

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

**EFEITOS DO MANGANÊS NAS RESPOSTAS GENOTÓXICAS E  
BIOQUÍMICAS EM JUVENIS DE ROBALO PEVA (*Centropomus  
parallelus* – Poey, 1960) EXPOSTOS A TRÊS DIFERENTES  
TEMPERATURAS**

**BÁRBARA LOUISE LOSADA TUZUKI**

**VILA VELHA**  
**MARÇO/2013**

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

**EFEITOS DO MANGANÊS NAS RESPOSTAS GENOTÓXICAS E  
BIOQUÍMICAS EM JUVENIS DE ROBALO PEVA (*Centropomus  
parallelus* – Poey, 1960) EXPOSTOS A TRÊS DIFERENTES  
TEMPERATURAS**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia de Ecossistemas.

**BÁRBARA LOUISE LOSADA TUZUKI**

**VILA VELHA**  
**MARÇO/2013**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

T968e Tuzuki, Bárbara Louise Losada.

Efeitos do manganês nas respostas genotóxicas e bioquímicas em juvenis de robalo peva (*Centropomus parallelus* – Poey, 1960) expostos a três diferentes temperaturas / Bárbara Louise Losada Tuzuki. – 2013.

45 f.: il.

Orientadora: Adriana Regina Chippari-Gomes.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Robalo (peixe) - Contaminação. 2. Manganês. 3. Toxicologia genética. I. Chippari-Gomes, Adriana Regina. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.08527

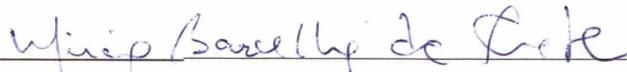
**BÁRBARA LOUISE LOSADA TUZUKI**

**EFEITOS DO MANGANÊS NAS RESPOSTAS GENOTÓXICAS E BIOQUÍMICAS  
EM JUVENIS DE ROBALO PEVA (*Centropomus parallelus* – Poey, 1960)  
EXPOSTOS A TRÊS DIFERENTES TEMPERATURAS**

Dissertação apresentada a  
Universidade Vila Velha, como  
pré-requisito do Programa de Pós  
graduação em Ecologia de  
Ecossistemas, para a obtenção do grau  
de Mestre em Ecologia de  
Ecossistemas.

Aprovada em 26 de março de 2013,

Banca Examinadora:



**Dr<sup>a</sup> Mercia Barcellos da Costa (UFES)**



**Dr. Werther Krohling (UVV)**



**Dr<sup>a</sup> Adriana Regina Chippari Gomes (Orientadora/UVV)**

“Não importa onde você parou, em que momento da vida você cansou, o que importa é que sempre é possível e necessário "Recomeçar".  
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo.  
É renovar as esperanças na vida e o mais importante: acreditar em você de novo.  
Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado.  
Chorou muito? Foi limpeza da alma.  
Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia.  
Sentiu-se só por diversas vezes? É por que fechaste a porta até para os outros.  
Acreditou que tudo estava perdido? Era o início da tua melhora.  
Recomeçar! Hoje é um bom dia para começar novos desafios.”

(Paulo Roberto Gaefke)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço...

Primeiramente à minha família pelo apoio dado, paciência com minhas alterações bruscas de humor e por sempre estarem presentes na minha vida.

Ao Josmar Luiz Dias Júnior, pela paciência com as TPMs causadas pelo mestrado, pela ajuda para cuidar dos peixes e me acompanhar até a UVV todo final de semana e pelo apoio dado.

À minha orientadora, Adriana Regina Chippari-Gomes, pela dedicação, pelo aprendizado, por toda ajuda e paciência que me foi disponibilizada.

Aos colegas de laboratório, Alexandra Veronez e Vinícius D. Baroni pelos ensinamentos, pela ajuda e pela paciência de ouvir os seus nomes o tempo todo.

Às colegas de trabalho, Luciana Nascimento e Carolina Patrício, pela ajuda durante o projeto e companheirismo para cuidar dos nossos filhos (os peixes).

Ao Dr. Alessandro, pela grande ajuda durante todo o mestrado, pelo apoio e compreensão com todos meus problemas e pelos ensinamentos.

Por todos os professores, doutores, mestres e técnicos que me ajudaram a caminhar e chegar onde estou.

Ao Programa de Pós-Graduação strictu sensu em Ecologia de Ecossistemas da UVV, pela experiência e oportunidade dada.

A FAPES pela concessão da bolsa de estudos para a realização do projeto.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	15
METODOLOGIA.....	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS .....	36

## RESUMO

Tuzuki, Bárbara Louise Losada (M.Sc.), Universidade Vila Velha – ES, março de 2013. **Efeitos do manganês nas respostas genotóxicas e bioquímicas em juvenis de robalo peva (*Centropomus parallelus* – Poey, 1960) expostos a três diferentes temperaturas.**

Orientadora: Dr. Adriana Regina Chippari-Gomes

O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do manganês quando associado a três diferentes temperaturas (24, 27 e 32oC) por 96 horas em juvenis da espécie de peixe *Centropomus parallelus*, por meio de respostas genotóxicas (teste do micronúcleo e ensaio cometa) e bioquímicas (enzimas GST e CAT). Nas análises genotóxicas, foi encontrado aumento significativo na quantidade de eritrócitos com micronúcleo nos animais expostos ao manganês (Mn) quando comparados aos seus respectivos grupos controles, nas três temperaturas. Foi observado também aumento significativo da incidência de danos no DNA nos grupos expostos a este contaminante, sendo que na temperatura de 24oC encontrou-se uma quantidade maior de danos em relação às duas outras temperaturas, principalmente danos de classes 2 e 3. Com relação às análises bioquímicas, não foi possível identificar diferença significativa na atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST) entre grupos expostos ao Mn e seus grupos controles, onde o tempo de exposição pode não ter sido o suficiente para provocar alterações significativas no metabolismo de detoxificação do fígado destes indivíduos. E para a enzima Catalase (CAT) observou-se um aumento significativo na sua atividade nas temperaturas de 27 e 32oC nos grupos expostos ao Mn, e quando comparados os grupos controles das diferentes temperaturas o resultado foi que em 32oC houve um aumento significativo em relação aos demais controles, podendo dizer assim que o aumento da temperatura também pode induzir o estresse oxidativo. Conclui-se então que o manganês é tóxico para os juvenis de robalo peva causando danos genotóxicos e associado ao aumento da temperatura causa aumento do estresse oxidativo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Peixe, contaminação, micronúcleo, danos no DNA, enzimas.

## ABSTRACT

Tuzuki, Bárbara Louise Losada (M. Sc.), Universidade Vila Velha – ES, March, 2013.  
**Effects of manganese on the genotoxic and biochemical responses in juvenile robalo (*Centropomus parallelus* - Poey, 1960) exposed to three different temperatures.**

Orientadora: Dr. Adriana Regina Chippari-Gomes

The present study aimed to evaluate manganese effects when associated with three different temperatures (24, 27 and 32°C), for 96 hours, in juveniles of *Centropomus parallelus*, through genotoxic (micronucleus test and Comet assay) and biochemical responses (enzymes: GST and CAT). To genotoxic analyses, the amount of red cells with micronucleus in all animals exposed to manganese (Mn) increased significantly when compared to their respective groups. There was also a significant increase in the incidence of DNA damage in groups exposed to this contaminant. At temperature of 24°C animals exposed to Mn had a greater amount of DNA damage in relation to two other temperatures, especially damages in classes 2 and 3. With respect to the biochemical analysis, enzyme activity of Glutathione S-transferase (GST) did not have significant alteration between groups exposed to Mn and its respectively control groups, probably exposure time may not have been enough to cause significant alterations in the metabolism of liver detoxification of these individuals. For enzyme Catalase (CAT) was observed significant increase in its activity at temperatures of 27 and 32°C in groups exposed to Mn. And when the control groups are compared to each other, there is an increase in CAT activity in group exposed to 32°C. Probably the increase in temperature can also induce oxidative stress. So we conclude that manganese is toxic for the robalo juveniles causing genotoxic damage and associated with the increase in temperature can also provoke increase on oxidative stress.

**Keywords:** Fish, contamination, micronucleus, DNA damage, enzymes.

## 1. INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas têm sido conhecidas pelo seu impacto prejudicial sobre a biologia, fecundidade, crescimento e biodiversidade de animais aquáticos, terrestres e aéreos (Cochrane et al., 2009). A biodiversidade global está sob crescente pressão a partir de mudanças ambientais causadas pelas atividades humanas.

A temperatura é considerada como o “fator abiótico principal” em animais ectotérmicos aquáticos, pois influencia no comportamento, na fisiologia e na distribuição dos organismos (Lopez-Olmeda e Sanchez-Vazquez, 2011; Brett, 1971), como por exemplo os peixes. Na natureza, os peixes são bem adaptados à temperatura ambiental no qual estão expostos em seus nichos ecológicos, as espécies euritérmicas são consideradas tolerantes à variação da temperatura e as espécies estenotérmicas toleram pouca variação na temperatura (Lopez-Olmeda e Sanchez-Vazquez, 2011). Temperaturas acima do limite ideal de cada espécie de peixe influencia negativamente a saúde do animal, devido ao aumento da taxa metabólica, consumo de oxigênio, e a invasão e virulência de patógenos, que por sua vez, podem causar uma variedade de distúrbios fisiopatológicos podendo levar à morte dos peixes (Gordon, 2005; Dalvi et al., 2009).

Devido a sua importância, a tolerância térmica tem sido bastante estudada em peixes (Lopez-Olmeda & Sanchez-Vazquez, 2011). Entre os fatores que influenciam essa tolerância térmica em peixes, dois devem ser destacados: aclimação e a genética (Beitinger et al., 2000), sendo que a temperatura de aclimação está entre os fatores mais críticos que influenciam tanto a máxima quanto a mínima temperatura de tolerância em peixes. Em geral, conforme a temperatura de aclimação aumenta, ocorre também um aumento na temperatura tolerada máxima e mínima (Beitinger & Bennett, 2000). De acordo com Lopez-Olmeda e Sanchez-Vazquez, 2011 (*apud* Woiwode & Adelman, 1992), a plasticidade do desenvolvimento também pode influenciar a tolerância térmica dos peixes. O aumento da temperatura da água leva a uma série de consequências, a concentração de oxigênio na água diminui, o consumo de oxigênio pelos peixes aumenta, o metabolismo dos organismos aumenta e a biodisponibilidade dos

xenobióticos também aumenta, visto que solubilidade destes é dependente da temperatura da água (Osterauer & Köhler, 2008). A taxa metabólica e o tamanho do corpo de organismos ectotérmicos também são altamente dependentes da temperatura (Lopez-Olmeda & Sanchez-Vazquez, 2011).

Em termos de número de espécies, os peixes representam o grupo mais diversificado entre os vertebrados (Nelson, 2006). No Brasil são registradas 4 espécies de robalo: *Centropomus undecimalis*, *Centropomus parallelus*, *Centropomus ensiferus*, *Centropomus pectinatus*. Essas espécies habitam as águas salgadas e salobras da costa leste brasileira, desde o Rio Mampituba (sul de Santa Catarina) até o estado do Maranhão. O Robalo peva ou peba (*Centropomus parallelus* (Poey 1960)) é um peixe ósseo da família Centropomidae. As espécies do gênero *Centropomus* são peixes estenotérmicos (não suportam grandes variações na temperatura) e termofílicos (gostam de ambientes mais quentes) (Amaral Junior et al., 2009). Caracterizam-se também por serem eurialinos (suportam grandes variações da salinidade), estando presentes no mar e em águas continentais, geralmente são nas águas salobras de ambientes estuarinos, onde são encontrados em maior número (Pérez-Pinzón, 1991).

A contaminação aquática é uma importante causa da perda da biodiversidade (Carrera-Martinez et al., 2011), afetando não só a vida aquática, mas também representando uma grave ameaça para toda a vida no planeta. O avanço rápido do desenvolvimento industrial levou a um afluxo contínuo de xenobióticos em oceanos, podendo vir a perturbar o frágil equilíbrio da vida nos mares (Niyogi et al., 2001). Preocupações com as contaminações químicas das águas correntes tem estimulado um aumento na pesquisa para melhorar a compreensão dos efeitos de algumas substâncias tóxicas selecionadas (como metais e organoclorados).

Os metais são conhecidos por serem tóxicos para a maioria dos organismos, quando presentes em concentrações excessivas. Eles atingem os sistemas aquáticos como consequência de atividades industriais, agrícolas e antropogênicas, expondo os organismos aquáticos a uma quantidade significativa desses poluentes (Atli et al., 2006). A terminologia “metais” tem sido utilizada para caracterizar metais e metalóides com potencial ou capacidade de fenômenos toxicológicos ou ecotoxicológicos (Duffus, 2001). Metais tais como ferro, cobre, zinco e manganês

são essenciais no metabolismo biológico, porém podem também produzir efeitos tóxicos quando em concentrações elevadas (Tüzen, 2003).

O elemento químico Manganês de símbolo Mn pertence à classe dos metais de transição com número atômico 25 ele pertence ao grupo 7 da Tabela Periódica, é o 12º elemento mais abundante na crosta da Terra e constitui cerca de 0,1% do mesmo. Este elemento não ocorre livre e é encontrado em mais de 100 minerais. O manganês é um micronutriente essencial para o peixe, mas pode ser muito tóxico em concentrações acima do limite ótimo (Vieira et al., 2012). A gama da concentração do manganês causando toxicidade depende da espécie do peixe, fase da vida e da química da água ambiente (Fish, 2009). Este metal está envolvido em doenças neurogenéticas através da formação de radicais livres (Chen et al., 2006) e da inativação das enzimas antioxidantes, no entanto, o conhecimento sobre o impacto de manganês sobre a saúde dos peixes ainda é limitado (Vieira et al., 2012).

Para entender possíveis impactos ecotoxicológicos da contaminação, os estudos de biomonitoramento fornecem informações valiosas sobre a poluição ambiental e podem ajudar na melhora do processo de avaliação de risco através de medições das respostas fisiológicas dos indivíduos (Viarengo et al., 2007; An et al., 2012). No sentido geral, o biomonitoramento pode ser definido como o uso de organismos para obter informações sobre determinadas características da biosfera.

A utilização de testes em organismos e as medições de diversas respostas biológicas proporcionam uma abordagem para a avaliação da qualidade de um corpo de água (Allan et al., 2006). Esta abordagem tem assumido renovada importância visto que a fauna aquática é o principal destinatário de poluentes da água. O monitoramento biológico pode ser realizado a diversos níveis. Nos níveis celular e intracelular de biomarcadores específicos, sensíveis para a detecção inicial de degradação da qualidade da água (Galloway et al., 2004). Organismos inteiros podem também ser utilizados em testes de toxicidade padronizados, ou detectando alterações fisiológicas e comportamentais quando as espécies testes são submetidas a um evento de poluição (Allan et al., 2006). No nível mais alto, a medição de populações de flora e fauna e comunidades constitui parte integrante de monitoramento do estado ecológico (Salas et al., 2004; Andersen et al., 2004). Os

bioindicadores integram as condições ambientais com o tempo, e mais importante, quaisquer alterações resultantes observadas nestes bioindicadores são resultados de mudanças ecológicas relevantes nas condições ambientais (Fabricius et al., 2012).

Entre os inúmeros biomarcadores ecotoxicológicos propostos nas últimas três décadas, aqueles baseados nas respostas em níveis molecular e celular representam os primeiros sinais de perturbação ambiental e são comumente usados para biomonitoramento (Viarengo et al., 2007; Moore et al., 2004). Medindo o mesmo biomarcador em diferentes locais ao mesmo tempo, pode-se ter informações sobre o estado de poluição da região e fornece uma melhor compreensão dos mecanismos de resposta dos organismos aos poluentes (Frenzilli et al., 2004; Giarratano et al., 2010). Segundo Galloway et al. (2004) e Thain et al. (2008) os biomarcadores revelam estresses ambientais nos organismos, causados por contaminantes químicos e também outras variáveis ambientais. Portanto a integração de biomarcadores e análises químicas são essenciais a fim de estabelecer ligações entre estresse e poluição. Biomarcadores de exposição e de efeito têm sido amplamente utilizados no campo e no biomonitoramento *in situ* para avaliar os efeitos temporais e espaciais da poluição nas espécies aquáticas (Barbee et al., 2008; Schlenk et al., 2008; Browne et al., 2010).

Em ambientes aquáticos, todos os organismos (principalmente os macro invertebrados, peixes e zooplâncton) podem ser utilizados como bioindicadores da presença de substâncias bioacumuláveis ou tóxicas, uma vez que elas incorporam poluentes a partir da ingestão de alimentos (através da biomagnificação) e a partir do ambiente aquático, pela captação direta de poluentes através da pele ou das brânquias (bioconcentração), em estrita relação com seus níveis tróficos (Bettinetti et al., 2012).

Nudi et al (2007) caracterizam os biomarcadores como conhecidas variações bioquímicas ou fisiológicas medidas em um tecido ou em um fluido biológico evidenciando exposição e/ou o efeito de um ou mais contaminantes. Biomarcadores podem ser utilizados para avaliar o estado de saúde de um organismo, assim antecipando mudanças em níveis mais altos da organização biológica (ou seja, população, comunidade ou ecossistema) (Bettinetti et al., 2012). Micronúcleos são

utilizados como biomarcadores de danos estruturais e quantitativos dos cromossomos, e assim pode ser aplicado a qualquer população celular proliferando (Arkhipchuk & Garanko, 2005). A detecção de micronúcleo e anormalidades nucleares em peixes ajuda a conhecer o estado da qualidade da água, assim como a saúde de determinadas espécies (Talapatra & Banerjee, 2007). O ensaio cometa, ou “eletroforese em gel de célula individual”, é um método genotóxicológico sensível para a avaliação do dano no DNA em células individuais, permitindo a quantificação de quebras no DNA e de sítios alcalinos lábeis (Christofolletti, et al. 2009). O ensaio cometa foi aplicado com sucesso em eritrócitos de várias espécies de peixes, demonstrando assim a sensibilidade das células sanguíneas desses animais para efeitos genotóxicos (Christofolletti et al., 2009). O teste de micronúcleo é capaz de detectar danos no DNA, ou seja, de cadeia simples ruptura ou outras lesões (Russo et al., 2004).

As enzimas têm aplicações úteis em diversos campos industriais, tais como biotecnologia, farmacêutica e indústria alimentícia (Li et al., 2004). As enzimas têm tomado muito interesse de uma grande quantidade de pesquisadores devido às suas propriedades únicas, tais como a eficiência catalisadora, especificidade e condições amenas de operação (Cengiz et al., 2012). A Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é uma enzima presente em várias células aeróbicas, que decompõe  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular, sendo essencial para proteger organismos aeróbios de efeitos tóxicos do  $H_2O_2$  (Yoshimoto et al., 2007). A importância biológica da Catalase é devido ao fato de o  $H_2O_2$  ser o principal precursor celular do radical hidroxila ( $HO\cdot$ ) (forma altamente reativa e tóxica) (Vlahogiannit et al., 2007). A remoção de  $H_2O_2$  é uma estratégia importante de organismos marinhos contra o stress oxidativo (Vlahogianni et al., 2007). A enzima Glutathiona S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) desempenha um papel importante no stress oxidativo atenuante em todas as formas de vida (Lee et al., 2008), e sua atividade também tem sido amplamente utilizada como um biomarcador para a detecção de estresse (Cunha et al., 2007; Won et al., 2011). Ambas são enzimas multifuncionais diméricas que estão envolvidas na detoxificação endógena (metabólitos intracelulares) e de substâncias exógenas (drogas, pesticidas e outros poluentes) (Rezg et al., 2008).

A escolha do manganês nesse trabalho se deu por causa de sua grande incidência na composição do minério de ferro e o Estado do Espírito Santo é uma região que sofre alta influência da mineração por causa de grandes mineradoras existentes no Estado, as quais são responsáveis por produzirem cerca de 47,25 milhões de toneladas de ferro. Essas mesmas empresas fazem o beneficiamento desse minério e depois seu escoamento para os portos, onde entra em contato com a água do mar.

## 2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

### *Hipótese*

Temperaturas mais elevadas da água aumentam os efeitos tóxicos, genotóxicos e bioquímicos da contaminação por manganês em juvenis de *Centropomus parallelus*.

### *Objetivo Geral*

Avaliar os efeitos do manganês associado a diferentes temperaturas na espécie de peixe *Centropomus parallelus*, por meio de respostas genotóxicas e bioquímicas.

### *Objetivos Específicos*

1. Determinar os limites letais superiores de temperatura em exemplares de robalo expostos à temperatura de aclimação de 27°C e também com a associação da exposição ao manganês.
2. Avaliar os efeitos genotóxicos e bioquímicos em robalo exposto ao manganês associado à três temperaturas (24, 27°C e na temperatura máxima em que não for observada mortalidade dos peixes).

### 3. METODOLOGIA

#### ***Aquisição e aclimatação dos peixes***

Os exemplares de juvenis de *Centropomus parallelus* (108 peixes medindo  $7,12 \pm 0,52$ cm e pesando  $2,46 \pm 0,54$ g) foram provenientes de uma estação de criação localizada no município de Linhares, ES. Os peixes foram mantidos em dois tanques de polietileno de 300 L, cada tanque com uma temperatura mantida sob controle em 24 e 27°C e com sistema de recirculação de água, no Laboratório de Ictiologia Aplicada (Labpeixe – UVV). A temperatura da água foi mantida e controlada por meio de um aquecedor acoplado a um controlador de temperatura. Foi feita a troca total da água uma vez por semana enquanto duraram os testes, sempre com cuidado de fazer a reposição de água com a mesma temperatura de cada tanque. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, todos os dias, com ração comercial.

A água salgada que abasteceu os aquários de manutenção, dos aquários testes com manganês e dos grupos controles de ambos delineamentos experimentais foi proveniente de uma região da praia de Vila Velha, ES, a qual foi aquecida previamente para as temperaturas de 24 e 27°C. Durante a aclimatação e durante os testes foram monitorados os seguintes parâmetros físico-químicos: temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, condutividade, amônia e nitrito, foi feita a média do valores medidos três vezes por semana. Esses parâmetros devem ser monitorados tendo em vista que eles podem afetar a saúde do peixe e toxicidade do químico (Carvalho & Fernandes, 2008). A temperatura da água foi controlada por meio de um aquecedor acoplado a um controlador.

A substância usada como contaminante foi o  $\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , na quantidade de 0,00879g/l de água (experimentos pretéritos não publicados).

#### ***Protocolo Experimental 1 – Definindo o Limite Letal Superior de Temperatura (LLST)***

Após período de aclimatação (21 dias) na temperatura de 27°C, os juvenis de *C. parallelus* tiveram seu status de saúde averiguado, e apresentando boas condições de saúde foram submetidos ao protocolo para Determinação do Limite

Letal Superior de Temperatura (LLST) com e sem manganês. Para tal grupos de dez (10) juvenis de robalo, com triplicata, foram transferidos para unidades experimentais de polietileno de 20L, dotados de aeração e temperatura constantes ( $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ), esta última mantida por meio de um controlador de temperatura (marca Full Gauge, modelo TIC-17RGT) acoplado a um termostato (Figura 1). Os animais foram transferidos para estes aquários 24h antes do início dos experimentos para que houvesse aclimatação dos mesmos. A temperatura da água destes aquários foi a mesma da aclimatação ( $27^{\circ}\text{C}$ ). A alimentação dos animais foi suspensa 48h antes do início dos experimentos. Após as 24 h de aclimatação dos animais, foi adicionada na água das unidades experimentais a concentração de manganês e a temperatura então foi elevada  $1^{\circ}\text{C}$  por dia, até ser observado 100% de mortalidade dos indivíduos. A mortalidade foi contabilizada a cada 24h. O mesmo procedimento foi realizado para o grupo controle (sem contaminante).

Após a determinação do LLST, foi realizado um experimento adicional, nas mesmas unidades experimentais usadas anteriormente, o qual consistiu em expor grupos de seis animais, com triplicata, na temperatura máxima ( $32^{\circ}\text{C}$ ) em que não houve mortalidade dos peixes quando expostos ao manganês, por 96h. Ao fim desse período de exposição, os animais desta etapa foram sacrificados para a realização das análises genotóxicas e bioquímicas. Este experimento também foi acompanhado de um grupo controle (sem contaminante) na mesma temperatura do grupo exposto ( $32^{\circ}\text{C}$ ).

### ***Experimento 2 – Exposição à temperaturas de 24 e $27^{\circ}\text{C}$***

Após o período de aclimatação (21 dias) nas duas temperaturas: 24 e  $27^{\circ}\text{C}$ , os peixes tiveram seu status de saúde averiguado, e apresentando boas condições de saúde grupos de seis animais, com triplicata, foram transferidos para as unidades experimentais usadas nos experimentos anteriores, na mesma temperatura de aclimatação (24 ou  $27^{\circ}\text{C}$ ). Após 24 horas foi acrescido à água cloreto de manganês (0,00879g/L de água), sendo os animais mantidos a esta condição por 96 horas. Cada grupo de experimento foi acompanhado por um grupo controle, que consistiu na exposição de seis peixes em cada uma das temperaturas estabelecidas, porém sem o contaminante, por 96 horas, tendo o número de

repetição também igual a três.

A alimentação desses animais também foi suspensa 48 horas antes do início dos experimentos. A água das unidades experimentais dos dois protocolos experimentais foi parcialmente trocada (25%) a cada 48 horas. Esta substituição foi sempre realizada mantendo as condições dos experimentos: temperatura e presença ou não do contaminante.



**Figura 1.** Unidades experimentais de polietileno (20L) utilizadas nos dois protocolos experimentais. Em cada caixa havia um aquecedor e a temperatura era mantida por um controlador acoplado a um termostato.

### **Rejeitos**

Todo rejeito gerado durante o trabalho (líquido e sólido) foi estocado em bombonas (líquido) ou mantido congelado (peixes) até o momento da coleta e transporte dos mesmos por uma empresa licenciada em fazer coleta, transporte e processamento de rejeitos de classe I.

### **Aprovação do Comitê de Ética**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal (CEUA-UVV) que considerou o projeto adequado satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem a Comissão, com número de processo número 198 – 2011.

### **Coleta do sangue e tecido**

Ao término dos experimentos, os animais foram anestesiados com benzocaína (1mg/L) e o sangue coletado da veia caudal, com a utilização de seringas heparinizadas (Figura 2), e transferido para microtubos “eppendorf”, mantendo-o sempre em gelo fundente. Parte do sangue foi usada nas análises do Ensaio Cometa e a outra parte no Teste do Micronúcleo. Imediatamente após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por secção cervical para a retirada de tecido hepático. O fígado foi estocado em freezer -80°C até o momento das análises das atividades das enzimas Glutathione-S-Transferase (GST) e Catalase (CAT).



**Figura 2.** Coleta de sangue através da veia caudal em juvenis de *Centropomus parallelus*.

## **Testes de Genotoxicidade**

### *Teste do micronúcleo*

O sangue foi coletado e gotejado sobre uma lâmina para a realização de extensões sanguíneas. Após seca foi submetida a um banho de 30 minutos em Metanol P. A. (100%) para fixação, sendo coradas em seguida com uma solução de Giemsa 5% por 40 minutos; lavada posteriormente com água destilada e seca em temperatura ambiente, como descrito por Grisolia et al. (2005). Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico, 1000 células sanguíneas (eritrócitos) foram contadas para a quantificação dos micronúcleos presentes. Foram contadas duas lâminas para cada peixe.

### *Ensaio cometa*

A análise de fragmentos de DNA foi realizada utilizando ensaio cometa alcalino e coloração com nitrato de prata modificado de Tice et al., (2000) e Andrade et al., (2004). O método consiste na detecção de fragmentos de DNA em microgel de agarose. Para isso lâminas de microscopia, duas para cada exemplar, foram previamente cobertas com agarose 1,5% (1,80g de agarose e 120 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4). As amostras de sangue foram diluídas 20 vezes em tampão fosfato e posteriormente, 10µl do sangue diluído foi misturado com 100µl de agarose low melting (0,15g de agarose em 20 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4) a 40°C. Em seguida foram colocadas sobre as lâminas com pré-cobertura e recobertas com lamínulas para que o gel se espalhe uniformemente até solidificar. Após a retirada das lamínulas, as lâminas foram colocados na solução de lise (146,1g NaCl (2,5M), 37,2g EDTA (100mM), 1,2g de Tris (10mM), 1 litro de água destilada e o pH da solução foi ajustado para 13 com NaOH e no momento do uso foram adicionados 1% de Triton X-100 e 10% DMSO) por no mínimo 2h, em geladeira e protegidos da luz. Depois da lise as lâminas foram colocadas em cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético (300 mM NaOH e 1mM EDTA em pH>13) por 20 min. Em seguida foi realizada a corrida eletroforética em 25V e 300mA por 15 min. Após esta etapa as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (48,5 g de Tris em 1 litro de água destilada) durante 5 min. por três vezes e

sendo lavadas com água destilada por duas vezes. As lâminas foram secas por 2h a 37°C. Após esse período as lâminas foram fixadas em solução fixadora (15% de ácido tricloacético, 5% de sulfato de zinco (heptaidratado), 5% de glicerol e 1 litro de água destilada) por 10 min. Após esta etapa as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e secas por 2h a 37°C. Depois de secas as lâminas foram hidratadas por 5 min. com água destilada e coradas com solução de coloração com prata (66 ml da solução de carbonato de cálcio (12,5g de carbonato de cálcio para 250 ml de água) e 34 ml da solução de nitrato de prata (50mg de nitrato de prata, 50mg de nitrato de amônio, 250mg de ácido tungstosalicílico e 125µl de formaldeído) por 15 min. a 37°C. Depois de coradas as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e então submersas por 5 min. em solução stop (ácido acético 1%). Passado os 5 min. de reação foram novamente lavadas por três vezes e secas em temperatura ambiente.

Os danos no DNA foram medidos e classificados posteriormente de acordo com o tamanho da cauda em 5 classes: classe 0 – não apresenta cauda; classe 1 – cauda é menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 – cauda com variação de comprimento de 1x a 2x o diâmetro do núcleo; classe 3 – cauda maior que 2x o diâmetro do núcleo (Grazeffe et al., 2008) e classe 4 – apoptose da célula. Os resultados foram expressos em porcentagem para cada classe. O índice de danos (ID) analisado pelo teste cometa foi avaliado utilizando a somatória do número de células danificadas multiplicado pelo valor da classe de dano (0 a 4). Esses valores demonstraram os danos apresentados nos tratamentos de acordo com Heuser et al. (2008).

## **Análises Bioquímicas**

### *Preparação das Amostras Teciduais*

As amostras de fígado foram descongeladas sobre gelo, pesadas e homogeneizadas em triturador automático na proporção de nove vezes o volume de tampão de homogeneização Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, sacarose 0,5 mM, KCl 0,15 mM, pH 7,6 contendo PMSF 0,1 mM e DTT 1mM, utilizando homogeneizador. O homogeneizado foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugado a 13.000 rcf por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então utilizado nas análises

enzimática na determinação de proteínas.

#### *Glutathione S-transferase (GST) (E.C.:2.5.1.18)*

A enzima glutathione S-transferase (GST) catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) a compostos nucleofílicos, resultantes da transformação do organismo ao estresse metabólico, assim como a produtos celulares danificados pelo ataque dos radicais livres. Os níveis de atividade enzimática foram determinados a 25°C em um leitor de placa Molecular Devices Spectra max 190 utilizando a técnica descrita por Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima (1998) com adaptações. As reações enzimáticas procederam com o seguinte protocolo: 50mM de tampão fosfato, 1mM GSH (glutathione reduzida) pH 7,2 a 25°C. As reações foram iniciadas com adição de 1mM de CDNB (1-cloro-,4-dinitrobenzeno). As leituras das absorbâncias foram realizada em 340nm. A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDNB.

#### *Enzima Catalase (CAT) (E.C.:1.11.1.6)*

A atividade da CAT foi analisada espectrofotometricamente no fígado, através do decréscimo de absorbância a 240nm associado a velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O meio de reação consistiu de uma mistura de 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,5mM EDTA, 0,1M Tris-HCl (pH 8,0) e 10µL (10%) de amostra em um volume final de 1mL. Todas as análises foram realizadas em duplicatas e o decréscimo de absorbância medido a 240 nm, registrado durante 1 minuto. A atividade da catalase foi expressa em nanomoles/minuto/g de tecido fresco. Uma unidade de CAT corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa 1µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto, a 25°C, em pH 8,0.

#### ***Determinação de proteína***

A concentração de proteínas totais, no fígado, foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). As amostras foram lidas em um espectrofotômetro em 750nm. A concentração de proteínas totais foi determinada a fim de ser utilizada no cálculo da atividade da enzima GST.

### **Análise de Água**

Durante a aclimatação e durante os experimentos, a temperatura, a condutividade e a salinidade foram medidos com um multiparâmetro (YSI, modelo EC300), o oxigênio dissolvido foi medido com uma multiparâmetro (YSI, modelo DO200), o pH foi medido com um pHmetro digital (Quimis Q400) e a amônia e o nitrito foram medidos conforme protocolos para determinação dos mesmos (APHA,1998), feitos no laboratório.

### **Análises Estatísticas**

Os resultados obtidos para GST foram expressos em média e erro padrão da média para os dados paramétricos e para micronúcleos, ID e CAT foram expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25% para os dados não paramétricos. Os resultados obtidos para cada temperatura (grupo controle e exposto ao Mn) foram comparados por meio do teste t (*student*) ou Mann whitney ( $p < 0,05$ ). Uma comparação entre os tratamentos (grupo controle ou exposto ao Mn) nas diferentes temperaturas foi realizada por meio de uma análise de variância (ANOVA) e teste a posteriori de Tukey ( $p < 0,05$ ) no caso de dados paramétricos, ou Kruskal Wallis em dados não paramétricos. As análises foram feitas usando o software SigmaStat®.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns parâmetros físico-químicos da qualidade da água foram observados durante o experimento, conforme mostra o quadro 1. Não houve variação significativa entre os parâmetros físico-químicos da água entre os controles e os seus respectivos grupos contaminados, sendo assim, esses parâmetros não afetaram a relação do contaminante manganês com a temperatura e seus controles.

**Quadro 1.** Parâmetros físico-químicos analisados durante experimentos. Sendo Temp. – temperatura; Oxig. – oxigênio; Cond. – condutividade; Salin. – salinidade; Amôn. – amônia; Nitr. – nitrito.

Tratamentos	Temp. (°C)	Oxig. (mg/L)	Cond. (mS/cm)	Salin. (ppt)	Amôn.	Nitr.
<b>24°C</b>						
Controle	24,74±0,32	5,08±0,54	39,23±0,23	25,26±0,15	0,37±0,26	0,32±0,57
Exposto Mn	24,65±0,44	5,08±0,54	39,31±0,21	25,43±0,15	0,62±0,42	0,35±0,51
<b>27°C</b>						
Controle	27,24±0,30	5,99±1,04	40,69±1,68	25,16±0,80	0,61±0,50	0,03±0,28
Exposto Mn	27,15±0,18	6,04±0,82	40,92±0,85	25,37±0,14	0,71±0,53	0,04±0,27
<b>32°C</b>						
Controle	32,06±0,09	5,45±0,62	41,69±0,21	25,1±0,26	0,46±0,37	0,15±0,24
Exposto Mn	32,16±0,20	5,63±0,61	42,33±0,52	25,33±0,21	0,47±0,37	0,15±0,54

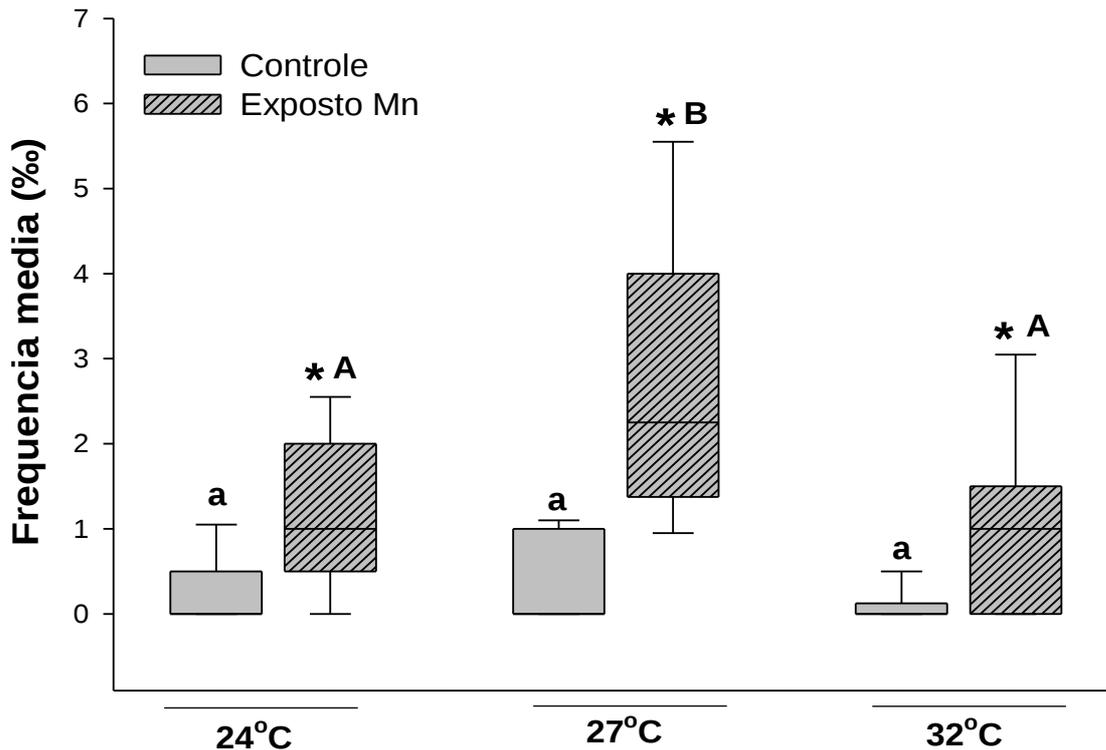
O limite letal superior de temperatura (LLST) determinado neste trabalho para os juvenis de robalo aclimatados a 27°C foi de 38°C para o grupo controle (não contaminado) e de 37°C para o grupo contaminado. De acordo com alguns autores (Gagné et al., 2007; Ivanina et al. 2009; Sokolova, 2004) o aumento da temperatura nos oceanos pode aumentar a sensibilidade dos organismos aos contaminantes, visto que as flutuações na temperatura podem comprometer a habilidade dos organismos em controlar a toxicidade. Nos resultados obtidos observa-se a perda de 1°C nos LLST do grupo exposto ao Mn em relação ao grupo controle, muito provavelmente se deu pelo fato dos animais terem diminuído a sua habilidade em

controlar a toxicidade. O LLST também pode ser alterado por conta de vários motivos, assim como idade, temperatura de aclimatação, salinidade, estado nutricional, presença de contaminantes e também variando entre as espécies. Wedemayer et al. (1980) comprova que quando os peixes estão estressados por qualquer processo, eles são menos capazes de lidar com outros fatores estressantes, por exemplo poluentes tóxicos, como os metais.

Com relação à mortalidade dos robalos, observou-se que dos trinta indivíduos do controle morreram sete em 37°C e o restante (vinte e três animais) em 38°C, enquanto que no tratamento com manganês todos os trinta indivíduos morreram em 37°C.

Uma vez determinado o LLST, foi escolhida a temperatura de 32°C para expor os exemplares de juvenis de robalo também a 96h (similar aos experimentos de 24 e 27°C) a fim de se verificar as respostas desses animais em situação de estresse térmico. A temperatura de 32°C foi escolhida, por ser uma temperatura segura que não causou morte nos animais e que sobreviveriam em 96h de experimento.

No presente trabalho, foi possível observar danos genotóxicos e bioquímicos nos juvenis de robalo expostos ao Mn. Com relação às respostas genotóxicas, a figura 3 mostra que as frequências de micronúcleos nas temperaturas de 24, 27 e 32°C dos grupos expostos ao manganês foram significativamente maiores que seus respectivos grupos controles ( $p < 0,001$ ), ou seja, há uma toxicidade do manganês para os juvenis de *Centropomus parallelus* causando danos genotóxicos nos eritrócitos desses indivíduos. Segundo Çavas et al. (2005) alterações celulares como núcleos em forma de rim, segmentado, lobado, presença de micronúcleo ou ainda células binucleadas são indicadores de divisões celulares anormais provocadas por substâncias tóxicas. Com relação à variação na temperatura, não foi observado efeito dessa condição sobre a quantidade de micronúcleos nas células eritrocitárias dos grupos controles ( $p = 0,215$ ). No entanto, para os animais expostos ao Mn pode-se observar que na temperatura de 27°C houve um aumento significativo em relação aos animais expostos ao Mn nas temperaturas de 24 e 32°C ( $p = 0,001$ ).



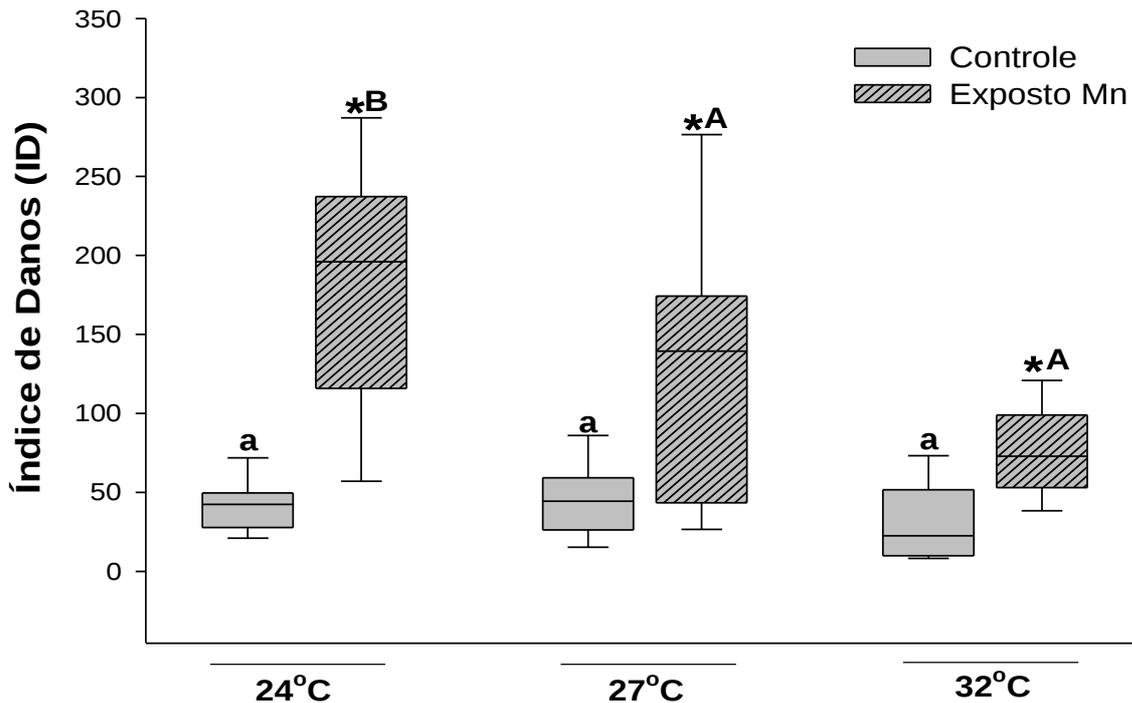
**Figura 3.** Frequência de Micronúcleos Eritrocitários em *Centropomus parallelus* expostos ao manganês (Mn) e seus respectivos grupos controles, por 96h em três diferentes temperaturas. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. \* Indica diferença significativa dos tratamentos comparados com seus respectivos grupos controles. Letras minúsculas indicam comparações entre controles de diferentes temperaturas. Letras maiúsculas indicam comparações entre expostos ao Mn de diferentes temperaturas. Número amostral (n) = 108.

Vários estudos corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, de que a frequência de micronúcleo é aumentada em animais expostos a diferentes metais e a outros contaminantes. Ayllon e Garcia-Vazquez (2000) observaram esse aumento em exemplares de *Poecilia latipinna* expostos a duas doses diferentes de nitrato de mercúrio injetadas intraperitonealmente. Em exemplares de *Hoplias malabaricus* expostos ao chumbo (Pb) a frequência de micronúcleos nos eritrócitos é de 3,0% (Ferraro et al., 2004). Enquanto que Arkhipchuk e Garanko (2005) encontraram que as frequências de micronúcleos induzidas por cobre (Cu) e cádmio (Cd) na espécie *Carassius auratus gibelio* foram de 0,92% e 1,75%, respectivamente. Yadav e Trivedi (2009) avaliaram o potencial genotóxico do HgCl<sub>2</sub>, As<sup>2</sup>, O<sup>3</sup> e

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  para estimar a frequência de micronúcleos em células renais de *Channa punctata* após exposição in vivo a concentrações subletais desses compostos, os autores encontraram aumento da frequência de micronúcleos em cada período de avaliação. Assim como Ramirez e Garcia (2005), que também encontraram aumento na indução de micronúcleo em células branquiais de peixe-zebra, *Danio rerio*. Segundo esses autores o aumento na frequência de micronúcleos depende da duração e da dose do contaminante testado, no caso o arsênio. Oss (2011) também observou uma frequência elevada de micronúcleos nos grupos com adição de cobre em robalo peva (*Centropomus parallelus*). Sendo assim, as observações feitas no presente trabalho corroboram com os demais trabalhos no que diz respeito que a exposição dos peixes, no caso juvenis de robalo, à água contaminada com metais (no caso Mn) causa aumento na frequência de células com micronúcleo, caracterizando um dano genotóxico.

Com relação ao índice de danos no DNA (ID) observa-se que em todas as temperaturas, o manganês também foi tóxico, ou seja, houve uma diferença significativa entre os grupos contaminados e seus respectivos controles ( $p=0,004$ ) (Figura 4). Segundo Jena et al. (1998), categorias essenciais e não-essenciais de metais são potencialmente tóxicos e a toxicidade é regulada pela concentração. Este trabalho corrobora com Chang e Kosman (1989) quando dizem que “nota-se que o excesso de  $\text{Mn}^{2+}$  é tóxico para as células e o seu efeito protetor pode mudar para danos celulares”.

Quando comparado o efeito da temperatura sobre o ID, não se observou diferença estatística nos grupos controles entre as três temperaturas, porém quando comparados os grupos expostos ao Mn entre si, observou-se uma diminuição significativa no ID nos animais expostos a 27°C e 32°C em comparação ao grupo exposto ao Mn na temperatura de 24°C. Esses resultados podem ser confirmados ao ser avaliada a distribuição de danos nas diferentes classes (Quadro 2), onde há um predomínio de danos maiores (classe 2 e 3) nos exemplares de robalo expostos a 24°C ao Mn em relação aos expostos às duas outras temperaturas.



**Figura 4.** Índice de danos no DNA em *Centropomus parallelus* expostos ao manganês (Mn) e seus respectivos grupos controles, por 96h em três diferentes temperaturas. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. \* Indica diferença significativa dos tratamentos comparados com seus respectivos grupos controles. Letras minúsculas indicam comparações entre controles de diferentes temperaturas. Letras maiúsculas indicam comparações entre expostos ao Mn de diferentes temperaturas. Número amostral (n) = 108.

Com relação ainda à distribuição de danos no DNA (Quadro 2), observa-se que há um predomínio das classes 0 e 1 nos robalos do grupo controle indicando uma normalidade nas células do sangue, independente da temperatura. Entretanto essa distribuição não permanece assim nos robalos expostos ao Mn. O que se observa é que o Mn afeta o DNA das células eritrocitárias, aumentando as quebras na dupla fita do DNA, visto que são observados danos frequentes de classes 2 e 3, principalmente na temperatura de 24°C, e uma pequena quantidade de danos na classe 4. Além disso, de alguma forma esses danos tendem a diminuir à medida que a temperatura aumenta.

**Quadro 2.** Distribuição das classes de danos encontrados nos eritrócitos de *Centropomus parallelus* expostos ao manganês (Mn) por 96 horas em três diferentes temperaturas. Os dados estão expressos em mediana.\* Indica diferença significativa dos tratamentos comparados com seus respectivos grupos controles. Letras minúsculas indicam comparações entre controles de diferentes temperaturas. Letras maiúsculas indicam comparações entre expostos ao Mn de diferentes temperaturas. Número amostral (n) = 108.

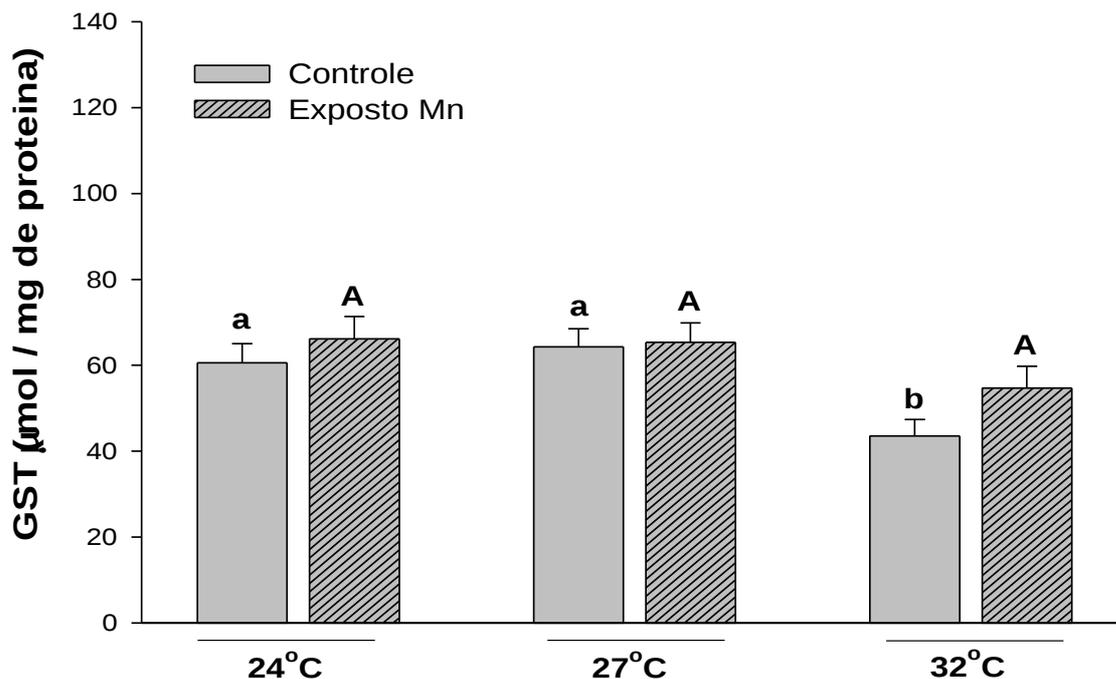
Tratamentos	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
<b>24°C</b>					
<b>Controle</b>	68,50 <sup>a</sup>	18,00 <sup>a</sup>	10,00 <sup>b</sup>	0,50 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>
<b>Exposto Mn</b>	22,50 <sup>*A</sup>	12,00 <sup>A</sup>	22,00 <sup>*B</sup>	21,41 <sup>*B</sup>	1,50 <sup>*A</sup>
<b>27°C</b>					
<b>Controle</b>	72,50 <sup>a</sup>	23,00 <sup>a</sup>	4,25 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>
<b>Exposto Mn</b>	60,00 <sup>*B</sup>	10,50 <sup>*A</sup>	2,00 <sup>*A</sup>	2,00 <sup>*A</sup>	13,25 <sup>*B</sup>
<b>32°C</b>					
<b>Controle</b>	78,00 <sup>a</sup>	17,00 <sup>a</sup>	0,50 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>
<b>Exposto Mn</b>	31,50 <sup>*A</sup>	59,00 <sup>*B</sup>	3,25 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>*A</sup>

Corroborando com este trabalho, Oss (2011) confirma a utilização do ensaio cometa em eritrócitos de peixes como uma ferramenta bastante sensível para a detecção de genotoxicidade nos ecossistemas aquáticos. Mesmo em concentrações baixas, o cobre é genotóxico e desta forma pode influenciar toda uma população, podendo gerar prejuízos ao material genético e culminar em mutações irreversíveis e prejudiciais aos organismos (Çavas et al., 2005). Frenzilli et al. (2009) verificaram que embriões de *Danio rerio* expostos ao cobre também apresentaram dano ao material genético quando avaliado por meio do ensaio Cometa, assim como foi observado no presente trabalho. Os resultados encontrados no presente trabalho na distribuição de danos nas diferentes classes, inclusive no ID, vão em contraposição a estes observados por Vilches (2009), visto que a maior quantidade de danos no DNA foi observado na menor temperatura testada (24°C). O fato dos danos terem sido maiores nesta temperatura pode ter ocorrido por causa do metabolismo menos

acelerado dos animais, sendo na temperatura maior os danos corrigidos mais rapidamente no mesmo intervalo de tempo.

Para a atividade da enzima de GST em relação à toxicidade e à temperatura, os resultados obtidos não apresentaram uma diferença significativa entre os grupos expostos ao Mn e seus respectivos controles (Figura 5). E também não houve diferença dos grupos expostos ao Mn quando comparados entre si ( $p=0,193$ ), porém houve diferença entre os controles dos três tratamentos ( $p=0,002$ ). Sendo assim, observando os resultados obtidos para a atividade da GST não se pode dizer que o manganês foi tóxico ou se a temperatura afetou os indivíduos. Isso pode ter acontecido por causa do tempo de exposição (96h) dos indivíduos ao contaminante, podendo não ter sido longo o suficiente para provocar alterações significativas no metabolismo de detoxificação do fígado destes indivíduos.

Oss (2011) observou que a exposição de robalo peva ao cobre causa uma diminuição da atividade da GST, após 4 dias e após 10 e 30 dias de recuperação. Outros trabalhos indicam que há um aumento na atividade da GST quando os animais são expostos a contaminantes. Bainy et al. (2000) identificaram que a atividade da enzima na glândula digestiva do mexilhão *Perna perna* se elevou em sítios de poluição industrial em Santa Catarina, Brasil. Outros autores observaram que a enzima GST no fígado pode ter sua atividade alterada por compostos xenobióticos, como os metais, em apenas 12-24h (Lamb & Franklin, 2000; Cho & Kim, 2000; Bouraoui et al., 2008). Porém autores como Alves et al. (2002) observaram que em brânquias de *Perna perna* e *Crassostrea rhizophorae* expostos ao pesticida Furadan por 96 horas, as atividades enzimáticas não foram significativas, corroborando com o que foi encontrado nesse trabalho.

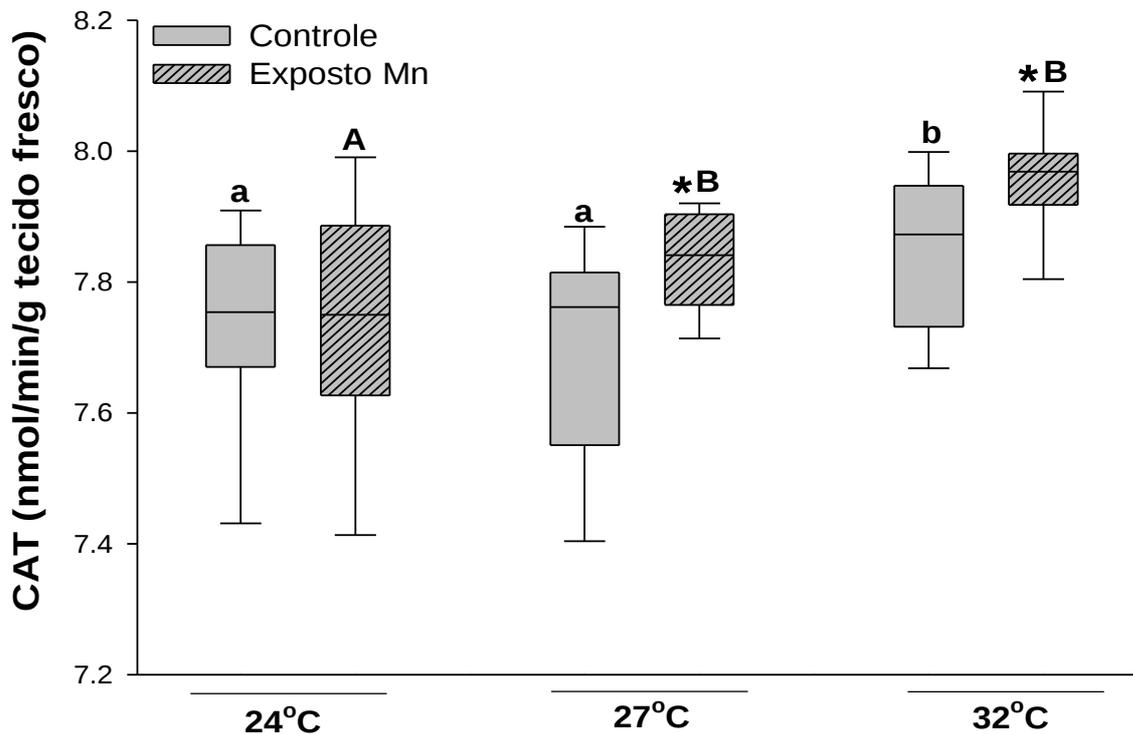


**Figura 5.** Atividade da enzima Glutationa Transferase (GST) em *Centropomus parallelus* expostos ao manganês (Mn) e seus respectivos grupos controles, por 96h em três diferentes temperaturas. Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão médio. Letras minúsculas indicam comparações entre controles de diferentes temperaturas. Letras maiúsculas indicam comparações entre expostos ao Mn de diferentes temperaturas. Número amostral (n) = 108.

Considerando trabalhos com peixes, Duarte e colaboradores (2011) concluíram que a atividade de GST nas brânquias foi positivamente associado com a temperatura. Wilhelm Filho et al. (2000, 2001) também encontraram que o aumento da temperatura e da disponibilidade de alimentos são acompanhados por um aumento no consumo de oxigênio e, conseqüentemente, um aumento da geração de ROS celular, que pode ser compensado por um aumento das defesas antioxidantes. Won et al. (2011) encontraram em seus estudos que a enzima GST tem aumento significativo ou diminuição em sua atividade, com padrões diferentes, de acordo com os elementos expostos ou condições de exposição. No entanto, há poucos relatos da caracterização de GSTs em peixes, e muito pouca informação sobre seus perfis de expressão após a exposição ao metal (Kim et al., 2010). Neste

trabalho não foram observados aumentos ou diminuições significativos, podendo as 96h de exposição não terem sido suficientes para apresentar uma resposta diferente para a enzima GST. Porém pode ter ocorrido da ação da enzima CAT ter suprido a atividade da GST, ou seja, a GST não respondeu pois outra enzima, como a CAT pode ter respondido.

Com relação à atividade da enzima catalase, observou-se aumento significativo nos exemplares de robalo expostos ao Mn quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 6), com exceção do tratamento a 24°C, no qual não houve diferença significativa. Neste caso o tempo de 96h talvez tenha sido um fator limitante para aumentar a atividade da CAT nessa temperatura, já que em temperaturas mais elevadas o metabolismo dos animais acontece mais rápido. A temperatura também tem sido considerada como sendo o fator mais importante que afeta a atividade natural da enzima (Lau et al., 2004; Leiniö & Lehtonen, 2005). Leiniö e Lehtonen (2005) apontaram que, mesmo sob condições de poucos poluentes, fatores sazonais podem afetar as respostas de biomarcadores em maior medida do que o estresse de poluentes. Essa explicação pode ser aplicada no presente trabalho, visto a atividade da CAT aumentou significativamente nos robalos do grupo controle na temperatura de 32°C, em comparação aos controles das duas outras temperaturas. Resultado similar foi observado para o grupo exposto ao Mn nessa mesma temperatura, assim como para o grupo exposto na temperatura de 27°C, quando comparados entre si. Conforme Verlecar et al. (2007), o aumento das taxas metabólicas durante a primavera (uma estação mais quente) poderia aumentar a taxa de formação de ROS, o que resulta em stress oxidativo. Pode-se dizer assim, que a temperatura pode aumentar o estresse oxidativo, visto o aumento da ação da CAT nos juvenis de robalo expostos ao Mn em temperaturas mais elevadas.



**Figura 6.** Atividade da enzima Catalase (CAT) em *Centropomus parallelus* expostos ao manganês (Mn) e seus respectivos grupos controles por 96h em três diferentes temperaturas. Os dados estão expresso em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. \* Indica diferença significativa dos tratamentos comparados com seus respectivos grupos controles. Letras minúsculas indicam comparações entre controles de diferentes temperaturas. Letras maiúsculas indicam comparações entre expostos ao Mn de diferentes temperaturas. Número amostral (n) = 108.

Diversas respostas da atividade da CAT foram observadas em animais expostos a contaminantes orgânicos ou metálicos tanto em experimentos de campo quanto em laboratório e a CAT demonstrou ser induzida ou inibida pelos metais, dependendo da dose, da espécie ou da via de exposição (Romeo et al., 2000;. Sanchez et al., 2005). No estudo de Atli et al. (2006), a exposição dos peixes a Ag, Cd, Cr, Cu e Zn, durante 96h, resultou tanto na estimulação e quanto na inibição de CAT em diferentes órgãos. Em outros estudos, a exposição aguda a Cr não teve nenhum efeito sobre a atividade CAT em brânquia e rim (Ahmad et al., 2006a), enquanto que a exposição de peixe ao Zn, por 45 dias produziu um aumento na peroxidação de lípidos no fígado, rim e cérebro, mas a atividade de CAT foi apenas

aumentada no fígado (Gioda et al., 2007). Rosety et al. (2005) demonstraram uma variação no curso de tempo da atividade de enzimas antioxidantes em peixes expostos a uma concentração subletal de malatião para 24, 48, 72 e 96 h. Eles relataram que a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) atividades foram alteradas significativamente, de 24h em diante. Atli e Canli (2007) utilizaram *Oreochromis niloticus* para exposição a concentrações de cádmio e chumbo, e o resultado foi o aumento da atividade da catalase. Ventura et al. (2002) utilizaram a espécie *Orthopristis ruber* no monitoramento de poluentes em águas costeiras nas Baías de Guanabara, Sepetiba e Ilha Grande no Rio de Janeiro e obtiveram como resultado, um gradiente de atividade da catalase, o que demonstrou o elevado grau de poluição com metais (incluindo o manganês). Sendo assim, pode-se afirmar que a ação da enzima CAT concorda com a hipótese deste trabalho, que em temperaturas da água mais elevadas, os efeitos tóxicos do manganês são mais acentuados em juvenis de *Centropomus parallelus*.

## 5. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, foi possível chegar as seguintes conclusões:

- Juvenis da espécie *Centropomus parallelus* são sensíveis ao manganês, o qual foi considerado tóxico para eles.
- A concentração e o tempo de 96 horas de exposição foram suficientes para causar danos genotóxicos e na atividade da enzima catalase na espécie estudada.
- A temperatura agindo em conjunto com o contaminante pode ser um fator estimulante para danos nos indivíduos de *C. parallelus*.
- A hipótese do trabalho foi parcialmente aceita, visto que à medida em que houve aumento na temperatura da água, os efeitos tóxicos do manganês foram mais pronunciados na frequência de micronúcleos e na ação da enzima CAT, porém foi menos evidente quando analisado o índice de danos no DNA em temperaturas mais elevadas e a ação da enzima GST não foi alterada nos indivíduos de *Centropomus parallelus*.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD I.; MARIA V. L.; OLIVEIRA M.; PACHECO M.; SANTOS M. A. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to beta-naphthoflavone. **Mutation Research**, 2006, v. 608, p. 16–28.
- ALLAN I. J.; VRANA B.; GREENWOOD R.; MILLS G. A.; ROIG B.; GONZALEZ C. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. **Talanta**, 2006. V.69, p.302–322.
- ALVES S. R. C.; SEVERINO P. C.; IBBOTSON D. P.; SILVA A. Z.; LOPES F.; SÁENZ L. A.; BAINY A. C. D. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. **Marine Environmental Research**, 2002,v. 54, p. 241-245.
- AMARAL JUNIOR H.; SANTOS J. J.; SOUZA F.; CAVALERI R. Monocultivo de robalo *Centropomus parallelus* em água doce. Snook *Centropomus parallelus*, monoculture in freshwater. **REDVET. Revista eletrônica de Veterinaria**, 2009, Vol. 10, N. 10
- AN, L.; ZHENG, B.; WANG, L.; ZHANG, Y.; CHEN, H.; ZHAO, X.; ZHANG, L. LEI, K. Biomarker responses and genotoxicity in the mud snail (*Bullacta exarata*) as indicators of coastal contamination. **Marine Pollution Bulletin**, 2012. V. 64, p. 303–309.
- ANDERSEN J. H.; CONLEY D. J.; HEDAL S. Palaeoecology, reference conditions and classification of ecological status: the EU Water Framework Directive in practice. **Marine Pollution Bulletin**, 2004. V.49, p.283-290.
- ARKHIPCHUK, V. V.; GARANKO, N. N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fishfin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2005. V. 62, p. 42–52.
- ATLI G.; ALPTEKIN O.; T UKEL S.; CANLI M. Response of catalase activity to Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 2006, v. 143, p. 218–224.
- ATLI G.; CANLI M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 2007, v. 145, p. 282-287.

AYLLON F.; GARCIA-VAZQUEZ E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow, *Phoxinus phoxinus* and mollie, *Poecilia latipinna* : an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, 2000, v. 467, p.177– 186.

BAINY A. C. D.; ALMEIDA E. A.; MÜLLER I. C.; VENTURA E. C.; MEDEIROS I. D. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research**, 2000, v. 50, p. 411-416.

BAGDONAS E.; VOSYLIENE M. Z. A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Biologija**, 2006, v. 1, p. 8–13.

BARBEE G. C.; BARICH J.; DUNCAN B.; BICKHAM J. W.; MATSON C. W.; HINTZE C. J.; AUTENRIETH R. L.; ZHOU G. D.; MCDONALD T. J.; CIZMAS L.; NORTON D.; DONNELLY K.C. In situ biomonitoring of PAH- contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2008. V.71, p.464-464.

BARRIONUEVO W. R.; BURGGREN W. W. O<sub>2</sub> consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O<sub>2</sub>. **American Journal Physiology** 1999. V. 276, p. R505–R513.

BEITINGER T. L.; BENNETT W. A. Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes. **Environmental Biology of Fishes**, 2000. V. 58, p. 277–288.

BEITINGER T. L.; BENNETT W. A.; MCCAULEY R. W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. **Environmental Biology of Fishes**, 2000. V. 58, p. 237–275.

BELPAEME K.; COOREMAN K.; KIRSCH-VOLDERS M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 1998. V. 415, p. 167-184.

BETTINETTI R.; PONTI B.; MARZIALI L.; ROSSARO B. Biomonitoring of lake sediments using benthic macroinvertebrates. **Trends in Analytical Chemistry**, 2012. V. 36.

BOURAOU Z.; BANNI M.; GHEDIRA J.; CLERANDEAU C.; GUERBEJ H.; NARBONNE J. F.; BOUSSETTA H. Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*.

**FishPhysiol.Biochem.**, 2008, v. 34, p. 201–207.

BROWNE E.; KELLEY M.; ZHOU G.; HE L. Y.; MCDONALD T.; SHIRLEY W.; DUNCAN B.; MEADOR J.; DONNELLY K; GALLAGHER E. In situ biomonitoring of juvenile Chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) using biomarkers of chemical exposures and effects in a partially remediated urbanized waterway of the Puget Sound, WA. **Environmental Research**, 2010. V. 110, p. 675–683.

CARRERA-MARTINEZ D.; MATEOS-SANZ A.; LOPEZ-RODAS V.; COSTAS E. Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination. **Aquatic Toxicology**, 2011. V. 101, p. 342–350.

CARVALHO C. S.; FERNANDES M. N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A.**, 2008, v. 151, p. 437–442.

ÇAVAS T.; GARANKO N. N.; ARKHIPCHUK V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, 2005, v. 43, p. 569–574.

CENGİZ S.; ÇAVAŞ L.; YURDAKOÇ K. Bentonite and sepiolite as supporting media: Immobilization of catalase. **Applied Clay Science**, 2012. V.65 – 66, p.114 –120.

CHANG E. C.; KOSMAN D. J. Intracellular Mn II associated superoxide scavenging activity protects Cu Zn superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* against dioxygen stress. **Journal Biology Chemical**, 1989, v. 264, p. 12172 – 12178.

CHEN M. T.; CHENG G. W.; LIN C. C.; CHEN B. H.; HUANG Y. L. Effects of acute manganese chloride exposure on lipid peroxidation and alteration of trace metals in rat brain. **Biology Trace Element Research**, 2006, v. 110, p. 163–177.

CHO M. K.; KIM S. G. Induction of class Alpha glutathione S-transferases by 4-methylthiazole in the rat liver: role of oxidative stress. **Toxicology Letters**, 2000, v. 115, p. 107 – 115.

CHRISTOFOLETTI C. A.; DAVID J. A. O.; FONTANETTI C. S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. **Genetics and Molecular Biology**, 2009. V. 32, n. 1, p.155-158.

COCHRANE K.; DE YOUNG C.; SOTO D. Climate change implications for fisheries and aquaculture: Overview of current scientific knowledge. **Fisheries Technical**

**Paper**, 530. FAO, Rome, 2009, p.216.

CUNHA I.; MANGAS-RAMIREZ E.; GUILHERMINO L. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 2007. V.145, p.648– 657.

DALVI R. S.; PAL A. K.; TIWARI L. R.; DAS T.; BARUAH K. Thermal tolerance and oxygen consumption rates of the catfish *Horabagrus brachysoma* (Günther) acclimated to different temperatures. **Aquaculture**, 2009. V. 295, p. 116–119.

DUARTE C. A.; GIARRATANO E.; AMIN O. A.; COMOGLIO L. I. Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). **Marine Pollution Bulletin**, 2011, v. 62, p. 1895–1904.

DUFFUS J. H. “Heavy Metals” - A Meaningless term chemistry international. Research Triangle Park, 2001. v.23, n. 6, p.163-168.

FABRICIUS K. E.; COOPER T. F.; HUMPHREY C.; UTHICKE S.; DE'ATH G.; DAVIDSON J.; LEGRAND H.; THOMPSON A.; SCHAFFELFE B. A bioindicator system for water quality on inshore coral reefs of the Great Barrier Reef. **Marine Pollution Bulletin.**, 2012. V. 65, p. 320–332.

FERRARO M. V. M.; FENOCCHIO A. S.; MANTOVANI M. S.; RIBEIRO C. de O.; CESTARI M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, 2004, v. 27, p. 103–107.

FISH J. T. Groundwater water treatment for iron and manganese reduction and fish rearing studies applied to the design of the Ruth Burnett Sport Fish Hatchery, Fairbanks, Alaska. **Aquacultural Engineering**, 2009, v. 41, p. 97–108.

FRENZILLI G.; BOCCHETTI R.; PAGLIARECCI M.; NIGRO M.; ANNARUMMA F.; SCARCELLI V.; FATTORINI D.; REGOLI F. Time-course evaluation of ROS mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. **Marine Environmental Research**, 2004. V. 58, p. 609–613.

FRENZILLI G.; NIGRO M.; LYONS B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, 2009, v. 681, p. 80–92.

GALLOWAY T. S.; BROWN R. J.; BROWNE M. A.; DISSANAYAKE A.; LOWE D.; JONES M. B.; DEPLEDGE M. H. Rapid assessment of marine pollution in Southampton water, UK: a multi-biomarker approach to ecosystem management. **Environmental Science & Technology**, 2004. V.38, n.6, p.1723–1731.

GIARRATANO E.; DUARTE C. A.; AMIN O. A. Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2010. V.73, p.270–279.

GIODA C. R.; LISSNER L. A.; PRETTO A.; DA ROCHA J. B.; SCHETINGER M. R.; NETO J. R.; MORSCH V. M.; LORO V. L. Exposure to sublethal concentrations of Zn(II) and Cu(II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. **Chemo-sphere**, 2007, v. 69, p. 170–175.

GONTIJO A. M. M. C.; BARRETO R. E.; SPEIT G.; REYES V. A. V.; VOLPATO G. L.; SALVADORI D. M. F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research**, 2003. V.534, p.165-172.

GONZALEZ R. J.; GRIPPO R. S.; DUNSON W. A. The disruption of sodium balance in brook char, *Salvelinus fontinalis* (Mitchell), by manganese and iron. **Journal Fish Biology**, 1990, v. 37, p. 765–774.

GORDON C. J. Temperature and Toxicology: And Integrative, Comparative, and Environmental Approach. CRC Press, Boca Raton, USA, 2005. p. 338.

HOWE, P.D., MALCOLM, H.M., DOBSON, S. Manganese and its Compound: Environmental Aspects. Concise International Chemical Assessment Document, 63rd ed. World Health Organization, New York, 2004.

JENA B. S.; NAYAK S. B.; PATNAIK B. K. Age-related changes in catalase activity and its inhibition by manganese (II) chloride in the brain of two species of poikilothermic vertebrates. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, 1998, v. 26, p. 119 – 129.

KIM J-H.; DAHMS H-U.; RHEE J-S.; LEE Y-M.; LEE J.; HAN K-N.; LEE J-S. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes in cadmium-exposed river pufferfish (*Takifugu obscurus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 151, 2010, p. 99 –106.

KLIGERMAN D. Fishes as biological detectors of the effects of genotoxic agents. In: Heddle, J. (Ed.), Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology. **Academic Press**, New York, 1982, p. 435–456.

LAMB J. G.; FRANKLIN M. R. Early events in the induction of rat hepatic UDP-glucuronosyl-transferase, glutathione S-transferase and microsomal epoxide hydro-lase by 1,7-phenanthroline: comparison with oltipraz, tert-butyl-4-hydroxyanisole, and tert-butylhydroquinone. **Drug Metabolism and Disposition**, 2000, v. 28, p. 1018–1023.

LAU P. S.; WONG H. L.; GARRIGUES P. Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong. **Continental Shelf Research**, 2004, v. 24, p. 1969–1987.

LEE I-S.; KIM O. K.; CHANG Y-Y.; BAE B.; KIM H. H.; BAEK K. H. Heavy Metal Concentrations and Enzyme Activities in Soil from a Contaminated Korean Shooting Range. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2002, v. 94, n. 5, p. 406-411.

LEE K-W.; RAISUDDIN S.; RHEE J-S.; HWANG D-S.; YU I-T.; LEE Y-M.; PARK H. G.; LEE J-S. Expression of glutathione S-transferase (GST) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. **Aquatic Toxicology**, 2008. V.89, p.158–166.

LEINIÖ S.; LEHTONEN K. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. **Comparative Biochemical Physiology Part C**, 2005, v. 140, p. 408–421.

LI S.; HU J.; LIU B. Use of chemically modified PMMA microspheres for enzyme immobilization. **BioSystems**, 2004. V.77, p.25–32.

LOPEZ-OLMEDA J. F.; SANCHEZ-VAZQUEZ F. J. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Thermal Biology**, 2011. V.36, p.91–104.

MAGNUSON J. J.; CROWDER L. B.; MEDVICK P. A. Temperature as an ecological resource. **American Zoologist**, 1979. V.19, p.331–343.

MOORE M. N.; DEPLEDGE M. H.; READMEN J. W.; LEONARD D. R. P. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research**, 2004. V.552, p.247–268.

NELSON J. S. *Fishes of the World*. Wiley, Hoboken, NJ, USA, 2006.

NIYOGI S.; BISWAS S.; SARKER S.; DATTA A. G. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, 2001. V.52, p.13-26.

NUDI A. H.; WAGENER A. L. R.; FRANCONI E.; SCOFIELD A. L.; SETTE C. B.; VEIGA A. Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. **Environment International**, 2007, n. 33, p. 315 – 327.

OSS R. N. Efeito crônico do cobre em robalo peva (*Centropomus parallelus*). 2011. Dissertação de mestrado, disponível em: <[http://www.uvv.br/edital\\_doc/22.%20RODRIGO%20NUNES%20OSS.pdf](http://www.uvv.br/edital_doc/22.%20RODRIGO%20NUNES%20OSS.pdf)>.

OSTERAUER R.; KÖHLER H. Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, 2008. V.86, p.485–494.

PADRANGI R.; PETRAS M.; RALPH S.;VRZOC M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environmental Molecular Mutagenesis.**, 1995. V.26, p.345-356.

PARTRIDGE G. J.; LYMBERY A. J. Effects of manganese on juvenile mullet (*Argyrosomus japonicus*) cultured in water with varying salinity implications for inland mariculture. **Aquaculture**, 2009, v. 290, p. 311–316.

PÉREZ-PINZÓN M. A.; LUTZ P. L. Activity related cost of osmoregulation in the juvenile snook (*Centropomus undecimalis*). Florida: **Bulletin of Marine Science**, 1991. V.48, n.1, p.58-66.

RADI A. A.; MATKOVICS B. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein content and lipid peroxidation of carp tissues. **Comparative Biochemistry Physiology Part C**, 1988, v. 90, p. 69–72.

RAMIREZ O. A. B.; GARCÍA F. P. Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapán, Hidalgo, Mexico. **Mutagenesis**, 2005, v. 20, n. 4, p. 291–295.

REZG R.; MORNAGUI B.; EL-FAZAA S.; GHARBI N. Biochemical evaluation of hepatic damage in subchronic exposure to malathion in rats: Effect on superoxide dismutase and catalase activities using native PAGE. **Comptes Rendus Biologies**, 2008, v. 331, p. 655–662.

RIVAS L. R. The Florida fishes of the genus *Centropomus*, commonly known as snook. Quarterly Journal of the Florida Academy of Science. Ichthyological Laboratory and Museum, Department of Zoology, University of Miami. Contribution n. 42. Florida: **Florida Academy of Sciences**, 1962. V.25, n.1, p.53-64.

RODRIGUEZ V. M.; JIMENEZ-CAPDEVILLE M. E.; GIORDANO M. The effects of arsenic exposure on the nervous system. **Toxicology Letters**, 2003, v. 145, p. 1–18.

ROMEO M.; BENNANI N.; GNASSIA-BARELLI M.; LAFAURIE M.; GIRARD J. P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax* . **Aquatic Toxicology**, 2000, v. 48, p. 185 –194.

ROSETY M.; RODRIGUEZ M. R.; ORDONEZ F. J.; ROSETY I. Time course variations of antioxidant enzyme activities and histopathology of gilthead seabream gills exposed to malathion, **Histology and Histopathology**, 2005, v. 20, n. 4, p. 1017–1020.

RUSSO C.; ROCCO L.; MORESCALCHI M. A.; STINGO V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2004, v. 57, p. 168–174.

SALAS F.; NETO J. M.; BORJA A.; MARQUES J. C. Evaluation of the applicability of a marine biotic index to characterize the status of estuarine ecosystems: the case of Mondego estuary (Portugal). **Ecological Indicators**, 2004. V.4, p.215–225.

SANCHEZ W.; PALLUEL O.; MEUNIER L.; COQUERY M.; PORCHER J. M.; AIT-AISSA S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. **Environmental Toxicology Pharmacology**, 2005, v. 19, p. 177 –183.

SCHLENK D.; HANDY R.; STEINERT S.; DEPLEDGE M.; BENSON W. Biomarkers. In: DI GIULIO R. T.; HINTON D. E. Editors. **The Toxicology of Fishes**. CRC Press; Boca Raton, FL:2008, p.683-715.

TALAPATRA S. N.; BANERJEE S. K. Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms. **Food and Chemical Toxicology**, 2007, v. 45, p. 210–215.

THAIN J. E.; VETHAAK A. D.; HYLLAND K. Contaminants in marine ecosystems: developing an integrated indicator framework using biological-effect techniques. **ICES Journal of Marine Science**, 2008. V.65, p.1508–1514.

TÜZEN, M. Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea (Turkey) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food chemistry**, 2003. v.80, p. 119-123.

VENTURA E. C.; GAELZER L. R.; ZANETTE J.; MARQUES M. R. F.; BAINY A. C. D. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research**, 2002, v. 54, p. 775-779.

VERLECAR X. N.; JENA K. B.; CHAINY G. B. N. Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, 2007, v. 76, p. 745–752.

VIARENGO A.; LOWE D.; BOLOGNESI C.; FABBRI E.; KOEHLER A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemical Physiology Part C**, 2007. V.146, n.3, p.281–300.

VIEIRA M. C.; TORRONTERAS R.; CÓRDOBA F.; CANALEJO A. Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2012, v. 78, p. 212–217.

VILCHES M. Análise genotóxica do rio Cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores. Novo Hamburgo, 2009. Dissertação de mestrado. Disponível em: <<http://ged.feevale.br/bibvirtual/Dissertacao/DissertacaoMelissaVilches.pdf>>

VILLELA I. V.; DE OLIVEIRA I. M.; DA SILVA J.; HENRIQUES J. A. P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis**, 2006, v. 605, n. 1–2, p. 78– 86.

VLAHOGIANNI T.; DASSENAKIS M.; SCOULLOS M. J.; VALAVANIDIS A. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. **Marine Pollution Bulletin**, 2007, v. 54, p. 1361–1371.

WILHELM FILHO D.; TORRES M. A.; MARCON J. L.; FRAGA C. G.; BOVERIS A. Comparative antioxidant defences in vertebrates – emphasis on fish and mammals. **Trends in Comparative Biochemistry & Physiology**, 2000, v. 7, p. 33–45.

WILHELM FILHO D.; TRIBESS T.; GASPARI C.; CLAUDIO F. D.; TORRES M. A.; MAGALHAES A. R. M. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). **Aquaculture**, 2001, v. 203, p. 149–158.

WOIWODE J. G.; ADELMAN I. R. Effects of starvation, oscillating temperatures, and

photoperiod on the critical thermal maximum of hybrid striped x white bass. **Journal of Thermal Biology**, 1992. V.17, p.271–275.

WON E-J.; KIM R-O.; RHEE J-S.; PARK G-S.; LEE J.; SHIN K-H.; LEE Y-M.; LEE J-S. Response of glutathioneS -transferase (GST ) genes to cadmium exposure in the marine pollution indicator worm, *Perinereis nuntia*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 2011. V.154, p.82–92.

YOSHIMOTO M.; SAKAMOTO H.; YOSHIMOTO N.; KUBOI R.; NAKAO K. Stabilization of quaternary structure and activity of bovine liver catalase through encapsulation in liposomes. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007. V.41, p.849–858.

ZANETTE J.; NUNES F. F.; MEDEIROS I. D.; SIEBERT M. N.; MATTOS J. J.; LÜCHMANN K. H.; MELO C. M. R.; BAINY A. C. D. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, 2008, v. 66, p. 196-198.