposição não foi acompanhado pelo aumento da atividade da CAT nesse período. No entanto, é possível que a eliminação das EROs após exposição à hidrocarbonetos possa ocorrer por outra peroxidase, via glutathione peroxidase (GPx), conforme descrito anteriormente por Simonato et al.(2008) e confirmado por Bettim et al. (2016). Nesse sentido, Sadauskas-Henrique et al. (2017) observaram uma correlação positiva entre a ação da SOD e a GPx na metabolização de benzo[a]pireno (BaP) injetado intraperitonealmente em tambaqui (*Colossoma macropomum*).

O estresse oxidativo ocorre quando o mecanismo de defesa antioxidante é superado pela ação de eventos pró-oxidantes, levando à formação de espécie reativas de oxigênio (EROs), capazes de causar danos estruturais em diversas macromoléculas que compõem a estrutura celular (Shi et al., 2005; Zhang et al., 2004), podendo induzir distúrbios na estrutura, fluidez e permeabilidade da membrana lipídica (Niki, 2009).

Neste trabalho, observou-se que a exposição à 50 % da FSD foi capaz de causar danos diretos na estrutura da membrana dos hepatócitos de *H. reidi*, tanto no protocolo de exposição aguda quanto no sub-crônico, de modo que todos os tratamentos que apresentaram níveis de LPO superiores aos seus respectivos controles foram acompanhados de elevados valores de metabólitos de HPAs na bile, portanto, é possível sugerir que a bioativação desses compostos, ainda que realizada por uma via alternativa à GST, esteja associada aos danos encontrados.

Os resultados de peroxidação lipídica observados no presente trabalho, encontram respaldo na literatura, seja em experimentos envolvendo a exposição de uma mistura complexa de hidrocarbonetos (Holth et al., 2014; Nogueira et al., 2013; Simonato et al., 2011) seja investigando os efeitos da exposição de um hidrocarboneto específico (Sadauskas-Henrique et al., 2017; Li et al., 2016; Ren et al., 2014; Almeida et al., 2012). Além disso, os níveis de LPO após o experimento de recuperação apresentaram um recuo de seus valores, diferindo-se estatisticamente do grupo exposto por 168 h, o que indica a capacidade de recuperação dos danos provocados pelo estresse oxidativo na ausência da FSD. Novamente esses valores estão em consonância com os valores de metabólitos dos HPAs encontrados na bile, que retornaram a níveis semelhantes aos encontrados no tratamento controle.

Os processos que determinam os danos no material genético e sua extensão podem ser divididos de acordo com a intervenção do xenobiótico na promoção e manutenção da genotoxicidade, em oposição ao papel dos sistemas anti-genotóxicos do organismo (Guilherme et al., 2014). A integridade do DNA pode ser afetada como um resultado do ataque direto do agente genotóxico (e.g. formação de adutos), e/ou seus metabólitos (Brinkmann et al., 2013; Nwani et al., 2013), assim como indiretamente, por meio da geração de EROs que podem causar danos como quebras de fita simples e dupla, regiões álcali-lábeis (Nwani et al., 2013; Guilherme et al., 2012; Azqueta et al., 2011). Elas ainda podem atacar as bases nitrogenadas, bem como a desoxirribose, que é considerada o esqueleto do DNA, induzindo modificações nessas moléculas e desestruturando o material genético (Marnett, 2000).

Assim como mencionado anteriormente para os valores de LPO, os maiores valores de índices de danos (ID) verificados pelo teste cometa foram registrados paralelamente aos maiores valores de metabólitos de HPAs na bile, reforçando a

hipótese de que a bioativação desses compostos leva à formação de espécies reativas capazes de causar lesões no DNA mesmo nas primeiras horas de exposição. Haja visto que houve um incremento da atividade da SOD e da CAT após 12 h de exposição, mas que não foram suficientes para impedir danos no material genético, evidenciado pelos valores significativos de ID nesse período. Sadauskas-Henrique et al. (2017), encontraram uma correlação positiva entre os danos na molécula de DNA de sangue periférico de tambaqui (*C. macropomum*) e os metabólitos de BaP na bile, confirmando que esses biomarcadores podem aumentar concomitantemente. Similarmente, Dévier et al. (2013) encontraram uma relação positiva entre os metabólitos de HPAs presentes na bile e danos no DNA de eritrócitos de *Dicentrarchus labrax* coletados em locais contaminados por PAHs, estabelecendo uma relação entre a exposição aos HPAs e os danos no DNA. Da mesma maneira, Costa et al., (2008) e Wessel et al. (2010) chegaram a conclusões semelhantes.

Além disso, as EROs exercem influência sobre a atividade das enzimas que atuam no mecanismo de síntese ou reparo de danos no DNA (inativando-as ou tornando-as menos eficientes) e, uma vez que isso ocorra, lesões irreversíveis no nível cromossômico podem ser esperadas. Tais lesões são caracterizadas como mutagênicas e podem ser detectadas pelo teste do micronúcleo (Arslan et al., 2015; Guilherme et al., 2012; Souza e Fontanetti, 2012; Buschini et al., 2003).

Neste estudo, o teste do MN foi capaz de detectar danos no material genético de *H. reidi* a partir de 24 h de exposição. O aumento da frequência de MN é considerado um marcador indireto de irregularidades numéricas e estruturais de cromossomos causadas por exposição a agentes estressores (Corvi et al., 2008; Fenech, 2002;). Eles são formados durante a divisão celular, e podem se originar a partir da perda de um cromossomo inteiro, ou um fragmento de cromossomo, ou alguma disfunção do aparelho mitótico, como a má formação das fibras do fuso, atraso da migração das cromátides ou mesmo apoptose (Arslan et al., 2010; Parry e Parry, 2006). O que ajuda a explicar a ausência de MN durante as primeiras 12 h de exposição, uma vez que, provavelmente, nesse curto período de tempo a célula ainda não havia passado por nenhum ciclo de divisão celular. Esses resultados também evidenciam a baixa sensibilidade do teste do MN em comparação ao teste do cometa na detecção de

danos no DNA, uma vez que este último foi capaz de detectar resultados significativos desde as primeiras 12 h de exposição.

Durante o protocolo de exposição aguda, as frequências de MN apresentaram um padrão de resposta do tipo tempo-dependente, aumentando de maneira significativa em relação a seus respectivos controles, indicando que o potencial clastogênico e/ou aneugênico dos hidrocarbonetos contidos na FSD, assim como dos seus metabólitos, aumenta de maneira gradativa na medida em que se aumenta o período de exposição. Da mesma forma, Delunardo et al. (2015); Gravato e Santos (2003); Siu et al. (2004); Teles et al. (2003) e Pacheco e Santos (2001) já haviam encontrado resultado semelhantes em pesquisas anteriores envolvendo exposição de organismos aquáticos à hidrocarbonetos, petróleo ou seus derivados.

Com relação ao experimento de exposição subcrônica, tanto a frequência de MN quanto o ID apresentaram uma queda após 336 h de exposição, diferindo significativamente do período de 168 h. É provável que estes valores estejam relacionados aos processos de renovação celular dos organismos, de modo que os eritrócitos danificados pela exposição ao contaminante sejam removidos pela ação catabólica do baço e substituídos por células intactas. Assim como no presente trabalho, Vanzela et al., 2007 verificaram em *Prochilodus lineatus* que após exposição à fração solúvel do diesel por 6 h, 24 h, 96 h e 15 dias, as menores frequências de micronúcleos foram verificadas nos períodos extremos de exposição, tanto no menor quanto no maior. Assim, apesar do teste do MN ser reconhecido com um biomarcador adequado, existe uma tendência de queda nesses valores após exposições crônicas ou sub-crônicas (Çavas e Ergene-Gozükara, 2005).

A toxicidade de derivados do petróleo e seu potencial em causar danos genotóxicos em diversos organismos aquáticos expostos a tais compostos têm sido extensivamente divulgados na literatura (Kochhann et al., 2013; Negreiros et al., 2011; Fedato et al., 2010; Nahrgang et al., 2010; Vanzella et al., 2007; Çavas e Ergene-Gözükara, 2005; Frenzilli et al., 2004; Pérez-Cadahía et al., 2004; Siu et al., 2004; Rose et al., 2001). Entretanto, a análise de uma potencial recuperação dos danos provocados no DNA uma vez cessada a exposição a esses xenobióticos ainda são escassos (Delunardo et al., 2013; Fedato et al., 2010), com apenas alguns relatos abordando os



efeitos da exposição e pós-exposição à herbicidas e metais (Guilherme et al., 2014; Marques et a., 2014 a,b; Oss et al., 2013).

Uma das hipóteses para o retorno dos valores dos danos genotóxicos e mutagênicos a níveis basais após o experimento de recuperação é que o contaminante tenha afetado o bom funcionamento da vasta maquinaria de reparo do DNA (Au et al., 2010), e que o período livre da exposição à FSD tenha sido suficiente para que esse componentes voltassem a desempenhar a sua função de maneira eficaz, desencadeando dessa forma, uma significativa redução dos danos ao DNA. Outra hipótese que não pode ser descartada é a de que a cinética de substituição de células sanguíneas (eritropoiese) tenha desempenhado um papel importante, removendo os eritrócitos danificados e liberando células saudáveis na circulação (De Flora et al., 1993).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a exposição aos agentes tóxicos contidos na FSD, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e hidrocarbonetos monoaromáticos, conhecidos por BTEX, induziram danos oxidativos nos espécimes de *H. reidi*, sendo estes efeitos deletérios prontamente atenuados após o período de recuperação (sem a exposição à FSD), tal como visto pelo retorno dos níveis de LPO, ID e MN a valores próximos do grupo controle.

## 6. REFERÊNCIAS

As referências deste capítulo estão de acordo com as normas do periódico “Science of the Total Environment”.

Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., Andersen, O.K., 2000. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquat. Toxicol.* 51, 241-258.

ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011. Ecotoxicologia aquática-Toxicidade aguda- Método de ensaio com peixes NBR 15088.

Akaishi, F.M., Silva de Assis, H.C., Jakobi, C.G., Eiras-Stoffela, D.R., St-Jean, S.D., Courtenay, S.C., Lima, E.F., Wagener, A.L.R., Scofield, A.L., Oliveira Ribeiro, C.A., 2004. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 244-253.

Almeida, J.R., Gravato, C., Guilhermino, L., 2012. Biological parameters towards polycyclic aromatic hydrocarbons pollution: a study with *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the model compound benzo(a)pyrene. *Water. Air. Soil. Pollut.* 223, 4709-4722.

Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121-135.

Arslan, O.C., Boyacioglu, M., Parlak, H., Katalay, S., Karaaslan, M.A., 2015. Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliaga Bay Turkey. *Mar. Pollut. Bull.* 94, 48-54.

APHA., 2005. Standard methods for the examination of water and waste water, 21<sup>st</sup> edn. American Public Health Association, Washington, DC.

Au, D.W.T., 2004. The application of histocytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 817-834.

Azqueta, A., Meier, S., Priestley, C., Gutzkow, K.B., Brunborg, G., Sallette, J., Soussaline, F., Collins, A.R., 2011. The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. *Mutagenesis* 26, 393-399.

Beutler E., 1975. *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods*. Grune & Stratton, New York.

Bettim, F.L., Galvan, G.L., Cestari, M.M., Yamamoto, C.I., de Assis, H.C.S., 2016. Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline. *Chemosphere* 144, 1467-1474.

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

Brinkmann, M., Hudjetz, S., Kammann, U., Hennig, M., Kuckelkorn, J., Chinoraks, M., Cofalla, C., Wiseman, S., Giesy, J.P., Schaffer, A., Hecker, M., Wolz, J., Schuttrumpf, H., Hollert, H., 2013. How flood events affect rainbow trout: evidence of a biomarker cascade in rainbow trout after exposure to PAH contaminated sediment suspensions. *Aquat. Toxicol.* 128/129, 13-24.

Brown, C.E., Fieldhouse, B., Lumley, T.C., Lambert, P., Hollebone, B.P., 2011. Environment Canada's methods for assessing oil spill treating agents. In: Fingas, M. (Ed.), *Oil Spill Science and Technology*. Gulf Professional Publishing, Boston, pp. 643-671.

Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P., Rossi, C., 2003. Effects of temperature on baseline genotoxicant induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymoha*. *Mutat. Res.* 537, 81-9.

Çavas, T.; Ergene-Gözükara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264-71.

Chen, L., Wang, X., Huang, B., 2015. The genus *Hippocampus*-A review on traditional medicinal uses, chemical constituents and pharmacological properties. *J Ethnopharmacol.* 162, 104-111.

Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, P., Benthem, J., Vanparys, P., 2008. ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT), *Mutagenesis* 7, 1-13.

Costa, P.M., Lobo, J., Caeiro, S., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T.A., Costa, M.H., 2008. Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): effects of metallic and organic contaminants. *Mutat. Res.* 654, 29-37.

Dabrowska, H., Kopko, O., Góra, A., Waszak, I., Walkusz-Miotk, L., 2014. DNA damage, EROD activity, condition indices, and their linkages with contaminants in female flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. *Sci. Total. Environ.* 496, 488-498.

Dazy, M., Masfaraud, J.F., Ferard, J.F., 2009. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 75, 297-302.

Dede, E.B., Kaglo, H.D, 2001. Aqua-toxicological effects of water soluble fractions (WSF) of Diesel fuel on *O. niloticus* fingerlings. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* 5, 93-6.

De Flora, S., Vigano, L., Agostini, F.D., Camoirano, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C., Melodia, F., Arillo, A., 1993. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutat. Res.* 319, 167-177.

Delunardo, F. A. C., Carvalho, L. R., Silva, B. F., Galão, M., Val, A. L., Chippari-Gomes, A. R., 2015. Seahorse (*Hippocampus reidi*) as a bioindicator of crude oil exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 117, 28-33.

Delunardo, F. A. C., Silva, B. F., Paulino, M. G., Fernandes, M. N., Chippari-Gomes, A. R., 2013. Genotoxic and morphological damage in *Hippocampus reidi* exposed to crude oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 87, 1-9.

Dévier, M.H., Le DÛ-Lacoste, M., Akcha, F., Morin, B., Peluhet, L., Le Menach, K., Burgeot, T., Budzinski, H., 2013. Biliary PAH metabolites EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from seine estuary (France). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 708-722.

Faksness, L.G., Brandvik, P.J., Sydnnes, L.K., 2008. Composition of the water accommodated fractions as a function of exposure times and temperatures. *Marine. Poll. Bull.* 56, 1746-1754.

Fedato, R.P., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2010. Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. *Mut. Res.* 700, 80-85.

Fenech, M., 2002. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer, *Drug. Discov. Today.* 7, 1128-1137.

Finotti, A.R., Caicedo, N.O.L., Rodriguez, M.T.R., 2001. Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados de petróleo: toxicidade e a Legislação Brasileira. *RBRH – Rev. Bras. Recur. Hídricos* 6, 29-46.

Foster, S.J., Vincent, A.C.J., 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *J. Fish Biol.* 65, 1-61.

Frenzilli, G., Scarcelli, V., Del Barga, I., Nigro, M., Forlin, L., Bolognesi, C., Sturve, J., 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg Harbour. Mut. Res. 552, 187–195.

Guilherme, S., Santos, M.A., Gaivão, I., Pacheco, M., 2014. Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup® and Garlon®) in fish transient and reversible upon cessation of exposure? Aquat. Toxicol. 155, 213-221.

Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2012. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide-Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. Mutat. Res. 743, 1-9.

Gravato, C., Santos, M.A., 2003. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. Ecotoxicol. Environ. Saf. 55, 352-358.

Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants – Quo vadis? Trends Pharmacol. Sci. 32, 125-130.

Han, J., Won, E., Hwang, D., Shin, K., Lee, Y.S., Leung, K.M., Lee, S., Lee, J., 2014. Crude oil exposure results in oxidative stress-mediated dysfunctional development and reproduction in the copepod *Tigriopus japonicus* and modulates expression of cytochrome P450 (CYP) genes. Aquat. Toxicol. 152, 308-317

Hansen, B.H., Altin, D., Overjordet, I.B., Jager, T., Nordtug, T., 2013. Acute exposure of water soluble fractions of marine diesel on Arctic *Calanus glacialis* and boreal *Calanus finmarchicus*: effects on survival and biomarker response. Sci. Total Environ. 449, 276-284.

Heuser, V.D., Andrade, V.M., Peres, A., Braga, L.M.G.M., Chies, J. A. B., 2008. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. Cell. Biol. Int. 32, 1223-1229.

Holth, T.F., Eidsvoll, D.P., Farmen, E., Sanders, M.B., Martinez-Gomez, C., Budzinsk, H., Burgeot, T., Guilhermino, L., Hylland, K., 2014. Effects of water accommodated fractions of crude oils and diesel on a suite of biomarkers in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquat.Toxicol.* 154, 240-252.

Jiang Z.Y., Woolland A.C.S., Wolf S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange-comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids* 26, 777-860.

Keen J.H., Habig W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* 251, 6183-6188.

Kennish, M.J., 1992. *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects*. Londres: CRC Press, 494.

Kerambrun, E., Le Floch, S., Sanchez, W., Guyon, H.T., Meziane, T., Henry, F., Amara, R., 2012. Responses of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to acute concentrations of crude oil, as assessed by molecular and physiological biomarkers. *Chemosphere* 87, 692-702.

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Jr., Kirchner, E., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surreales, Vanhauwaert, A., Wakata, A., 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 167-172.

Kobayashi, H., Suguyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T., 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Commun.* 3, 103-115.

Kochhann, D., Brust, S.M.D.A., Domingos, F.X.V., Val, A.L., 2013. Linking hematological, biochemical, genotoxic, and behavioral responses to crude oil in the



- Amazon fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 65, 266-275.
- Koldewey, h.J., Martin-Smith, k. M., 2010. A global review of seahorse aquaculture. Aquaculture 302, 131-152.
- Koldewey, H., 2005. Seahorses in public aquariums. In: Koldewei, H. (Ed.), Syngnathid Husbandry in Public Aquariums. Project Seahorse, London.
- Krahn, M.M., Rhodes, L.D., Myers, M.S., Moore, L.K., MacLeod Jr., W.D., Malins, D.C., 1986. Associations between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophyrus vetulus*) from Puget Sound, Washington. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 15, 61-67.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutat. Res. 544, 43-64.
- Li, C., Zhou, S., Ren, Y., Jiang, S., Xia, B., Dong, X., 2016. Toxic effects in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicas* (Selenka) exposure to benzo[a]pyrene. Fish Shellfish Immunol. 59, 375-381
- Lin E.L.C., Cormier, S.M., Torsella, J.A., 1996. Fish biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites estimated by fixed-wavelength fluorescence: comparison with HPLC-fluorescent detection. Ecotox. Environ. Safe. 3, 16-23.
- Lüchmann, K.H., Mattos, J.J, Siebert, M.N., Granucci, N., Dorrington, T.S., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Sasaki, S., Daura-Jorge, F.G., Bainy, A.C.D., 2011. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. Aquat. Toxicol. 105, 652-660.

Luís, L.G., Guilhermino, L., 2012. Short-term toxic effects of naphthalene and pyrene on the common prawn (*Palaemon serratus*) assessed by a multi-parameter laboratorial approach: mechanisms of toxicity and impairment of individual fitness. *Biomarkers* 17, 275-285.

Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals, *Aquat. Toxicol.* 101, 13-30.

McCord J.E., Fridovich I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.

Marques, A., Custodio, M., Guilherme, S., Gaivao, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2014 (a). Assessment of chromosomal damage induced by a deltamethrin-based insecticide in fish (*Anguilla anguilla* L.) – A follow-up study upon exposure and post-exposure periods. *Pestic. Biochem. Physiol.* 113, 40-46.

Marques, A., Guilherme, S., Gaivao, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2014 (b). Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods - Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. *Comp. Biochem. Physiol. C* 166, 126-133.

Marnett, L.J., 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361-70.

Martins, M., Costa, P.M., Ferreira, A.M, Costa, M.H., 2013. Comparative DNA damage and oxidative effects of carcinogenic and non-carcinogenic sediment-bound PAHs in the gills of a bivalve. *Aquatic Toxicology* 142-143, 85-95.

Monteiro, V., Cavalcante, D.G.S.M., Viléla, M.B.F.A., Sofia, S.H., Martinez, C.B.R., 2011. *In vivo* and *in vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 104, 291-298.

Mohammed, A., 2005. Toxicity of water-soluble fractions of four fuels for *Metamysidopsis insularis*, an indigenous tropical mysid species. *Environ. Monit. Assess.* 104, 37-44.

Nahrgang, J., Camus, L., Carls, M.G., Gonzalez, P., Jonsson, M., Taban, I., Bechmann, R.K., Christiansen, J.S., Hop, H., 2010. Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to the water soluble fraction of crude oil. *Aquat. Toxicol.* 97, 234-242.

Neff, J.M., Ostazeski, S., Gardiner, W., Stejskal, I., 2000. Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1809-1821.

Negreiros, L.A., Silva, B.F., Paulino, M.G., Fernandes, M.N., Chippari-Gomes, A.R., 2011. Effects of hypoxia and petroleum on the genotoxic and morphological parameters of *Hippocampus reidi*. *Comp. Biochem. Phys. C.* 153, 408-414.

Nicodem, D. E., Guedes, C. L., B. Correa, R. J., 1998. Photochemistry of petroleum I. Systematic study of a Brazilian intermediate crude oil. *Mar. Chem.* 63, 93-104.

Niki, E., 2009. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free. Radic. Biol. Med.* 47, 469-484.

Nogueira, L., da Silva, D.G.H., Oliveira, T.Y.K., Rosa, J.M.C., Felício, A.A., de Almeida, E.A., 2013. Biochemical responses in armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. *Chemosphere* 93, 311-319.

Nogueira, L., Rodrigues, A.C.F., Trídico, C.P., Fossa, C.E., de Almeida, E.A., 2011. Oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil. *Environ. Monit. Assess.* 180, 243-255.

Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W.S., 2013. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 36, 539-547.

Ohnishi, S., Kawanishi, S., 2002. Double base lesions of DNA by a metabolite of carcinogenic benzo[a]pyrene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 290,778-782.

Oliva, M.,Gonzalez De Canales, L.M.,Gravato,C.,Guilhermino, L., Perales, J.A., 2010. Biochemical effects and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in senegal sole (*Solea senegalensis*) from a Huelva estuary (SW Spain). Ecotoxicol. Environ. Saf. 73,1843-1851.

Orbea, A., Ortiz-zarragoitia, M., Sole, M., Porte, C., Cajaraville, M.P., 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). Aquat. Toxicol 58, 75-98.

Oss, R.N., Baroni, V.D., Duarte, R.M., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Gomes, L.C., 2013. Recovery of fat snook, *Centropomus parallelus* (Teleostei: Perciformes) after subchronic exposure to copper. Comp. Biochem. Phys. C. 157, 306-309.

Pacheco, M., Santos, M.A., 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of (*Anguilla anguilla* L.) to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. Ecotoxicol. Environ. Saf 49, 64-75.

Palanikumar, L., Kumaraguru, A.K., Ramakritinan, C.M., Anand, M., 2012. Biochemical response of anthracene and benzo[a]pyrene in milkfish *Chanos chanos*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 75, 187-197.

Parry, J.M., Parry, E.M., 2006. The use of the in vitro micronucleus assay to detect and assess the aneugenic activity of chemicals, Mutat. Res. 607, 5-8.

Pathiratne, A., Hemachandra, C.K., 2010. Modulation of ethoxyresorufin O-deethylase and glutathione S-transferase activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by polycyclic aromatic hydrocarbons containing two to four rings: implications in biomonitoring aquatic pollution. *Ecotoxicology* 19, 1012-1018.

Pérez-Cadahía, B., Laffon, B., Pasaro, E., Mendez, J., 2004. Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled Prestige crude oil, *Comp. Biochem. Physiol. C* 138, 453-460.

Regoli, F., Giuliani, M.E., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 93, 106-117.

Regoli, F., Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquat. Toxicol.* 105, 56-66.

Ren, X., Pan, L., Lin, W., 2014. Toxic effects upon exposure to benzo[a]pyrene in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 194-207.

Rinaldi R., Eliasson E., Swedmark S., Morgenstern R., 2002. Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. *Drug. Metab. Dispos.* 30, 1053-1058.

Rodrigues, R.V., Miranda-Filho, K.C., Gusmão, E.P., Moreira, C.B., Sampaio, L.A., 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci. Total. Environ.* 408, 2054-2059.

Romero-Lopez, J., Lopez-Rodas, V., Costas, E., 2012. Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination. *Aquat. Toxicol.* 124-125, 227-237.

Rosa, I. L., Alves, R. R. N., Bonifácio, K. M., Mourão, J. S., Osório, F. M., Oliveira, T. P. R., Nottingham, M. C., 2005. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 1, 1-15.

Rosa, I. L.; Alves, R. R. N., 2007. Pesca e comércio de cavalos-marinhos (*Syngnathidae: Hippocampus*) no Norte e Nordeste do Brasil: subsídios para a conservação e manejo. In: Albuquerque, U. P. de; Alves, A. G. C.; Araújo, T. A. de S. (Org.). Povos e Paisagens. Recife: Núcleo de populações em ecologia e etnobotânica aplicada, pp 115-134.

Rose, W.L., French, B.L., Reichert, W.L., Faisal, M., 2001. Persistence of benzo[a]pyrene-DNA adducts in hematopoietic tissues and blood of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Aquat. Toxicol.* 52, 319-328.

Sadauskas-Henrique, H., Duarte, R.M, Gagnon, M.M., Almeida-Val, V.M.F., 2017. Validation of a suite of biomarkers of fish health in the tropical bioindicator species, tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Ecol. Indic.* 73, 443-451.

Sette, C.B., Pedrete, T.A., Felizzola, J., Nudi, A., Scofield, A.L, Wagener, A.L.R., 2013. Formation and identification of PAHs metabolites in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 91, 2-13.

Seuront, L., 2011. Hydrocarbon contamination decreases mating success in a marine planktonic copepod. *PloS One* 6, e26283.

Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E.P., George, S., James, M., Kullman, S.W., Van der Hurk, P., Willett, K., 2008. Biotransformation in fishes. In: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Taylor & Francis group, pp. 153-234.

Shi, H., Sui, Y., Wang, X., Luo, Y., Liangliang, J., 2005. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 140, 115-121.

Silva, C., Oliveira, C., Gravato, C., Almeida, J.R., 2013. Behaviour and biomarkers as tools to assess the acute toxicity of benzo(a)pyrene in the common prawn *Palaemon serratus*. Mar. Environ. Res. 90, 39-46.

Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Ecotoxicology 20, 1400-1410.

Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69, 112-120.

Siu, W.H.L., Cao, J., Jack, R.W., Wu, R.S.S., Richardson, B.J., Xu, L., Lam, P.K.S., 2004. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). Aquat. Toxicol. 66, 381-392.

Souza, T.S., Fontanetti, C.S., 2012. DNA damage of erythrocytes of fish *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), after acute exposure to river water receiving effluent from an oil refinery. J. Braz. Soc. Ecotoxicol. 7, 17-23.

Teles, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2003. *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin O-demethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and b-naphthoflavone. Ecotoxicol. Environ. Saf. 55, 98-107.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35, 206-221.

Tiburtius, E.R.L., Peralta-Zamora, P., Emmet, A., Leal, E.S., 2005. Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. Quim. Nova 28, 61-64.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.

Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat. Res.* 63, 36-43.

Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L., 2008. Acute effects of benzo(a)pyrene, anthracene and fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Sci. Total Environ.* 395, 87-100.

Vieira, M.C., Torronteras, R., Cordoba, F., Canalejo, A., 2012. Acute toxicity of manganese in gold fish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotox. Environ. Safe* . 78, 212-217.

Zhang, J.F., Sen, H., Xu, T.L., Wang, X.R., Li, W.M., Gu, Y.F., 2003. Effects of long term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 234-239.

Zhang, J.F., Wang, X.R., Guo, H.Y., Wu, J.C., Xue, Y.Q., 2004. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 110-116.

Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach, K., Buchet, V., Lebayon, N., Loizeau, V., Burgeot, T., Budzinski, H., Akcha, F., 2010. . Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). *Mar. Environ. Res.* 69, S71-3.

Willett, K.L., Gardinali, P.R., Lienesch, L.A., Di Giulio, R.T., 2000. Comparative metabolism and excretion of benzo(a)pyrene in 2 species of ictalurid catfish. *Toxicol. Sci.* 58, 68-76.



## **Capítulo IV**

**Efeitos da exposição à fração solúvel do óleo diesel nas respostas osmorregulatórias de cavalo marinho (*Hippocampus reidi*)**

## RESUMO

O óleo diesel é o derivado do petróleo de maior relevância em termos de risco ambiental por ser continuamente lançado nos ambientes costeiros, principalmente pela ampla utilização como combustível. Uma vez disponível para os organismos aquáticos, a sua fração solúvel pode ser absorvida pelo contato direto com epitélio branquial, considerado vital para os processos iônico e osmorregulatórios. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da exposição aguda e subcrônica à fração solúvel do óleo diesel nos mecanismos osmorregulatórios branquiais de *Hippocampus reidi*, além de avaliar a recuperação subsequente da exposição sobre tais parâmetros. Para tanto, os peixes (n = 8 por grupo) foram expostos a 50 % da FSD por 12, 24, 48 e 96 h (bioensaio agudo) e 168 e 360 h (bioensaio subcrônico). Adicionalmente, foi realizado um experimento de recuperação, onde os organismos permaneceram por 336 h livres do contaminante, após exposição por 168 h a 50 % FSD (totalizando 504 h de exposição). Ao término de cada protocolo experimental foi analisada a atividade branquial das enzimas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase, bem como a análise imunohistoquímica de células ricas em mitocôndrias (CRM). Aumentos significativos da atividade da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase foram observados após 48 e 96 h (exposição aguda) e 168 e 336 h (exposição subcrônica) em comparação a seus respectivos grupos controles. A atividade da H<sup>+</sup>-ATPase aumentou após 96 h e no ensaio subcrônico não foram observadas alterações em sua atividade. As CRM com imunomarcagem positiva para Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase foram encontradas exclusivamente na superfície do epitélio lamelar. A densidade dessas células foi significativamente superior em todos os grupos expostos em comparação aos seus respectivos grupos controles e, após o experimento de recuperação, o número de CRM diminuiu significativamente quando comparado com o grupo exposto por 168 h. Os resultados do presente trabalho indicam que a exposição à FSD resultou em ajustes morfofuncionais nas brânquias dos exemplares de *H. reidi*, na tentativa de manutenção do balanço hidro-eletrolítico como uma resposta compensatória frente à exposição ao contaminante.

Palavras-Chave: Contaminante, Syngnathidae, teleósteo, ionócitos, células ricas em mitocôndrias, biomarcadores, recuperação.

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação do ambiente aquático por derivados de petróleo como o óleo diesel ocorre principalmente por vazamentos de combustível durante o tráfego marinho de pequenas e grandes embarcações, rupturas de oleodutos, acidentes envolvendo caminhões transportadores das refinarias até os centros de distribuição, além de pequenos e contínuos vazamentos em tanques subterrâneos de armazenamento de combustível (Fingas e Brown, 2011; Vieira et al., 2008; Michaud et al., 2004; Silva et al., 2002). Uma vez em contato com o meio aquático, o óleo diesel forma uma fração solúvel em água (FSD), que difere substancialmente do composto original derramado, sendo normalmente mais tóxico devido aos intemperismos ocorridos, que alteram as proporções dos pesos moleculares dos compostos, que passam a conter hidrocarbonetos mais leves, voláteis e hidrossolúveis, o que os torna particularmente mais disponíveis para os animais na coluna d'água (Hansen et al., 2013; Incardona et al., 2012; Neff et al., 2000; Utvik, 1999).

Uma vez que as brânquias dos peixes estão em contato direto com o meio aquático, representando, portanto, a interface primária entre o organismo e o seu ambiente, são consideradas um órgão alvo para os poluentes (Dang et al., 2000). Além disso, as brânquias exercem funções vitais para a sobrevivência e são capazes de promover ajustes morfológicos e/ou funcionais para garantir a eficácia das trocas gasosas, equilíbrio ácido base e osmorregulação desses animais (Evans et al., 2005; Fernandes e Mazon, 2003). As células ricas em mitocôndrias (CRM) presentes nas brânquias são ionócitos especializados que desempenham um papel fundamental manutenção da homeostase, uma vez que representam os principais sítios de trocas iônicas (Paulino et al., 2012; Hwang e Lee, 2007).

Sabe-se que a abundância e as atividades das ATPases nas membranas das CRMs nas brânquias dos peixes podem ser alteradas em resposta à variáveis e diferentes pressões do ambiente aquático, sejam elas naturais ou antropogênica, como durante a ação de contaminantes (Agrahari e Gopal, 2008; Hochachka e Somero, 2002). Dessa forma, elas podem ser utilizadas de modo efetivo como um indicador de competência osmorregulatória (Shikano e Fugio, 1998).

A espécie *Hippocampus reidi* é um peixe conhecido por habitar regiões oceânicas temperadas e tropicais, e geralmente são encontradas em ambientes costeiros tais como estuários e manguezais. Além disso, são conhecidos por sua fraca mobilidade natatória, permanecendo ancorados à vegetação ou outros substratos pela cauda preênsil (Willadino et al., 2012; Rosa et al., 2005; Foster e Vincent, 2004;), o que os tornam animais particularmente suscetíveis às perturbações ambientais sejam elas naturais ou antropogênicas.

Uma vez que a presença de contaminantes pode interferir na homeostase iônica dos animais, afetando os processos associados ao equilíbrio hidro-eletrolítico, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da exposição aguda e subcrônica à fração solúvel do óleo diesel nas respostas osmorregulatórias nas brânquias de *H.reidi*, além de avaliar a recuperação subsequente da exposição sobre tais parâmetros.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Aquisição e manutenção dos exemplares de *Hippocampus reidi*

Indivíduos de *H. reidi* foram adquiridos de um criadouro (De Mar Company Ltda. ME, localizado em Guarapari, ES, Brasil) e os peixes foram aclimatados sob fotoperíodo natural (~ 12:12 horas) e aeração constante. A qualidade da água marinha foi rotineiramente monitorada para os parâmetros temperatura: 25-25,5 °C; condutividade: 48,6-50  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ; salinidade: 25-25,3 ppt; oxigênio dissolvido: 7,0-7,5  $\text{mg L}^{-1}$  e pH: 8,1-8,2 usando um condutivímetro YSI EC 300, oxímetro YSI OD 200 e um pHmetro YSI ph 100. Todo procedimento experimental foi realizado em conformidade com a Comissão de Bem Estar Animal da Universidade Vila Velha - UVV (número do protocolo: 261/2013).

### 2.2 Delineamento experimental

A simulação de derrame foi realizada em escala laboratorial de acordo com a metodologia proposta por Nicodem et al. (1998). O óleo diesel foi misturado a água salina (1:4 v/v) em um aquário de vidro que permaneceu exposto durante 24 h às intempéries, sob condições tropicais de insolação, durante 6 horas com radiação solar direta (das 10 até 16 h) em dias sem nuvens. Após a exposição, foi realizada a extração da fase orgânica e aquosa (FSD 100 %).

Foram realizados experimentos prévios (dados não publicados) que avaliaram o tempo de sobrevivência de *H. reidi* expostos à FSD diluída em 25 %, 50 % e 75 % durante 14 dias (equivalente a 336 h). Para cada tratamento foram utilizados seis indivíduos, expostos individualmente em aquários de vidro contendo 6 L de solução em sistema semi-estático com renovação total do meio a cada 96 h e aeração constante. A maior concentração testada nos experimentos prévios que não produziu efeito letal nos exemplares de *H. reidi* foi a de 50 % da FSD, e que por essa razão foi a concentração utilizada no presente trabalho.

Após aclimação, 112 peixes ( $5,73 \pm 0,16$  g e  $9,71 \pm 0,24$  cm) foram selecionados aleatoriamente e transferidos para aquários individuais de vidro (6 L), com

aeração constante, onde permaneceram por 24 h antes do início dos experimentos, realizado a partir de três protocolos experimentais:

- **Protocolo I:** Exposição aguda (EA) constituída por testes de toxicidade estáticos (sem renovação do contaminante) por 12, 24, 48 e 96 h.
- **Protocolo II:** Exposição subcrônica (ES) constituída por testes de toxicidade semi-estáticos por 168 e 336 h (equivalente a 7 e 14 dias), com renovação total do meio a cada 96 h.
- **Protocolo III:** Recuperação (R) constituído por teste de toxicidade semi-estático à FSD por 168 h, com renovação total do meio a cada 96 h, seguido de um tratamento de depuração total (exposição na ausência do contaminante) por 336 h, totalizando 504 h de duração. A recuperação após 168 h de exposição foi escolhida baseada em um trabalho anterior (Delunardo et al. 2013), onde indivíduos de *H. reidi* foram transferidos para aquários livres do contaminante após exposição aguda de 96 h ao petróleo bruto. Aqui, pretendeu-se avaliar a recuperação após um período maior de exposição, caracterizado por uma exposição subcrônica.

Imediatamente antes do início das séries experimentais, três litros da água dos aquários foram substituídos lentamente pela FSD, diluída para 50 %. Os aquários foram cobertos com uma película de plástico e tampa de vidro para evitar a volatilização dos compostos da FSD. Para cada período amostral dos protocolos I e II foram utilizados oito peixes por tratamento. Cada um dos períodos de exposição foi acompanhado simultaneamente por um grupo controle (água sem contaminante), também constituído por oito peixes expostos individualmente. O mesmo ocorreu para o protocolo III. O grupo controle foi amostrado simultaneamente ao seu respectivo grupo exposto ao término dos experimentos.

Ao final de cada protocolo experimental, os animais foram anestesiados com uma solução de benzocaína  $0,1 \text{ gL}^{-1}$  e insensibilizados por secção medular para retirada das brânquias. Os arcos branquiais foram removidos e fixados em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) para análise em microscopia de luz (ML). Sub-amostras do tecido branquial foram coletadas e imediatamente armazenadas a  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$

para as análises das ATPaes. Amostras de água foram coletadas nos tempos 0, 12, 24, 48 e 96 h para a caracterização dos hidrocarbonetos.

### 2.3 Quantificações químicas

Os hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) foram quantificados por cromatografia gasosa/detector de ionização de chama (Perkin- Elmer Clarus® 500), acoplado ao injetor headspace Turbomatrix HS 40 (Perkin- Elmer). Já os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram analisados por cromatografia gasosa/espectrômetro de massas (Perkin-Elmer Clarus® 500) (APHA, 2005).

Uma alíquota da fração solúvel em água do óleo diesel foi transferida para o frasco de 20 mL com *headspace* para análises de BTEX (Benzeno, etilbenzeno, tolueno e xileno) e 16 PAHs. 10 mL de água ultrapura e 20 mL de uma solução de padrão interno e *surrogate* (5 mg / mL em metanol) foram adicionados. As amostras foram analisadas utilizando cromatografia a gás com injetor automático e amostrador de *headspace* modelo TriPlus (Thermo Scientific) em um cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo Scientific) acoplado a um DSQ usando um espectrômetro de massa II (Thermo Scientific) com as seguintes configurações: incubação de amostra de 24 min a 70 ° C, volume amostral de 1 mL e condições cromatográficas e detecção com base nos métodos EPA 8260. Foram utilizadas as seguintes soluções de referência: VOC Mixture-Modified AccuStandard Cat M-502 A-R2-10X e VOA Standard Accu Cat M-8240/60-IS/SS-10X. Uma alíquota de amostra foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL, e o volume foi completado com diclorometano. Em seguida, foram adicionados 20 mL de uma solução de padrão interno e *surrogate* Standard Mix / Método8270-Surrogate Standard (25 mg / mL em diclorometano). As amostras foram analisadas utilizando cromatografia a gás com injetor automático e amostrador de *headspace* modelo TriPlus (Thermo Scientific) em um cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo Scientific) acoplado a um DSQ usando um espectrômetro de massa II (Thermo Scientific) com as seguintes configurações: volume de amostra de 3 mL, modo de injeção *splitless* e as condições cromatográficas e a detecção foram baseadas nos métodos EPA 8270. Foram utilizados os seguintes padrões de referência: Internal Standard Mix Standard AccuCat Z-014J, Method 8270-Surrogate Standard

AccuStandard Cat M-8270-SS, Fluoranthene Absolute Cat Standard 70183 e SVOC EPA 525 506 540 Cal Mix Supelco Cat. Foram determinados os seguintes PAHs: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benz [a] antraceno, benzo [b] fluoranteno, benzo [ghi] perileno, benzo [k] fluoranteno, benzo [a] pireno, criseno, dibenzo[a,h] antraceno Fenantreno, fluoreno, indeno (1,2,3-cd) pireno, naftaleno e pireno. A soma da quantidade total de todos estes compostos foi considerada o índice de total de PAHs.

## **2.4 Procedimentos bioquímicos**

Para a atividade das enzimas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase, amostras dos filamentos branquiais foram retiradas do freezer  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  e homogeneizadas (1:4, massa:volume) em tampão SEID (150 mM Sacarose, 50 mM Imidazol, 10 mM EDTA, 0,5 % ácido deoxicólico, pH 7,5). O ensaio foi realizado seguindo o protocolo descrito por Kültz e Somero (1995), que se baseia na oxidação do NADH pela reação enzimática acoplada à hidrólise do ATP. A taxa de oxidação do NADH foi monitorada em temperatura ambiente a 340 nm, a cada 10 segundos durante 10 minutos. As diferenças na inclinação do decaimento do NADH pelo tempo de reação entre as amostras incubadas sem inibidor (atividade atpásica total) e com inibidores específicos para a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Oubaina) e  $\text{H}^+$ -ATPase (N-etilmaleimida) foi utilizada para calcular as atividades específicas das ATPases, expressas como  $\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ .

O teor de proteína total ( $\text{mg proteína}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ) foi determinado utilizando o método de Bradford (1976) utilizando um espectrofotômetro no comprimento de 595 nm e albumina bovina ( $1 \text{mg mL}^{-1}$ ) como padrão.

## **2.5 Imunohistoquímica de células ricas em mitocôndria (CRM) nas brânquias**

Amostras de brânquias foram desidratadas em bateria crescente de etanol, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina histológica. A Técnica de imunohistoquímica para a marcação de CRM foi aplicada de acordo com Paulino (2012). Os cortes ( $8\text{ }\mu\text{m}$  espessura) foram desparafinizados, reidratados e lavados com tampão tris salino + triton (TBS-T 0,5 mM, pH 7,4) diluído 1:10 e incubado em soro normal de cabra 20 % (Gibco, Invitrogen) a fim de bloquear sítios inespecíficos. Em



seguida, os cortes foram incubados em *overnight* em câmara úmida a 20 °C com o primeiro anticorpo ( $\alpha 5$ ) - anti NKA diluído 1:300 (University of Iowa, USA). Após esse processo, os cortes foram incubados com o segundo anticorpo (Goat Anti Mouse Peroxidase - GAMPO - Chemicon International, USA), diluído 1:100. O complexo foi visualizado utilizando a coloração com DAB-Ni 0,5 % (3,3'-diaminobenzidina + Sulfato Níquel Amoniacal, Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

## **2.6 Análises estatísticas**

A premissa de normalidade foi verificada pelo teste de D'Agostino & Pearson. Os resultados obtidos para cada grupo experimental foram comparados com seu respectivo grupo controle utilizando-se o teste paramétrico t-Student não pareado. Os grupos expostos foram comparados entre si por meio de uma análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prisma 5.0 e foram considerados significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Análise química da água

Foi constatado que a FSD 50 % apresentou uma concentração significativamente superior ( $p \leq 0,001$ ) de hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) em relação hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), além disso, as concentrações de todos os hidrocarbonetos quantificados não permaneceram estáveis durante os períodos de amostragem, diminuindo progressivamente (**Tabela 1**). O xileno foi o representante dos BTEX com os maiores valores quantificados, seguidos pelo tolueno, etil-benzeno e benzeno. De todos os 16 HPAs analisados, apenas cinco puderam ser quantificados, de forma que o naftaleno foi o composto mais abundante, seguidos pelo fenantreno, fluoreno, antraceno e benzo(a)antraceno (**Tabela 1**).

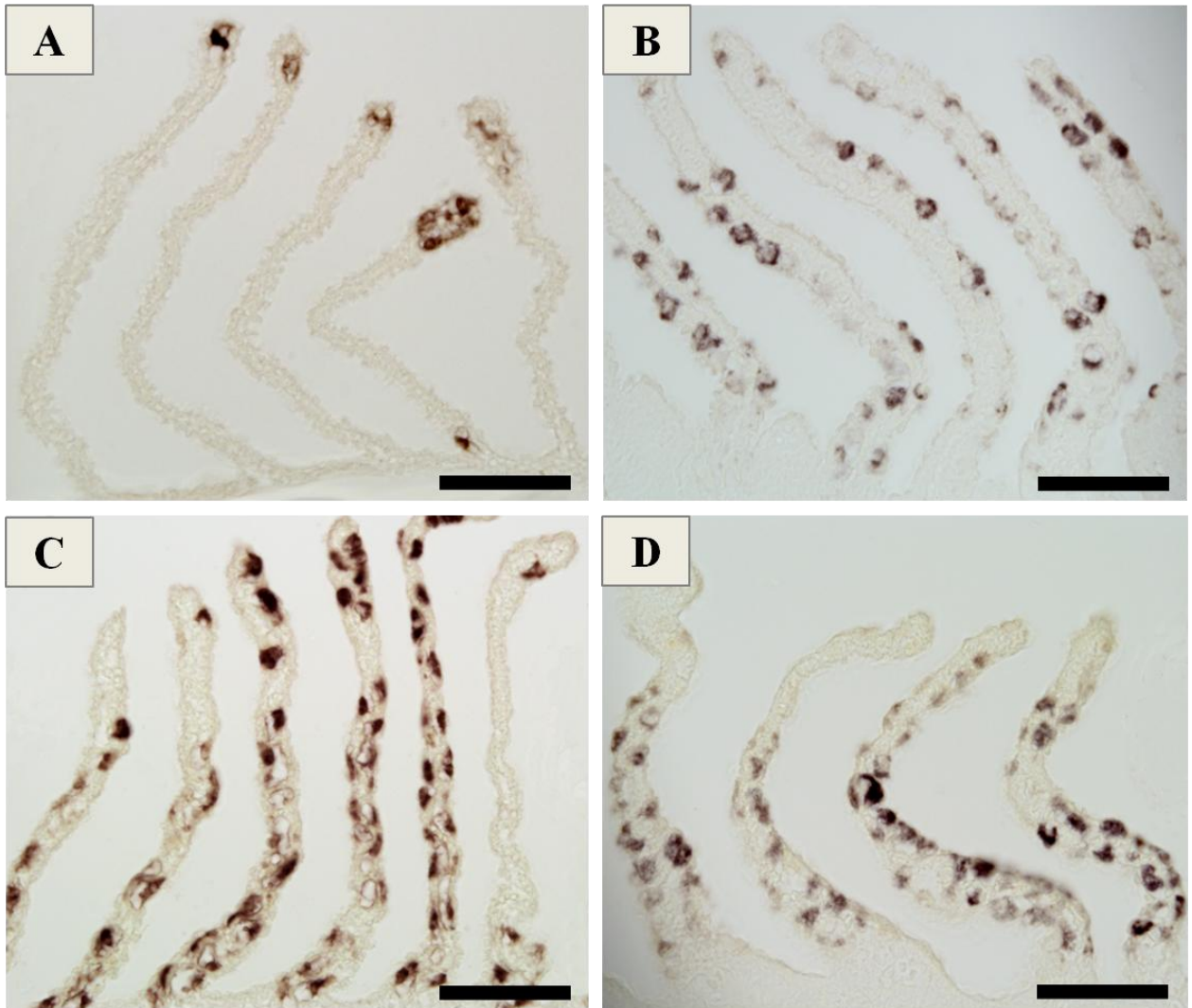
#### 3.2 Imunomarcção de células ricas em mitocôndria nas brânquias

Foi constatado que as CRM com imunomarcção positiva para  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foram encontradas exclusivamente na superfície do epitélio lamelar das brânquias de *H. reidi* (**Figura 1**). Quando comparado com os respectivos grupos controles, a densidade dessas células aumentou 1,6 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) após 12 h e após 24 h, 1,7 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) após 48h e 2,3 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) após 96 h (**Figura 2**). Ainda com relação à exposição aguda, foram encontradas diferenças entre os tempos de 12 h e 96 h ( $p \leq 0,0001$ ), 24 h e 96 h ( $p \leq 0,0001$ ) e 48 h e 96 h ( $p = 0,0002$ ). A exposição subcrônica revelou um aumento de 1,9 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) na densidade de CRM após 168 h e 2,1 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) após 336 h. em comparação a seus respectivos controles. Além disso, foram encontradas diferenças ( $p = 0,0356$ ) entre esses dois períodos de exposição (**Figura 2**). Após o protocolo de recuperação, o número de CRMs diminuiu 1,3 vezes ( $p \leq 0,0001$ ) quando comparado com o grupo exposto por 168 h (**Figura 2**).

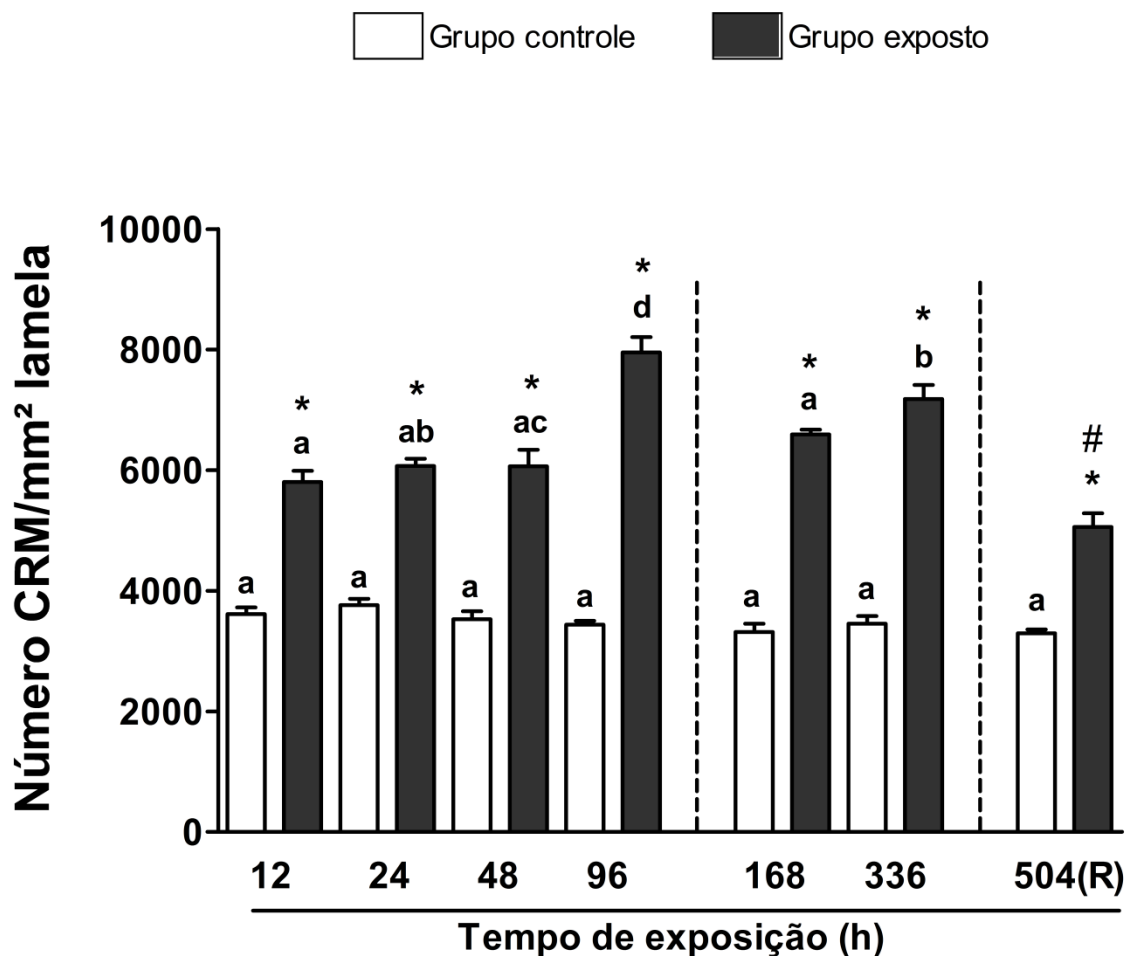
**Tabela 1.** Quantificação por cromatografia gasosa dos hidrocarbonetos monoaromáticos e policíclicos aromáticos (BTEX e HPAs) presentes em 50 % da fração solúvel do diesel (FSD) em diferentes períodos de exposição.

Hidrocarbonetos ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	50 % FSD				
	0 h	12 h	24 h	48 h	96 h
<b>BTEX</b>					
Benzeno	1172,6	25,1	10,9	--	--
Etil-benzeno	1314,21	43,2	19,57	--	--
Tolueno	1813,86	55,91	27,71	--	--
Xileno	2219,51	85,9	52,6	29,1	11,3
<b>BTEX total</b>	6520,18	210,11	110,78	29,1	11,3
<b>HPAs</b>					
Acenaftileno	--	--	--	--	--
Acenafteno	--	--	--	--	--
Antraceno	0,06	0,03	0,02	0,02	--
Benzo(a)antraceno	0,03	0,01	--	--	--
Benzo(b)fluoranteno	--	--	--	--	--
Benzo(k)fluoranteno	--	--	--	--	--
Benzo(a)pireno	--	--	--	--	--
Benzo(ghi)perileno	--	--	--	--	--
Criseno	--	--	--	--	--
Dibenzo[a,h]antraceno	--	--	--	--	--
Fenantreno	0,23	0,12	0,1	0,09	0,04
Fluoranteno	--	--	--	--	--
Fluoreno	0,18	0,12	0,11	0,06	0,05
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	--	--	--	--	--
Naftaleno	29,4	2,98	2	0,94	0,19
Pireno	--	--	--	--	--
<b>HPAs total</b>	29,9	3,35	2,23	1,11	0,28

Limite de quantificação: BTEX  $< 5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; PAHs  $< 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ . -- Abaixo do limite de quantificação. Limite de detecção: BTEX  $< 2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ; PAHs  $< 0,005 \mu\text{g L}^{-1}$



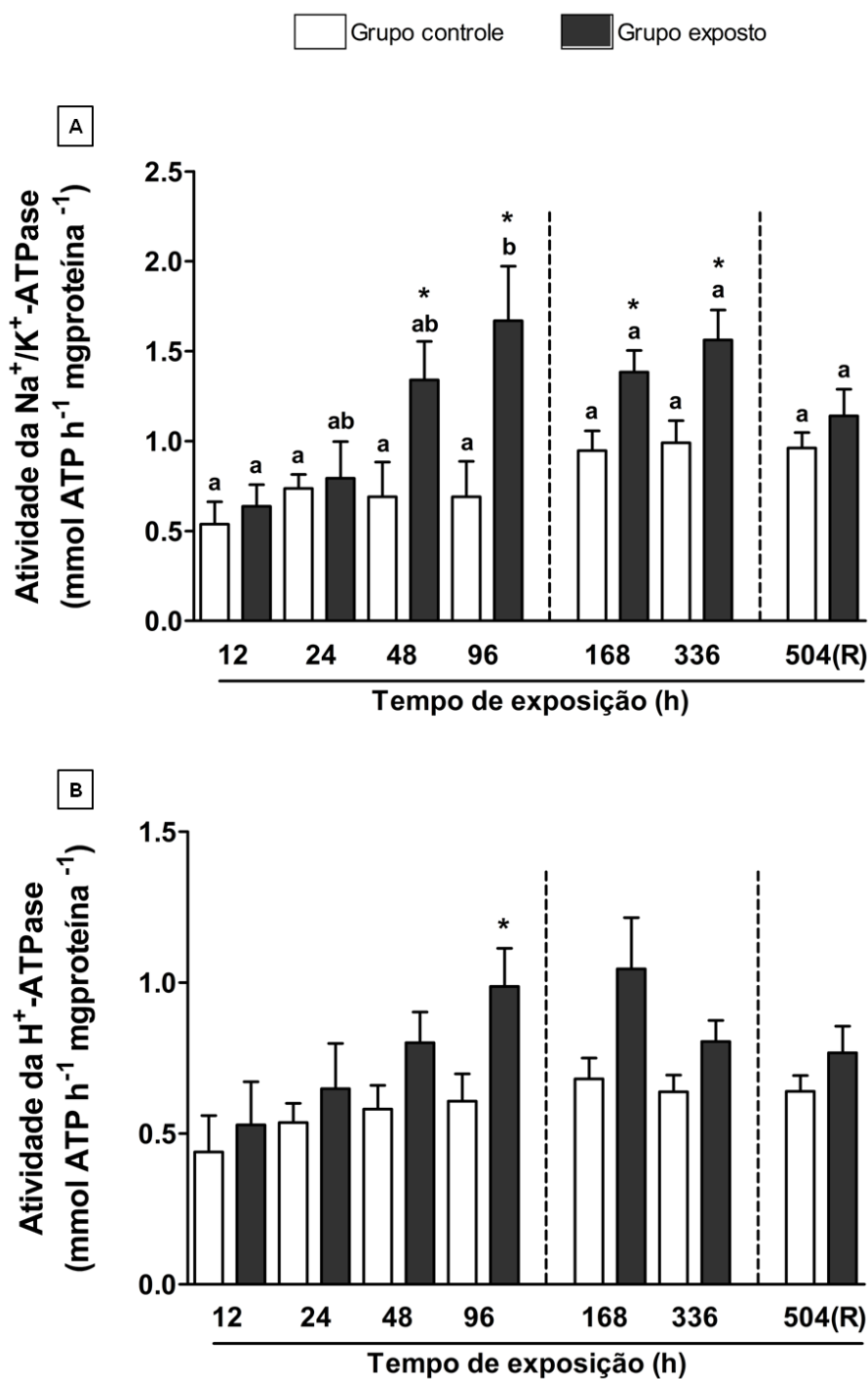
**Figura 1.** Imunohistoquímica de células ricas em mitocôndrias em lamelas branquiais de *Hippocampus reidi* expostos à 50 % da fração solúvel do diesel (FSD) em diferentes protocolos experimentais: (A) grupo controle, 12 h; (B) exposição aguda, 48 h; (C) exposição subcrônica, 168 h; (D) recuperação, 504 h. Barra de escala: 20  $\mu$ m.



**Figura 2.** Densidade de células ricas em mitocôndrias imunomarcadas nas lamelas branquiais de *Hippocampus reidi* expostos à fração solúvel do diesel (FSD) diluída 50 % em diferentes protocolos experimentais: agudo, subcrônico e recuperação (R). Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os períodos de exposição dentro de um mesmo grupo experimental (controle ou exposto). \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle dentro de um mesmo período de exposição. # indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o grupo exposto por 168 h e o grupo do protocolo experimental de recuperação.

### 3.3 Atividade das enzimas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase nas brânquias

A atividade da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aumentou significativamente nas brânquias de *H. reidi* após exposição aguda por 48 h (1,9 vezes,  $p = 0,0420$ ) e 96 h (2,4 vezes  $p = 0,0156$ ) à 50 % da FSD, em relação aos respectivos grupos controles. Quando os tratamentos foram comparados entre si, foi observada diferença entre os tempos de 12 e 96 h ( $p = 0,0055$ ) (**Figura 3A**). Durante a exposição subcrônica, foi observado que o incremento da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ocorreu tanto para o período de 168 h (1,5 vezes,  $p = 0,0185$ ) quanto 336 h (1,6 vezes,  $p = 0,0156$ ) de exposição, respectivamente, em comparação aos grupos controles (**Figura 3A**). O experimento de recuperação não evidenciou nenhuma alteração da atividade enzimática da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase em comparação ao grupo exposto por 168 h (**Figura 3A**). Com relação à atividade da H<sup>+</sup>-ATPase houve aumento de 1,6 vezes ( $p = 0,0276$ ) apenas durante o tempo de 96 h em relação ao seu controle (**Figura 3B**). Para os demais protocolos não foram observadas variações significativas (**Figuras 3B**).



**Figura 3.** Atividade das enzimas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (A) e  $\text{H}^+$ -ATPase (B) em brânquias de *Hippocampus reidi* expostos à fração solúvel do diesel (FSD) diluída 50 % em diferentes protocolos experimentais: agudo, subcrônico e recuperação (R). Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os períodos de exposição dentro de um mesmo grupo experimental (controle ou exposto). \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle dentro de um mesmo período de exposição.

## 4. DISCUSSÃO

A fração solúvel do petróleo e de seus derivados apresenta uma elevada capacidade de provocar toxicidade aguda para a vida marinha, em geral superior à sua porção originalmente derramada e insolúvel, devido à elevada concentração de compostos solúveis que são mais rapidamente ingeridos ou absorvidos pela biota (Beyer et al., 2016; Abbriano et al., 2011). De fato, alguns trabalhos demonstram que os componentes do óleo diesel são prejudiciais para animais aquáticos, especialmente para peixes (Holth et al., 2014; Nogueira et al., 2013, 2011; Rodrigues et al., 2010; Simonato et al., 2008). De modo que, animais de hábito bentônico ou de capacidade de locomoção reduzida, como a espécie utilizada neste estudo, tornam-se mais suscetíveis aos efeitos deletérios da exposição a essa classe de contaminante.

Após exposição à 50 % da FSD, por diferentes períodos de tempo, foram observadas alterações nas respostas osmorregulatórias em brânquias de *H. reidi*, e uma necessidade de ajustes morfofuncionais no sentido de preservar a homeostase dos indivíduos frente aos agentes tóxicos como os hidrocarbonetos presentes no contaminante, principalmente por meio da proliferação de CRM durante exposição aguda. Um resultado semelhante foi encontrado por Simonato et al., (2013) trabalhando com o peixe de água doce Curimatá, *Prochilodus lineatus*, expostos de forma aguda à fração solúvel da gasolina diluída à 5 %. Esses pesquisadores relataram um aumento significativo na densidade de CRM nas lamelas das brânquias desses organismos após 24 h de exposição, em comparação ao grupo controle. Diante disso é possível sugerir que até mesmo baixas concentrações dessa classe de contaminante se mostraram responsáveis por provocar um desequilíbrio nos mecanismos de troca iônica desses organismos após um curto prazo de exposição.

É provável que o aumento no número de CRM observado logo nas primeiras horas de contaminação esteja relacionado à influência do cortisol nos organismos expostos. Sabe-se que o cortisol é considerado um dos hormônios de ampla atuação em peixes, desempenhando entre outros, um papel fundamental na regulação iônica e osmótica (Wendelaar Bonga, 1997). Ele interage com o hormônio de crescimento GH/IGF-I em organismos marinhos, e com a prolactina em espécies dulcícolas, no sentido de promover ajustes fisiológicos para à manutenção da homeostase iônica do



organismo (McCormick, 2003). Além disso, o cortisol está associado às situações de estresse e pode responder à presença de agentes xenobióticos aumentando drasticamente suas concentrações plasmáticas (Mommensen et al., 1999; Uchida e Kaneko, 1996).

Vale ressaltar ainda que foi constatada que a distribuição das CRM ocorreu exclusivamente no epitélio das lamelas secundárias, não sendo observadas no filamento ou na região interlamelar, o que, de acordo com Evans et al. (2005) é o mais comum. Entretanto, essa resposta compensatória pode reduzir o espaço interlamelar e aumentar a distância de difusão água-sangue, o que pode causar a redução da eficácia das trocas gasosas e causar um desequilíbrio hidroeletrólítico (Paulino et al., 2012). Estudos anteriores demonstraram diferenças na distribuição dessas células em outros teleósteos (Hwang e Lee, 2007), de modo que foram descritas a sua ocorrência apenas nos filamentos branquiais (Uchida et al., 2000; Lin et al., 2004; Lee et al., 1996), nos filamentos e nas lamelas (Chen et al., 2004; Lin et al., 2004; McCormick et al., 2003; Lin et al., 2003; Varsamos et al., 2002; Hirai et al., 1999; Uchida et al., 1996) e raramente encontradas apenas na superfície das lamelas (Evans et al., 2005; Perry, 1997;). Uma hipótese sugerida para explicar esse peculiar achado relaciona-se ao notável formato de tufo dos filamentos branquiais de *H. reidi*, resultado principalmente de sua estrutura curta e “achatada” e de suas lamelas amplamente projetadas, portanto, a localização das CRM nas lamelas proporcionaria uma maior área de troca com o meio e aperfeiçoaria a secreção iônica.

Variações físico-químicas do ambiente aquático pela ação de compostos xenobióticos também podem modular a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, presentes na membrana basolateral das CRM, levando às alterações no balanço iônico e osmótico dos organismos. Isso pode ocorrer por esses compostos produzirem injúrias físicas nos órgãos envolvidos na osmorregulação, ou devido à interrupção de energia produzida pelas vias metabólicas, ou ainda interagindo diretamente com as enzimas e seus processos de transporte ativo (Paulino et al., 2012; Yan et al., 2007; Vinagre et al., 2002; Watson e Beamish, 1980). Alterações na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, assim como na densidade de CRM observadas nesse trabalho, reforçam a hipótese de que foram necessários ajustes morfofuncionais dos animais frente ao contaminante, numa tentativa de manter o equilíbrio osmótico e iônico. Entretanto, no período de 12 e 24 h, a

elevada densidade das CRM não foi acompanhada por aumentos concomitantes das atividades das ATPases. Possivelmente, a capacidade de transporte de íons dessas enzimas pode não estar relacionada exclusivamente com o número total de CRM, assim relatado por Fernandes e Perna-Martins (2002), uma vez que essas células podem estar em diferentes estágios do ciclo celular, apresentando-se imaturas ou em degeneração, o que reduz sua capacidade de transporte.

Interessante notar que durante o experimento de recuperação, a densidade das CRM apresentou uma média inferior àquela encontrada para o grupo exposto por 168 h, todavia, não foi observada diminuição na atividade da NKA. De acordo com Wendelaar Bonga (1997), a exposição a agente xenobióticos pode promover a apoptose das CRM e isso não necessariamente fará com que a atividade da NKA seja reduzida, devido ao fato das células restantes compensarem a ausência das outras. Além disso, a diminuição das CRM pode estar associada a uma resposta do organismo no sentido de prevenir prejuízos durante a respiração, conforme sugerido por Simonato et al. (2013).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a exposição aos agentes tóxicos contidos na FSD, tais como hidrocarbonetos monoaromáticos, conhecidos por BTEX, induziram a necessidade de ajustes morfofuncionais como uma resposta compensatória frente à exposição ao contaminante, principalmente após exposição aguda. Essa hipótese foi corroborada pelo retorno dos valores médios da densidade de CRM, após o período de recuperação da exposição.

## 6. REFERÊNCIAS

As referências deste capítulo estão de acordo com as normas do periódico “Ecotoxicology and Environmental Safety”.

Abbriano, R.M., Carranza, M.M., Hogle, S.L., Levin, R.A., Netburn, A.N., Seto, K.L., Snyder, S.M., Franks, P.J.S., 2011. Deepwater Horizon oil spill: a review of the planktonic response. *Oceanography* 24, 294-301.

Agrahari, S., Gopal, K., 2008. Inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) exposed to monocrotophos. *Pest. Biochem. Physiol.* 92, 57-60.

APHA., 2005. Standard methods for the examination of water and waste water, 21<sup>st</sup> edn. American Public Health Association, Washington, DC.

Beyer, J., Trannum, H.C., Bakke, T., Hodson, P.V., Collier, T.K., 2016. Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: A review. *Marine Poll. Bull.* 110, 28-51.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Chen, C.N., Lin, L.Y., Lee, T.H., 2004. Ionocyte distribution in gills of the Euryhaline milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal, 1775). *Zool. Stud.* 43, 772-777.

Dang, Z., Lock, R.A.C., Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., 2000. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *J. Exp. Biol.* 203, 379-387.

Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85, 97-177.

Fernandes, M.N., Mazon, F., 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A.L., Kapoor, B.G., Ed. Fish adaptations. Enfield: Science Publishers, p. 203-231.

Fernandes, M.N., Perna-Martins, S.A., 2002. Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the Gill of the armored catfish, *Hypostomus tietensis* (Loricariidae). Acta. Zool. 83, 321-328.

Fingas, M., Brown, C.E., 2011. Oil spill remote sensing: a review. In: Fingas, M. (Ed.), Oil Spill Science and Technology: Prevention, Response and Clean up, first ed. Gulf professional Publishing, Burlington, p. 7-48.

Foster, S.J., Vincent, A.C.J., 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. J. Fish Biol. 65, 1-61.

Hansen, B.H., Altin, D., Overjordet, I.B., Jager, T., Nordtug, T., 2013. Acute exposure of water soluble fractions of marine diesel on Arctic *Calanus glacialis* and boreal *Calanus finmarchicus*: effects on survival and biomarker response. Sci. Total Environ. 449, 276-284.

Hirai, N., Tagawa, M., Kaneko, T., Seikai, T., Tanaka, M., 1999. Distributional changes in branchial chloride cells during freshwater adaptation in Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. Zool. Scr. 16, 43-49.

Hochachka P.W., Somero G.N. 2002. Biochemical Adaptation - Mechanisms and Process in Physiological Evolution. Oxford University Press, New York, p. 466.

Holth, T.F., Eidsvoll, D.P., Farmen, E., Sanders, M.B., Martinez-Gomez, C., Budzinsk, H., Burgeot, T., Guilhermino, L., Hylland, K., 2014. Effects of water accommodated fractions of crude oils and diesel on a suite of biomarkers in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquat.Toxicol. 154, 240-252.

Hwang, P.P., Lee, T.H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp. Biochem. Phys. A* 148, 479-497.

Incardona, J.P., Vines, C.A., Linbo, T.L., Myers, M.S., Sloan, C.A., Anulacion, B.F., Boyd, D., Collier, T.C., Morgan, S., Cherr, G.N., Scholz, N.L., 2012. Potent phototoxicity of marine bunker oil to translucent herring embryos after prolonged weathering. *PLoS ONE* 7 (2), e30116

Katoh F., Hyodo S., Kaneko T., 2003. Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branchial mitochondria-rich cells of killifish *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment. *J. Exp. Biol.* 206, 793-803.

Lee, T.H., Hwang, P.P., Lin, H.C., Huang, F.L., 1996. Mitochondria-rich cells in the branchial epithelium of the teleost, *Oreochromis mossambicus*, acclimated to various hypotonic environments. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 513-523.

Lin, Y.M., Chen, C.N., Lee, T.H., 2003. The expression of gill Na, K-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water. *Comp. Biochem. Physiol. A* 135, 489-497.

Lin, C.H., Tsai, R.S., Lee, T.H., 2004. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. *Comp. Biochem. Physiol. A* 138, 287-295.

McCormick, S.D., Sundell, K., Bjornsson, B.T., Brown, C.L., Hiroi, J., 2003. Influence of salinity on the localization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the Hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*). *J. Exp. Biol.* 206, 4575-4583.

Michaud, L., Lo Giudice, A., Saitta, M., De Domenico, M., Bruni, V., 2004. The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 405-409.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of actions, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish* 9, 211-268.

Neff, J.M., Ostazeski, S., Gardiner, W., Stejskal, I., 2000. Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1809-1821.

Nicodem, D. E., Guedes, C. L., B. Correa, R. J., 1998. Photochemistry of petroleum I. Systematic study of a Brazilian intermediate crude oil. *Mar. Chem.* 63, 93-104.

Nogueira, L., da Silva, D.G.H., Oliveira, T.Y.R., da Rosa, J.M.C., Felício, A.A., de Almeida, E.A., 2013. Biochemical responses in armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. *Chemosphere* 93, 311-319.

Nogueira, L., Rodrigues, A.C.F., Trídico, C.P., Fossa, C.E., Almeida, E.A., 2011. Oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil. *Environ. Monit. Assess.* 180, 243-255.

Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Fernandes, M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a Neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80, 6-13.

Perry, S.F., 1997. The Chloride Cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 325-47.

Rodrigues, R.V., Miranda-Filho, K.C., Gusmão, E.P., Moreira, C.B., Sampaio, L.A., 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci. Total. Environ.* 408, 2054-2059.

Rosa, I. L., Alves, R. R. N., Bonifácio, K. M., Mourão, J. S., Osório, F. M., Oliveira, T. P. R., Nottingham, M. C., 2005. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. J. Ethnobiol. Ethnomed. 1,1-15.

Shikano, T., Fujio, Y. Immunolocalization of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -atpase in branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and freshwater acclimation. J. Exp. Biol. 201, 3031-3040, 1998.

Silva, R.L.B., Barra, C.M., Monteiro, T.C.N., Brilhante, O.M., 2002. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. Cad. Saúde Pública. 18, 1599-1607.

Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2013. Physiological effects of gasoline on the freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). Neotrop. Ichthyol. 11, 683-691.

Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69, 112-120.

Uchida, K., Kaneko, T., Yamauchi, K., Hirano, T., 1996. Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamellae and changes in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. J. Exp. Zool. 276, 193-200.

Uchida, K., Kaneko, T., Miyazaki, H., Hasegawa, S., Hirano, T., 2000. Excellent salinity tolerance of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*): elevated chloride cell activity in the branchial and opercular epithelia of the fish adapted to concentrated seawater. Zool. Sci. 17, 149-160.

Utvik, T.I.R., 1999. Chemical characterisation of produced water from four offshore oil production platforms in the North Sea. Chemosphere 39, 2593-2606.



Varsamos, S., Diaz, J.P., Charmantier, G., Flik, G., Blasco, C., Connes, R., 2002. Branchial chloride cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) adapted to fresh water, seawater, and doubly concentrated seawater. *J. Exp. Zool.* 293, 12-26.

Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L., 2008. Acute effects of benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Sci. Total Environ.* 395, 87-100.

Vinagre, T. M., Alciati, J. C., Yunes, J. S. A., Richards, J., Bianchini, A., Monserrat J. M. 2002. Effects of extracts from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ion-regulation and gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and K<sup>+</sup> dependent phosphatase activities of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Physiol. Biochem. Zool.* 75, 600-608.

Yan J.J.; Chou M.Y.; Kaneko T.; Hwang P.P. 2007 Gene expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in zebrafish H<sup>+</sup>-ATPase-rich cells during acclimation to low-Na<sup>+</sup> and acidic environments. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 293, 1814-1823.

Watson, T. A., Beamish, F. W. H., 1980. Effects of zinc on branchial ATPase activity in vivo in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 66, 77-82.

Wendelaar Bonga, S. E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.

Willadino, L., Souza-Santos, L. P., Mélo, R. C. S., Brito, A. P., Barros, N. C. S., Araújo-Castro, C. M. V., Galvão, D. B., Gouveia, A., Regis, C. G., Cavalli, R. O., 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. *Aquaculture* 360-361, 10-16.

# **Capítulo V**

## **Considerações Finais**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a realização deste trabalho foi constatado que as brânquias de *H. reidi* apresentam a mesma organização básica encontradas nos demais teleósteos, mas com a peculiar presença das “cristas” formadas por evaginações da superfície apical das CPVs, bem como pela presença de CRM exclusivamente no epitélio lamelar. A que a exposição a 50 % da FSD, constituída majoritariamente por BTEX, alterou a morfologia do epitélio branquial logo nas primeiras 24 h de exposição, seguindo progressivamente para exposição subcrônica. Estas alterações foram atenuadas após o protocolo de recuperação, entretanto, ela se deu de maneira parcial, de modo que um período maior de depuração é necessário para a restauração total do tecido branquial.

Verificou-se ainda uma necessidade de ajustes metabólicos e morfofuncionais no organismo-teste, na tentativa de manutenção homeostática como uma resposta compensatória frente aos danos causados pela exposição ao contaminante. Essa hipótese foi corroborada pelo retorno dos valores médios da LPO, do ID e da frequência de MN e da densidade média de CRM após o período de recuperação da exposição.

Diante disso, fica claro que o conjunto de biomarcadores utilizados foi eficiente em mostrar os efeitos agudos e subcrônicos da presença dos hidrocarbonetos em peixes e a espécie *H. reidi* que, apesar de figurar nas principais listas internacionais de espécies ameaçadas de extinção, provou ser um excelente organismo bioindicador em estudos ecotoxicológicos. Salvo que neste estudo todos os organismos utilizados foram comercializados de um criadouro apropriado, não impactando a população de cavalos-marinhos residentes na Baía do Espírito Santo, Vitória-ES ou de qualquer outra região costeira.