

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

**EFEITOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL NA
REPRODUÇÃO DE OURIÇO-DO-MAR (*Echinomentra lucunther*).**

TATIANA MIURA PEREIRA

VILA VELHA

FEVEREIRO / 2017

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

**EFEITOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL NA
REPRODUÇÃO DE OURIÇO-DO-MAR (*Echinomentra lucunther*).**

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

TATIANA MIURA PEREIRA

VILA VELHA

FEVEREIRO / 2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M618e Pereira, Tatiana Miura.
 Efeitos da fração solúvel do óleo diesel na
 reprodução de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunther*) /
 Tatiana Miura Pereira – 2017.
 48 f.: il.

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

 1. Ecologia. 2. Contaminação. 3. Ouriço-do-mar.
 I. Chippari-Gomes, Adriana Regina. II. Universidade Vila
 Velha. III. Título.

CDD 577

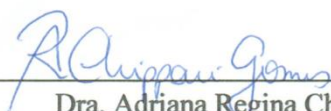
TATIANA MIURA PEREIRA

**EFEITOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL NA
REPRODUÇÃO DE OURIÇO-DO-MAR (*Echinometra lucunther*).**


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

Aprovada em 23 de fevereiro de 2017

Banca examinadora



Dra. Adriana Regina Chippari-Gomes - UVV
Presidente e orientadora



Dr. Levy de Carvalho Gomes - UVV



Dr. Eduardo Schettini Costa - UFES

Dedico, aos meus pais, Silvana e João Batista, que mesmo diante de todas as dificuldades sempre me apoiaram ao longo do meu estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS primeiramente, por me dar força e persistência e por sempre direcionar a minha vida nos momentos difíceis e por sempre me direcionar ao caminho certo.

À Dra. Adriana Regina Chippari Gomes, minha orientadora, por ter me acolhido como filha, me ensinado bastante ao longo desse tempo juntas, por ter me direcionado ao melhor caminho da pesquisa, por ter me feito adorar a ciência e a pesquisa, por ter aguentado meus momentos de ansiedade e me tranquilizado quando foi necessário. MUITO OBRIGADA.

Ao Dr. Levy Gomes, pelo seu incentivo e pelo seu apoio durante todo o desenvolvimento do meu mestrado. Pelos conselhos e oportunidades oferecidas.

À todos os professores do programa PPGEE e aos professores dos demais programas que ao longo da realização do meu projeto estiveram disponíveis para me ajudar. À Universidade Vila Velha pela estrutura e parceria. À CAPES por ter me concedido a bolsa e por principalmente ter tornado possível o meu sonho de virar mestre.

Agradeço aos meus pais João Batista e Silvana por todo o apoio e incentivo ao longo do mestrado. Por aguentarem os momentos difíceis, por vibrarem nos momentos positivos, pelas saídas de coleta nas manhãs de domingo e principalmente por acreditarem em mim e nunca terem me deixado desistir.

À minha amiga Julia Merçon, minha companheira de todas as horas, que fez parte ativamente desse trabalho. Obrigada por compartilhar os momentos de ansiedade e alegria, por ter me escutado e apoiado, pelas dicas, por ter ido a diversas coletas e bancadas. Não só isso, mas ao longo dos dois anos por ter dividido comigo todas as conquistas. Obrigada pela sua parceria, com toda certeza nossos momentos no laboratório serão sempre lembrados.

Aos amigos Taciana, Larissa, Dandara e Gabriel por terem formado comigo a melhor equipe. Muito obrigada pelos feriados perdidos em coletas e extração de gametas de ouriços. Pelos risos de distração nas horas do almoço, pelos ouvidos emprestados nas horas de angústia. MUITO OBRIGADA. Vocês foram parte importante ao longo desses dois anos. As manhãs e tardes não seriam as mesmas sem vocês.

À equipe do Laboratório de Ictiologia Aplicada (LAB-PEIXE) pelo suporte que me foi dado, pela colaboração para que esse trabalho fosse executado da melhor forma possível.

E desde já, aos membros da banca que aceitaram o convite para contribuir com meu trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	1
2. INTRODUÇÃO	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 PREPARO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL (FSD).....	13
3.2 QUANTIFICAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS PRESENTES NA FSD.....	14
3.3 COLETA DE ORGANISMOS	14
3.4 OBTENÇÃO DE GAMETAS	14
3.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL I	15
3.5.1 BIOENSAIO COM GAMETAS E EMBRIÕES DE <i>Echinometra lucunther</i>	15
3.5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
3.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL II.....	17
3.6.1 BIOENSAIO COM ADULTOS DE <i>Echinometra lucunther</i>	17
3.6.2 PERÍODO DE ACLIMATAÇÃO DOS OURIÇOS-DO-MAR.....	17
3.6.3 BIOENSAIO.....	17
3.6.4 COLETA DE ÓRGÃOS E ANÁLISES BIOQUÍMICAS	18
3.6.4.1 PROTEÍNA TOTAL	18
3.6.4.2 GLUTATIONA S-TRANSFERASE ((GST) E.C. 2.5.1.18).....	18
3.6.4.3 CATALASE (CAT) E.C. 1.11.1.6).....	19
3.6.5 OBTENÇÃO DE GAMETAS E TESTE DE FERTILIZAÇÃO.....	19
3.6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4. RESULTADOS	20
4.1. ANÁLISE QUÍMICA DA ÁGUA	20

4.2 EXPOSIÇÃO DE GAMETAS E EMBRIÕES À FSD	21
4.2.1 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM GAMETAS (TESTE DE FERTILIZAÇÃO)	21
4.2.2 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM EMBRIÕES (LARVAS PLUTEUS)	22
4.3 EXPOSIÇÃO DE ADULTOS DE <i>Echinometra lucunther</i>	23
4.3.1 TAXA DE FECUNDAÇÃO DOS INDIVÍDUOS ADULTOS EXPOSTOS À FSD	23
4.3.2 TAXA DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIOS DOS ADULTOS EXPOSTOS À FSD	24
4.3.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	25
4.3.3.1 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST).....	25
4.3.3.2 CATALASE (CAT).....	25
5. DISCUSSÃO	26
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
7. REFERÊNCIAS	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Ouriços-do-mar (*Echinometra lucunther*) durante o bioensaio de 96 h. Os organismos foram colocados em grupos de três indivíduos, em aquários de plástico de 20 L, de forma aleatória tanto para o grupo controle como para o grupo exposto a concentração de 2,5 % da fração solúvel do óleo diesel (FSD). (B) Ouriços-do-mar (*Echinometra lucunther*) durante o período de aclimação. Os organismos foram colocados em grupos de quatro indivíduos, em aquários de plástico de 20 L18

Figura 2. (A) Extração de gônadas de ouriços-do-mar (*Echinometra lucunther*). A gônada é caracterizada pela coloração amarelada (indicada pela seta). (B) Extração do gameta masculino de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunther*). O gameta masculino caracteriza-se pela coloração esbranquiçada (indicada pela seta). (C) Extração do gameta feminino de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunther*). O gameta feminino caracteriza-se pela coloração alaranjada (indicado pela seta).....19

Figura 3. Taxa de fecundação dos espermatozoides de *Echinometra lucunther* expostos a diferentes concentrações da fração solúvel do óleo diesel (FSD). Letras diferentes representam diferenças significativas na viabilidade de fecundação dos espermatozoides entre as concentrações ($p = \leq 0,05$). Dados como média \pm desvio padrão.....22

Figura 4. Taxa de desenvolvimento de larvas pluteus de *Echinometra lucunther* expostos a diferentes concentrações da fração solúvel do óleo diesel (FSD). Letras diferentes representam que o desenvolvimento das larvas reduziu significativamente entre as concentrações testadas das FSDs ($p = \leq 0,05$). Dados como média \pm desvio padrão.....23

Figura 5. Taxa de fecundação em indivíduos adultos de *Echinometra lucunther* expostos à fração solúvel do óleo diesel (FSD). * representa a redução significativa na taxa de fecundação dos indivíduos expostos a concentração em relação ao grupo 0 (controle) (teste t : $p = 0.0009$; $t = 9.115$; $df = 18$) (Dados como média \pm DP).24

Figura 6. Taxa de desenvolvimento das larvas pluteus de indivíduos adultos de *Echinometra lucunther* expostos à fração solúvel do óleo diesel (FSD). * representa

diferença significativa do grupo exposto em relação ao grupo 0 (controle) (teste *t*: $p = 0.000001$; $t = 13.217$; $df = 18$) (Dados como média \pm DP).....24

Figura 7. Atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST) em gônadas de *Echinometra lucunther* expostos à fração solúvel de óleo diesel (FSD). * representa diferença significativa do grupo exposto em relação ao grupo 0 (controle) (teste *t*: $p = 0.001$; $t = 4.515$; $df = 8$) (Dados como média \pm DP).....25

Figura 8. Atividade da enzima Catalase (CAT) em gônadas de *Echinometra lucunther* expostos à fração solúvel de óleo diesel (FSD). * representa diferença significativa do grupo exposto em relação ao grupo 0 (controle) (teste *t*: $p = 0.001$; $t = 5.513$; $df = 8$) (Dados como média \pm DP).....26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação dos números de fêmeas e machos de ouriços-do-mar utilizados em cada extração de gametas.....15

Tabela 2. Quantificação dos hidrocarbonetos mono e poliaromáticos (BTEX e HPAs) presentes na fração solúvel do óleo diesel (FSD) diluída em 0,5; 1,5 e 2,5%.....21

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT – NBR = Associação brasileira de normas técnicas

BTEX = Hidrocarbonetos monoaromáticos (Benzeno, Tolueno, etileno e Xileno).

CAT = Catalase

EROs = Espécies reativas de oxigênio

FSD = Fração solúvel do óleo diesel (FSD)

GST = Glutathione S-transferase

PAHs = Hidrocarbonetos poliaromáticos

SET = Sea urchin embryo test

RESUMO

Pereira, Tatiana, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2017. **Efeitos da fração solúvel do óleo diesel na reprodução de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunther*)**. Orientadora: Dr^a Adriana Regina Chippari Gomes.

Considerando o elevado número de acidentes com derramamento de óleo diesel que vem ocorrendo atualmente no ecossistema marinho, testes de toxicidade voltados para a avaliação dos efeitos deste poluente nos organismos residentes são necessários e urgentes. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade da fração solúvel do óleo diesel (FSD) em gametas e larvas pluteus de ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunther* e também, avaliar a toxicidade deste contaminante através do estresse oxidativo utilizando os biomarcadores GST e CAT em gônadas de indivíduos adultos dessa espécie, bem como, o potencial tóxico nas taxas de reprodução desses indivíduos adultos, através da exposição à FSD. Para isso, gametas e embriões foram expostos às concentrações de 0,5, 1,5 e 2,5 % da FSD e ao grupo controle (sem contaminante) e, indivíduos adultos foram expostos à concentração de 2,5 % da FSD e ao grupo controle (sem contaminante). A viabilidade dos gametas foi reduzida significativamente nas concentrações testadas em relação ao grupo controle tanto na exposição dos adultos quanto na exposição direta dos gametas. Na concentração de 2,5 % a viabilidade dos gametas expostos diretamente foi reduzida em 55 % enquanto na exposição dos adultos a viabilidade foi reduzida em 44 %, esses resultados indicam um alto potencial tóxico da FSD na viabilidade dos gametas. O desenvolvimento das larvas pluteus também foi reduzido significativamente tanto na exposição dos adultos (60 % na concentração 2,5 %) quanto na exposição direta das larvas (68 % na concentração 2,5 %) o que mostra o potencial teratogênico da FSD. Esses resultados sugerem que os hidrocarbonetos constituintes da FSD apresentam propriedades tóxicas que podem afetar as células reprodutivas e também reduzir as taxas de crescimento larval. Para avaliação do estresse oxidativo ambos os biomarcadores enzimáticos GST e CAT utilizados apresentaram uma inibição significativa da sua atividade de 51,10 % e 40 %, respectivamente, em relação ao grupo controle. Dentre eles a GST se mostrou mais eficaz para avaliação do estresse oxidativo, pois, a sua inibição pode estar relacionada ao uso do seu co-substrato GSH como primeira linha de defesa contra a FSD. Portanto, fica claro que o óleo diesel pode promover alterações significativas em fases de vida

iniciais e adultas de um organismo e, a melhor forma de se avaliar essa toxicidade seria a avaliação desse contaminante em todo o ciclo reprodutivo de uma espécie.

Palavras chaves: Ouriços-do-mar, Biomarcadores, Fecundação, Embrião, BTEX e PAHs.

ABSTRACT

Pereira, Tatiana, M.Sc., University Vila Velha – ES, february of 2017. **Effects of the soluble fraction of diesel oil on the reproduction of sea urchin (*Echinometra lucunther*)**. Advisor: Dr^a Adriana Regina Chippari Gomes.

Considering the high number of accidents with diesel oil spills currently occurring in the marine ecosystem, toxicity tests aimed at assessing the effects of these pollutants on resident organisms are necessary and urgent. The objective of this study was to evaluate the toxicity of the diesel oil in gametes and pluteus larvae of *Echinometra lucunther* species and to evaluate the toxicity of this contaminant through oxidative stress using the GST and CAT biomarkers in gonads of adult individuals of this species, as well as the toxic potential in the reproduction rates of these adult individuals, through exposure to the soluble fraction of diesel oil (SFD). For this, gametes and embryos were exposed to concentrations of 0.5, 1.5 and 2.5 % of SFD and to the control group, and adult were exposed to the concentration of 2.5% of SFD and to the control group (without contaminant). The viability of gametes was significantly reduced at concentrations tested relative to the control group in both adult exposure and direct gametes exposure. At the 2.5 % concentration the viability of the directly exposed gametes was reduced by 55 % while in the adults exposure the viability was reduced by 44%, these results indicate a high toxic potential of the FSD in the viability of the gametes. The development of pluteus larvae was also significantly reduced both in adult exposure (60 % in concentration 2.5 %) and in direct exposition of larvae (68 % in concentration 2.5 %), which shows the teratogenic potential of SFD. These results suggest that hydrocarbons constituents of FSD exhibit toxic properties that can affect reproductive cells and also reduce larval growth rates. In order to evaluate oxidative stress, both the GST and CAT enzyme biomarcoders showed a significant inhibition of their activity of 51.10 % and 40 %, respectively, in relation to the control group. Among them, GST has been shown to be more effective in the evaluation of oxidative stress because its inhibition may be related to the use of its GSH co-substrate as the first line of defense against SFD. Therefore, it is clear that diesel oil can promote significant changes in early and adult life stages, and the best way to assess this toxicity would be the evaluation of this contaminant throughout the reproductive cycle of a species.

Key words: Sea urchin, Biomarkers, Fertilization, Embryo, BTEX and PAHs.

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

CONTAMINAÇÃO DO ECOSISTEMA MARINHO POR ÓLEO DIESEL E SUA FRAÇÃO SOLÚVEL (FSD)

O ambiente marinho, atualmente, recebe todos os tipos de poluentes oriundos da indústria, agricultura, lixo urbano e esgoto doméstico, comprometendo a viabilidade da água e promovendo problemas para a biota residente. Dentre esses diferentes tipos de poluentes aquáticos, o petróleo e seus derivados são uns dos mais relevantes para a ecotoxicologia e têm causado muitas preocupações, tanto pela frequência dos eventos de contaminação, como pelo potencial poluidor dos seus compostos (Pacheco e Santos, 2001a; Tiburtius et al., 2004). As fontes de entrada do petróleo para o mar são diversas e podem ser categorizadas em quatro grupos principais, infiltrações naturais, extração de petróleo, transporte e consumo (Rodrigues et al., 2010). Acidentes envolvendo derramamento de petróleo ocorrem com frequência em todo o mundo e a estimativa anual de entrada de petróleo para o mar excede as 1.300.000 toneladas métricas (ANP, 2014). No Brasil os maiores eventos de poluição marinha por derramamento de petróleo estão relacionados à ruptura de dutos de óleo e derramamento de petroleiros (Meniconi et al., 2002). Embora esses grandes vazamentos sejam muito preocupantes e ocupem um considerável espaço na mídia, estima-se que a principal fonte de contaminação marinha por petróleo e seus derivados deva-se a pequenos e contínuos vazamentos de combustíveis oriundos de atividades recreativas aquáticas e o uso generalizado do óleo diesel em pequenas embarcações e máquinas pesqueiras (Fedato et al., 2010; Simonato et al., 2011).

. O óleo derramado sofre vários processos de intemperismo (bióticos e abióticos) que alteram a sua composição física e química. Os processos de intemperismo que contribuem para o destino do óleo diesel nesse ecossistema incluem evaporação, dissolução, dispersão, fotodegradação, biodegradação e sedimentação (National Academy of Science, 2003). Embora as atividades de evaporação possam reduzir a quantidade de óleo diesel que entra no ambiente, uma fração desse óleo dissolve-se na água do mar e continua a exercer efeitos adversos sobre o ambiente marinho (Clement et al., 1980). Além disso, em ambientes tropicais, a fotodegradação e a biodegradação representam um papel importante na quebra do óleo diesel aumentando ainda mais a

dispersão desses componentes no ambiente, e ainda podem transformar os componentes do óleo em mais frações solúveis (Lee, 2003; Saeed et al., 2011).

Define-se óleo diesel como sendo uma mistura de hidrocarbonetos constituída por frações com ponto de ebulição superior ao do querosene e inferior ao dos lubrificantes, que corresponde aos destilados intermediários do petróleo e cuja faixa de destilação se situa, aproximadamente, entre 190 a 330 °C (Vieira et al., 2007). Quimicamente, o óleo diesel é constituído basicamente por hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos, naftênicos e aromáticos, e em menores quantidades, moléculas de enxofre, nitrogênio, metais e oxigênio (Vieira et al., 2007). As frações solúveis costumam apresentar um maior número de hidrocarbonetos mono e poliaromáticos o que confere alto grau de toxicidade a essas frações. Os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno e xileno (BTEX) estão entre os compostos mais danosos ao ambiente devido à sua alta solubilidade em água (fator diretamente relacionado ao seu potencial poluidor) e à sua alta toxicidade crônica. Por outro lado, os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) são um dos piores contaminantes do ambiente marinho devido à sua ação mutagênica e seus efeitos cancerígenos para a biota (Bellas et al., 2003 Perrichon et al., 2016).

TOXICIDADE DOS HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS (BTEX) E POLIAROMÁTICOS (HPAS)

Hidrocarbonetos dos grupos BTEX e HPAs recentemente tornaram-se motivo de preocupação mundial devido ao seu efeito bioacumulativo, sua toxicidade e propriedades cancerígenas, sendo considerados muitas vezes como produtos orgânicos persistentes (POPs) no ambiente (Ma et al., 2005). Apesar da produção e do uso desses compostos terem sido banidos por quase 30 anos, eles ainda são muito utilizados como constituintes do petróleo e de seus produtos destilados sendo facilmente detectáveis no ambiente por possuírem uma longa meia vida (Qiu et al., 2005).

Hidrocarbonetos monoaromáticos como os benzenos, toluenos, etilenos e xilenos (BTEX) são constituintes encontrados no petróleo e seus produtos destilados, sendo considerados os mais voláteis. A poluição marinha por óleo diesel tem se tornado um fator preocupante devido aos efeitos ecológicos adversos causados pelo grupo BTEX (An, 2004). A toxicidade dos componentes do grupo BTEX se deve principalmente ao alto potencial de dissolução desses compostos em água e pela sua

elevada pressão de vapor. Os constituintes benzeno e tolueno apresentam uma maior solubilidade em água, já os etilenos e xilenos são mais resistentes aos processos de biodegradação (Mariano et al., 2008). Dentre estes, o benzeno mostra-se especialmente tóxico, podendo provocar câncer quando em condição de exposição crônica, principalmente devido à absorção por via respiratória (Peralta-Zamora et al., 2005). Além disso, os BTEX possuem uma grande habilidade de migração, não só em ambientes aquáticos como também em ambientes terrestres (Tiburtius et al., 2005).

Já os HPAs tornaram-se contaminantes ambientais bastante difundidos devido à sua ocorrência em petróleo e produtos destilados, carvão, fuligem e poluentes atmosféricos, sendo apontados como principal fonte de contaminação do ambiente marinho e de água doce (Reynaud e Deschaux, 2006). Grupos de HPAs são compostos orgânicos semi-voláteis com pelo menos dois anéis de benzeno em sua composição, são persistentes e bioacumuláveis, causando efeitos tóxicos mutagênicos nos organismos e apresentando propriedades cancerígenas (Bandowe e Wilcke, 2010). Os HPAs são facilmente absorvidos pelos seres vivos devido à alta partição do coeficiente octanol/água (K_{ow}) que favorece a transferência rápida da fase aquosa para compartimentos lipofílicos (como por exemplo, a camada lipídica das membranas celulares), essas substâncias podem ser metabolizadas em compostos que são detectáveis em fluídos e podem ser utilizados como biomarcadores da exposição ao petróleo e seus destilados (Sette et al., 2013). O metabolismo dos HPAs está presente em diferentes grupos de invertebrados e vertebrados, envolvendo processos de hidroxilação e conjugação destinados a biotransformar a substância parental em um composto mais solúvel e rapidamente excretado. Na fase I do metabolismo dos HPAs, as reações funcionais podem formar derivados epóxi e hidroxila (derivados hidroxilados) por vários citocromos adicionando grupos funcionais reativos tais como -OH, -NH₂, -SH e -COOH, à molécula do contaminante. Estes são os compostos eletrofílicos mais reativos que podem causar efeitos e danos a substratos endógenos tais como proteínas, membranas e DNA (Orbea et al., 2002). A fase II é caracterizada por reações de conjugação, representando a principal via de desintoxicação, aumentando a solubilidade do contaminante. Os metabólitos da fase I são convertidos em compostos conjugados (grupos polares), altamente solúveis em água, tais como glicoronídeo ou sulfatos, que podem se acumular nos organismos e posteriormente serem eliminados através da via de excreção (Sette et al., 2013).

BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

A partir da segunda metade do século passado, a concentração de compostos tóxicos em corpos d'água tem crescido de forma alarmante, com isso surgiu a necessidade de um acompanhamento dessas áreas (Arias et al., 2007), denominado de monitoramento ambiental, onde análises físico-químicas da água e dos sedimentos são realizados rotineiramente. No entanto essa forma de acompanhamento ambiental foi complementada com a utilização de organismos indicadores (bioindicadores), os quais permitem avaliar o “status” dos contaminantes no ambiente, bem como sua identificação e quantificação na biota, além dos efeitos que causam nestes organismos. Essa forma de se avaliar o grau de poluição aquática é denominada de biomonitoramento ambiental (Prego e Cobelo-García, 2003).

Os bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença e abundância são indicativos biológicos de uma determinada condição ambiental. Os bioindicadores são importantes para avaliar um determinado fator antrópico ou um fator natural com algum potencial impactante, representando, portanto uma ferramenta importante na avaliação da integridade do ecossistema (Napierska et al., 2009). Um organismo deve apresentar uma série de características para ser considerado um potencial bioindicador. Entre essas características pode-se descartar a ampla distribuição geográfica, ecologia e morfologia suficientemente estudada, importância ecológica e econômica e, certa sensibilidade ao contaminante (Prego e Cobelo-García, 2003; Moreno et al., 2004).

USO DE OURIÇO-DO-MAR (*Echinometra lucunter*) COMO BIOINDICADOR

Equinodermos são animais exclusivamente marinhos, estão inclusos entre os grupos de animais mais conhecidos e estudados do litoral e, estão amplamente distribuídos em todos os oceanos. Existem cerca de 7.000 espécies de equinodermos subdivididas em cinco classes, incluindo as crinoidea (lírios-do-mar), asteroidea (estrelas-do-mar), ophiuroidea (serpentes-do-mar), holothuroidea (pepinos-do-mar) e echinoidea (ouriços-do-mar) (Sugni et al., 2007). Os equinodermos são dotados de um endoesqueleto calcário provido de espinhos, e embora o endoesqueleto não seja uma coluna vertebral, ele é importante na sustentação do corpo, pois é bem desenvolvido e resistente (McClintock, 1994).

Ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) possuem hábito de vida bentônico, e uma capacidade bioerosiva que permite que habitem tocas em substratos rochosos. Essa característica confere aos organismos dessa espécie uma grande importância ecológica, pois, assim conseguem modificar a arquitetura do ecossistema e a estrutura da comunidade existente. Sua distribuição geográfica se estende do sul da Carolina do Norte e Bermudas (EUA) ao sul do Brasil. No litoral brasileiro, ocorrem em densidades bastante elevadas principalmente nos costões rochosos da região sudeste e sul. Esses echinoideas são herbívoros e podem exercer um controle significativo na população de algas, podendo também se alimentar de pequenos organismos incrustantes (Lima et al., 2009; Mariante et al., 2009).

Existem muitos aspectos relevantes que provam que os *E. lucunter* podem ser bons biodindicadores de contaminação ambiental. Primeiro, eles são componentes chave dos ecossistemas marinhos, contribuindo com mais de 90 % da biomassa bentônica (Brusca e Brusca, 1990), e muitas vezes desempenham papéis ecológicos importantes (p.ex. na maior parte do litoral tropical os ouriços-do-mar contribuem com o controle da comunidade de algas e bentos) (Lawrence, 1975). Segundo, possuem o epitélio externo expandido através do qual podem captar substâncias dissolvidas no ambiente e, seus hábitos bentônicos podem torná-los mais suscetíveis a captar poluentes adsorvidos nos sedimentos marinhos (Candia Carnevali, 2005). Terceiro, eles são predadores de segundo ou terceiro grau e por isso, estão sujeitos a processos de biomagnificação. E por último, sua biologia de desenvolvimento é bem caracterizada, testes envolvendo seus gametas e embriões já são bem estudados e de fácil manipulação (Cameron, 2002).

TESTES COM GAMETAS E EMBRIÕES DE OURIÇOS-DO-MAR (*Echinometra lucunter*)

A utilização de gametas e embriões de ouriços-do-mar em testes ecotoxicológicos foi estabelecida por diversos pesquisadores com a finalidade de investigar os efeitos dos contaminantes na fertilização e desenvolvimento desses animais (Dinnel et al., 1988). Essas fases costumam ser críticas para o crescimento normal dos ouriços e sensíveis para detectar efeitos da poluição em ambientes marinhos (Kobayashi, 1971). As perturbações que ocorrem no meio ambiente devido à liberação de compostos nocivos podem gerar efeitos graves sobre as populações e ecossistemas.

Por exemplo, as fases de vida iniciais de vários organismos são encontradas no plâncton muitas vezes a deriva na superfície da água onde a possibilidade de contato com o contaminante é muito maior. Uma vez em contato com contaminantes os efeitos deletérios causados por estes podem provocar uma diminuição no recrutamento das populações existentes. À medida que a população de reprodução vai sendo prejudicada, a diminuição de novos recrutas resultaria em um declínio gradual das populações prejudicando a ecologia da espécie. Por isso, bioensaios que utilizam gametas, embriões e larvas são ótimas ferramentas para identificação desse estresse ambiental causado pela liberação de contaminantes (Britt e Petersen, 1979; Fernández et al., 2006).

O uso de testes ecotoxicológicos envolvendo gametas e embriões de ouriços-do-mar (sea-urchin embryo test – SET) tem sido frequentemente muito utilizado como uma ferramenta biológica rápida e de baixo custo para avaliação da qualidade da água e sedimentos marinhos em todo o mundo (Saco-Álvarez et al., 2010). Devido à sua fácil disponibilidade, acessibilidade e transparência, os ovos e embriões de ouriços-do-mar têm ajudado a entender os processos deletérios subjacentes à fertilização, divisão celular e outros eventos morfogenéticos que possam ocorrer devido à presença de um determinado contaminante no ecossistema (Bellás et al., 2005; Fernández et al., 2006). O SET é bastante sensível e de fácil realização e, além disso, trata-se de um teste que não requer equipamentos sofisticados. Essas características fazem desse tipo de teste uma excelente ferramenta para ensaios ecotoxicológicos (Britt e Petersen, 1979).

BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Biomarcadores podem ser definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas nas células, fluídos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativos da exposição ou efeito de um contaminante (Lam e Gray, 2003). Ainda podem ser definidos como alterações biológicas que expressam a exposição e/ou efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente (Adams, 2002). Entre os numerosos biomarcadores ecotoxicológicos apresentados nos últimos anos, àqueles que são baseados na resposta ao nível celular e molecular oferecem respostas sobre os primeiros sinais de perturbação ambiental e vêm sendo constantemente utilizados em programas de biomonitoramento (Nigro et al., 2006). Dentre eles destacam-se os biomarcadores enzimáticos. Estes são utilizados na avaliação da toxicidade de contaminantes com o objetivo de analisar a interação entre um componente químico e o

organismo, o que possibilita avaliar efeitos da exposição e os riscos à saúde do ambiente (Amorim, 2003).

BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo tem se tornado um tópico interessante em estudos ecotoxicológicos por conta dos danos causados aos organismos (Kellogg e Fridovich, 1977). Este ocorre quando há um desequilíbrio na geração e remoção de radicais entre os organismos. A maioria desses radicais envolve oxigênio e as espécies são conhecidas como espécies reativas ao oxigênio (EROs) (Sies, 1996). Evidências recentes sugerem que a saúde dos organismos aquáticos esteja ligada a esse estresse oxidativo e a consequente formação das EROs (Winston e Di Giulio, 1991). Portanto, há um crescente interesse particular em processos onde esse estresse pode ser desencadeado por poluentes ambientais (Winston, 1991). Contaminantes em geral induzem a uma formação mais rápida das EROs levando a danos teciduais e celulares mais severos (Modesto e Martinez, 2010). Como forma de proteção os organismos desenvolvem uma via de defesa antioxidante para neutralizar a EROs que é constituída principalmente por enzimas, dentre elas a Glutathione S-Transferase e a Catalase (Samanta et al., 2014). A Glutathione S-Transferase catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) juntamente com vários metabólitos eletrofílicos que estão envolvidos na detoxificação tanto dos intermediários reativos, como dos radicais de oxigênio produzidos pelas EROs (Monteiro et al., 2006), enquanto a Catalase catalisa o peróxido de hidrogênio produzido durante vários processos metabólicos à moléculas de oxigênio e à água, menos tóxicos (Livingstone, 2001).

GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (GST EC 2.5.1.18)

A GST é conhecida por fornecer proteção celular contra os efeitos tóxicos de uma variedade de endógenos e produtos químicos ambientais (Lee et al., 2006). Sua principal função é catalisar a conjugação da glutathione com contaminantes, como por exemplo, os hidrocarbonetos, para facilitar a excreção dos complexos formados (Van der Oost et al., 2003). Comumente, a exposição dos organismos a esse contaminante promove o estresse oxidativo, através da produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênios (EROs) (Lee et al., 2006), fazendo com que a enzima GST aja como um agente detoxificante nas células contra essas EROs (Rogers et al., 1999; Ranson et al., 2000). Em seu mecanismo de defesa, a enzima é responsável pela transferência de

grupos aril e alquil, com exceção do grupamento metil. A principal reação desenvolvida pela GST é: Haletos orgânicos (R-X) + Glutathiona (GSH) → Hidrácido de halogênio (H-X) + R-S-Glutathiona (Tang e Tu, 1994; Lumjuan et al., 2005). A GST possui um centro eletrofílico reativo, são abundantes e muito presentes na natureza e catalisam a conjugação do grupo tiol do tripeptídeo da glutathiona (GSH) em uma variedade de moléculas orgânicas hidrofóbicas. Os conjugados de GSH, que são, geralmente, menos tóxicos, são metabolizados e excretados, posteriormente do organismo. As GSTs também são capazes de unir um grupo diverso de compostos lipofílicos com alta afinidade, reduzindo sua toxicidade e facilitando seu transporte intracelular. Além disso, algumas GSTs possuem atividades peroxidativas capazes de reduzir hidropéroxidos orgânicos (Lau et al., 1980; Tang e Tu, 1994).

CATALASE (CAT EC 1.11.1.6)

A catalase está presente em todos os três domínios da vida (Archaea, bactéria e Eukaryota). A principal reação da enzima é a dismutação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular. A enzima utiliza o H_2O_2 tanto como doador quanto como receptor de elétrons na reação de dismutação (Bravo et al., 1999). Catalases (Hidropoxidases Catalíticas, CHPs) são enzimas onipresentes e estão divididas em quatro grupos principais: catalases clássicas, contendo grupo heme, para as quais H_2O_2 é tanto o doador quanto o receptor de elétrons; as peroxidases catalíticas bifuncionais que contêm grupo heme (CPX), nas quais a atividade catalítica é muito maior que a atividade peroxidativa; catalases que não apresentam grupo heme (Allgood e Perry, 1986); e um grupo mesclado contendo proteínas com menor atividade catalítica, mas nenhuma atividade peroxidática (Jones e Masters, 1978). A maioria das CHPs existem como subunidades tetraméricas de 60-65 kDa (unidade de massa atômica) (Nadler et al., 1986). Mais de 300 sequências de CHPs estão observadas e divididas entre catalases monofuncionais (>225), catalase-peroxidases bifuncionais (>50) e manganocatalases (>25) (Chelikani et al., 2004).

Os organismos utilizam diferentes isoenzimas, que são expressas simultaneamente, ou em estágio de desenvolvimento além de em condições ambientais específicas (Schubert e Wilmer, 1991) para decompor peróxidos em um estado fundamental de O_2 . Catalases dismutam, diretamente, H_2O_2 em água e O_2 por meio de duas reações redox de transferência de elétrons, enquanto que peroxidases removem

H_2O_2 , que são utilizados na oxidação de outro substrato (Schubert e Wilmer, 1991). A enzima CAT representa um papel importante no equilíbrio redox da célula. Embora o peróxido de hidrogênio seja a ERO menos reativa, o composto pode reagir com contaminantes, resultando na produção do radical hidroxila ($OH\cdot$), uma ERO muito reativa e perigosa para o organismo (Gutteridge, 1986; Thomas et al., 2009).

ARTIGO

**EFEITOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL (FSD) NA
REPRODUÇÃO DE OURIÇO-DO-MAR (*Echinometra lucunther*).**

2. INTRODUÇÃO

De todos os problemas causados pelo excesso de poluição no ambiente marinho, um dos mais importantes é a contaminação causada pelo petróleo e seus derivados (Simonato et al., 2008). O óleo diesel é o principal combustível utilizado em grandes e pequenas embarcações pesqueiras como também em barcos e lanchas de recreação, fazendo com que este seja um dos derivados do petróleo mais apontado como responsável pelo aumento na liberação de compostos orgânicos nocivos ao ambiente marinho (Pacheco e Santos, 2001a). O óleo diesel pode promover sérios distúrbios no ecossistema uma vez que suas frações solúveis em água (FSD) podem tornar-se disponíveis à biota marinha (Teles et al., 2003). Essa biodisponibilidade pode se dar por meio da incrustação física do contaminante ao sedimento e também pela solubilidade dos hidrocarbonetos em água (Rodrigues et al., 2010).

O óleo diesel é uma complexa mistura de elementos químicos contendo centenas de substâncias químicas nocivas e uma alta concentração de hidrocarbonetos mono (BTEX) e poliaromáticos (HPAs) que fazem dele o derivado mais perigoso (Pacheco e Santos, 2001a). Na fração solúvel do óleo diesel (FSD), benzenos, toluenos e xilenos (BTEX) estão entre os compostos mais danosos ao ambiente devido à sua alta solubilidade em água (fator diretamente relacionado ao seu potencial poluidor), à sua toxicidade crônica e à sua grande habilidade de migração. Além disso, os BTEX também podem provocar câncer quando em condições de exposição crônica, além de poderem acumular-se em compartimentos lipídicos da membrana celular, perturbando as propriedades fisiológicas da mesma (Peralta-Zamora et al., 2005; Tiburtius et al., 2005; Rodrigues et al., 2010). Já os compostos dos HPAs podem induzir a insuficiência reprodutiva e provocar alterações imunológicas e comportamentais (Sagerup et al., 2016). Os BTEX e os HPAs também são conhecidos por promoverem efeitos mutagênicos e genotóxicos, podendo levar à indução do estresse oxidativo e até mesmo à neoplasia (Nogueira et al., 2013).

A indução do estresse oxidativo provocada pela exposição dos organismos ao BTEX e HPAs ocorre quando espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO) são produzidos em excesso, conduzindo à oxidação de componentes celulares. Esse estado pode causar graves consequências em organismos como a perda da integridade do

DNA, indução de mutações, aberrações cromossômicas, defeitos de nascimento e uma diminuição na taxa de reprodução e crescimento (Frenzilli et al., 2004; Silva et al., 2013). Estudos realizados com invertebrados marinhos (Stømgren e Nielsen, 1991; Cajaraville et al., 1992) afirmam que essa perda na taxa de reprodução e desenvolvimento está ligada à perda da função principal da gônada do animal devido à formação das EROs. As gônadas quando expostas aos grupos BTEX e HPAs reduzem sua atividade de reprodução e passam a servir as exigências de manutenção do metabolismo frente às condições de estresse, o que também aumenta o número de aberrações cromossômicas e defeitos de nascimento. A fim de proteger as células contra essa produção excessiva de EROs, os organismos possuem várias defesas antioxidantes, como as enzimas Glutathione S-Transferase (GST) e Catalase (CAT), essas enzimas agem removendo as EROs, promovendo, assim, uma proteção contra os seus efeitos nocivos, e, portanto, sendo consideradas importantes ferramentas biomarcadoras utilizadas para acessar os efeitos dos contaminantes, podendo detectar efeitos imediatos resultantes da exposição (Livingstone, 2001; Van der Oost et al., 2003).

Ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunther* (Linnaeus, 1758) possuem uma grande importância ecológica por modificarem a arquitetura do ecossistema devido a sua capacidade bioerosiva e, também por contribuírem com o controle da comunidade de algas e bentos. Sua distribuição geográfica se estende do sul dos EUA ao sul do Brasil. No litoral brasileiro, ocorrem em densidades bastante elevadas principalmente nos costões rochosos da região sudeste e sul (Lima et al., 2009; Mariante et al., 2009). Existem muitos aspectos que provam que os *E.lucunther* podem ser bons bioindicadores de contaminação ambiental. Primeiro, eles são componentes chave dos ecossistemas marinhos (contribuindo com mais 90 % da biomassa bentônica) (Brusca e Brusca, 1990). Segundo, possuem o epitélio externo expandido através do qual podem captar substâncias dissolvidas no ambiente e, seus hábitos bentônicos podem torna-los mais susceptíveis a captar poluentes adsorvidos nos sedimentos marinhos (Candia Carnevali, 2005). Terceiro, eles são predadores de segundo ou terceiro grau e por isso, estão sujeitos a processos de biomagnificação. E por último, sua biologia de desenvolvimento é bem caracterizada, testes envolvendo seus gametas e embriões já são bem estudados e de fácil manipulação (Cameron, 2002).

Com isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade da FSD em gametas e larvas pluteus de ouriços-do-mar da espécie *E. lucunther* e, avaliar a

toxicidade desse contaminante através do estresse oxidativo utilizando os biomarcadores bioquímicos GST e CAT em gônadas de indivíduos adultos dessa mesma espécie expostos à FSD, bem como, o potencial tóxico da FSD nas taxas de reprodução desses indivíduos adultos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PREPARO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL (FSD)

Para a obtenção da fração solúvel do óleo diesel (FSD) foi utilizado o óleo diesel automotivo comercial adquirido em posto de abastecimento de combustíveis. A simulação do derrame foi realizada em escala de laboratório de acordo com a metodologia proposta por Nicodem et al. (1998). Na simulação uma parte do diesel foi adicionada a 4 partes de água do mar filtrada, em aquário de vidro, com capacidade de 30 L, e a solução foi exposta por 6 horas à luz solar intensa, iniciando assim a etapa da reação fotoquímica, onde os componentes fotodegradados do combustível foram incorporados à água. Essa mistura foi deixada em repouso por 24 horas. Passado este período, foi realizada a extração das fases: orgânica e aquosa. A fase aquosa (solúvel) foi separada (FSD 100 %) para utilização nos testes de exposição e a fase orgânica (insolúvel) foi descartada apropriadamente. A extração da fase aquosa foi realizada com o auxílio de uma torneira acoplada na parte inferior da lateral do aquário para evitar o contato de ambas às fases. A FSD 100 % foi, portanto, coletada e armazenada em recipiente âmbar, em temperatura controlada de 4 °C, por no máximo sete dias, até o início dos experimentos.

Testes pré-ritos foram realizados a fim de se determinar as concentrações adequadas da FSD a serem utilizadas no presente trabalho, para isso, a FSD 100 % foi diluída inicialmente para 5; 7,5; 10 e 15 % com água do mar filtrada. Os resultados preliminares mostraram um índice de fecundação menor que 21 % na fração de 5 %. Com isso, as concentrações estabelecidas da FSD para o teste definitivo de exposição dos gametas e embriões de *E. lucunther* foram de 0,5; 1,5; e 2,5 %. Os indivíduos adultos de *E. lucunther* foram expostos à maior concentração estabelecida (2,5 %) a fim de se ter uma relação positiva para avaliar o estresse oxidativo em gônadas e os efeitos na reprodução de indivíduos já expostos.

3.2 QUANTIFICAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS PRESENTES NA FSD

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram analisados por cromatografia gasosa/espectrômetro de massas (Perkin-Elmer Clarus® 500) (SM, 2205) de acordo com metodologia proposta por Lim et al. (1996). 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) de acordo com metodologia proposta por Lim et al. (1996).

3.3 COLETA DE ORGANISMOS

Ouriços-do-mar da espécie *E. lucunter* foram coletados em um costão rochoso localizado na praia Curva da Baleia em Jacaraípe, litoral norte do Estado do Espírito Santo (20°10'24.32"S, 40°11'11.89"O). Para o protocolo experimental I, foram coletados 20 indivíduos a fim de se ter uma proporção considerável de machos e fêmeas para extração de gametas e, para o protocolo experimental II, foram coletados 36 indivíduos a fim de ser ter o *n* amostral adequado para o bioensaio com indivíduos adultos. Os ouriços-do-mar foram coletados por meio de mergulho livre entre os meses de março a novembro de 2016, as coletas foram realizadas ao final da lua crescente e início da lua cheia de cada mês (período reprodutivo) e período de maré baixa de acordo com o proposto por Mariantes et al (2009). Após a coleta, os ouriços foram transportados para o Laboratório de Ictiologia Aplicada (Lab Peixe – Complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha – UVV) onde permaneceram devidamente acondicionados em aquários de plástico com capacidade de 20 L (4 animais por aquário) e com aeração constante até o início dos experimentos. A água do mar coletada foi filtrada e mantida respeitando os valores adequados de salinidade (35), temperatura (25 °C) e pH (7,8-8,3) para os testes com ouriços-do-mar de acordo com a norma ABNT-NBR 15350 de métodos de ensaio com ouriços-do-mar (Echinodermata:Echinoidea)/2006.

3.4. OBTENÇÃO DE GAMETAS

A indução da liberação de gametas foi realizada por meio da injeção de 2,5 mL de solução 0,5 M de cloreto de potássio (KCl) na cavidade celomática. Os óvulos das fêmeas (tabela 1) foram coletados em béqueres de 50 mL contendo água do mar filtrada.

Após a observação de sua qualidade, com o auxílio de um microscópio invertido (aumento 40x), os óvulos foram peneirados (malha de 45 µm) para retenção de detritos e acondicionados novamente em béqueres de 50 mL, e sua densidade (nº de óvulos/mL) foi estimada, visando calcular o volume de solução de óvulos acondicionados em cada réplica. O líquido espermático dos machos foi coletado (tabela 1) com auxílio de uma pipeta Pausteur e acondicionado em um béquer de 50 mL sem presença de água e mantido em gelo até o momento de sua utilização. A obtenção de gametas seguiu a norma ABNT-NBR 15350 de métodos de ensaio com ouriços-do-mar (Echinodermata:Echinoidea)/2006.

Tabela 1. Quantificação dos números de fêmeas e machos de ouriços-do-mar utilizados em cada extração de gametas.

	Indivíduos coletados	Fêmeas	Machos
Desova 1	20	8	12
Desova 2	20	11	9
Desova 3	20	7	13
Desova 4	20	12	8
Desova 5	20	6	14
Total	100	44	56

3.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL I

3.5.1 BIOENSAIO COM GAMETAS E EMBRIÕES DE *Echinometra lucunther*

Para o teste de toxicidade crônica com gametas (teste de fertilização), após a obtenção dos gametas e a validação dos mesmos, 0,5 mL de líquido espermático foi diluído em 25 mL de água do mar para ativação e então, 20 µL dessa solução foi adicionada a tubos de ensaio de 20 mL contendo 10 mL das frações 0,5; 1,5 e 2,5 % da FSD e ao controle contendo apenas água do mar filtrada por um período de 20 minutos. Após essa exposição, 400 µL da solução dos óvulos (calculado através da densidade) foram adicionadas a estes tubos de ensaio contendo os espermatozoides para promover a fertilização. Depois de 40 minutos, todos os tubos de ensaio foram fixados com 0,5 mL de formoldeído para observação da taxa de fertilização. A porcentagem de fertilização de cem ovos foi determinada com auxílio de um microscópio invertido (aumento 40x) e câmera de Sedgwick-Rafter. Para o teste de fertilização foram realizados 5 desovas (tabela 1) e, para cada uma das desovas o teste foi feito em quintuplicatas. Para a

aceitabilidade do resultado do ensaio foi necessário que a porcentagem de ovos fertilizados no controle fosse superior ou igual a 80 %.

Para o teste de toxicidade crônica com embriões (larvas pluteus), os gametas femininos peneirados foram adicionados em um béquer de 2 L contendo 600 mL de água do mar filtrada em filtro analítico (47 mm), logo após, 2 mL da solução já diluída e ativada do espermatozoide foi adicionada a esta solução contendo os óvulos. A solução foi agitada por 3 minutos para promover a fecundação e em seguida deixada em repouso por 2 horas para o início do desenvolvimento embrionário. Após 2 horas de fecundação, 100 µL da solução de ovos foi adicionada a tubos de ensaio de 20 mL contendo 10 mL das concentrações 0,5; 1,5 e 2,5 % da FSD e ao controle contendo apenas água do mar filtrada. Os experimentos foram mantidos em incubadora refrigerada B.O.D (TE-371) com temperatura controlada de 26 °C e fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro, por aproximadamente 36 horas, sendo este o tempo necessário para os embriões de *E. lucunter* se desenvolverem até o estágio de larvas pluteus. Depois de 36 horas, todos os tubos de ensaio foram fixados com 0,5 mL de formoldeído para avaliação dos embriões normais (corpo bem caracterizado em formato triangular e braços desenvolvidos) e também aqueles que apresentarem alguma anomalia morfológica ou retardamento no seu desenvolvimento (corpo desestruturado e não desenvolvido e qualquer estágio primário de desenvolvimento embrionário). A avaliação dos embriões foi feita com auxílio de um microscópio invertido (aumento 40x) e câmera de Sedwick-Rafter. Para o teste de embriões foi realizado um total de 5 desovas, e para cada uma das desovas o teste foi realizado em quintuplicata. Para a aceitabilidade do resultado do ensaio foi necessário que a porcentagem de larvas pluteus bem desenvolvidas no controle fosse superior ou igual a 80 %.

Ambos os testes de toxicidade crônica com gametas e embriões foram realizados de acordo com a norma ABNT-NBR 15350 de métodos de ensaio com ouriços-do-mar (Echinodermata:Echinoidea)/2006).

3.5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A apresentação dos dados foi feita na forma de média \pm desvio padrão. Os resultados obtidos foram testados quanto a sua normalidade através do teste Shapiro-Wilk. Os resultados apresentaram distribuição normal ($P = 0.642$) e, em seguida foi

realizado a Análise de Variância (ANOVA – *One Way*) com pós-teste de Tuckey, através do programa SigmaPlot versão 12.5.

3.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL II

3.6.1 BIOENSAIO COM ADULTOS DE *Echinometra lucunther*

3.6.2 PERÍODO DE ACLIMATAÇÃO DOS OURIÇOS-DO-MAR

Após a coleta, os ouriços-do-mar foram mantidos em aquários de plástico com capacidade de 20 L (quatro animais por aquário) (Figura 1B). Os aquários com os organismos adultos foram mantidos em condições de aeração constante, com troca diária total de água e temperatura controlada (± 22 °C) por meio de refrigeração do ambiente de laboratório. Nesses aquários, também foi mantido a salinidade de 35 UPS. Os organismos foram alimentados com macroalgas da espécie *Ulva lactuca* à vontade diariamente. O período de aclimação teve uma duração de 24 h.

3.6.3 BIOENSAIO

Após período de aclimação, os exemplares de *E. lucunther* foram submetidos a um bioensaio de quatro dias (96 h). Para o início do bioensaio, os organismos foram transferidos para outros 12 aquários de plástico com capacidade de 20 L, onde em cada aquário foram colocados três indivíduos, totalizando 36 indivíduos (Figura 1A). Os aquários foram dotados de aeração constante, e a temperatura da água foi mantida por meio de refrigeração do ambiente de laboratório (± 22 °C). Os ouriços-do-mar foram expostos a dois tratamentos: grupo controle (sem a presença do contaminante) e o grupo FSD 2,5 %. Cada um dos tratamentos teve seis réplicas. Diariamente, foi realizada a troca total de água dos aquários com reposição de 100 % do contaminante no grupo FSD 2,5%. Durante esse período, os animais foram alimentados à vontade, com macroalgas da espécie *Ulva lactuca* e também, foi mantido o controle de salinidade da água. Para os testes de fecundação e de desenvolvimento embrionário foram utilizados 12 indivíduos, dois de cada aquário, e para a avaliação do estresse oxidativo foram utilizados os indivíduos restantes, também um de cada aquário (totalizando 6 indivíduos). Essa divisão e procedimento foram realizados tanto para o grupo controle quanto para o grupo exposto para evitar que a extração de gametas influenciasse na atividade enzimática.

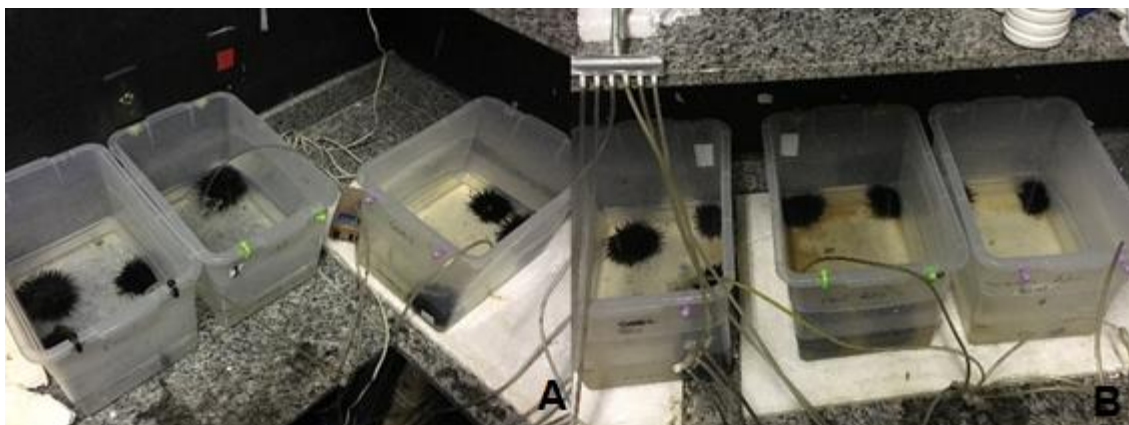


Figura 1. (A) Ouriços-do-mar (*Echinometra lucunter*) durante o bioensaio de 96 h. Os organismos foram colocados em grupos de três indivíduos, em aquários de plástico de 20 L, de forma aleatória tanto para o grupo controle como para o grupo exposto a concentração de 2,5 % da fração solúvel do óleo diesel (FSD). (B) Ouriços-do-mar (*E. lucunter*) durante o período de aclimatação. Os organismos foram colocados em grupos de quatro indivíduos, em aquários de plástico de 20 L .

3.6.4 COLETA DE ÓRGÃO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Ao final dos 4 dias de experimento, 6 ouriços-do-mar (sem distinção de sexo), separados para as análises bioquímicas após o período de bioensaio, foram sacrificados de acordo com o proposto por Ross et al. (2008) em normas para anestesia e sedativo de animais aquáticos, e as gônadas extraídas (Figura 2A). Após extração, as gônadas foram acondicionadas em microtubos e congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para realização das análises enzimáticas. Para a execução das análises bioquímicas, as gônadas dos animais foram descongeladas e homogeneizadas com tampão fosfato (pH 7,0) em gelo fundente e logo após foram centrifugadas (13000 RPM), por 30 min, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante do centrifugado foi utilizado nas análises enzimáticas e de proteínas totais.

3.6.4.1 PROTEÍNA TOTAL

A concentração de proteínas totais na gônada foi determinada pelo método de Bradford (1976) e as amostras foram lidas em um leitor de placa (Molecular Device – Spectra Max 190) ao comprimento de onda de 595 nm. As análises de proteína totais se faz necessário para o cálculo final das atividades enzimáticas.

3.6.4.2 GLUTATIONA S-TRANSFERASE ((GST) E.C. 2.5.1.18)

A atividade enzimática da GST foi determinada utilizando o tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM de GSH e 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância em

comprimento de onda de 340 nm, em um leitor de placa (Molecular Device – Spectra MAX 190) a uma temperatura de 27° C. A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDNB (Habig et al., 1974; Habig e Jakoby, 1981). A atividade da GST foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 mmol de produto por minuto por miligrama de proteína. A atividade foi expressa como U/mg de proteína.

3.6.4.3 CATALASE ((CAT) E.C. 1.11.1.6)

A catalase foi estimada por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em 240 nm a uma temperatura de 27 °C (Aebi, 1984). Para isso, foi utilizado um tampão para o meio de reação com peróxido de hidrogênio a 10 mM e tampão TE (Tris HCL 1 M e EDTA 5 mM), as amostras foram diluídas 10x no tampão TE. Para leitura, 10 µL do homogeneizado foram adicionados a uma cubeta de quartzo contendo 990 µL de tampão de reação, lidas em espectrofotômetro de absorção atômica (Biospectro SP -220). A atividade da CAT foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 mmol de produto por minuto por miligrama de proteína. A atividade foi expressa como U/mg de proteína.

3.6.5 OBTENÇÃO DE GAMETAS E TESTE DE FERTILIZAÇÃO

Após a exposição dos exemplares adultos de *E. lucunter* à FSD (2,5 %), por 96 h, foram executados os protocolos para a obtenção de gametas, os testes de fecundação e desenvolvimento embrionário, utilizando apenas os 12 indivíduos separados após o término do período do bioensaio para essas análises. Os testes foram feitos de acordo com o que foi realizado no experimento I (Figura 2B e C).

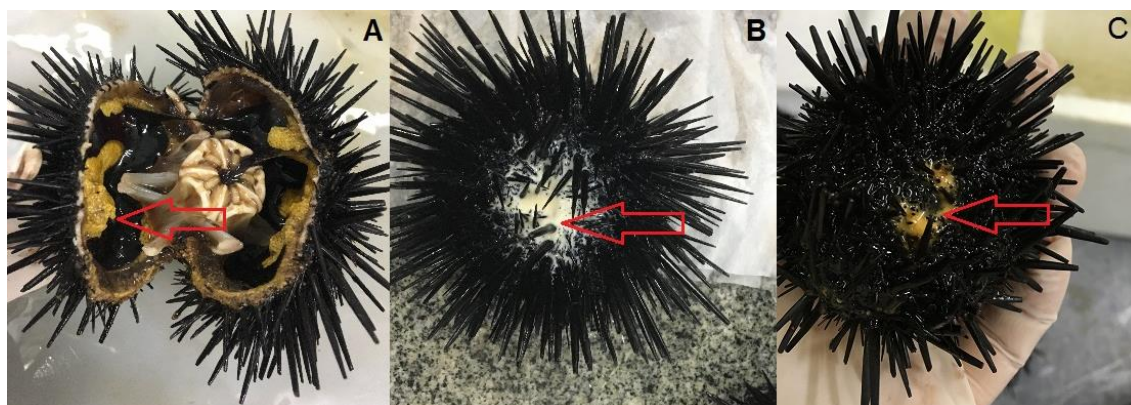


Figura 2. (A) Extração da gônada de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*). A gônada é caracterizada pela coloração amarelada (indicado pela seta). (B) Extração do gameta masculino

de ouriço-do-mar (*E. lucunther*). O gameta masculino caracteriza-se pela coloração esbranquiçada (indicado pela seta). (C). Extração do gameta feminino de ouriço-do-mar (*E. lucunther*). O gameta feminino caracteriza-se pela coloração alaranjada (indicado pela seta).

3.6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A apresentação dos dados foi feita na forma de média \pm desvio padrão. Os resultados obtidos foram testados quanto a sua normalidade através do teste Shapiro-Wilk. Os resultados apresentaram distribuição normal ($P = 0,131$) e, em seguida foi realizado o teste t , através do programa SigmaPlot versão 12.5.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE QUÍMICA DA ÁGUA

A análise da concentração de hidrocarbonetos presentes em 0,5; 1,5 e 2,5 % da FSD indicou uma maior concentração de HPAs do que de BTEX. Entre os HPAs, o naftaleno foi o composto que apresentou a maior concentração entre os compostos encontrados, já entre os BTEX o tolueno foi o composto que apresentou a maior concentração. De um modo geral, as concentrações dos hidrocarbonetos mono e poliaromáticos apresentaram uma tendencia em aumentar sua concentração de acordo com o aumento da concentração da FSD. A quantificação dos hidrocarbonetos BTEX e HPAs foi realizada antes do início dos experimentos (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação dos hidrocarbonetos mono e poliaromáticos (BTEX e HPAs) presentes na fração solúvel do óleo diesel (FSD) diluída em 0,5; 1,5 e 2,5 %.

Hidrocarbonetos ($\mu\text{g/L}$)	FSD (%)			
	0,5	1,5	2,5	100
BTEX				
Benzeno	< 5,0	< 5,0	< 5,0	12,46
Etil-benzeno	< 5,0	< 5,0	< 5,0	184,14
Tolueno	2,89	11,56	24,84	44,19
Xileno	< 5,0	18,36	< 5,0	2088,76
BTEX total	2,89	29,917	24,84	2329,55
HPAs				
Acenaftileno	< 0,01	0,70	1,48	57,00
Acenafteno	1,37	4,46	5,75	293,00
Antraceno	0,10	0,74	1,33	50,00
Benzo(a)antraceno	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Benzo(b)fluoranteno	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Benzo(k)fluoranteno	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Benzo(a)pireno	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Benzo(ghi)perileno	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Criseno	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Dibenzo[a,h]antraceno	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Fenantreno	0,22	7,70	17,13	576,00
Fluoreno	0,09	7,56	12,68	471,00
Fluoranteno	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Naftaleno	0,23	27,48	99,88	4098,00
Pireno	0,22	3,16	6,90	226,00
HPAs total	2,21	51,80	145,13	5771,00

Limite de quantificação: BTEX < 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; PAHs < 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$. Limite de detecção: cinco vezes menor que o limite de quantificação.

4.2 EXPOSIÇÃO DE GAMETAS E EMBRIÕES À FSD

4.2.1 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM GAMETAS (TESTE DE FERTILIZAÇÃO)

A viabilidade dos gametas de *E. lucunther* foi significativamente reduzida pela exposição à FSD. Todas as concentrações das FSDs testadas apresentaram efeito na capacidade de fecundação dos espermatozoides. A taxa de fecundação reduziu significativamente nos grupos expostos à FSD (49 % para a FSD de 0,5 %, 37 % para a FSD de 1,5 % e 29 % para a FSD de 2,5 %) quando comparada a taxa de fecundação do grupo controle (84 %) (Figura 3). Essa redução na taxa de fecundação foi significativamente agravada à medida que as concentrações de FSD aumentaram.

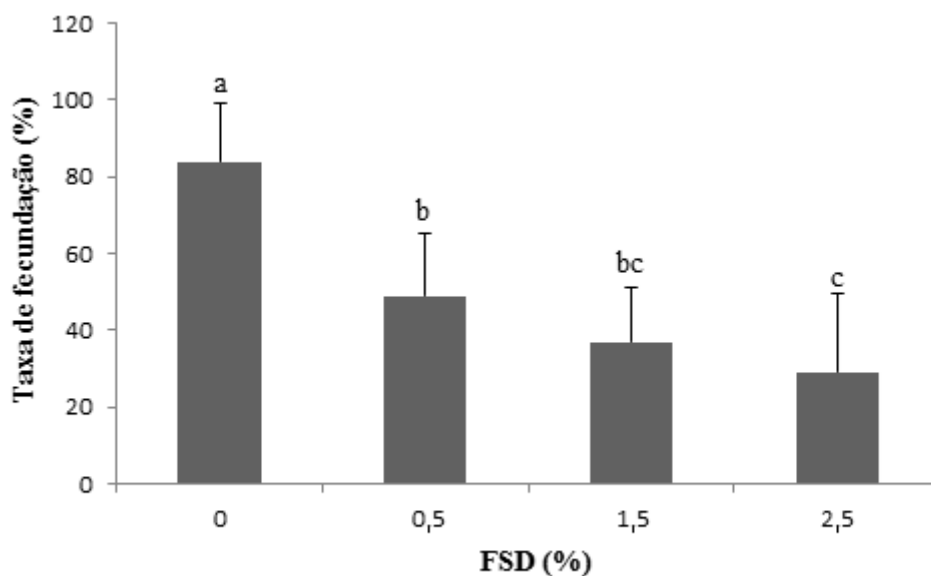


Figura 3. Taxa de fecundação dos espermatozoides de *Echinometra lucunter* expostos a diferentes concentrações da fração solúvel do óleo diesel (FSD). Letras diferentes representam que houve diferenças significativas na viabilidade de fecundação dos espermatozoides entre cada concentração ($p \leq 0,05$) (Dados como média \pm DP).

4.2.2. TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM EMBRIÕES (LARVAS PLUTEUS)

O desenvolvimento das larvas pluteus de *E. lucunther* foi significativamente afetado pela exposição às concentrações da FSD. Todas as concentrações das FSDs testadas apresentaram efeito no desenvolvimento de larvas pluteus após exposição de 36 h. A taxa de desenvolvimento das larvas expostas à FSD (50 % para a FSD 0,5 %, 27 % para a FSD 1,5 % e 12 % para a FSD 2,5 %) reduziu significativamente quando comparada a taxa de desenvolvimento do grupo controle (80 %) (Figura 4). Entre as concentrações testadas a taxa de desenvolvimento das larvas pluteus também foi reduzida significativamente.

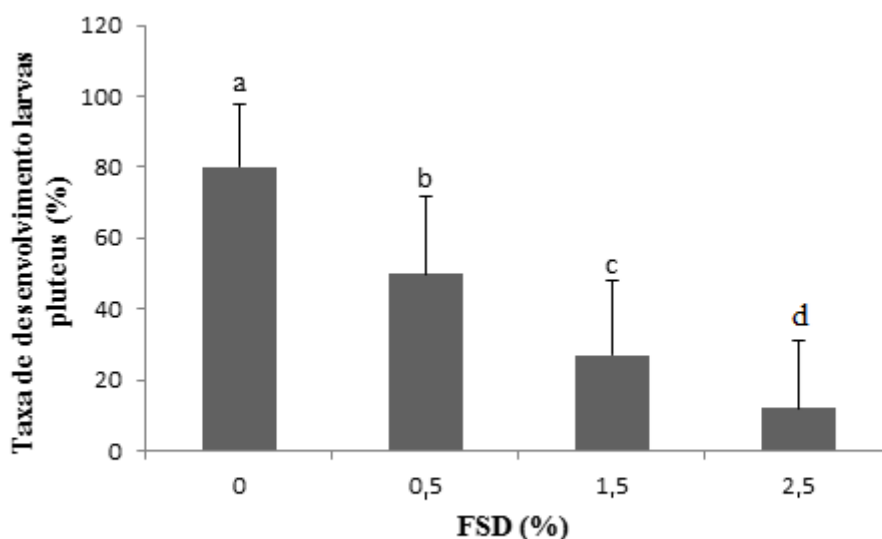


Figura 4. Taxa de desenvolvimento de larvas pluteus de *Echinometra lucunther* expostas a diferentes concentrações da fração solúvel do óleo diesel (FSD). Letras diferentes representam que o desenvolvimento das larvas reduziu significativamente entre as concentrações testadas das FSDs. ($p \leq 0,05$) (Dados como média \pm DP).

4.3 EXPOSIÇÃO DE ADULTOS DE *Echinometra lucunther* À FSD

Durante as 96 horas do bioensaio com os indivíduos adultos de *E. lucunther* expostos à concentração 2,5 % da FSD não houve nenhuma mortalidade dos exemplares. No entanto observou-se perda na função dos pés ambulacrais de todos os indivíduos expostos, o que fez com esses animais não mais conseguissem se fixarem no aquário como os indivíduos do grupo controle.

4.3.1 TAXA DE FECUNDAÇÃO DOS GAMETAS DOS INDIVÍDUOS ADULTOS EXPOSTOS À FSD

Os exemplares adultos de *E. lucunther* quando expostos à concentração de 2,5 % da FSD tiveram uma redução significativa ($p = < 0,001$) no potencial de fecundação de 44 %. Os indivíduos do grupo controle apresentaram a taxa de fecundação de 82 %, enquanto que os indivíduos expostos à FSD de 2,5 % apresentam uma taxa de apenas 38 % (Figura 5).

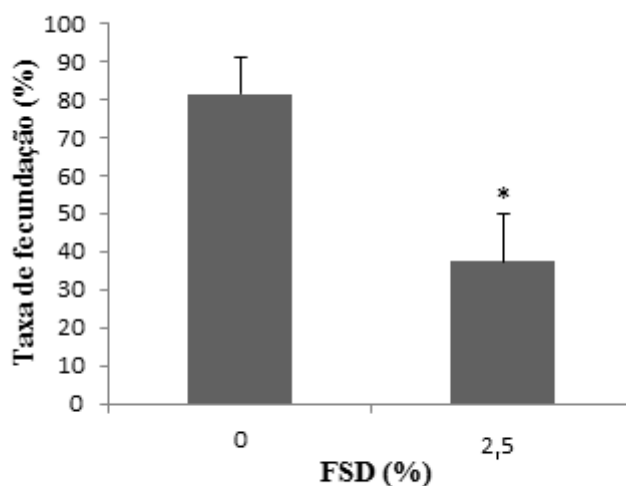


Figura 5. Taxa de fecundação em indivíduos adultos de *Echinometra lucunther* expostos à fração solúvel do óleo diesel (FSD). * representa a redução significativa na taxa de fecundação dos indivíduos expostos a concentração em relação ao grupo 0 (controle) (teste *t*: $p = < 0,001$; $t = 9.115$; $df = 18$) (Dados como média \pm DP).

4.3.2 TAXA DE DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES DOS INDIVÍDUOS ADULTOS EXPOSTOS À FSD

O desenvolvimento das larvas pluteus de *E. lucunther* expostos à 2.5 % da FSD apresentaram um retardo significativo ($p = < 0,001$) de 60% quando comparado ao grupo controle. O desenvolvimento das larvas no grupo exposto foi de 20 %, enquanto no grupo controle esse desenvolvimento foi de 80 % (Figura 6).

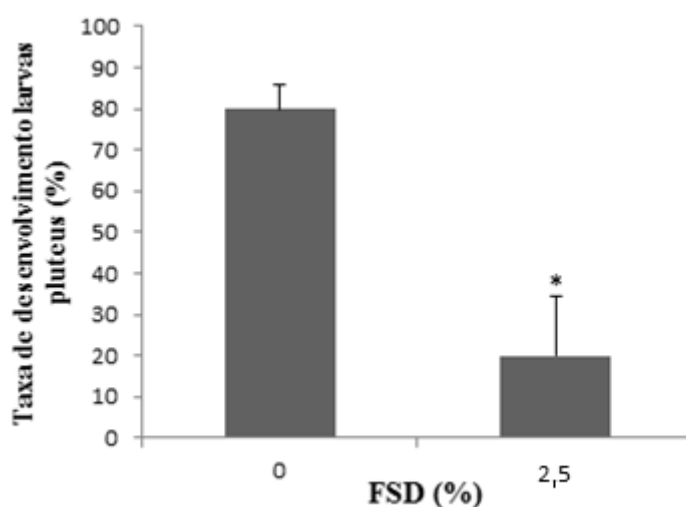


Figura 6. Taxa de desenvolvimento dos embriões dos indivíduos adultos de *Echinometra lucunther* expostos à fração solúvel do óleo diesel (FSD). * representa diferença significativa do grupo exposto em relação ao grupo 0 (controle) (teste *t*: $p = < 0,001$; $t = 13.217$; $df = 18$) (Dados como média \pm DP).

4.3.3. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

4.3.3.1 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

As gônadas dos organismos do grupo exposto à concentração de 2,5 % de FSD apresentaram atividade para a GST menor do que as gônadas dos organismos do grupo controle (Figura 7). Essa atividade específica da enzima nos organismos expostos foi significativamente reduzida em 51,10 % ($p = 0,001$). A média da atividade da GST no grupo controle foi de 14,1 U/ mg proteína e na concentração de 2,5 % foi de 6,9 U/mg proteína.

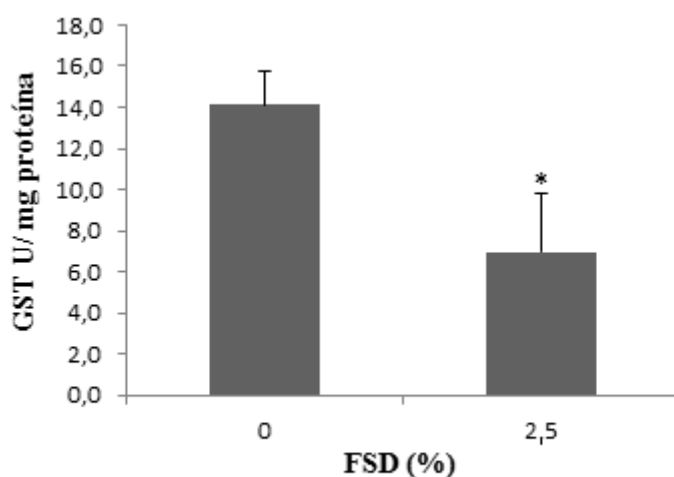


Figura 7. Atividade da enzima Glutationa S-transferase (GST) em gônadas de *Echinometra lucunther* expostos à fração solúvel de óleo diesel (FSD). * representa diferença significativa do grupo exposto em relação ao grupo 0 (controle) (teste t : $p = 0,001$; $t = 4,515$; $df = 8$) (Dados como média \pm DP).

4.3.3.2 CATALASE (CAT)

A enzima CAT variou significativamente sua atividade específica entre o grupo controle e o grupo exposto à concentração de 2,5 % da FSD. A atividade específica da enzima nos organismos expostos à concentração de 2,5 % foi reduzida em 40 % ($p = 0,001$) quando comparada ao grupo controle. A atividade da CAT no grupo controle foi de 5,95 U/ mg proteína e na concentração de 2,5 % foi de 3,6 U/ mg proteína (Figura 8).

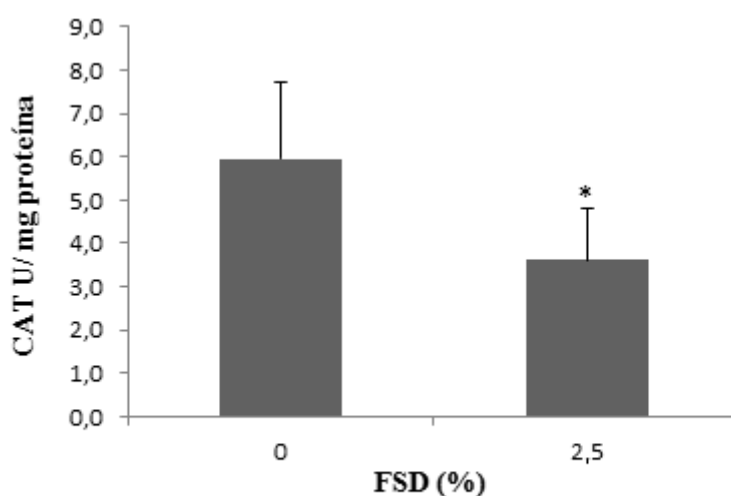


Figura 8. Atividade da enzima Catalase (CAT) em gônadas de *Echinometra lucunther* expostos à fração solúvel de óleo diesel (FSD). * representa diferença significativa do grupo exposto em relação ao grupo 0 (controle) (teste t : $p = 0,001$; $t = 5,513$; $df = 8$) (Dados como média \pm DP).

5. DISCUSSÃO

A liberação do óleo diesel para o ecossistema marinho gera impactos negativos, não apenas devido aos efeitos diretos causados por esse contaminante, mas também como consequência da toxicidade da sua fração solúvel (FSD) (Rodrigues et al., 2010). Mesmo quando os níveis de exposição não são altos o suficiente para serem letais, os organismos podem ser afetados por esses hidrocarbonetos que foram dissolvidos na fração solúvel e, que por conseguinte tornaram-se biodisponíveis à biota (Neft et al., 2000). Os resultados do presente estudo ilustram os impactos causados pela FSD sobre a viabilidade dos gametas e o desenvolvimento das larvas pluteus e o impacto desses contaminantes na reprodução de ouriços-do-mar da espécie *E. lucunther*.

As comparações sobre os efeitos tóxicos do óleo diesel e sua FSD com outros estudos são difíceis, pois, as concentrações de hidrocarbonetos presentes nesses componentes são extremamente variáveis de acordo com sua origem e fabricação (Neft et al., 2000). Na FSD utilizada no presente trabalho nas concentrações de 0,5; 1,5 e 2,5 % mostraram concentrações diferenciadas de hidrocarbonetos BTEX e HPAs, sendo o tolueno, do grupo BTEX, o único presente em todas as frações, e os compostos naftaleno, pireno, fluoreno e fenantreno, do grupo HPA, os mais presentes em todas as frações. Essa diferença na concentração dos dois grupos de hidrocarbonetos se deve ao alto potencial volátil dos BTEX. De acordo com Gonzáles-Doncel et al. (2008), comumente os hidrocarbonetos presentes nesse grupo tendem a possuir baixo peso molecular e, por conseguinte, serem mais voláteis e menos tóxicos quando comparados ao grupo dos HPAs. Resultados semelhantes foram relatados por outros autores (Neft et al., 2000; Rodrigues et al., 2010) ao analisarem as frações solúveis do óleo diesel e da gasolina. Os hidrocarbonetos do grupo HPA tendem a serem mais tóxicos e causarem mais efeitos deletérios em estágios de vida iniciais e em organismos adultos quando comparados aos BTEX (Shailaja e D'Silva, 2003; Harvey et al., 2012; Vieira e Corrêa, 2016).

A toxicidade da FSD observada no presente estudo sugere que a exposição à luz solar intensa dessa fração durante o período de intemperismo poderia ser pelo menos em parte também responsável pelo aumento dos efeitos observados. O processo de intemperismo artificial conduzido em laboratório visando simular os processos físicos e químicos que acontecem no ambiente natural faz com que a FSD sofra evaporação devido à exposição ao ar livre, fotooxidação devido à exposição à luz, e processos de dissolução e acomodação. Esses processos de fotooxidação dos compostos da FSD no ambiente natural ou artificial aumentam a toxicidade desses produtos (Reynaud e Deschaux, 2006; Sette et al., 2013). Saco-Álvarez et al. (2008) encontraram valores de toxicidade de gametas e embriões próximos aos relatados no presente estudo trabalhando com a espécie de ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*. Os autores observaram que após a fotooxidação, a FSD foi mais tóxica aos ouriços afetando mais a taxa de reprodução do que antes dessa etapa. Bellas et al. (2013) observaram diferença similar também com a espécie de ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*. O pireno e fluoreno aumentam a sua toxicidade somente na presença da luz UV, onde eles podem causar cerca de 50 % das respostas biológicas deletérias observadas. Nessas condições

esses produtos atingem o seu ponto de solubilidade aquosa máxima (Saco-Álvarez et al., 2008; Das et al., 2012). O potencial de solubilidade aquosa da maioria das moléculas constituintes do grupo dos HPAs é um fator importante de se levar em conta para conhecer os riscos desses compostos para o ambiente marinho, uma vez que sua biodisponibilidade e a concentração máxima de lipídios são limitadas por esse fator (Vieira e Corrêa, 2016).

Verificou-se no presente estudo que a exposição à FSD afetou a viabilidade dos gametas e o desenvolvimento das larvas pluteus de *E. lucunther* expostos diretamente ao contaminante. As taxas de viabilidade dos gametas (49 % para a FSD de 0,5 %, 37 % para a FSD de 1,5 % e 29 % para a FSD de 2,5 %) e desenvolvimento das larvas pluteus (50 % para a FSD de 0,5 %, 27 % para a FSD de 1,5 % e 12 % para a FSD de 2,5 %) diminuíram significativamente com o aumento da concentração da FSD, demonstrando o potencial tóxico da FSD utilizada no presente trabalho. Paixão et al. (2007) também observaram uma queda nas taxas de viabilidade dos gametas da espécie de ostra *Crassostrea rhizophorae* expostas à fração solúvel da gasolina. De acordo com esses autores os efeitos biológicos primários para organismos em contato com contaminantes do grupo BTEX pode ser a incorporação celular de células expostas a quantidades subletais desses hidrocarbonetos, que podem reduzir a resposta à tolerância dos organismos a outros fatores ambientais. De acordo com Paixão et al. (2005) e Ramos et al. (2005) o grupo BTEX pode ainda causar efeitos crônicos notáveis a longo prazo que podem ser precedidos por defesas bioquímicas primárias como a indução de proteínas de estresse e uma redução na integridade e estabilidade dos lisossomos. Martin et al. (2016) explicam que os espermatozoides apresentam um elevado teor de ácidos poliinsaturados, tornando-os altamente susceptíveis à peroxidação lipídica causada pelos BTEX, fazendo com que a membrana plasmática perca sua fluidez e integridade, levando em última instância à uma perda da função espermática. De acordo com os mesmos, a perda da fluidez da membrana pode também afetar as trocas de íons da membrana celular que controlam o movimento do espermatozoide, afetando, portanto a sua capacidade de fecundação. A redução da viabilidade dos espermatozoides também pode ser explicada pela toxicidade do grupo de hidrocarbonetos HPAs, esses são conhecidos por gerarem impactos na mobilidade do espermatozoide e no seu potencial de diluição (Lewis et al., 2008). De acordo com Meeker et al. (2004), a velocidade do espermatozoide pode ser reduzida na presença do composto naftaleno, além disso, esse

composto pode também causar peroxidação lipídica e microviscosidade da membrana celular, prejudicando o potencial de fecundação. Em larvas, os efeitos subletais da FSD, comumente, ocorrem nas 12 primeiras horas de desenvolvimento do organismo e, por conseguinte, nessa etapa é possível observar um aumento da mortalidade de embriões nas fases de clivagem e gastrulação (Lewis et al., 2008), esse fato pode explicar a queda significativa de 30 % do número de larvas pluteus já na menor concentração da FSD do presente estudo. Resultados semelhantes foram relatados por Wessel et al., 2007 em larvas de ostras e por Pillai et al. (2003) em larvas de ouriços-do-mar, os autores descreveram que os HPAs causaram efeitos teratogênicos incluindo o rompimento do desenvolvimento axial em larvas de ouriços-do-mar e desenvolvimento anormal em larvas de ostras. A queda do desenvolvimento das larvas pluteus pode ser explicada ainda de acordo com Pillai et al. (2003) os quais explicam que os HPAs como fenantreno, fluoreno e pireno são capazes de induzir a exogastrulação em embriões recém incubados, sendo o fenantreno também conhecido por levar os embriões ao estado vegetativo e posteriormente à morte. Os compostos fenantreno, naftalento e pireno também foram tóxicos para as larvas pluteus de ouriços-do-mar da espécie *Paracentrotus lividus* como relatado por Beiras e Saco-Álvarez, (2006). Estes três HPAs também estavam presentes em todas as concentrações da FSD utilizada no presente trabalho.

Já em relação à exposição indireta de gametas e embriões através da exposição dos indivíduos adultos de *E. lucunther* quando estes foram submetidos à concentração de 2,5 % da FSD foi observada uma redução nessas taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário de 44 e 60 %, respectivamente. Essas reduções nas taxas podem ser explicadas pelo potencial dos hidrocarbonetos BTEX e HPAs de causarem a degeneração das células germinativas, atrofia do tecido gonadal e reações inflamatórias em gônadas de invertebrados marinhos, levando a uma produção de gametas fracos e, por conseguinte, a uma queda no desenvolvimento embrionário (Tay et al., 2003; Aarab et al., 2004; Ortiz-Zarragoitia e Cajaraville, 2006). Segundo Dietrich et al. (2008) a exposição da gônada à FSD pode levar a uma degeneração dos folículos ovarianos que é comumente descrito como uma atresia folicular causada por uma condição de estresse, os autores também perceberam uma redução no sucesso reprodutivo e no desenvolvimento larval da espécie de mexilhão *Mytillus edulis*, e explicam que a exposição à contaminantes aumentam significativamente a incidência desses folículos

atrésicos. Segundo Schafer e Kohler (2009) todos esses fatores levam a uma má produção de gametas femininos e, por consequência, a uma redução na taxa de fecundação e desenvolvimento embrionário. Os mesmos autores observaram lesões ovarianas graves para a espécie de ouriço-do-mar *Psammechinus miliaris* após a exposição à FSD durante um período de 20 dias, os autores relatam que os oócitos degenerados formam agregados levando a desestabilização da estrutura acinal. Essa desorganização torna a oogênese inadequada, uma vez que a migração dos oócitos de maturação para o lúmen acinal é dificultada. Quando gônadas de invertebrados marinhos adultos são expostas a um determinado contaminante, os espermatozoides tendem a serem menos susceptíveis aos efeitos deletérios causados por esses. Mesmo assim, Schafer et al. (2010) em seus estudos com ouriços-do-mar da espécie *Psammechinus miliaris* relataram a formação e o acúmulo de lipofuscina nos espermatozoides. A formação e o acúmulo desses compostos estão associados ao estresse oxidativo sofrido pelo adulto. Ainda segundo os autores, a fibrose da parede acinal é encontrada com mais frequência em gametas masculinos, prejudicando a sua mobilidade. A redução do sucesso reprodutivo de *E.lucunther* expostos a FSD pode ainda ser explicada pela atividade fagocitária das gônadas. Segundo Kelly (2000) em equinodermos é comum após a desova à reabsorção de gametas inutilizados pela gônada, mas frente a um contaminante essa reabsorção tende a ser precoce, o que pode levar a fagocitação de gametas que estariam em perfeitas condições.

A utilização de biomarcadores para avaliação dos danos causados por um determinado contaminante considera que a detecção da resposta ao impacto é a interação entre o estresse (controle/tratamento) e o período (antes e depois do impacto) (Box et al., 2007; Jena et al., 2009; López-Galindo et al., 2010; Vidal-Linan et al., 2010). As defesas antioxidantes testadas no presente estudo não aumentaram de acordo com o aumento do estresse em que o animal estava exposto. Isso foi inesperado, uma vez que os parâmetros oxidantes estudados foram ativados em bivalves e mexilhões expostos a hidrocarbonetos da FSD como observado por vários autores (Monserrat et al., 2002; Dafre et al., 2004; Silva et al., 2005). De acordo com Van der Oost et al. (2003), as atividades enzimáticas costumam a aumentar quando expostas ao contaminante, porém suas respostas não seguem um padrão específico. Reid e Macforlane (2003) explicam que as comparações devem ser realizadas com cautela, pois, os organismos estão sujeitos a variáveis e escalas de variabilidade que são bastante

diferentes sob cada condição. A atividade enzimática da GST em gônadas de *E. lucunther* expostas à concentração 2,5 % da FSD foi de 6,9 U/ mg proteína, enquanto que no grupo controle essa atividade foi de 14,1 U/ mg proteína, o que mostra uma inibição significativa de 51,10 % da atividade enzimática. De acordo com Grintzalis et al. (2012) e Martins et al. (2012) os níveis de GSH tendem a diminuir em invertebrados marinhos expostos a hidrocarbonetos da FSD. Esse fato pode estar relacionado com a capacidade da GSH de eliminar o contaminante, agindo como um mecanismo primário de proteção contra a EROs. Regoli et al. (1998) e Hannam et al. (2010) explicam que essa capacidade oxidante pode causar uma oxidação em massa da GSH e uma subsequente redução da glutathiona total intracelular. A inibição da atividade da GST observada no presente estudo pode estar relacionada a essa redução dos níveis da GSH, uma vez que a GST é dependente da GSH e, sua estimulação pode levar a depleção da GSH, como observado por Marques et al. (2014) em gônadas de mexilhões da espécie *Mytillus guyanensis* expostas ao óleo diesel e sua fração solúvel. Para os organismos expostos ao contaminante esses autores encontraram valores da atividade da GST de 4 U/ mg proteína, e explicam ainda que como não foi observada um aumento da GST, é razoável inferir que a GSH foi a principal defesa contra os BTEX e HPAs e, posteriormente, por conseguinte, a atividade da GST foi reduzida pela redução do seu cosubstrato. Diferente das brânquias de invertebrados marinhos como ostras e mexilhões, por exemplo, que refletem o estado do ambiente, e a mudança na atividade de suas enzimas antioxidantes não dependem de fatores internos (p.ex. metabolismo), o complexo antioxidante das gônadas é afetado não apenas pelo ambiente como também por certos fatores internos (p.ex. período de desova) (Vidal-Linan et al., 2010). Esse fato pode explicar a inibição enzimática significativa da CAT de 40 % nas gônadas expostas à concentração de 2,5 % da FSD em relação ao grupo controle, uma vez que os animais estavam em período reprodutivo para atender aos objetivos do presente estudo. Sandrini-Neto et al. (2016) explicam que a atividade da CAT pode ser influenciada por fatores como variação na temperatura e na atividade metabólica, e essas são limitações relevantes para sua utilização como biomarcadores de exposição a FSD. A inibição observada da CAT pode ainda estar relacionada com a produção excessiva de ânion superóxido, que posteriormente não foi convertido em peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase resultando em um fluxo de radicais superóxidos que são conhecidos por inibir a atividade da CAT, como foi descrito por Damasio et al. (2007) com gônadas de *Barbus meridionalis* expostas ao óleo diesel. Para os organismos

expostos ao contaminante a atividade enzimática da CAT observada foi de 4 U/ mg proteína contra 7 U/ mg proteína do grupo controle, enquanto no presente estudo foi de 3,6 U/ mg proteína contra 5,95 U/ mg proteína do grupo controle.

Relacionar os impactos da exposição à FSD na biologia reprodutiva do ouriço-do-mar medidos em condições laboratoriais aos efeitos populacionais que ocorreriam na natureza é complexo. As taxas de mortalidade de larvas em invertebrados marinhos de desova livre são naturalmente elevadas e, portanto, é difícil estabelecer uma relação direta entre as causas (Lewis et al., 2008). O que pode ser deduzido é que um evento de poluição pela FSD aumentaria o fracasso do sucesso de fertilização tanto na exposição direta dos gametas quanto na exposição de adultos durante o período de reprodução. Pode-se inferir que o óleo diesel e sua fração solúvel são tóxicos para esses organismos tanto nas fases de vida iniciais quanto na fase adulta, pois estes podem afetar todo o ciclo reprodutivo da espécie. Gametas que são liberados na coluna da água podem facilmente entrar em contato com o contaminante disperso, de acordo com Lewis et al. (2008), esse contato pode reduzir a viabilidade dos gametas afetando a taxa de fertilização. De acordo com os mesmos autores quando os gametas masculinos liberados são expostos à FSD, esta age aumentando os efeitos da diluição dos espermatozoides, provavelmente através de impactos na mobilidade espermática, reduzindo consideravelmente a fertilização e, em indivíduos adultos expostos também é possível observar os mesmos efeitos nos gametas masculinos e, por conseguinte, a redução da fertilização. Cajaraville et al. (1992) explica que efeitos tóxicos nos gametas antes ou depois da desova reduzem a taxa reprodutiva, uma vez que a integridade dos gametas é vital para o sucesso de fertilização. De acordo com os autores o reconhecimento do ovo pelo espermatozoide e as membranas são geralmente alvos fáceis para a peroxidação lipídica relacionada à exposição ao BTEX e HPAs. As larvas, constituintes do plâncton, também estão mais sujeitas a exposição ao contaminante e, uma redução no número de larvas resultaria em uma redução no recrutamento de novos indivíduos (Britt e Petersen, 1979; Fernández et al., 2006). A redução nas taxas de fecundação e no desenvolvimento de gametas (55%) e de embriões (68 %) expostos diretamente à FSD e de gametas (44%) e embriões (60%) expostos indiretamente (através da exposição ao adulto) à FSD de 2,5 % do presente estudo comprova que o contaminante apresenta efeitos sobre o sucesso reprodutivo da espécie, mesmo a contaminação após a desova ter apresentado uma tendência maior em reduzir as taxas de fecundação e de desenvolvimento. A

exposição de indivíduos adultos também é crítica, pois, estas podem trazer danos aos indivíduos afetando o seu metabolismo. De acordo com Fernández et al. (2006) quando o metabolismo reprodutivo é afetado o processo de gametogênese torna-se inadequado gerando gametas com baixa viabilidade reduzindo, assim, a fecundação e o desenvolvimento de novos indivíduos. Assim é possível inferir que tanto a exposição direta dos gametas como a dos adultos resultaria em uma alteração na taxa de reprodução e no desenvolvimento embrionário que poderia levar a uma futura redução populacional.

6. CONCLUSÃO

A fração solúvel do óleo diesel (FSD) apresentou um alto potencial tóxico nas taxas de fecundação e no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunther* tanto na exposição direta quanto na exposição dos adultos (indireta). À medida que a concentração da fração aumentou a viabilidade dos gametas e o desenvolvimento das larvas pluteus foram reduzidos. Dentre os biomarcadores enzimáticos utilizados para avaliar se houve ou não o estresse oxidativo em gônadas de *E. lucunther* expostos à FSD foi possível concluir que os biomarcadores GST e CAT tiveram suas atividades inibidas em organismos expostos a concentração de 2,5 %. Essa inibição pode estar relacionada à utilização do substrato dessas enzimas como primeira linha de defesa ou a atividade metabólica da gônada relacionada ao período de reprodução.

7. REFERÊNCIAS

Aarab, N., Minier, C., Lemaire, S., Unruh, E., Hansen, P.D., Larsen, B.K., Andersen, O.K., Narbonne, J.F., 2004. Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to North Sea oil and to a mixture of North Sea oil and alkylphenols. *Marine Environment Research* 58, 437-441.

ABNT NBR 15350. 2006. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade Crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea).

Adams, M., 2002. Biological Indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, USA: 644p.

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.

Allen, H., 1971. Effects of petroleum fractions on the early development of a sea urchin. *Advances in Marine Biology* 8, 215-290.

Allgood, G.C., Perry, J.J., 1986. Characterization of a manganese-containing catalase from the obligate thermophile *Thermoleophilum album*. *Journal of Bacteriology* 168, 563-573. Amorin, L.C.A., 2003. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 6, 158-170.

An, Y.J., 2004. Toxicity of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) mixtures to *Sorghum bicolor* and *Cucumis sativus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72, 1006-1011.

Arias, A.R.L. Buss, D.F. Albuquerque, C. Inácio, A.F. Freire, M.M. Egler, M. Mugnai, R. Baptista, D.F. 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxico. *Ciências e Saúde Coletiva*. 12:61-72.

Bandowe, B.A.M., Wilcke, W., 2010. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygen-containing derivatives and metabolites in soils. *Journal of Environmental Quality* 39, 1349-58.

Beiras, R., Saco-Álvarez, L., 2006. Toxicity of seawater and sand affected by the *Prestige* fuel-oil spill using bivalve and sea urchin embryogenesis bioassays. *Water Air Soil Pollution* 177, 457-466.

Bellas, J., Saco-Álvarez, L., Nieto, O., Bayona, J.M., Albaigés, J., Beiras, R., 2003. Evaluation of artificially-weathered standard fuel oil toxicity by marine invertebrate embryogenesis bioassays. *Chemosphere* 90, 1103-1108.

Bellas, J., Beiras, R., Mariño, J.C., Fernández, N., 2005. Toxicity of organic compounds to marine invertebrates embryos and larvae: a comparison between sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology* 14, 337-353.

Bellas, J., Saco-Álvarez, L., Nieto, O., Bayona, J.M., Albaigés, J., Beiras, R., 2013. Evaluation of artificially-weathered standard fuel oil toxicity by marine invertebrate embryogenesis bioassays. *Chemosphere* 90, 1103-1108.

Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., Deudero, S., 2007. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*.C 146, 531-539.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Bravo, J., Mate, M.J., Schneider, T., Switala, J., Wilson, K., Loewen, P.C., Fita, I., 1999. Structure of catalase HPII from *Escherichia coli* at 1.9 Å Resolution. *Proteins: Structure, Function, and Genetic* 34, 155-166.

Britt, I., Petersen, F., 1979. Toxic effects of aqueous extracts of ekofisk crude oil, crude oil fraction, and commercial oil products on the development of sea urchin eggs. *Marine Biology Research* 13, 18-24.

Brusca, R.C., Brusca, G.J., 1990. Phylum echinodermata. In: *Invertebrates*. Sinauer Associates Sunderland, MA, pp. 801-839.

Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A., Angulo E., 1992. Comparative effects of the water accommodated fraction of three oils on mussels-I survival, growth and gonad development. *Comparative Biochemistry and Physiology – PART A* 1, 103-112.

Cameron, R.A., 2002. Sea urchin developmental genetics and culture. In Matranga Smolenicka (eds) *The Sea urchin: from basic biology to aquaculture*. Swets and Zeitlinger, Lisse, pp 31-36.

Candia Carnevali, M.D., 2005. Regenerative response and endocrine disrupters in Crinoid echinoderms: an old experimental model, a new ecotoxicological test. In: Matranga V (ed) *Echinodermata, progress in molecular and subcellular biology, subseries marine molecular biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 167-199.

Candia Carnevalli, M.D., 2006. Regeneration in Echinoderms: repair, regrowth, cloning. *Department of Biology* 3, 64-76.

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2004. Diversity of structure and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 192-208.

Clement, LE., Stekoll, M.S., Shaw, D.G., 1980. Accumulation, fractionation and release of oil by the intertidal clam *Macoma balthica*. *Marine Biology* 57, 41-50.

Dafre, A.L., Medeiros, L.D., Muller, I.C., Ventura, E.C., Bainy, A.C.D., 2004. Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. *Chemical-Biological Interaction* 149, 97-105.

Damásio, J.B., Barata, C., Munné, A., Ginebreda, A., Guasch, H., Sabater, S., Caixach, J., Porte, C., 2007. Comparing the response of biochemical indicators (biomarkers) and biological indices to diagnose the ecological impact of an oil spillage in a Mediterranean river (NE Catalunya, Spain). *Chemosphere* 66, 1206-1216.

Das, D.C., Roy, A.K., Sinha, N., 2012. GA based frequency controller for solar thermal-diesel-wind hybrid energy generation/energy storage system. *International Journal of Electrical Power & Energy System* 43, 269-273.

Dietrich, D.R., Krieger, H.O., Rumpf, S., 2008. Histological Analysis of endocrine disruptive effects in small laboratory fish. Wiley & Sons Inc.

Dinnel, P., Pagano, G.G., Oshida, P.S., 1988. A sea urchin test system for marine environmental monitoring. In: International Echinoderm Conference, 6. Proceedings. Burke, R.D., Miladenov, P.V., Lambert, P., Parsley, R.L., (Eds). Balkema, Rotterdam, p. 611-619.

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. Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 700, 80-85.

Fernández, N., Cesar, A., Salamanca, M.J., DelValls, T.A., 2006. Toxicological characterisation of the aqueous soluble phase of the *Prestige* fuel-oil using the sea-urchin embryo bioassay. Ecotoxicology 15, 593-599.

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

González-Doncel, M., González, L., Fernández-Torija, C., Navas, J.M., Tarazona, J.V., 2008. Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with *Prestige* oil and medaka (*Oryzias latipes*). Aquatic Toxicology 87, 280-287.

Grintzali, K., Georgiou, C.D., Dailianis, S., 2012. Total thiol redox status as a potent biomarker of PAH-mediated effects on mussels. Marine Environmental Research 81, 26-34.

Gutteridge, J.M.C., 1986. Antioxidant properties of the proteins ceruloplasmin, albumin and transferrin A. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients rheumatoid arthritis. Biochemistry and Biophysics Acta 869, 119-127.

Habig, W.H., Pabts, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. The Journal Biological Chemistry 249, 7130-7139.

Habig, W.H., Jakoby, M.J., 1981. Assays for differentiation of glutathione s-transferases. *Methods in Enzymology* 77, 398-405.

Hannam, M.L., Bamber, S.D., Moody, A.J., Galloway, T.M., Jones, M.B., 2010. Immunotoxicity and oxidative stress in the Arctic scallop *Chlamys islandica*: Effects of acute oil exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1440-1448.

Harvey, S.D., Jarman, K.H., Moran, J.J., Sorensen, C.M., Wright, B.W., 2012. Characterization of diesel fuel by chemical separation combined with capillary gas chromatography (GC) isotope ratio mass spectrometry (IRMS). *Talanta* 99, 262-269.

Jena, K.B., Verlecar, X.N., Chainy, G.B.N., 2009. Application of oxidative stress indices in natural population of *Perna viridis* as biomarker of environmental pollution. *Marine Pollution Bulletin* 58, 107-113.

Jones, G.L., Masters, C.J., 1976. On the comparative characteristics of mammalian catalases. *Comparative Biochemistry and Physiology* 55, 511-518.

Kellogg, E.W., Fridovich, I., 1977. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. *Journal Biology Chemistry* 252, 6721-6728.

Kelly, M.S., 2000. The reproductive cycle of the sea urchin *Psammechinus miliaris* (Echinodermata:Echinoidea) in a Scottish sea loch. *Journal Marine Biology Association. UK.* 80:909-919.

Kobayashi, N., 1971. Fertilized sea urchin eggs as an indicator material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. *Publication* 18, 379-406.

Lam, P.K.S., Gray, J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin* 46, 182-186.

Lau, E.P., Niswander, L., Watson, D., Fall, R.R., 1980. Glutathione S-Transferase is present in a variety of microorganisms. *Chemosphere* 9, 565-595.

Lawrence, J.M., 1975. On the relationship between marine plants and sea urchins. *Oceanography and Marine Biology* 13, 213-286.

Lee, R.F., 2003. Photo-oxidation and photo-toxicity of crude and refined oils. *Spills Science Technolloy Bulletin* 8, 157-162.

Lee, Y.M., Seo, J.M., Jung, S.O., Kim, I.C., Lee, J.C., 2006. Molecular cloning and characterization of 0-class glutathione S-transferase (GST-T) from the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* and biochemical comparisons with α -class glutathione S-transferase (GST-A). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346, 1053-1061.

Lewis, C. Pook, C. Galloway, T. 2008. Reproductive toxicity of the water accomodated fraction (WAF) of crude oil in the polychaetes *Arenicola marina* (L) and *Nereis virens* (Sars). *Aquatic Toxicology* 90: 73-81.

Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42, 656-666.

Lima, E.J.B., Gomes, P.B., Souza, J.R.B., 2009. Reproductive biology of *Echinometra lucunther* (Echinodermata: Echinoidea) in a northeast Brazilian sandstone reef. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 81, 51-59.

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. *Ecotoxicological Environmental Safety* 35, 16-23.

López-Galindo, C., Vargas-Chacoff, I., Nebot, H., Casanueva, J., Rubio, D., Mancera, J., Montserrat, S., 2010. Sublethal responses of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to sodiumhypochlorite and mexels432 used as antifoulants. *Ecotoxicology and Envinronmental Safety* 73, 825-834.

Lumjuan,N., McCarroll, L., Praphanthadara, L., Hemingway, J., Ranson, H., 2005. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 861-871.

Ma, L.L., Muir, D., Wang, X.T., Xu, X.B., 2005. Simultaneous analysis of organic pollutants in soils by gas chromatography and gas chromatography –mass spectrometry. *International Journal environmental analytical chemistry* 85, 89-98.

Mariano, A.P., Bonotto, D.M., Angelis, D.F., Pirôllo, M.P.S., Contiero, J., 2008., Biodegradability of comercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 133-142.

Mariante, L.F., Lemos, G.B., Eutrópio, F.J., Gomes, L.C., 2009. Reproductive biology of *Echinometra lucunther* (Echinodermata:Echinoidea) in Praia da Costa, Vila Velha, Espírito Santo. *Zoologia* 26, 641-646.

Marques, J.A., Assis, H.C.S., Guiloski, I.C., Sandrini-Neto, L., Carreira, R.S., Lana, P.C., 2014. Antioxidant defenses responses in *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) exposed to an experimental diesel oil spill in Paranaguá Bay (Paraná, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107, 269-275.

Martins, M., Costa, P.M., Raimundo, J., Vale, C., Ferreira, A.M., Costa, M.H., 2012. Impact of remobilized contaminants in *Mytilus edulis* during dredging operations in a harbour area: Bioacumulation and biomarker responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 85, 96-103.

Martin, J.H. Nixon, B. Lord, T. Bromfield, E.G. Aitken, R.J. 2016. Identification of a key role for permeability glycoprotein in enhancing the cellular defense mechanisms of fertilized oocytes. *Developmental Biology* 417: 63-76.

McClintock, J.B., 1994. Trophic biology of antartic shallow-water echinoderms. *Marine Ecology Progress Series* 111, 191-202.

Meeker, J.D. Ryan, L. Barr, D.B. Herrick, R.F. Bennet, D.H. Bravo, R. Hauser, R. 2004. The relationship of urinary metabolites of carbaryl/naphthalene and chlorpyrifos with human semen quality. *Environ. Health. Perspect.* 17: 1665-1670.

Meniconi, M.F.G., Gabardo, I.T., Carneiro, M.E.R., Barbantini, S.M., Massone, G.C.S.C.G., 2002. Brazilian oil spills chemical characterization-case studies. *Environmental Forense* 3, 303-21.

Modesto, K.A., Matinez, C.B., 2010. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294-299.

Moreno, P., Callisto, M., França, J., Ferreira, W., 2004. Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta na avaliação das condições ecológicas na bacia do Rio das Velhas (MG). In: Simpósio de Ecossistemas Brasileiros, 6, 2004, São Paulo. Anais. São Paulo: Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 2004.

Monserrat, J.M., Bianchini, A., Bainy, A.C.D., 2002. Kinect and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Marine Environmental Research* 54, 781-785.

Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide folisuper 600 (methyl paration). *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C* 143, 141-149.

Nadler, V., Goldberg, I., Hochman, A., 1986. Comparative study of bacterial catalases. *Biochemistry and Biophysics Acta* 882, 234-241.

NAP – National Academies Press. Oil in the sea III: inputs, fates, and effects. Washigton D.C: National Research Council (U.S); 2003. 278 pp.

Napierska, D., Barsiene, J., Mulkiewicz, E., Podolska, M., Rybakovas, A., 2009. Biomarker responses in flounder *Platichthys flesus* from the polish coastal area of the Baltic Sea on applications in biomonitoring. *Ecotoxicology* 18, 846-859.

National Academy of Sciences, 2003. Oil in the sea – III inputs, fates, and effects. National Academic Press, Washigton DC, pp 93-94.

Neft, J.M., Ostazeski, S., Gardiner, W., Stejskal, I., 2000. Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oil and a diesel fuel to marine animals. *Environronmental Toxicology Chemistry* 7, 1809-21.

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

Nigro, M., Falleni, A., Barga, I.D., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F., Frenzilli, G., 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology* 77, 339-347.

Nogueira, L., Silva, D.G.H., Oliveira, T.Y.K., Rosa, J. M. C., Felício, A.A., 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.

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). *Aquatic Toxicology* 25, 75-98.

Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M., 2006. Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. *Archiver of Environmental Contamination and Toxicology* 50, 361-369.

Pacheco, M., Santos, M.A., 2001a. Biotransformation, endocrine, and genetic response of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49, 64-75.

Paixão, J.F., Nascimento, I.A., Pereira, S.A., 2005. Implicações ambientais de diferentes formulações de gasolina no desenvolvimento embrionário da ostra *Crassostrea rhizophorae*. In: V Congresso Brasileiro de Pesquisas Ambientais e Saúde, São Paulo, pp. 379-384.

Paixão, J.F., Nascimento, I.A., Pereira, S.A., Leite, M.B.L., Carvalho, G.C., Silveira JR, J.S.C., Rebouças, M., Matias, G.R.A., Rodrigues, I.L.P., 2007. Estimating the gasoline components and formulation toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: An approach to minimize environmental pollution risk. *Environmental Environmental Research* 103, 365-374.

Peralta-Zamora, E.R.L.T., Peralta-Zamora, P., Emmel, A., Leal, E.S., 2005. Degradação de BTEX via processos oxidativos avançados. *Química nova* 28, 61-64.

Perrichon, P., Le Menach, K., Akcha, F., Cachot, J., Budzinski, H., Bustamante, P., 2016. Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two diferente oils using a zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval bioassay with a multilevel approach. *Science of the Total Environment* 568, 952-966.

Petersen, I.B.F., 1979. Toxic effects of aqueous extracts of ekofisk crude oil, crude oil fractions, and commercial oil products on the development of sea urchin eggs. *Sarsia* 64, 161-169.

Pillai, M.C., Vines, C.A., Wikramanayake, A.H., Cherr, G.N., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons disrupt axial development in sea urchin embryos through a β -catenin dependent pathway. *Toxicology* 196, 93-108.

Prego, R., Cobelo-Garcia, A., 2003. Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias (NW Iberian Peninsula). *Environmental Pollution*. 121, 425-452.

Qiu, X.H., Zhu, T., Yao, B., Hu, J.X., Hu, S.W., 2005. Contribution of dicofol to the current DDT pollution in china. *Environmental Science & Technology* 39, 4385-4390.

Ramos, M.L.N., Rodrigues, L.E.A., Nascimento, I.A., 2005. Uso da fosfatase ácida como biomarcador da degradação ambiental. *Anais do V Congresso Brasileiro de Pesquisas Ambientais e Saúde Santos* (pp.353-356).

Ranson, H., Jensen, B., Wang, X., Praphanthadara, L., Hemingway, J., Collins, F.H., 2000. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malária vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 9, 499-507.

Regoli, F., Nigro, M., Orlando, E., 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquatic Toxicology* 40, 375-392.

Reid, D.J., Macfarlane, G.R., 2003. Potential biomarkers of crude oil exposure in the gastropod mollusk, *Austrocochlea porcata*: laboratory and manipulative field studies. *Environmental Pollution* 126, 147-155.

Reynaud, S., Deschaux, P., 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquatic Toxicology* 77, 229-238.

Rodrigues, R.V., Miranda-Filho, K.C., Gusmão, E.P., Moreira, C.B., Romano, L.A., Sampaio, L.A., 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum,

diesel, and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. Science of Total Environment 408, 2054-2059.

Rogers, M.E., Jani, M.K., Vogt, R.G., 1999. An olfactory-specific glutathione-S-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta*. Journal Experimental Biology 202, 1625-1637.

Ross, L.G., Ross, B., 2008. Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals. 3ed.

Saco-Álvarez, L., Bellas, J., Nieto, O., Bayona, J.M., Albaigés, J., Beiras, R., 2008. Toxicity and phototoxicity of water-accommodated fraction obtained from *Prestige* fuel oil and Marine fuel oil evaluated by marine bioassays. Science of Total Environment 394, 275-282.

Saco-Álvarez, L., Durán, I. Lorenzo, J.I., Beiras, R., 2010. Methodological basis for the optimization of a marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 491-499.

Saeed, T., Ali, L.N., Al-Bloushi, A., Al-Hashash, H., Al-Bahloul, M., Al-Khabbaz, A., Al-Khayat, A., 2011. Effect of environmental factors on photodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water-soluble fraction of Kuwait crude oil in seawater. Marine Environmental Research 72, 143-150.

Sagerup, K., Nahrgang, J., Frantzen, M., Larsen, L.H., Geraudie, P., 2016. Biological effects of marine diesel oil exposure in red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) assessed through a water and foodborne exposure experiment. Marine Environmental Research 119, 126-135.

Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K., Ghosh, A.R., 2014. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activity of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. Ecotoxicology and Environmental Safety 107, 120-125.

Sandrini-Neto, L., Pereira, L., Martins, C.C., Assis, H.C.S., Camus, L., Lana, P.C., 2016. Antioxidant responses in estuarine invertebrates exposed to repeated oil

spills: Effects of frequency and dosage in a field manipulative experiment. *Aquatic Toxicology* 177, 237-249.

Schafer, S., Kohler, A., 2009. Gonadal lesions of female sea urchin (*Psammechinus miliaris*) after exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene. *Marine Environmental Research* 68, 128-136.

Schafer, S., Abele, D., Weihe, E., Kohler, A., 2010. Sex-specific biochemical and histological differences in gonads of sea urchin (*Psammechinus miliaris*) and their response to phenanthrene exposure. *Marine Environmental Research* 71, 70-78.

Schubert, J., Wilmes, J.W., 1991. Does hydrogen peroxide exist “free” in biological systems? *Free Radical Biology and Medicine* 11, 545-555.

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

Shailaja, M.S., D’Silva, C., 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* 53, 835-841.

Sies, H., 1996. Physiological Society Symposium: Impaired Endothelial and Smooth Muscle Cell Function in Oxidative Stress. *Experimental Physiology* 82, 291-295.

Silva, A.Z., Zanette, J., Ferreira, J.F., Guzenski, J., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2005. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 376-382.

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*. *Marine Environmental Research* 90, 39-46.

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. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 112-120.

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.

Strømngren, T., Nielsen, M.V., 1991. Spawning frequency, growth and mortality of *Mytilus edulis* larvae, exposed to copper and diesel oil. *Aquatic Toxicology* 21, 171-180.

Sugni, M., Mozzi, D., Barbaglio, A., Bonasoro, F., Carnevali, M.D.C., 2007. Endocrine disrupting compounds and echinoderms: new ecotoxicological sentinels for the marine ecosystem. *Ecotoxicology* 16, 95-108.

Tang, A.H., Tu, C.P., 1994. Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferase D1 and D21. *Journal of Biological Chemistry* 269, 27876-27884.

Tay, K.L., Teh, S.J., Doe, K., Lee, K., Jackman, P., 2003. Histopathologic and histochemical biomarker response of baltic clam, *Macoma Balthica*, to contaminated Sydney harbour sediment, Nova Scotia, Canada. *Environmental Health Perspect* 111, 273-280.

Teles, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2003. *Anguilla anguilla* L. ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine response to naphtalene and @-naphthoflavone. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 98 – 107.

Thomas, H.E., Mckenzie, M.D., Angstetra, E., Campbell, P.D., Way, T.W., 2009. Beta cell apoptosis in diabetes. *Apoptosis* 14, 1389-1404.

Tiburtius, E.R.L., Peralta-Zamora, P., Emmel, A. 2005., Treatment of gasoline-contaminated waters by advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials B* 126, 86-90.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology Pharmacology* 13, 57-149.

Vidal-Linan, L., Bellas, J., Campillo, J.A., Beiras, R., 2010. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 78, 265-272.

Vieira, P.A., Vieira, R.B., França, F.P.E., Cardoso, V.L., 2007. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *Journal of Hazardous Materials* 140, 52-59.

Vieira, C., Corrêa, S.M., 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel emission, diesel fuel and lubricant oil. *Fuel* 185, 925-931.

Wessel, N., Rousseaus, S., Caisey, F., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzeno(a)pyrene, ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology* 85, 133-142.

Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 19, 137-161.

Winston, G.W., 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A* 100, 173-176.

Zhan, Y., Hu, W., Zhang, W., Liu, M., Duan, L., Huang, X., Chang, Y., Li, C., 2016., The impact of CO₂-driven ocean acidification on early development and calcification in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Marine Pollution Bulletin* 11, 291-302.