

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

TOXICIDADE DO FENANTRENO EM *Geophagus brasiliensis* E
***Centropomus parallelus* EXPOSTOS A DIFERENTES**
TEMPERATURAS

VINÍCIUS DADALTO BARONI

VILA VELHA
JULHO / 2014

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**TOXICIDADE DO FENANTRENO EM *Geophagus brasiliensis* E
Centropomus parallelus EXPOSTOS A DIFERENTES
TEMPERATURAS**

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

VINÍCIUS DADALTO BARONI

**VILA VELHA
JULHO / 2014**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

B266t Baroni, Vinícius Dadalto.

Toxicidade do fenantreno em *Geophagus brasiliensis* e *Centropomus parallelus* expostos a diferentes temperaturas / Vinícius Dadalto Baroni. – 2014.

81 f.: il.

Orientador: Adriana Regina Chippari Gomes.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Peixe. 2. Stress oxidativo. 3. Toxicologia Ambiental. I. Gomes, Adriana Regina Chippari. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 571.95

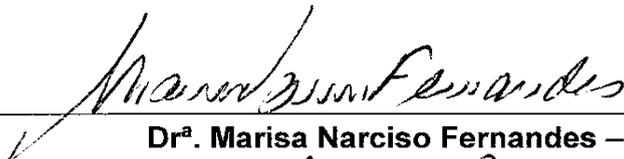
VINÍCIUS DADALTO BARONI

**TOXICIDADE DO FENANTRENO EM *Geophagus brasiliensis* E
Centropomus parallelus EXPOSTOS A DIFERENTES
TEMPERATURAS**

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

Aprovado em 28 de julho de 2014,

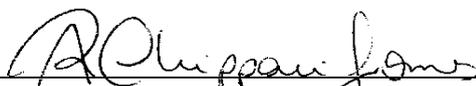
Banca Examinadora:



Dr^a. Marisa Narciso Fernandes – UFSCar



Dr. Marcio Fronza – UVV



**Dr^a. Adriana Regina Chippari Gomes – UVV
Orientadora**

Dedico aos meus pais, irmã e cunhado por todo apoio a este projeto, em todos os momentos de aflição, como também nos momentos de alegria desta e de outras caminhadas.

“Deus nos ensinou a não aceitar a facilidade,
mas a encontrar Vida na dureza da Cruz”

Dom Hélder Câmara

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que o mestrado se realizasse em minha vida me concedendo saúde, força e garra para chegar ao fim, manifestando-se em todos os momentos como o maior mestre que alguém pode ter.

À minha orientadora Dr^a. Adriana Regina Chippari Gomes e ao professor Dr Levy de Carvalho Gomes, pela oportunidade, incentivo e amizade durante esses anos, e por acreditar que no final tudo isso seria possível e real. Muito Obrigado!

Aos meus pais, minha irmã e cunhado, minha família que desde o início me apoiaram e me deram coragem para seguir em frente nesta conquista.

À Universidade Vila Velha, aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de ecossistemas que contribuíram para minha formação acadêmica, e que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do trabalho. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pela concessão da bolsa.

Aos amigos do Laboratório de Ictiologia Aplicada – Lab Peixe, que contribuíram e acompanharam de maneira direta e indireta com o trabalho, Alexandra Veronez, Priscylla Pavione, Andréa Tassis, Isadora, Raphaele, David e Jéssica. Meu muito obrigado a todos.

Aos funcionários do complexo Biopráticas que se demonstraram sempre disponíveis.

SUMÁRIO

LISTA DE EQUAÇÕES.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS	xv
RESUMO.....	xx
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
2.1. Petróleo.....	3
2.2. Presença no ambiente	4
2.3. HAPs.....	5
2.4. Fenantreno.....	7
2.5. Temperatura.....	9
2.6. Ecotoxicologia	10
2.7. Bioindicadores.....	11
2.8. Biomarcadores	11
2.9. Espécies estudadas	15
3. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	18
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo geral.....	19
4.2. Objetivo específico.....	19
5. MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1. Aquisição e aclimação dos peixes	20
5.2. Desenho experimental	21
Desenho experimental I.....	21
Desenho experimental II.....	22
5.3. Coleta de tecido e órgão	22
5.4. Análises genotóxicas	23
Ensaio cometa.....	23
Teste do micronúcleo.....	24
5.5. Enzimas da fase II de conjugação	24
Atividades enzimáticas.....	24
5.6. Determinação do valor de proteína total do tecido hepático (Método de Bradford)	26

5.7. Estatística	26
6. RESULTADOS	27
6.1. Ensaio cometa	27
6.2. Teste do micronúcleo	29
6.3. Glutathione S-transferase	30
6.4. Superóxido dismutase.....	32
6.5. Catalase	34
6.6. Glutathione peroxidase	36
7. DISCUSSÃO	39
8. CONCLUSÃO.....	48
9. REFERÊNCIAS.....	49

LISTA DE EQUAÇÕES

- Equação 1** Conjugação da GSH com substrato eletrofílicos tóxico (xenobióticos pela ação da glutathione S-transferase (GST). 13
- Equação 2** Desintoxicação do radical superóxido (${}_{2}O^{\cdot}$) pela enzima superóxido dismutase (SOD). 13
- Equação 3** Desintoxicação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima catalase (CAT). 14
- Equação 4** Oxidação da GSH a GSSG, pela ação da GPx, com H_2O_2 como substrato. 14
- Equação 5** Oxidação da GSH a GSSG, pela ação da GPx, utilizando hidroperóxido de lipídeo (LOOH) como substrato formando um álcool não tóxico (LOH). 14

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Grupo dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Fonte: umaquimicanova.blogspot.com. 6
- Figura 2** Fórmula estrutural do fenantreno. Fonte: jccanalda.es. 8
- Figura 3** Exemplar de *Centropomus parallelus*, robalo peva. Fonte: forumaquario.com.br. 16
- Figura 4** Exemplar de *Geophagus brasiliensis*, acará. Fonte: forumaquario.com.br. 17
- Figura 5** Índice de danos no DNA em *Centropomus parallelus* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, p < 0,05. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, p < 0,05. Os valores de média e desvio padrão das barras (n = 6) foram expressos em função de 1 + Log. 28
- Figura 6** Índice de danos no DNA em *Geophagus brasiliensis* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, p < 0,05. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, p < 0,05. Os valores de média e desvio padrão das barras (n = 6) foram expressos em função de 1 + Log. 29
- Figura 7** Frequência de micronúcleos em eritrócitos de *Centropomus parallelus* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam 30

diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

Figura 8 Frequência de micronúcleos em eritrócitos de *Geophagus brasiliensis* expostos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

31

Figura 9 Atividade da glutathione S-transferase (GST) hepática em *Centropomus parallelus* expostos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

32

Figura 10 Atividade da glutathione S-transferase (GST) hepática em *Geophagus brasiliensis* expostos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o

33

mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

Figura 11 Atividade da superóxido dismutase (SOD) hepática em *Centropomus parallelus* expostos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

34

Figura 12 Atividade da superóxido dismutase (SOD) hepática em *Geophagus brasiliensis* expostos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

35

Figura 13 Atividade da catalase (CAT) hepática em *Centropomus parallelus* expostos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

36

Figura 14 Atividade da catalase (CAT) hepática em *Geophagus brasiliensis* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, p < 0,05. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, p < 0,05. Os valores de média e desvio padrão das barras (n = 6) foram expressos em função de 1 + Log. 37

Figura 15 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx) hepática de *Centropomus parallelus* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, p < 0,05. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, p < 0,05. Os valores de média e desvio padrão das barras (n = 6) foram expressos em função de 1 + Log. 38

Figura 16 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx) hepática de *Geophagus brasiliensis* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, p < 0,05. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, p < 0,05. Os valores de média e desvio padrão das barras (n = 6) foram expressos em função de 1 + Log. 39

LISTA DE SÍMBOLOS ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

HAPs – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Fe – Ferro

Zn – Zinco

Ni – Níquel

EPA - Environmental Protection Agency

3NPA - 3-nitrofenantreno

9NPA - 9-nitrofenantreno

PHE – Fenantreno

CONAMA - Conselho nacional de meio ambiente

$\mu\text{g L}^{-1}$ – Micrograma por litro

mg.L^{-1} – Miligrama por litro

EROs - Espécies reativas de oxigênio

LC_{50} - Concentração de uma substância que é letal para 50% de uma população no período de 96 h

NEC - Concentração máxima que não provoca qualquer efeito adverso ao organismo alvo

EC_x - Concentração que afeta x% dos organismos em um experimento de dose-resposta

NOEC - Concentração sem efeito observável

LOEC - Menor concentração com efeito observável

DNA - Ácido desoxinucleico

GST - Glutathione S-transferase

CAT – Catalase

SOD - Superóxido dismutase

GPx - Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

GSTA - GST-alfa

GSTM - GST-Um

GSTP - GST-Pi

GSTT - GST-Teta

kDa - Quilodalton

${}_{2}O^{\cdot -}$ - Superóxido

$H_{2}O_{2}$ – Peróxido de hidrogênio

O_{2} - Oxigênio reativo

SOD-Mn - Superóxido dismutase manganês

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

$H_{2}O$ – Água

LOOH - Hidroperóxidos de lipídeo

LOH - Álcool não tóxico

Sec – Selenocisteína

Se-GPx - Glutathione peroxidase dependentes de selênio

não-Se-GPx - Glutathione peroxidase não dependentes de selênio

GSSG – Glutathione oxidada

EUA – Estados Unidos da América

Kg – Quilograma

°C – Grau Celsius

h - Horas

cm - Centímetros

g - Gramas

ES – Espírito Santo

LAB PEIXE - Laboratório de Ictiologia Aplicada

UVV - Universidade Vila Velha

L – Litros

mS - Milisiemens

mg O₂ L⁻¹ – Miligramas de oxigênio por litro

IFES – Instituto Federal do Espírito Santo

μS - Microsiemens

mL - Mililitro

n - Número

% - Porcentagem

g.L⁻¹ – Grama por litro

EC - Ensaio cometa alcalino

PBS – Phosphate buffer solution

NaCl – Cloreto de sódio

KCl – Cloreto de potássio

Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dibásico

KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico

μL – Microlitro

M - Molar

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

TRIS – Tris hidroximetil aminometano

mM - Milimolar

DMSO – Dimetilsufóxido

NaOH – Hidróxido de sódio

min. – Minuto

V – Volt

mA - Miliampére

$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ – 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

ID - Índice de danos

MN – Micronúcleo

P. A. – Para análise

PMSF – Phenylmethylsulfonylfluoride

DTT - Ditioneitol

CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

nm – Nanômetro

seg. - Segundo

$\mu\text{mol CDNB. min.}^{-1}. \text{mg proteína}^{-1}$ - Micromol de CDNB por miligrama de proteína

U m L^{-1} - Unidade de enzima por litro

$\text{U SOD. min.}^{-1}. \text{mg proteína}^{-1}$ – Unidade de SOD por minuto por miligrama de proteína

$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2. \text{min.}^{-1}. \text{mg proteína}^{-1}$ - Micromol de H_2O_2 por miligrama de proteína

$\mu\text{mol NADPH. min.}^{-1}. \text{mg proteína}^{-1}$ - Micromol de NADPH por miligrama de proteína

ANEs - Anormalidades nucleares eritrocitárias

MnSOD - SOD manganês

FeSOD - SOD ferro

CuZnSOD - SOD cobre e zinco

NiSOD - SOD níquel

$\mu\text{g L}^{-1}$ – Micrograma por litro

Cr^{3+} - Crômo III

Cr^{6+} - Crômo VI

GR - Glutathiona redutase

RESUMO

BARONI, Vinícius Dadalto, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, julho de 2014. **Toxicidade do fenantreno em *Geophagus brasiliensis* e *Centropomus parallelus* expostos a diferentes temperaturas.** Orientadora: Adriana Regina Chippari Gomes.

O fenantreno possui propriedades tóxicas que causam fotossensibilidade da pele, propriedades carcinogênicas que induzem a permutação das cromátides irmãs na divisão celular e atua na abertura de ligação inibindo a comunicação intracelular. Dentro do organismo, eles tendem a se ligar às estruturas que apresentam o mesmo comportamento, ou seja locais lipofílicos, quando ligados a esses locais eles interagem com moléculas celulares promovendo seus efeitos nocivos. Somado a esse fato pesquisas vêm demonstrando que a variação da temperatura exerce efeito na toxicidade de substâncias químicas presentes no meio ambiente. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da toxicidade do fenantreno na concentração de 0,1 mg.L⁻¹ associado a variação de temperatura, nos parâmetros de estresse oxidativo, e genotóxico, das espécies de peixes *Centropomus parallelus* e *Geophagus brasiliensis*, expostos por 96 h, às temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C. Ao analisar o índice de danos, pelo ensaio cometa, foi observado em *C. parallelus* um índice de danos maior no controle da temperatura de 28 °C em relação aos outros grupos controles e uma diferença entre os tratamentos de 26 °C. Para *G. brasiliensis*, o índice de danos do grupo controle de 22 °C diferiu de todas as outras temperaturas, e entre os grupos expostos ao fenantreno houve diferença entre as temperaturas mais altas. Para o Teste do Micronúcleo o aumento da temperatura associado a exposição ao fenantreno, promove um aumento significativo de micronúcleos em *C. parallelus* quando comparados os grupos expostos ao contaminante a 26 e 28 °C com 22 °C. Somado a isso os grupos expostos ao fenantreno são diferentes entre si nas temperaturas de 26 e 28 °C. Já nas análises enzimáticas foram observadas diferenças na glutathione S-transferase em *C. parallelus* e na superóxido dismutase em *G. brasiliensis*. Porém as enzimas catalase e glutathione peroxidase não sofreram alterações nos seus níveis basais nas duas espécies. No presente trabalho, a exposição de *C. parallelus* e *G. brasiliensis* a uma concentração de 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno por 96 h nas diferentes temperaturas permitiu chegar as seguintes conclusões: primeiro, para cada uma das espécies existe um padrão de resposta distinta uma da outra. Em segundo é que a interação da temperatura com a exposição ao fenantreno promove genotoxicidade nas espécies de peixes testadas, sendo mais expressiva em *C. parallelus*. Por fim conclui-se que a temperatura juntamente com o fenantreno interfere na atividade das principais enzimas da fase II de ambas as espécies.

Palavras chave: catalase, ecotoxicologia, estresse oxidativo, genotoxicidade, HAPs

ABSTRACT

BARONI, Vinícius Dadalto, M.Sc., University Vila Velha - ES, July 2014. **Toxicity of phenanthrene in *Geophagus brasiliensis* and *Centropomus parallelus* exposed to different temperatures.** Advisor: Adriana Regina Chippari Gomes.

Phenanthrene has toxic properties that cause photosensitivity of the skin and carcinogenic properties that induce permutation of sister chromatids in cell division acting in connection with the opening inhibiting in intracellular communication. Inside the body, it tends to bind to structures that exhibit the same behavior, binding to lipophilic sites that interact with cellular molecules promoting its harmful effects. Temperature variation has an effect on the toxicity of some chemicals in the environment. Therefore this study aims to evaluate the effects of toxicity of phenanthrene (0.1 mg.L^{-1}) associated with temperature variation in oxidative stress, and genotoxic parameters of *Centropomus parallelus* and *Geophagus brasiliensis*, exposed for 96 h at temperatures of 22, 24, 26 and 28 °C. When analyzing the index of damage by the comet assay, a higher index of DNA damage was observed in *C. parallelus* in the control group at 28 °C when compared with other control groups, and a difference between treatments of 26 °C. For *G. brasiliensis*, the DNA damage index of the control group at 22 °C differed from all other temperatures, and between groups exposed to phenanthrene have a significant difference between the highest temperatures. For the micronucleus test, the temperature rise associated with exposure to phenanthrene promotes a significant increase in micronuclei of *C. parallelus* groups when exposed to the contaminant at 26 °C and 28 °C compared with 22 °C. In addition, groups exposed to phenanthrene are different at temperatures of 26 and 28 °C. Enzymatic analysis differences were observed for glutathione S-transferase in *C. parallelus*, and for superoxide dismutase in *G. brasiliensis*. But the enzymes catalase and glutathione peroxidase did not change in their baseline levels in both species. In conclusion for each of these species there is a distinct response pattern. The interaction of temperature with exposure to phenanthrene promotes genotoxicity in the fishes tested, however this was most pronounced in *C. parallelus*. The temperature and phenanthrene interferes with the activity of key phase II enzymes in both species.

Keywords: catalase, ecotoxicology, genotoxicity, oxidative stress, PAHs

1. INTRODUÇÃO

Com a revolução industrial a sociedade moderna tornou-se extremamente dependente do petróleo, pois é ele que move grande parte dos meios de transporte, é por causa de seus derivados como o plástico, produtos farmacêuticos e pesticidas que a vida moderna tornou-se muito mais simples. Essa dependência fez com que aumentou nas últimas décadas sua exploração e utilização (Wu et al., 2012). Antes de seu beneficiamento, quando o petróleo bruto é extraído ele é constituído por uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos ou aromáticos, heteroátomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio associados a moléculas orgânicas e moléculas organometálicas (Doyle et al., 2013; Liang et al., 2009). Além disso, o petróleo quando é extraído também é composto por sedimento e água que pode estar livre ou emulsionada ao óleo. A água livre é retirada por diferença de densidade deixando o óleo parado e assim se forma a fase óleo água. A água emulsionada traz consigo sais incorporados no processo de formação do mineral é extraída por meio de aquecimento do composto (Doyle et al., 2013). O petróleo é classificado de acordo com as concentrações de seus componentes em: petróleo bruto caracterizado por todo tipo de óleo que não possui fluidez, ou petróleo leve, quando predomina em sua composição hidrocarbonetos saturados (Wu et al., 2012).

Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são moléculas orgânicas constituintes do petróleo, mas podem se formar através da combustão de compostos orgânicos (Machado et al., 2014; Sette et al. 2013). Devido a sua onipresença em todos os ecossistemas, mas principalmente nos ambientes aquáticos, eles são incluídos no grupo de poluentes que potencialmente causam mais problemas. Dentro da variedade de transtornos que os HAPs podem causar, sua propriedade de bioacumulação na teia alimentar não é tão expressiva quanto sua genotoxicidade, carcinogênese e citotoxicidade (Machado et al., 2014). Esses efeitos tóxicos dos HAPs são provocados pela sua alta afinidade por moléculas de lipídio, assim suas moléculas que estão dispersas no ambiente aquático ligam-se mais facilmente aos sítios lipofílicos do organismo. Quando essas moléculas se ligam ao tecido

animal elas podem ser facilmente metabolizadas e esses metabólitos podem ser detectados nos fluidos corporais (Sette et al., 2013).

A presença de HAPs representa uma ameaça praticamente incontrolável nos ecossistemas aquáticos principalmente para a biota, uma vez que em contato com a água o petróleo é degradado por meio da fotodegradação ou de forma mecânica com o batimento das ondas. Esse processo disponibiliza os HAPs que se dispersam além da grande mancha de óleo visível na forma de fração solúvel persistindo por vários anos na água e no sedimento (Moreno et al., 2011). Muitos estudos têm sido realizados para verificar o potencial tóxico do petróleo e de seus hidrocarbonetos, estes estudos podem ser de curto ou longo prazo *in situ* ou laboratoriais. Estudos de curto prazo se concentram em medir taxas fotossintéticas e/ou comunidades de invertebrados, já os estudos de longo prazo preocupam-se com os impactos indiretos ocasionados pela exposição crônica aos contaminantes e por fim os experimentos laboratoriais utilizam taxas e modelos experimentais semelhantes aos que são encontrados no campo porém com a possibilidade de controlar algumas variáveis (Carrera-Martínez et al., 2010).

O principal intuito de abordagens ecotoxicológicas como estas é o de compreender e poder antecipar o potencial mecanismo de ação dos xenobiontes sobre o organismo e o ecossistema ao qual ele está inserido (Uleberg et al., 2010). Para o entendimento desses efeitos potenciais dos contaminantes lança-se mão dos biomarcadores que são compreendidos por respostas fisiológicas, bioquímicas, comportamentais e/ou histológicas (Jakšić et al., 2008; Guedard et al., 2012).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Petróleo*

O petróleo é um líquido viscoso altamente inflamável de ocorrência natural originado de formações geológicas profundas (Wu et al., 2012). Sua formação ocorre por meio da junção de três fatores representados por uma matriz orgânica, formada a partir do acúmulo de material animal e vegetal; de alta temperatura e de grande pressão (Behrenbruch e Dedigama, 2007). O tempo de formação desse mineral está intimamente relacionado com o histórico de soterramento da matriz orgânica bem como com o substrato orgânico que o compõe (Behrenbruch e Dedigama, 2007; Wu et al., 2012).

O petróleo natural é composto essencialmente de hidrocarbonetos aromáticos (de cadeia curta) como o benzeno, naftaleno e o fenantreno e saturados (de cadeia longa) como o pireno e o fluoranteno compondo 75% do óleo, porém sua composição não fica restrita a apenas compostos de origem orgânica, também fazem parte da constituição do petróleo metais e metaloides, seja desde a sua formação ou a partir das operações de transporte e armazenagem. A forma mais comum de se encontrar essas formas inorgânicas é como sais (cloretos ou sulfatos) em meio à fase aquosa ou como substâncias organometálicas adsorvidas na interface óleo-água (Pereira et al., 2010). A concentração dos elementos inorgânicos assim como a das substâncias orgânicas depende do local de extração, porém suas concentrações dificilmente ultrapassam 0,03%. Aproximadamente sessenta elementos são encontrados no petróleo contemplando 10% do óleo, destes: ferro (Fe), zinco (Zn) e níquel (Ni) são encontrados em maiores concentrações (Pontes et al., 2013).

O petróleo é constituído por duas frações, uma é denominada fração solúvel formada por hidrocarbonetos de cadeia curta que são caracterizados por serem muito voláteis e de pouca duração no ambiente, a outra é conhecida como fração de água-acomodada, nesta estão presentes os hidrocarbonetos de cadeia longa, tidos como menos voláteis e mais duradouros no ambiente (Duarte et al., 2010). Os hidrocarbonetos de cadeia curta apesar de sua pouca

persistência e grande volatilidade são mais tóxicos para a comunidade aquática, já os hidrocarbonetos saturados que são mais persistentes e pouco voláteis representam uma ameaça física à comunidade, visto que se comportam como uma barreira viscosa na interface ar-água (Brauner et al., 1999).

Atualmente o petróleo é uma das mais importantes matrizes energéticas, é também usado em larga escala como matéria prima na fabricação de tintas, borrachas, óleos lubrificantes, entre outros. Essa larga utilização promove o incentivo de atividades de exploração, transporte e armazenagem, as quais contribuem na contaminação da água, do solo e do ar ocasionando grandes impactos aos ecossistemas e colocando a saúde humana em risco (Liang et al., 2009).

2.2. Presença no ambiente

Zonas costeiras e estuarinas têm uma grande produtividade o que a possibilita manter uma grande diversidade biológica, porém o equilíbrio desses ecossistemas encontra-se ameaçado uma vez que estes recebem uma grande carga de efluentes orgânicos, metais e derramamentos de petróleo provocados principalmente por naufrágios, explorações de poços de petróleo, explosões de refinarias entre outros (Ruiz et al., 2011; Lee e Lin, 2013), além dos pequenos vazamentos que ocorrem cotidianamente das pequenas embarcações e procedimentos rotineiros.

Locais de água salobra (por exemplo, manguezais e estuários) que compõem habitats importantes e exclusivos com fauna e flora únicas incluem-se nestas áreas sujeitas, constantemente, a diversas pressões, como por exemplo a da contaminação por petróleo e seus derivados, ela é ainda mais agravada em regiões portuárias onde existe um intenso tráfego de embarcações (Lecklin et al., 2011).

Acredita-se que as atividades antrópicas promovem a entrada de 3,2 milhões de toneladas de petróleo por ano nos oceanos. Este fato promove a formação de diversas plumas de contaminação toda vez que o óleo entra em

contato com a água, e estas são transformadas por uma combinação de processos físicos (evaporação, dispersão e dissolução), químicos (fotodegradação) e biológicos (ação microbiana) (Nicodem et al., 1998).

Inúmeros são os registros de derramamentos de petróleo pelo mundo, entre eles destacam-se o do petroleiro Prestige, em 2002, na costa espanhola, onde cerca de 56 mil toneladas vazaram para o ambiente (Carrera-Martínez et al., 2010). Em 2010, houve também uma explosão de um oleoduto na China derramando cerca de 1,5 mil toneladas de óleo (Liu et al., 2013). E, recentemente, os acidentes no Golfo do México, com o derramamento de 3 a 4 milhões de barris de petróleo, devido a um rompimento da tubulação submersa ocasionado por uma explosão ocorrida na plataforma; e, em 2011, o acidente com a plataforma da Chevron no Campo do Frade na baía de Campos, RJ, com o derramamento 400.000 litros de óleo.

A poluição causada por esses derramamentos de petróleo é caracterizada pela mortalidade de organismos marinhos, pela persistência de certos componentes como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que exercem efeitos sub letais sobre os organismos, onde suas consequências, na maioria das vezes somente serão observadas com o passar dos anos (Moreno et al., 2011).

2.3. HAPs

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são compostos hidrofóbicos que apresentam entre 2-8 anéis aromáticos e com estruturas de anéis pentacíclicos sem arranjos linear ou angular (Figura 1). Eles são originados por meio de reações como pirólise e combustão incompleta de madeira, combustíveis fósseis, incêndios florestais, ou seja, queima da biomassa associada a altas temperaturas (Reddy et al., 2010; Chen et al., 2012; Huang et al., 2012). Os HAPs pertencem a uma classe de poluentes orgânicos de ampla distribuição sendo considerados onipresentes, o que o torna motivo de preocupação devido ao seu potencial tóxico (Zhang et al., 2013). Essa ampla distribuição dos HAPs ocorre devido a sua baixa

solubilidade, moderada pressão de vapor e baixa reatividade (Ma et al., 2010). Devido às suas características tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas alguns dos HAPs estão listados como poluentes prioritários pela agência de proteção ambiental (Environmental Protection Agency- EPA), o que contribui para que eles recebam maior atenção do meio científico e dos governos no desenvolvimento de mais pesquisas na área e estabelecendo políticas e legislações (Chen et al., 2012).

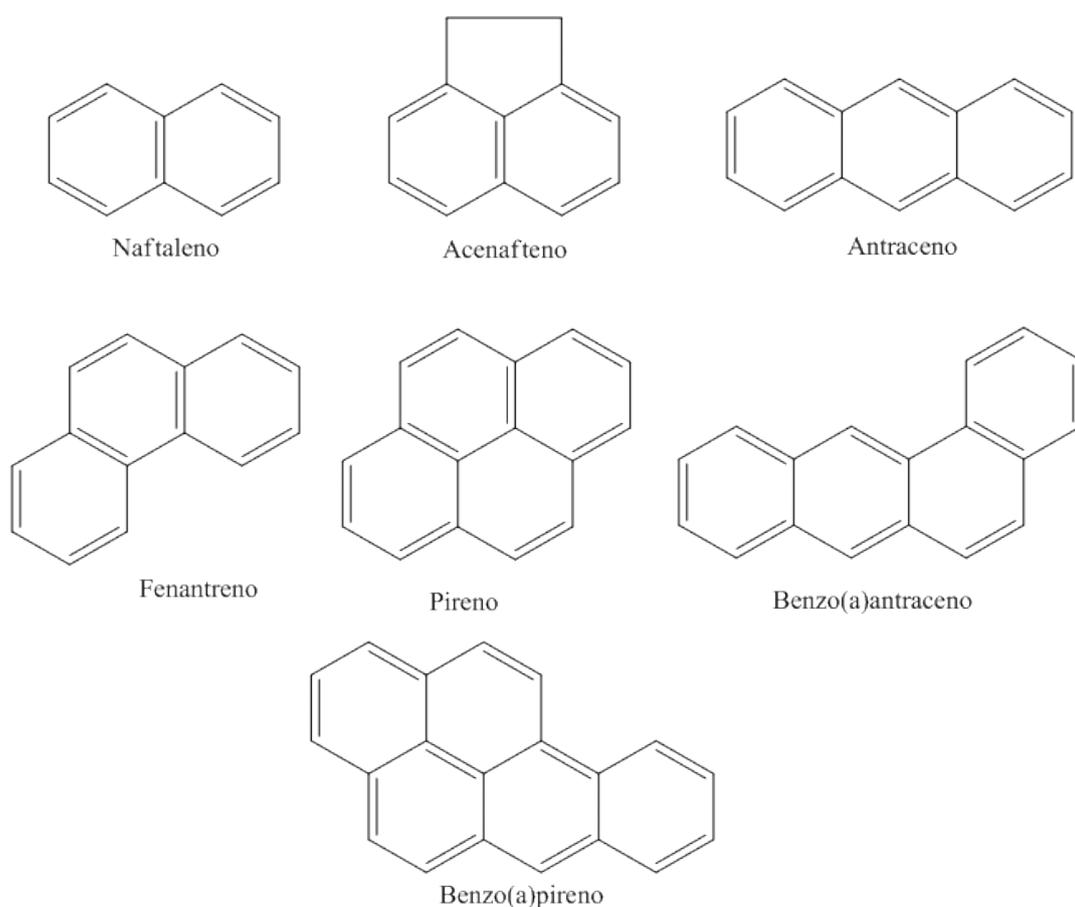


Figura 1. Grupo dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Fonte: umaquimicanova.blogspot.com.

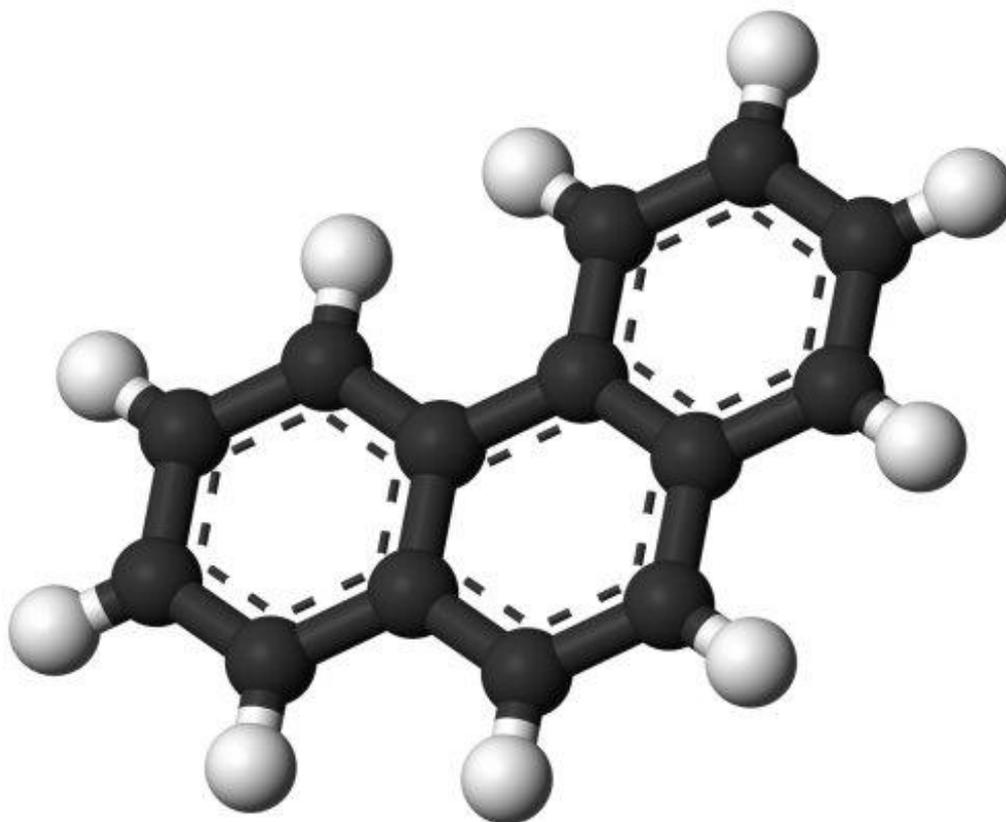
Os hidrocarbonetos podem entrar em contato com os oceanos de diversas formas: derramamentos de petróleo, tráfego de navios, naufrágio de petroleiros e descarga de efluentes (Pedetta et al., 2012). Além dessas entradas conhecidas de HAPs nos oceanos outra forma de contato dos

mesmos com o ambiente marinho é através da circulação de ar atmosférico que não é considerado muito significativo (de Bruyn et al., 2012).

Ainda no que se relaciona com os HAPs, outros compostos têm sido motivo de grande atenção, como os nitratos e os oxigenados HAPs formados a partir de reações de foto oxidação, oxidação química ou transformação microbiana com hidrocarbonetos atmosféricos. Por exemplo, o 3-nitrofenantreno (3NPA) e o 9-nitrofenantreno (9NPA) que são formados na atmosfera a partir da reação em fenantreno (PHE), alguns desses nitro-HAPs tem potencial carcinogênico e mutagênico maior do que os de seus HAPs originais (Wei et al., 2012). Essas novas espécies podem facilmente entrar em contato com os ecossistemas marinhos através do contato da interface ar-água.

2.4. Fenantreno

O fenantreno é um HAP formado por três anéis aromáticos fundidos, sua estrutura química é constituída de 14 átomos de carbono e 10 átomos de hidrogênio, sendo considerado um dos hidrocarbonetos mais abundantes em ecossistemas marinhos (Figura 2) (Ying et al., 2007). Atualmente, a agência ambiental americana o considera como um poluente prioritário por possuir propriedades relacionadas a genotoxicidade e a mutagenicidade presente em HAPs (Ying et al., 2007; Wenju et al., 2009; Janbandhu e Fulekar, 2011). No Brasil o conselho nacional de meio ambiente (CONAMA) na sua resolução 357/2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água não existe uma preocupação com relação as concentrações legais permitida de PHE na água. Porém uma resolução mais atual a CONAMA 420/2009, que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substância químicas visando a manutenção de sua funcionalidade e a proteção da qualidade de águas superficiais e subterrâneas estabelece uma concentração de $140 \mu\text{g L}^{-1}$ de PHE. O PHE é um composto orgânico de alta reatividade com outros elementos químicos, apresenta um baixo peso molecular e pouca solubilidade em água ($1,29 \text{ mg.L}^{-1}$) (Pedetta et al., 2013).



Sabe-se que o PHE possui propriedades tóxicas que causam fotossensibilidade da pele, propriedades carcinogênicas que induzem a permutação das cromátides irmãs na divisão celular e atua na abertura de ligação inibindo a comunicação intracelular (Patel et al., 2012). Ying et al. (2007) afirmam que pelo fato de hidrocarbonetos serem hidrofóbicos eles têm uma grande possibilidade de serem assimilados pelos organismos, uma vez que eles não possuem afinidade a moléculas de água. Dentro do organismo, eles tendem a se ligar às estruturas que apresentam o mesmo comportamento, ou seja locais lipofílicos, quando ligados a esses locais eles interagem com moléculas celulares. Ainda segundo Ying et al. (2007) a comunidade científica está concentrando esforços em estudos toxicológicos e análises de risco de HAPs, esses estudos têm mostrado que a exposição a HAPs promove o aumento da expressão de citocromo P450, sendo que alguns dos metabólitos

Figura 2. Fórmula estrutural do fenantreno. Fonte: jccanalda.es.

produzidos por essa enzima de fase I podem promover a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs).

2.5. Temperatura

Em meio às variáveis ambientais a temperatura se destaca como sendo uma variável fundamental que interfere nos padrões e processos biológicos. Tem sido demonstrado que alterações na mesma interferem nas funções bioquímicas e fisiológicas, essa influência pode ser facilmente medida, uma vez que essas funções representam índices de crescimento, reprodução e sobrevivência (Kordas et al., 2011). As atividades fisiológicas nos animais acontecem dentro de uma amplitude pequena de temperatura, estruturas moleculares e celulares envolvidas no funcionamento dos mecanismos fisiológicos também contribuem para restringir grandes variações de temperatura (Miranda et al., 2013). Em nível bioquímico, um acréscimo da temperatura ambiental ativa o mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, caso essa defesa venha a falhar, um estado de estresse oxidativo leve promove efeitos deletérios por meio de alterações de funções celulares (Lushchak e Bagnyukova, 2006).

Pesquisas vêm demonstrando que por meio de alterações na estrutura química do contaminante a temperatura, exerce efeito na toxicidade de substâncias químicas presentes no meio ambiente potencializando seu mecanismo de ação. Em meio a ambientes de altas temperaturas animais como, por exemplo, peixes estão mais suscetíveis a contaminação por poluentes, uma vez que esse tipo de ambiente promove um acréscimo no processo de ventilação do animal, promovido pelo aumento do metabolismo e decréscimo da solubilidade do oxigênio (Schiedek et al., 2007). Tendo isso em mente, hoje não só é importante avaliar os efeitos da influência da degradação ambiental promovidos por poluentes nos organismos, mas incorporar outras variáveis de estresse promovidas pelas mudanças globais (Schiedek et al., 2007).

2.6. *Ecotoxicologia*

A ecotoxicologia é marcada por um rápido desenvolvimento com muitas contribuições memoráveis na investigação de desequilíbrios promovidos por contaminantes no meio ambiente, em nível molecular, fisiológico, individual, populacional, de comunidade e de ecossistemas (Beketov e Liess, 2012).

Em virtude das grandes pressões do desenvolvimento, a biodiversidade, os serviços ecossistêmicos e a saúde humana encontram-se em risco. Diante disso, ecotoxicologistas são chamados a desenvolver uma estratégia de ação para prever, prevenir e mitigar as consequências do desenvolvimento sobre ecossistemas terrestres e aquáticos (Artigas et al., 2012).

A pesquisa ecotoxicológica procura estabelecer diretrizes, determinar valores de gatilho e concentrações limites de substâncias químicas nocivas à biota do ambiente receptor (Fox, 2010). Sabendo que quando se trabalha em nível de comunidade as respostas de concentrações tóxicas, distinguem-se para cada população, são feitos diferentes ensaios para o estabelecimento das diretrizes, valores de gatilho e concentrações limites para cada uma. Após os ensaios são montadas as curvas de dose-resposta para avaliar uma variedade de medidas como a LC_{50} (concentração de uma substância que é letal para 50% de uma população no período de 96 h), a NEC (a concentração máxima que não provoca qualquer efeito adverso ao organismo alvo) e EC_x (a concentração que afeta x% dos organismos em um experimento de dose-resposta) (Fox, 2010). Testes estatísticos como teste “t” e ANOVA também são usados como análises auxiliares para a determinação da NOEC (concentração sem efeito observável) e da LOEC (menor concentração com efeito observável) (Fox, 2010).

Atualmente, trabalhos de ecotoxicologia de nível de exposição crônica ou aguda procuram obter valores de biomarcadores morfológicos, fisiológicos, comportamentais, histológicos e moleculares para avaliar o grau de toxicidade de contaminantes ao ecossistema (Wenju et al., 2009), para tanto são usados organismos sentinelas ou bioindicadores.

2.7. Bioindicadores

Indicadores biológicos são utilizados como ferramentas na detecção de efeitos sinérgicos ou antagônicos promovidos pelas diversas classes de poluentes químicos ao organismo desse indicador (Oguntimehin et al., 2010). Para se estabelecer um bioindicador é necessário que ele seja capaz de fornecer informações mensuráveis e replicáveis quando colocado à prova, ou seja, em uma situação de ambiente impactado, de forma mais eficiente do que os meios analíticos para aquela situação. Para tanto indicadores biológicos correspondem a um organismo ou parte dele que oferece informações a respeito da qualidade ambiental a qual ele está inserido (Fiera, 2009). Além disso, também se avalia um bom bioindicador por meio da sua sensibilidade a baixas concentrações do contaminante e sua posição na cadeia trófica, pois quanto mais alto ele estiver na cadeia trófica mais exposto ao contaminante ele estará, por isso peixes são tidos como bons organismos sentinelas (Ying et al., 2007; Lemos et al., 2008).

2.8. Biomarcadores

Várias metodologias, como métodos analíticos, bioensaios e biomarcadores como técnicas *in vitro* e *in vivo*, são aplicadas para o estudo da ação tóxica e genotóxica dos contaminantes nos ambientes aquáticos (Lemos et al., 2008). Vários são os propósitos de utilização dos biomarcadores, entre eles estão avaliar a exposição, avaliar os efeitos das substâncias químicas e avaliar a suscetibilidade individual (Amorim, 2003).

Ambientes representados principalmente por regiões litorâneas, estuarinas e corpos de água continentais sofrem pressões antrópicas das mais variadas formas possíveis. Frente a essa problemática fica claro que é necessário conciliar o desenvolvimento humano com a preservação ambiental, para isso a utilização de técnicas de marcadores biológicos ou biomarcadores vêm colaborando nessa conciliação apontando até aonde o desenvolvimento caminha sem interferir no ambiente (Fasulo et al., 2010).

Trabalhos com HAPs apontam que hidrocarbonetos e seus metabólitos podem causar sinais que demonstram toxicidade, por meio da formação de EROs ou de ligações covalentes a macromoléculas celulares, como por exemplo o ácido desoxinucleico (DNA) (Wenju et al., 2009).

No ambiente aquático os organismos podem entrar em contato com uma infinidade de compostos nocivos a eles (Prosser et al., 2011). Essa exposição exige uma resposta imune do organismo que ocorre através da metabolização do composto em uma tentativa de biotransformá-lo em uma espécie menos tóxica, esse processo ocorre através da atividade de enzima que são geralmente divididas em dois grupos: enzimas de reação de fase I e enzimas de fase II (Sinaei et al., 2012). As enzimas da fase I, conhecidas como monooxigenase, associadas à ação do citocromo P450 por meio de reações de oxidação, redução ou hidrólise, inserem um grupo polar nas moléculas xenobióticas tornando-as menos hidrofóbicas facilitando sua eliminação. As enzimas da fase II, chamadas de conjugativas, biotransformam os restos metabólitos da fase I que ainda não se tornaram polares o suficiente para serem eliminados, além de conjugarem xenobióticos que passaram pela fase I (Sinaei et al., 2012). Tanto as enzimas de fase I, como as da família do citocromo P450, quanto as enzimas de fase II, como glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), podem ser usadas como biomarcadores de contaminação.

A glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18) constitui um grupo de enzimas diméricas que têm a função de catalisar uma grande quantidade de xenobióticos e compostos endógenos do organismo, seja de forma direta ou catalisando metabólitos secundários provenientes dos citocromos P450 conjugando a glutathione reduzida (GSH) a uma variedade de substratos hidrofílicos e eletrofílicos, originando conjugados solúveis em água e reduzindo sua toxicidade (Equação 1). As GSTs atuam desempenhando um papel importante como enzimas desintoxicadoras do organismo (Gadagbui e James, 2000; Yu et al., 2007; Li et al.; 2009; Ren et al., 2009; Ezemonye e Tongo, 2010). As GSTs são encontradas em animais vertebrados e invertebrados (insetos), fungos (levedura), organismos unicelulares (bactérias aeróbias) e vegetais (Yu et al., 2007). Esse grupo de enzimas foi dividido em três

superfamílias de acordo com os compartimentos celulares com os quais elas se encontram, são elas: GSTs citosólicas, GSTs microsossomais e GSTs mitocondriais (Li et al.; 2009). Para peixes cada família se divide nas seguintes classes GST-alfa (GSTA), GST-Mu (GSTM), GST-Pi (GSTP) e GST-Teta (GSTT) (Yu, et al., 2008).



Equação 1. Conjugação da GSH com substrato eletrofilicos tóxico (xenobióticos pela ação da glutathione S-transferase (GST)).

Outra enzima comumente empregada como biomarcador é a superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) motivado por se tratar de uma enzima chave no processo de combate aos danos oxidativos. Trata-se de uma enzima presente em diferentes tipos celulares, bem como em diversas organelas celulares como mitocôndria, cloroplastos, plastídios e dispersa no citoplasma. Sua função compreende a catálise de superóxido (${}_{2}\text{O}^{\cdot-}$) em peróxido (H_2O_2) e oxigênio reativo (O_2) (Equação 2) (Kim et al., 2011). Dentro das isoformas a SOD-Mn é a única forma mitocondrial formada a partir de um grupo de aminoácidos precursores formados no citoplasma e posteriormente é conduzido a mitocôndria após a clivagem do peptídeo sinal, SOD-Mn trata-se de uma enzima composta por quatro subunidades de proteína de 22 kDa (Wang et al., 2010).



Equação 2. Desintoxicação do radical superóxido (${}_{2}\text{O}^{\cdot-}$) pela enzima superóxido dismutase (SOD).

A catalase (CAT; EC 1.11.1.6) é considerada uma das principais enzimas que atuam no processo de defesa celular contra os potenciais efeitos danosos causados pelos EROs como, por exemplo, H_2O_2 que é produzido através de reações biológicas, por esse motivo a CAT vem sendo usada como um ótimo biomarcador nos estudos de Ecotoxicologia (Kim et al., 2010). A CAT é uma enzima oxireductase, responsável por converter duas moléculas de

peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e uma molécula de oxigênio por meio de reações catalíticas (Equação 3) (Ichise et al., 2008; Li et al., 2008; Gonçalves-Soares et al., 2012). A CAT trata-se de uma hemoproteína onipresente constituída por quatro subunidades ferrifotoporfirina (Kim et al., 2010; Gonçalves-Soares et al., 2012). Cada um dos quatro monômeros é constituído por um grupo heme juntamente com uma nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) que está ligado ao monômero por resquícios de aminoácidos (Kim et al., 2010). De acordo com a estrutura e as características da enzima, as catalases podem ser classificadas em três grupos: as catalases monofuncionais, as catalase-peroxidases, e as heme não-catalases (Ichise et al., 2008).



Equação 3. Desintoxicação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima catalase (CAT).

Ainda dentro do grupo das enzimas antioxidantes a glutathione peroxidase (GPX; EC 1.11.1.9) constituem uma família de enzimas que catalisam a redução do H_2O_2 em água (H_2O), assim como do hidroperóxidos de lipídeo (LOOH) em álcool (Equação 4 e 5, respectivamente) (Westphal et al., 2009; Bain e Schuller, 2012). Durante anos a família das GPx foram chamadas se seleno-enzimas devido a selenocisteína (Sec) em seu sítio ativo, porém isso foi verdade para as primeiras isoformas de estudadas. Isso aconteceu porque a presença de uma Sec nas isoformas de GPxs mais a presença de GSH no meio promovem rápida catálise dos substratos enzimáticos (Brigelius-Flohé e Maiorino, 2013). No entanto novas isoforma de GPxs não apresentam esse aminoácido. Assim as enzimas da família da GPx foram divididas em glutathione peroxidase dependentes de selênio (Se-GPx) e glutathione peroxidase não dependentes de selênio (não-Se-GPx) (Yeh et al., 2009).



Equação 4. Oxidação da GSH a GSSG, pela ação da GPx, com H_2O_2 como substrato.



Equação 5. Oxidação da GSH a GSSG, pela ação da GPx, utilizando hidroperóxido de lipídeo (LOOH) como substrato formando um álcool não tóxico (LOH).

2.9. *Espécies estudadas*

Centropomus parallelus (robalo peva) (Figura 3) é uma espécie de peixe costeira eurialina, possui uma ampla distribuição geográfica ocorrendo desde a Flórida (EUA) passando pela parte oriental da América Central, incluindo o Caribe, Cuba e Porto Rico, até Santa Catarina (Brasil) (Lemos et al., 2006; Rocha et al., 2007; Santos et al., 2009). Seus hábitos alimentares compreendem pequenos organismos invertebrados e peixes, seu peso médio é de 3 kg (Lemos et al., 2006; Rocha et al., 2007), eles se reproduzem em ambientes estuarinos e dulcícolas, dependendo de sua fase reprodutiva. Seu ciclo de vida pode ocorrer na foz de rios ou oscilar entre ambientes marinhos e estuarinos (Borges et al., 2010). A amplitude termica de sobrevivencia da espécie *C. parallelus* é muito grande variando desde 13 °C, na qual o animal perde o equilíbrio de natação, e vai até 30 °C levando a redução do consumo alimentar, prejudicando sua sobrevivencia (Costa Filho et al., 2013). Por causa de sua alta taxa de sobrevivência, de seu rápido crescimento, sua resistência a procedimentos experimentais (Rocha et al., 2007) e por atender as premícias descritas anteriormente o robalo peva destaca-se como um bioindicador.



Figura 3. Exemplar de *Centropomus parallelus*, robalo peva. Fonte: forumaquario.com.br.

Geophagus brasiliensis (Figura 4) é um ciclídeo popularmente conhecido como acará, sua distribuição geográfica compreende os ecossistemas do sudeste e sul do Brasil e o Uruguai (Hauser-Davis et al., 2010; Perazzo et al., 2013), em meio a essa grande amplitude de ocorrência ambiental variações morfológicas sugerem eventos de especiação devido as particularidades do ambiente (Perazzo et al., 2013). Essa grande plasticidade ambiental permite que eles habitem rios, lagos, lagoas, bacias costeiras, lagoas costeiras e estuários (Perazzo et al., 2013). Somado a essa plasticidade ambiental *G. brasiliensis* apresenta uma grande amplitude de temperatura de sobrevivência compreendida entre 9 e 36 °C (Rantin 1980). Seu hábito alimentar onívoro vem despertando interesse no biomonitoramento ambiental, pois como trata-se de um animal que tem como base nutricional uma grande variedade alimentos, os efeitos da poluição ambiental ficam mais evidentes quando se avalia uma magnificação trófica (Hauser-Davis et al., 2010).



Figura 4. Exemplar de *Geophagus brasiliensis*, acará. Fonte: forumaquario.com.br.

3. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Na área da ecotoxicologia este trabalho tem grande relevância porque quando se realiza pesquisa testando a toxicidade de um único contaminante, no caso PHE, que pertence ao grupo dos HAPs presentes no petróleo, poderá contribuir para que o contaminante em questão se torne uma substância de referência desde que obedeça as seguintes regras como: ter meia vida longa e estável, estar disponível na forma pura, apresentar uma boa curva de concentração-resposta para o organismo e ser estável em solução aquosa, que quando somado a outros resultados, abre um precedente para que o mesmo ocorra com os outros contaminantes do grupo. Associado a essa ideia está o estudo do comportamento da toxicidade do PHE sobre os organismos aquáticos ao aumento da temperatura das águas oceânicas e continentais. Assim, o presente trabalho trata da problemática do aquecimento global, em uma perspectiva do aumento da temperatura das águas, levantando a questão de que este aumento de temperatura promove uma maior toxicidade dos contaminantes. Este fato pode vir a ocorrer por meio de uma reação dos contaminantes a temperaturas mais elevadas e pelo fato de que nestas condições o metabolismo do animal aumenta, promovendo uma maior liberação de EROs que sobrecarregam a atividade das enzimas da fase II, responsáveis pela metabolização destas substâncias geradas tanto pelo contaminante como pelo aceleração do metabolismo.

Em posse dos resultados de toxicidade do contaminante, estes podem ser usados para o estabelecimento de políticas públicas visando manter os níveis do contaminante em um nível que não ofereça riscos a espécie *C. parallelus*, *G. brasiliensis* e a todos os outros organismos que possuem limites de tolerância aos contaminantes iguais ou maiores que o da espécie estudada.

Para que isto seja alcançado este trabalho parte da hipótese de que as atividades das enzimas da fase II tais como GST, SOD, CAT e GPx são alteradas em *C. parallelus* e *G. brasiliensis* expostos ao fenantreno em diferentes temperaturas, assim como haverá danos genotóxicos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos causados pela toxicidade do fenantreno associado a diferentes temperaturas no DNA (ensaio cometa e teste do micronúcleo) e nas enzimas da fase II de biotransformação em duas espécies de peixes tropicais, *Centropomus parallelus* e *Geophagus brasiliensis*.

4.2. Objetivo específico

Avaliar os danos no DNA, como ensaio cometa e teste do micronúcleo, em exemplares de robalo e acará, expostos ao fenantreno nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28°C, por 96 h.

Avaliar as respostas das enzimas da fase II de biotransformação, por meio da atividade das enzimas glutathione S-transferase, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase em exemplares de robalo e acará, expostos ao fenantreno nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28°C, por 96 h.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Aquisição e aclimação dos peixes

Os exemplares de robalo (*C. parallelus* - $13,00 \pm 0,60$ cm e $35,90 \pm 4,30$ g) foram obtidos em um criador particular no município de São Mateus, ES. Os mesmos foram levados ao Laboratório de Ictiologia Aplicada (LAB PEIXE), no Complexo Biopráticas, da Universidade Vila Velha (UVV), ES, onde foram aclimatados durante 30 dias, na salinidade 15, com fotoperíodo controlado (12 h claro e 12 h escuro). Os animais foram mantidos em aquários de polietileno de 500 L, dotados de aeração constante. Durante o período de aclimação os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial contendo 52 % de proteína bruta (NRC 1.2 da empresa INVE). A água do tanque de aclimação foi sifonada diariamente para evitar o acúmulo de ração e fezes, mantendo uma boa qualidade de água. Uma vez por semana foi realizada troca parcial de 70 % do volume de água. Os parâmetros físicos de salinidade ($14,98 \pm 0,13$), condutividade ($24,79 \pm 0,38$ mS), oxigênio dissolvido ($6,10 \pm 0,25$ mg O₂ L⁻¹), pH ($7,15 \pm 0,07$), temperatura ($25,25 \pm 0,47$ °C) e salinidade ($15 \pm 0,3$) foram monitorados com um Multiparâmetro YSI e os parâmetros químicos de amônia ($0,26 \pm 0,17$ mg L⁻¹) e nitrito ($0,04 \pm 0,02$ mg L⁻¹) também foram avaliados como descritos em APHA (1998). Essas análises físico-químicas foram realizadas três vezes por semana, sendo uma imediatamente após a troca da água, uma no terceiro dia após a troca da água e uma no dia da troca da água.

Os acarás (*G. brasiliensis* - $7,10 \pm 0,60$ cm e $11,30 \pm 2,80$ g) foram obtidos do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), no município de Alegre, ES, e transferidos ao LAB PEIXE, onde o procedimento de aclimação realizado foi similar ao da outra espécie, a exceção da condição da salinidade da água que para *G. brasiliensis* foi utilizada água doce. Os parâmetros físicos de condutividade ($148,85 \pm 15,19$ µS), oxigênio dissolvido ($5,68 \pm 0,26$ mg O₂ L⁻¹), pH ($5,86 \pm 0,36$), temperatura ($28,59 \pm 0,31$ °C) e salinidade ($0 \pm 0,1$) foram monitorados com um Multiparâmetro YSI e os parâmetros químicos de amônia ($1,17 \pm 0,54$ mg L⁻¹), nitrito ($0,04 \pm 0,02$ mg L⁻¹), alcalinidade ($9,00 \pm 4,02$ mg L⁻¹)

¹⁾ e dureza ($73,00 \pm 9,38 \text{ mg L}^{-1}$) também foram avaliados como descritos em APHA (1998), essas análises físico-químicas foram realizadas três vezes por semana sendo uma imediatamente após a troca da água, uma no terceiro dia após a troca da água e uma no dia da troca da água.

5.2. Desenho experimental

Desenho experimental I

Após período de aclimação (30 dias), quatro grupos de 12 exemplares de *C. parallelus* foram transferidos para aquários de 60 L de água na salinidade 15, dotados de aeração constante e temperatura mantida por um aquecedor acoplado a um controlador de temperatura digital. Cada grupo foi aclimatizado a uma das temperaturas experimentais de 22, 24, 26 ou 28 °C, por um período de 14 dias, mantendo sempre o mesmo padrão de manejo do período de aclimação de 30 dias.

Após período de aclimatização, os peixes foram transferidos para aquários testes individuais contendo 10 L de água salobra, na mesma temperatura a que foram aclimatizados e nas demais condições físico-químicas. Nestes aquários testes foi adicionada à água, de cada um, PHE na concentração de $0,1 \text{ mg. L}^{-1}$ (diluído em 1 mL de etanol que corresponde a 0,01 % do volume total do aquário), onde os animais foram mantidos por um período de exposição de 96 h. Esta quantidade de contaminante foi adicionada após 24 h da transferência dos animais para os aquários testes. A concentração de PHE foi escolhida com base no estudo de Ying et al. (2007) com a espécie *Carassius auratus*, bem como por meio de um estudo piloto realizado no LAB-PEIXE, para as espécies estudadas no presente trabalho. O número amostral de animais, para cada temperatura experimental, expostos ao contaminante foi igual a seis. Houve um jejum de 24 h antes da transferência dos peixes, retornando a alimentação 24 h após a adição do contaminante. Concomitante à realização desse experimento, houve um grupo controle para cada temperatura experimental, nos quais os animais ($n = 6$) foram expostos às mesmas

condições experimentais com PHE, porém foram mantidos em água sem presença do contaminante.

A fim de garantir a qualidade da água houve troca parcial de água (50 %) a cada 24 h, sendo reposta o mesmo volume de água com proporcional quantidade do contaminante. Os animais foram alimentados uma vez ao dia durante o experimento, tendo início 24 h após a adição do PHE.

Amostras de água de três aquários foram coletadas no início e no fim dos experimentos para quantificação, em laboratório especializado, da dose de PHE diluída na água. Toda a água contaminada por PHE usada no trabalho foi recolhida e acondicionada em recipientes vedados que posteriormente foram recolhidos por uma empresa especializada no tratamento de resíduos tóxicos. Isso foi feito com a finalidade de que nosso trabalho não sirva também como fonte de deterioração do meio ambiente.

Desenho experimental II

O mesmo procedimento que foi realizado no desenho experimental I também foi adotado para esse experimento com a diferença de que foi usado *G. brasilienses* como espécie experimental e a água que era continental (doce).

5.3. Coleta de tecido e órgão

Ao final de todos os experimentos, os peixes foram anestesiados com solução de Benzocaina ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$) e o sangue coletado por punção da veia caudal, para realização do ensaio cometa e do teste do micronúcleo. Após coleta do sangue, os animais foram eutanasiados por secção cervical (Nickum et al., 2004) e em seguida foi extraído o fígado, que foi acondicionado em microtubos e estocados a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, para as análises de enzimas da fase II.

Todo o procedimento adotado no decorrer do trabalho envolvendo o período de aclimação, a fase experimental bem como a coleta de tecido e órgão foram realizados em conformidade com as normas estabelecidas no parecer técnico descrito no protocolo nº 300-2013 concedido pela comissão de ética no uso de animais (CEUA/UVV).

5.4. Análises genotóxicas

Ensaio cometa

A análise de fragmentos de DNA foi realizada por meio do ensaio cometa alcalino (EC) e coloração com nitrato de prata, metodologia de Silva et al. (2000) e Tice et al. (2000).

O método consiste na detecção de fragmentos de DNA em microgel de agarose. Para isso lâminas de microscopia, duas para cada exemplar, foram previamente cobertas com agarose 1,5 % mais PBS (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ / pH 7) As amostras de sangue foram diluídas 20 vezes em RPMI com pH 7,1 ajustado com tampão fosfato e posteriormente, 10 µL do sangue diluído foram misturados com 100 µL de agarose lowmelting mais PBS a 37 °C. Em seguida as lâminas com pré-cobertura de gel foram recobertas com lamínula para que se espalhasse uniformemente até solidificar. Após a retirada das lamínulas, os slides foram colocados na solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 10 mM, TRIS 10 mM) / pH 10 e no momento do uso foram adicionados de triton X-100 e DMSO por no mínimo 1 h, em geladeira e protegidos da luz. Depois da lise as lâminas foram colocadas em cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM) / pH >13 por 20 min. Em seguida foi realizada a corrida eletroforética em 25 V e 300 mA por 15 min. Depois desta etapa as lâminas foram neutralizadas com tampão de neutralização (NH₂ C(CH₂OH)₃) / PH 7,5 durante 5 min por três vezes e então foram lavadas duas vezes com água destilada.

As lâminas foram secas por no mínimo 2 h a 37 °C. Após esse período as lâminas foram fixadas em solução fixadora (ácido tricloroacético, sulfato de zinco e glicerol) por 10 min. Novamente, as lâminas foram lavadas por três vezes e secas por 2 h a 37 °C. Depois de secas, as lâminas foram hidratadas por 5 min e coradas com solução de coloração (carbonato de sódio, nitrato de amônia, nitrato de prata, ácido tungstosilicico, formaldeído) com prata

por 15 min a 37 °C ou até a solução começar a escurecer. Depois de coradas as lâminas foram lavadas por três vezes e então submersas por 5 min em solução stop (ácido acético). Passados 5 min de reação foram novamente lavadas por três vezes e secas em temperatura ambiente.

A observação dos danos no DNA foi feita com auxílio de microscópio óptico da marca Leica Galen III com aumento de 40 X. Foram contadas 100 células de cada lâmina e os danos foram classificados conforme forma e tamanho da cauda de 0 (não danificado) a 4 (dano máximo). O tamanho da cauda foi proporcional ao nível de fragmentos de DNA.

Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e distribuição das classes. O Índice de Danos (ID) foi calculado pela multiplicação do número de nucleóides encontrados por classe pelo número da classe.

Teste do micronúcleo

Para o teste do micronúcleo (MN) foram coletados 20 µL de sangue e gotejado sobre uma lâmina para ser feito o esfregaço e esperado o período de “overnight” para secagem do material. A lâmina foi então submetida a um banho de 15 min em álcool metílico P. A. (metanol 100 %) para fixação do material. Em seguida foi feita uma lavagem com água destilada. Logo após a lâmina foi corada com solução de giemsa 5 % por 40 min; lavadas posteriormente com água destilada e seca em temperatura ambiente. Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico, e 1000 células sanguíneas (eritrócitos) foram contadas para a quantificação dos micronúcleos presentes. Foram contadas duas lâminas para cada peixe (Grisolia et al., 2005).

5.5. Enzimas da fase II de conjugação

Atividades enzimáticas

O tecido hepático dos animais, congelados em freezer - 80 °C, foram descongelados e homogeneizados com tampão de homogeneização (TRIS 20 mM, EDTA 1 mM, sacarose 0,5 mM, KCl 0,15 mM, PMSF 0,1 mM e DTT 1 mM) / pH 7,0, posteriormente foram centrifugados (17.949 g – marca Eppendorf) por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado nas análises enzimáticas de glutathione S-transferase, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

A atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18) foi determinada utilizando o método descrito por Habig et al. (1974) e por Habig e Jakoby (1981). O tampão utilizado foi o de fosfato (fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico) / pH 7,0, com glutathione (GSH) 1mM e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 1mM 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 Devices) a cada 10 seg. durante um min. A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDNB. O valor da atividade enzimática foi expresso em $\mu\text{mol CDNB. min.}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) foi determinada utilizando o método descrito por Flohé e Ötting (1984), a qual utiliza solução de Xantina 1 mM, solução de Xantina oxidase 0,2 U m L⁻¹ e mistura reativa. A atividade cinética da SOD foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 550 nm, em um leitor de placa (Molecular Devices plus) a cada 10 seg. durante um min. A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de redução do citocromo C. Por fim a atividade da enzima foi expressa em U SOD. min.⁻¹ . mg proteína⁻¹.

A atividade enzimática da catalase (CAT; EC 1.11.1.6) foi determinada utilizando o método descrito por Aebi (1984), a qual utiliza o tampão TE (TRIS, EDTA) e tampão de leitura (tampão TE e peróxido de hidrogênio) / pH 8,0. A atividade cinética da CAT foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 240 nm, em um espectrofotômetro BioSpectro a cada 15 seg. durante um min. A atividade da enzima foi estimada

por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

A atividade enzimática da glutathione Peroxidase (GPX; EC 1.11.1.9) foi determinada utilizando método descrito por Hopkins e Tudhope (1973), a qual utiliza meio de reação (NADPH, azida sódica 5 mM, GSH, tampão fosfato de sódio 0,1 M) / pH 7,0 juntamente glutathione redutase e peróxido de hidrogênio 20 mM. A atividade cinética da GPx foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 340 nm, em um leitor de placa (Molecular Devices plus) a cada 10 seg. durante um min. A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de redução do NADPH, sendo expressa em $\mu\text{mol NADPH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

5.6. Determinação do valor de proteína total do tecido hepático (Método de Bradford)

O tecido hepático dos peixes foi descongelado, homogeneizados com com tampão de homogeneização (TRIS 20 mM, EDTA 1 mM, sacarose 0,5 mM, KCl 0,15 mM, PMSF 0,1 mM e DTT 1 mM) / pH 7,0, posteriormente foram centrifugados (17.949 g – marca Eppendorf) por 30 min a 4 °C, obtendo o sobrenadante utilizado para a determinação de Proteína Total.

O valor de proteína total foi determinado utilizando o método descrito por Bradford (1976) e adaptado para leitora de placas segundo Kruger (1994), utilizando Coomassie brilliant blue G-250 e albumina bovina como padrão. A proteína total foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 595 nm, em um leitor de placa (Molecular Devices). Os valores de proteína total foram utilizados para expressar a atividade das enzimas utilizadas nesse trabalho.

5.7. Estatística

Os resultados dos ensaios genotóxicos e enzimáticos foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para que fosse avaliada sua

normalidade. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram normalizados usando a fórmula $(1+\text{Log})$. Em seguida, foi realizada uma ANOVA de dois fatores para que fosse verificado se a interação da temperatura com os tratamentos influencia os resultados obtidos e um teste de Tukey ($p < 0,05$) como um Post Hoc, com auxílio do software Statistica.

6. RESULTADOS

6.1. Ensaio cometa

Os danos no DNA expressos em índice de danos foram analisados por meio de uma Post Hoc (Tukey) que permitiu a comparação entre o grupo controle e grupo exposto ao PHE nas diferentes temperaturas. No resultado obtido para a espécie *C. parallelus* foi possível observar uma diferença significativa entre o grupo controle e o exposto ao PHE apenas na temperatura de 26 °C (Figura 5). Para a espécie *G. brasiliensis* resultados como esses foram observados apenas na menor temperatura, a de 22 °C (Figura 6).

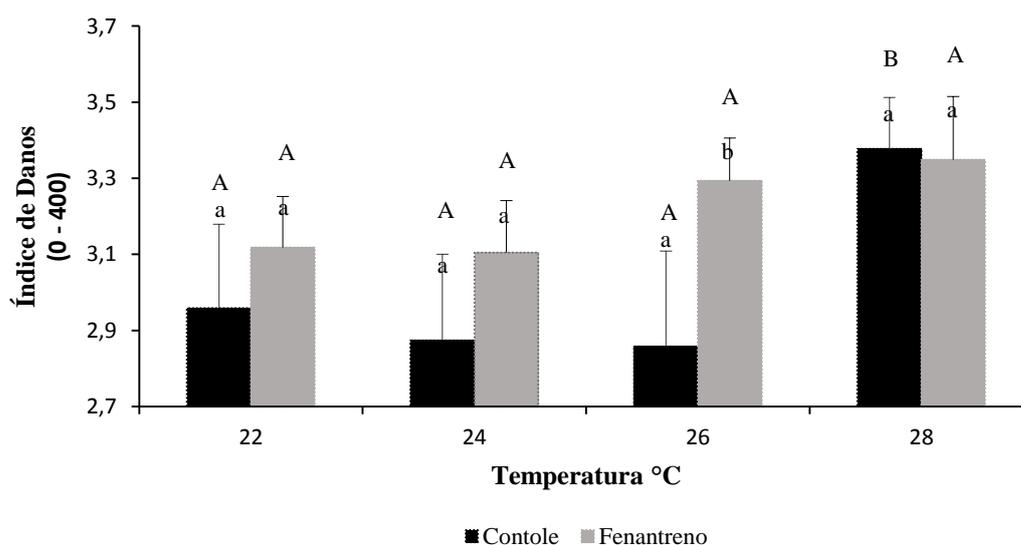


Figura 5. Índice de danos no DNA em *Centropomus parallelus* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

O teste de Tukey permitiu comparar um mesmo grupo controle ou exposto ao PHE entre as diferentes temperaturas, assim foi possível observar que para *C. parallelus*, os peixes do grupo controle na temperatura de 28 °C

foram os únicos que apresentaram valores de ID elevados em relação aos das demais temperaturas, no entanto o resultado do grupo dos robalos expostos ao PHE na temperatura de 28 °C não foram observadas variações significativas (Figura 5). Para a espécie *G. brasiliensis* foi possível verificar valores de ID significativamente maiores nos animais controle expostos às temperaturas de 24, 26 e 28 °C em relação ao grupo exposto à 22 °C (Figura 6). Enquanto que no grupo exposto ao PHE valores mais elevados foram observados apenas na maior temperatura de aclimatização experimental (28 °C) em relação à temperatura de 26 °C (Figura 6).

Ao analisar os dados por meio de uma ANOVA de dois fatores foi possível notar que os efeitos da temperatura sobre o ID de ambas as espécies estudadas, visto que há um aumento de danos no grupo controle.

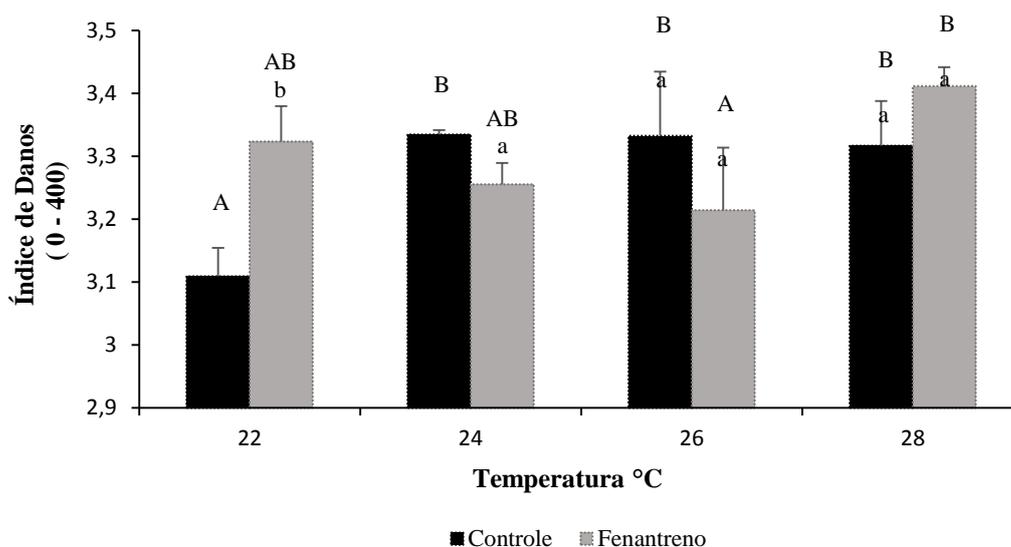


Figura 6. Índice de danos no DNA em *Geophagus brasiliensis* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, p < 0,05. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, p < 0,05. Os valores de média e desvio padrão das barras (n = 6) foram expressos em função de 1 + Log.

6.2. Teste do micronúcleo

Para o teste do micronúcleo, a Figura 7 mostra que em temperaturas mais elevadas há um aumento significativo na frequência de MN em *C. parallelus* expostos ao PHE, onde foi possível verificar um aumento de aproximadamente duas vezes na temperatura de 28 °C em relação a 22 °C. Para a espécie *G. brasiliensis* observou-se aumento da frequência de micronúcleos apenas no grupo exposto ao PHE quando aclimatizado a 26 °C em relação aos das demais temperaturas, como mostra a Figura 8. O efeito da temperatura não foi observado nos grupos controles das duas espécies.

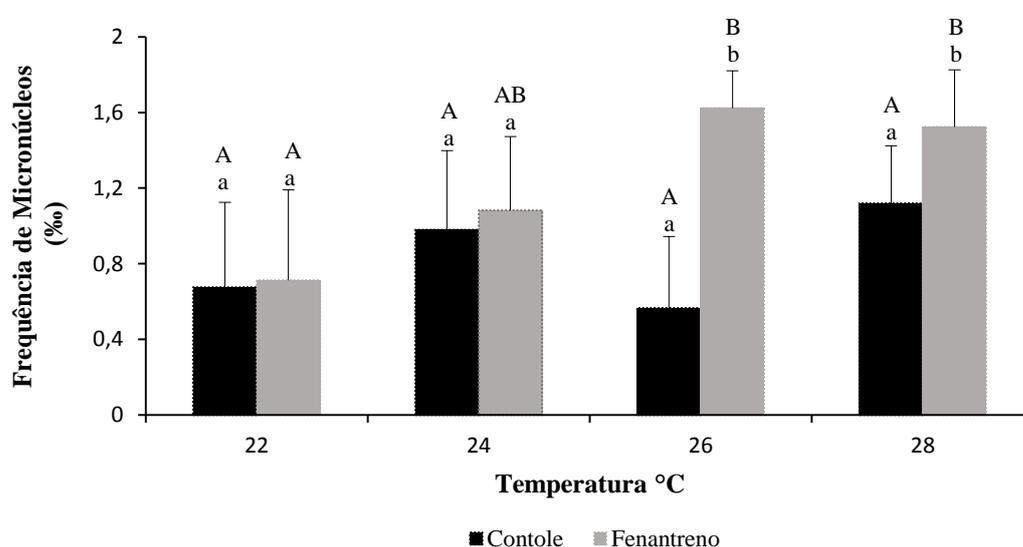


Figura 7. Frequência de micronúcleos em eritrócitos de *Centropomus parallelus* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

Ao analisar os grupos experimentais em cada temperatura foi possível verificar que houve diferenças significativas entre o controle e o grupo exposto ao PHE nas duas temperaturas mais altas para os indivíduos da espécie *C. parallelus* (Figura 7). Nos exemplares de *G. brasiliensis* não foi

possível observar diferenças significativas nos grupos expostos ao PHE quando comparados com seus respectivos grupos controle (Figura 8). Quando se analisou os grupos experimentais entre as diferentes temperaturas a única diferença significativa perceptível foi no grupo exposto ao PHE da temperatura de 26 °C que difere de todos os outros grupos de exposição ao PHE (Figura 8).

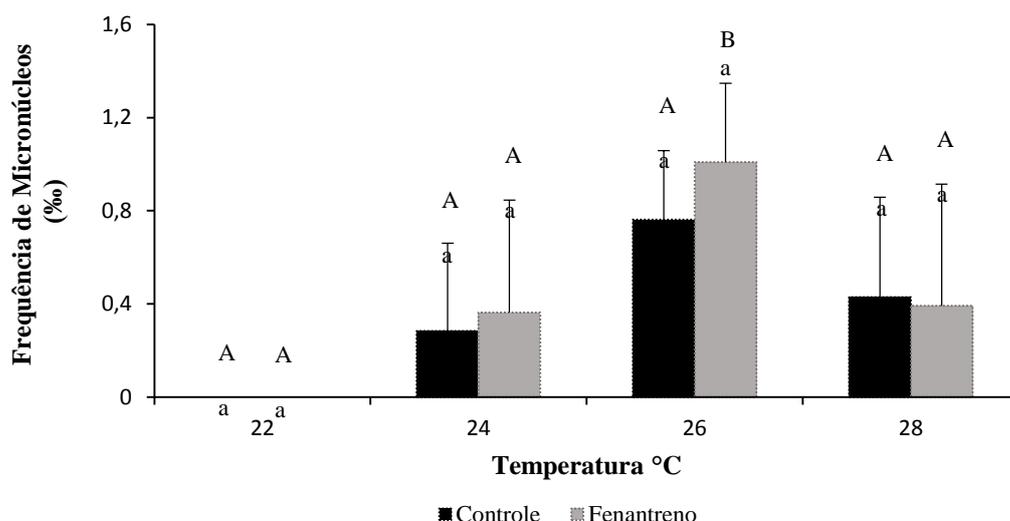


Figura 8. Frequência de micronúcleos em eritrócitos de *Geophagus brasiliensis* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, p < 0,05. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, p < 0,05. Os valores de média e desvio padrão das barras (n = 6) foram expressos em função de 1 + Log.

6.3. Glutathione S-transferase

Os efeitos da exposição ao PHE foram igualmente observados na atividade da GST em *C. parallelus*. Os grupos controle e exposto ao PHE diferiram nas temperaturas de 22 e 26 °C, sendo que em 22 °C ocorreu uma ativação da atividade nos peixes expostos ao PHE e em 26 °C uma inibição (Figura 9). Ao mesmo tempo foi analisada a relação da atividade enzimática entre o grupo controle das diferentes temperaturas e os resultados mostraram que há um aumento gradativo até 26 °C, sendo esta temperatura diferente

significativamente do controle a 22°C, no entanto a atividade da enzima diminuiu a 28 °C. Quando foi avaliada a exposição do robalo ao PHE nas diferentes temperaturas, diferenças foram observadas, em 26 °C na qual ocorreu uma inibição da GST em relação apenas ao grupo a 22 °C, não diferindo dos grupos experimentais a 24 e 28 °C (Figura 9).

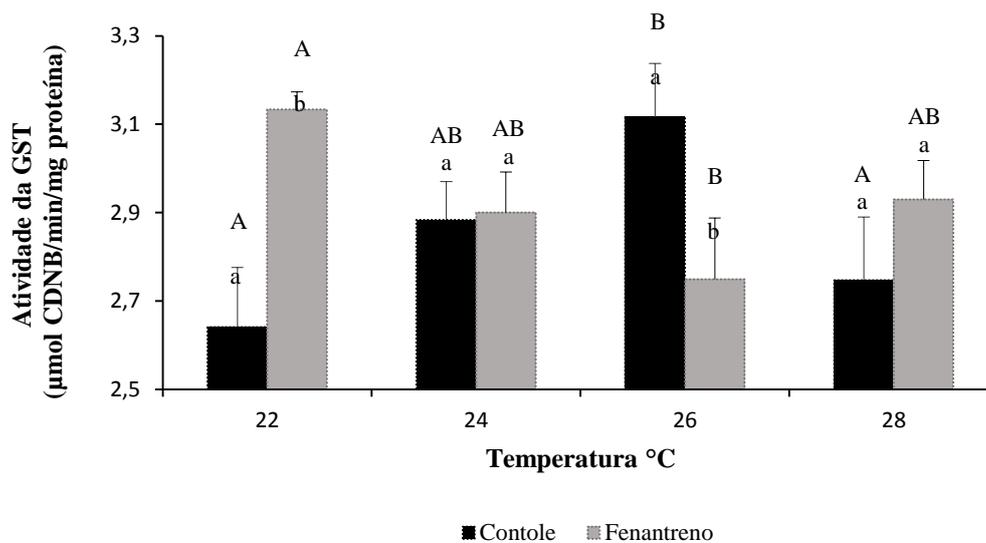


Figura 9. Atividade da glutathione S-transferase (GST) hepática em *Centropomus parallelus* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

Ao analisar os dados de atividade enzimática da GST para *G. brasiliensis* não foi observada uma interação significativa entre temperatura e os grupos experimentais, assim como não foi constatado diferenças entre os grupos experimentais dentro da mesma temperatura (Figura 10).

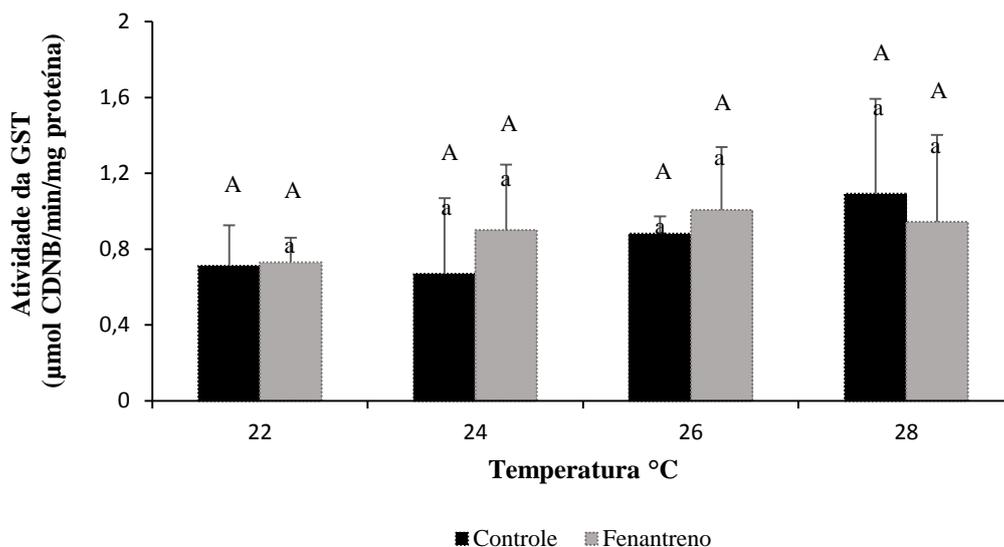


Figura 10. Atividade da glutathione S-transferase (GST) hepática em *Geophagus brasiliensis* expostos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

6.4. Superóxido dismutase

Os valores obtidos na análise enzimática da SOD dos exemplares de *C. parallelus* não foi possível verificar alterações nos padrões enzimáticos na comparação entre os grupos controle e exposto ao PHE em cada uma das temperaturas de aclimatização, ao mesmo tempo em que não foram encontradas diferenças estatísticas em cada grupo controle ou exposto ao PHE nas diferentes temperaturas (Figura 11).

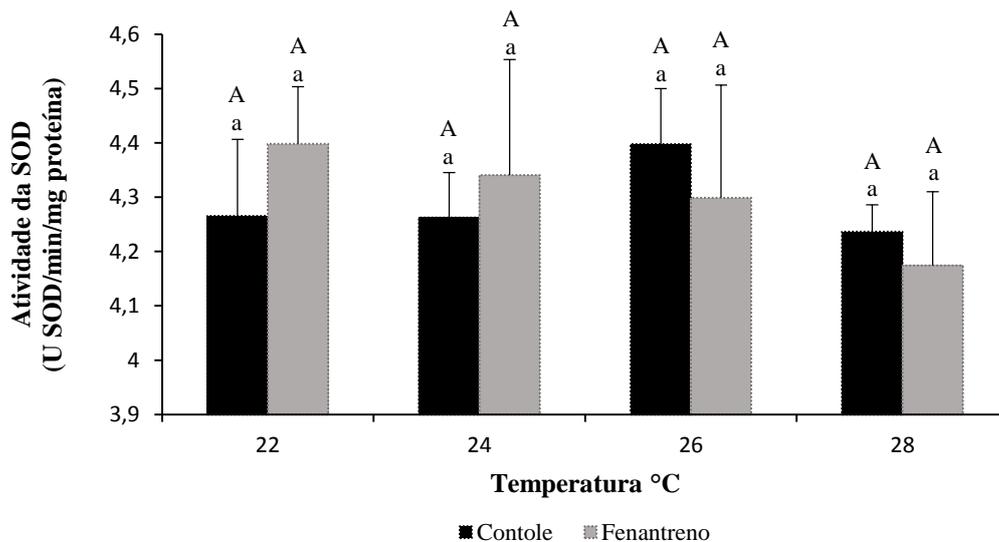


Figura 11. Atividade da superóxido dismutase (SOD) hepática em *Centropomus parallelus* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

Quando a resposta enzimática foi analisada para a espécie *G. brasiliensis* os resultados estatísticos apontam para uma interação significativa da temperatura com o grupo controle (Figura 12). Uma comparação entre os tratamentos na mesma temperatura mostra que a atividade da enzima no grupo controle difere significativamente do grupo exposto ao PHE nas temperaturas de 22, 24 e 26 °C.

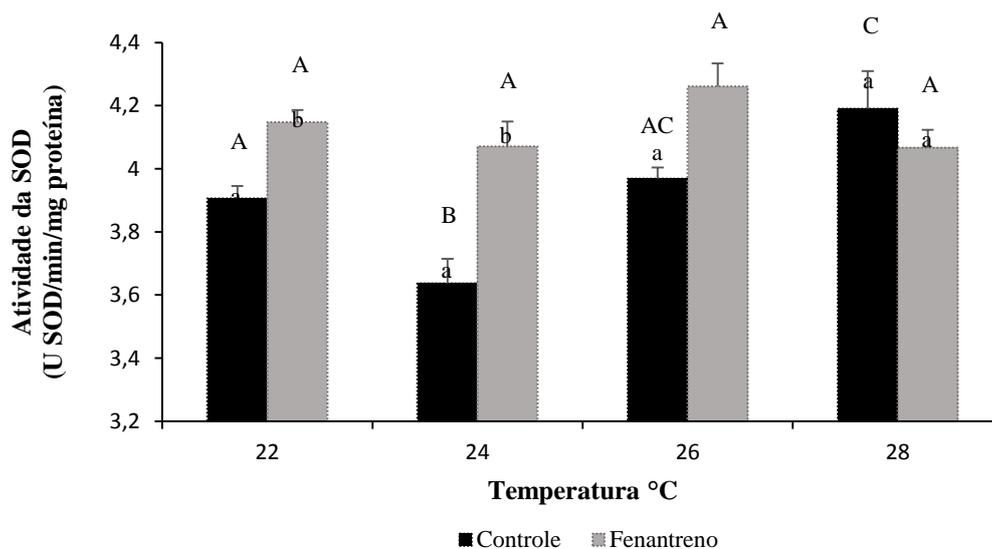


Figura 12. Atividade da superóxido dismutase (SOD) hepática em *Geophagus brasiliensis* expostos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

6.5. Catalase

Ao analisar a atividade da CAT para *C. parallelus* (Figura 13) e *G. brasiliensis* (Figura 14) não foi possível observar diferenças significativas entre o grupo exposto ao PHE e o grupo controle para cada uma das temperaturas, assim como não houve alterações entre cada um dos tratamentos nas diferentes temperaturas.

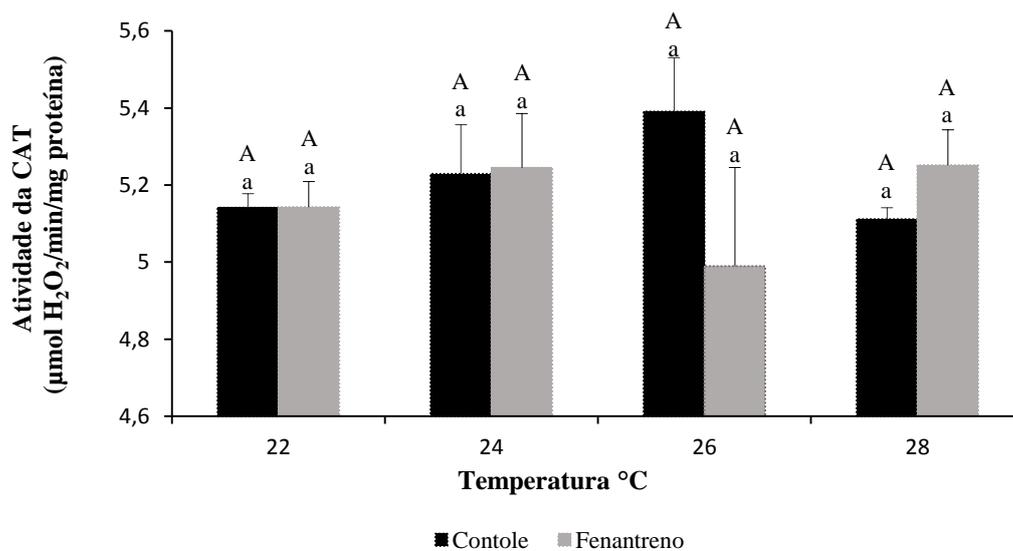


Figura 13. Atividade da catalase (CAT) hepática em *Centropomus parallelus* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, p < 0,05. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, p < 0,05. Os valores de média e desvio padrão das barras (n = 6) foram expressos em função de 1 + Log.

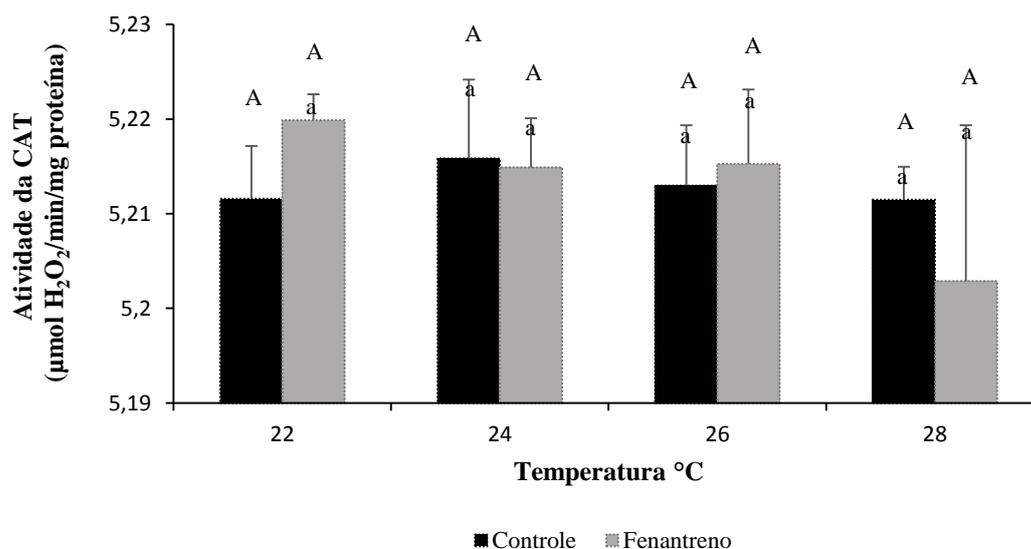


Figura 14. Atividade da catalase (CAT) hepática em *Geophagus brasiliensis* expostos a 0,1 mg L⁻¹ de fenantreno, por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

6.6. Glutathione peroxidase

A análise estatística dos valores da GPx, conforme indica a Figura 15, mostra que em *C. parallelus* não houveram diferenças significativas quando se compara o efeito da temperatura sobre os resultados dos dois grupos (controle e PHE). Inclusive na avaliação dos resultados dos peixes expostos ao PHE em relação ao grupo controle em cada temperatura. Os mesmos resultados estatísticos foram encontrados para a espécie *G. brasiliensis* como pode ser observado na Figura 16.

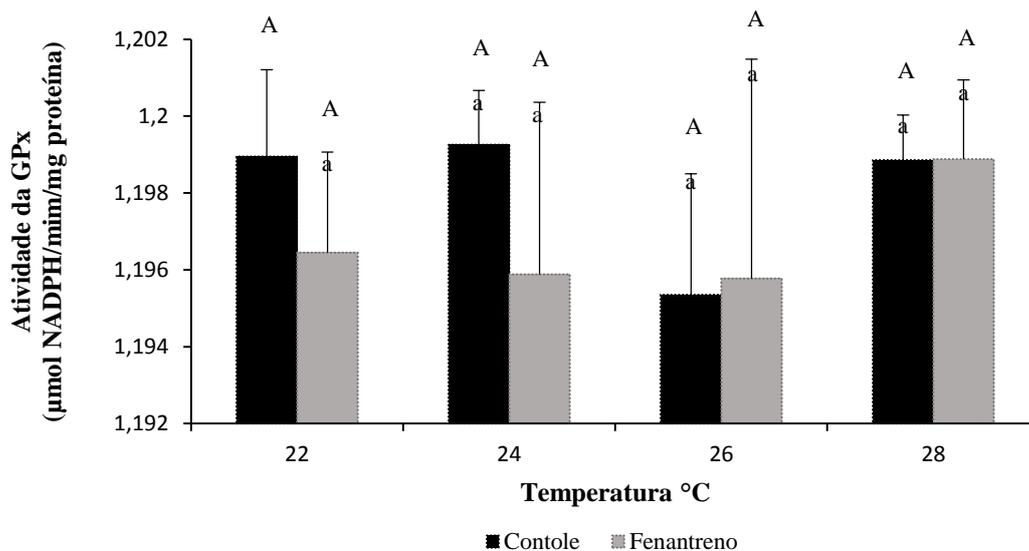


Figura 15. Atividade da glutathione peroxidase (GPx) hepática de *Centropomus parallelus* expostos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de fenantreno por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

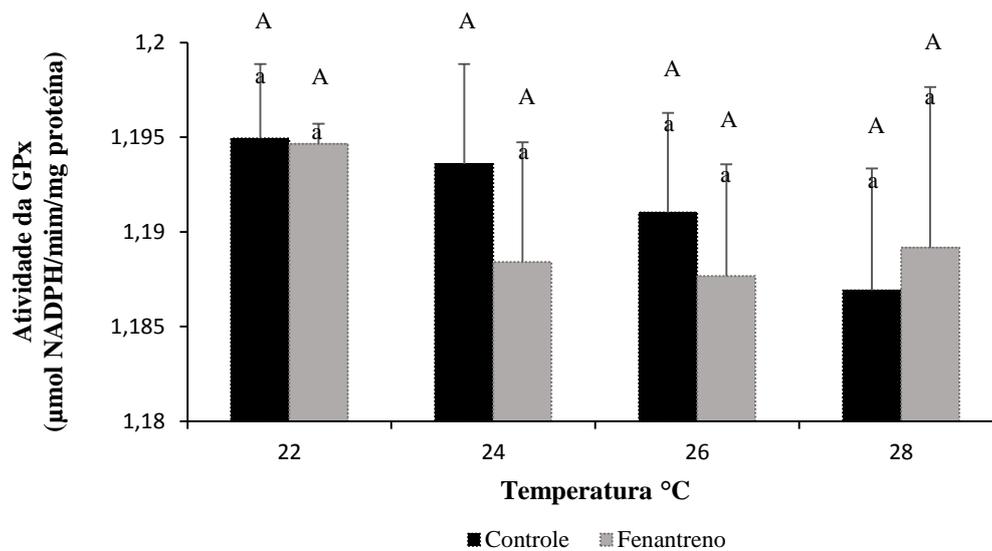


Figura 16. Atividade da glutathione peroxidase (GPx) hepática de *Geophagus brasiliensis* expostos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de fenantreno por 96 h nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C, acompanhados de seus grupos controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos da mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores de média e desvio padrão das barras ($n = 6$) foram expressos em função de $1 + \text{Log}$.

7. DISCUSSÃO

O ensaio cometa tem sido muito usado como biomarcador devido a sua simplicidade de execução, sua alta sensibilidade a agentes genotóxicos e principalmente por não exigir um conhecimento prévio do cariótipo da espécie estudada, além de poder ser usado em qualquer tipo de célula nucleada (Sukumaran e Grant 2013). Essas facilidades de se realizar o ensaio cometa, proporcionou que ele fosse usado em um grande número de espécies distribuídas em uma grande diversidade filogenética, observando assim a sensibilidade das mesmas aos agentes genotóxicos (Lacaze et al., 2010).

O PHE, assim como os demais compostos do petróleo, é conhecido por causar danos genotóxicos nas células animais. Estes danos foram mais uma vez confirmados no presente trabalho para as duas espécies avaliadas, visto que houve aumento no ID nos animais expostos ao PHE, mostrando que o tempo de 96 h de exposição e a concentração do contaminante testada são suficientes para promover danos expressivos ao DNA, somado a isso fica comprovado estatisticamente a interação da temperatura com os tratamentos no ID.

Delunardo et al. (2013) propõem em seu trabalho que o aumento expressivo nos danos ao DNA de *Hippocampus reidi* expostos ao petróleo ocorrem devido a uma falha no processo de defesa antioxidante, responsável por eliminar as EROs, radicais altamente nocivos ao DNA e que são produzidos na fase I de biotransformação dos componentes do petróleo. Assim, o acúmulo ou com a superprodução de EROs são gerados os danos ao DNA. Os resultados obtidos nesse trabalho são corroborados por Sforzini et al. (2012) que expuseram *Eisenia andrei* ao benzeno[a]pireno por 10 e 28 dias. Para explicar seus resultados os autores propuseram que os metabólitos reativos da catálise do benzeno[a]pireno são capazes de promover quebras simples na dupla fita de DNA e em ligações de bases instáveis. Porém no presente trabalho foi observada uma ativação da defesa antioxidante que não deve ter sido eficiente o suficiente para evitar os danos no DNA.

Anormalidades nucleares eritrocitárias (ANEs) também têm sido usadas por muitos pesquisadores como um marcador de toxicidade genética. Dentro do grupo formado pelas ANEs, o micronúcleo, é compreendido por fragmentos de cromossomos ou por cromossomos inteiros que durante a divisão celular não migraram para os polos celulares desencadeados pela falta de um centrômero ou por falha na citocinese (Fasulo et al., 2010).

A indução na formação de micronúcleos nos exemplares de robalo expostos ao PHE corrobora com os resultados obtidos por Negreiros et al. (2011). Esses autores observaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos em células eritrocitárias de *H. reidi* expostos ao petróleo bruto. Segundo esses autores, resultados como esses apontam para o teste do micronúcleo como um bom biomarcador de genotoxicidade causada pelo petróleo. Delunardo et al. (2013) testando a exposição de *H. reidi* ao petróleo, sugerem que o tempo de exposição entre 48 a 168 h é adequado para a observação do aumento na frequência de MN, uma vez que os danos promovidos pelo contaminante não tenham sido ainda reparados nesse período de tempo, que foi anterior ao início da mitose, quando a divisão celular aconteceu as células filhas herdaram os danos. Essa hipótese pode ser levada em conta para o presente trabalho com a espécie *C. parallelus*. Machado et al. (2014) expuseram *Poecilia vivípara* ao PHE, por 96 h, a concentrações de 10, 20 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, nas quais observaram diferenças significativas com relação ao aumento da frequência de MN. Os autores afirmam que o aparecimento de micronúcleos ocorre em baixas concentrações do contaminante ou em ocasiões de estresse. Isso acontece porque segundo eles uma alta concentração de contaminante pode mascarar os resultados do teste uma vez que nessa situação ocorre uma redução do número de células na corrente sanguínea.

O PHE com sua comprovada função genotóxica atua nos cromossomos em divisão formando os MN, essa situação pode ter sido potencializada com a elevação da temperatura, visto que houve um aumento de duas vezes na frequência de micronúcleos nos robalos expostos ao PHE a 28 °C em relação aos aclimatizados a 22 °C. Isso se deve ao fato de o aumento da temperatura, provavelmente, promover um desgaste na eficiência das

funções celulares forçando uma renovação celular. Essa ideia é sustentada por Hayashi et al. (1998) que afirma em seu trabalho que a atividade metabólica em peixes está intimamente relacionada com a variação da temperatura, portanto se a temperatura oscila o metabolismo também muda, assim afetando o processo de divisão celular. Contrariando os resultados obtidos para robalo e a maior parte da literatura a frequência de MN em *G. brasiliensis* não sofreu alterações pela exposição ao PHE comparados aos grupos controles, ocasionado por uma possível ausência de renovação celular. Para o surgimento do MN é necessário que ocorra a divisão celular o fato do não aparecimento de MN na maioria dos exemplares de acará pode ser explicado por uma ausência do processo de mitose nesses indivíduos durante o período do experimento.

A glutathione S-transferase é uma enzima que em meio às suas muitas funções celulares uma delas é a eliminação de compostos citotóxicos do meio celular, não se limitando apenas a metabólitos endógenos tóxicos mas também a substâncias exógenas. Essa ação de desintoxicação ocorre produzindo, através da conjugação catalítica, moléculas ligadas à glutathione ou ao ácido glucurônico (Fasulo et al., 2010).

A atividade da GST em *C. parallelus* apresentou diferenças significativas quando avaliada a interação do aumento da temperatura na atividade enzimática dos grupos controle e expostos ao PHE. Sem a presença do contaminante houve uma ativação da atividade da enzima, observada nos peixes aclimatizados à 26 °C. Isso acontece por meio de uma condução da atividade metabólica gerando um maior consumo de oxigênio ativando com isso as enzimas do estresse oxidativo (Lushchak e Bagnyukova, 2006). No entanto, uma resposta inversa, inativação, foi observada em presença do PHE nos peixes expostos a essa temperatura em relação ao grupo à 22 °C.

O PHE trata-se de uma molécula apolar, portanto hidrofóbica. Assim esperava-se que a atividade da GST aumentasse como o ocorrido na temperatura de 22 °C, porém por um efeito da temperatura, seja volatilizando a molécula ou quebrando a molécula, isso não foi observado nos peixes expostos às temperaturas de 24 e 28 °C. O que se observou foi justamente uma

resposta contrária, uma inibição da GST no grupo exposto ao PHE em 26 °C. Maria et al. (2004), em seu experimento com *Anguilla anguilla* expostos por 8 e 48 h em água de porto não observaram alteração na atividade da GST em nenhuma das horas, o que segundo eles sugere uma falha no processo de conjugação da fase II. Corroborando com os resultados do presente estudo para essas duas temperaturas, e principalmente com a espécie *G. brasiliensis*. O trabalho de Mu et al. (2014) compartilham com a ideia levantada neste trabalho sobre a pouca expressividade do fenantreno sobre a atividade da GST. Eles avaliaram a atividade da EROD e da GST e para ambas não obtiveram diferenças significativas, segundo esses autores o PHE tem fraca indução da CPY1A e uma fraca ligação com o Receptor aril de hidrocarbonetos. Porém é importante ressaltar que segundo esses autores a indução é fraca, mas não é inexistente, caso contrário no presente trabalho não seria observada a ativação e inibição da enzima nas temperaturas de 22 e 26 °C, respectivamente, para o robalo.

Outra possibilidade para explicar a inexistência de atividade foi levantada por Lüchmann et al. (2014) que expôs *Crassostrea brasiliana* ao PHE, por 24 h na temperatura de 21 °C a qual foram aclimatados, em uma concentração de 100 e 1000 µg L⁻¹ onde observou a ocorrência de uma grande expressão do gene que codifica a GST, porém ao medir a atividade enzimática se deparou com níveis semelhantes aos basais. Segundo os autores as GSTs são enzimas altamente eficazes em conjugar HPA levando a depreciação do conteúdo de GSH celular, assim sem o substrato específico tem muita enzima, demonstrando uma real necessidade de desintoxicação, e pouca atividade. Essa possibilidade está intimamente relacionada com uma das estipuladas no presente trabalho, a relação de tempo, que pode explicar o fato de que não houve alteração na atividade da GST em todas as temperaturas experimentais da espécie *G. brasiliensis*. Ainda na mesma linha de raciocínio de que GSTs são eficientes na conjugação de PHE, Yin et al. (2007) em seu trabalho com *C. auratus* aclimatados a uma temperatura de 22 °C e expostos ao PHE, por 96 h, a diferentes concentrações observaram um aumento na atividade da GST, nas concentrações de 0,07 e 0,1 mg L⁻¹ de PHE que segundo eles ocorreu devido a uma adaptação metabólica à exposição a altas concentração de PHE. Essa é

uma solução bastante plausível uma vez que a GST é uma enzima de defesa antioxidante que possui uma grande plasticidade de possíveis substratos.

Dentro do grupo das metalo enzimas, a superóxido dismutase é muito conhecida pela sua atividade no combate das espécies reativas de oxigênio por meio da reação de dismutação catalítica do $\cdot\text{O}_2$ intracelular normalmente proveniente das mitocôndrias em H_2O_2 (Akyol et al., 2005; Mahanty et al., 2012). Elas recebem nomes conforme o metal de ligação presente em seu sítio ativo, dessa forma tem-se a SOD manganês (MnSOD), SOD ferro (FeSOD), SOD cobre e zinco (CuZnSOD) e SOD níquel (NiSOD) (Mahanty et al., 2012).

No presente trabalho, a aclimatização do robalo em diferentes temperaturas não proporcionou nem ativação e nem inibição significativa da atividade dessa enzima nos grupos controles e expostos ao PHE. A manutenção da atividade dessa enzima nos níveis normais, possivelmente, pode ser considerada como uma falha na expressão dos genes que codificam a SOD, o que é mais provável, visto que o aumento da temperatura promove uma maior produção de EROs. Dessa forma, era esperada que fossem encontradas diferença pelo menos entre as temperaturas mais baixas e as mais altas.

A exposição dos peixes ao PHE não ocasionou alterações na atividade da SOD em robalo, quando comparadas aos seus respectivos grupos controles. Esses resultados evidenciam que a degradação do fenantreno pelas enzimas da fase I não promoveu a formação de $\cdot\text{O}_2$ na concentração e/ou no tempo na espécie testada, mantendo os mesmos níveis intracelulares regulares a ponto de não se observar alterações nos níveis basais de atividade da enzima. Yin et al. (2007) em seu trabalho com *C. auratus* que foram aclimatados a uma temperatura de 22 °C e expostos ao PHE, por 96 h, a diferentes concentrações, observaram um aumento na atividade da SOD, porém quando testaram a concentração de 1 mg L⁻¹ constataram que era uma concentração tão grande que a produção de $\cdot\text{O}_2$ era maior do que a enzima podia catalisar, levando a uma inativação da SOD. E ao avaliarem a concentração de 0,01 mg L⁻¹ não observaram alteração na atividade da SOD,

confirmando a teoria dose efeito levantada para o presente estudo, assim é possível que a concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de PHE promova alguma dessas alterações.

A pesquisa realizada por Correia et al. (2007) corrobora com os resultados obtidos para a espécie *G. brasiliensis*, e ao mesmo tempo, vai de encontro aos resultados obtidos no presente trabalho para a espécie *C. parallelus*, uma vez que ao expor exemplares de *Sparus aurata* a $0,11$ e $0,56 \mu\text{M L}^{-1}$ de PHE, por 96 h em uma temperatura experimental de $16 \text{ }^\circ\text{C}$, obtiveram uma ativação da enzima SOD. Ainda de acordo com esses autores o motivo dessa ativação é explicado pelo fato de que a concentração de PHE e o tempo de exposição para a espécie *S. aurata* foram suficientes para ativar as enzimas da fase I, que ao catalisarem o PHE produzem $\cdot\text{O}_2$, com o acúmulo de EROs no meio celular, a SOD é ativada para catalisar o superóxido em H_2O_2 , impedindo com que esses anions comprometam a função celular. Essa teoria é válida para *G. brasiliensis*, porém para *C. parallelus* como a concentração usada no trabalho de Correia et al. (2007) é muito pequena quando comparada com a usada no presente estudo, a explicação proposta por eles não contradiz a hipótese aqui levantada de que tenha ocorrido uma falha na expressão dos genes que codificam a SOD. Em seu trabalho Sun et al. (2006) expos *C. auratus* a $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de PHE por quatro dias com a temperatura experimental de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e obteve uma ativação da atividade enzimática. Ao analisarem os dados, os autores afirmam que, no decorrer dos dias, o PHE foi acumulando-se nos tecidos e o organismo, em uma tentativa de reverter esse acúmulo, começou a degradar PHE e conseqüentemente levou a uma produção do ânion superóxido, responsável por ativar a SOD. Esses dados obtidos por eles explicam o que pode ter acontecido com os exemplares de acará expostos ao PHE, nas temperaturas de 22 , 24 e $26 \text{ }^\circ\text{C}$, no entanto contrariam os resultados encontrados para robalo, porém é aceito que esse tipo de resultado varia de acordo com a espécie e como são espécies diferentes resultados diferentes podem ocorrer.

Em seu trabalho Modesto e Martinez (2010) observaram uma inibição da atividade da SOD em exemplares de *Prochilodus lineatus* a 10 mg L^{-1} de Roundup[®] por 24 h, segundo eles isso ocorreu em virtude do acúmulo de

H₂O₂ no meio celular eles chegaram a essa conclusão uma vez que não observaram a atividade da enzima CAT, somado a isso eles obtiveram uma inibição da GPx expondo uma falha nas duas enzimas que catalisam H₂O₂. Essa explicação levantada por Modesto e Martinez (2010) pode ser aplicada aos resultados obtidos para *C. parallelus* a qual tanto a CAT quanto a GPx não apresentaram alterações nos níveis basais da atividade levando por conseguinte a uma possível inativação da atividade da SOD culminando em uma possível inibição com a postergação das horas do trabalho. Já para os resultados obtidos com a espécie *G. brasiliensis* a explicação proposta por Modesto e Martinez (2010) não se aplica muito bem, uma vez que foi observado uma ativação da SOD e uma inativação da CAT e GPx, a não ser que o nível crítico de acúmulo de H₂O₂ não tenha sido alcançado para a espécie em 96 h.

A atividade da enzima catalase não foi alterada com a presença do PHE e nem com o aumento da temperatura de aclimatização nas duas espécies de peixes. A catalase pertence ao grupo de enzimas antioxidantes, seu mecanismo de ação é considerado o mais eficiente e altamente estruturado. Sua função é catalisar moléculas de H₂O₂ em H₂O e O₂ mantendo-o em níveis aceitáveis de maneira que ele não prejudique as funções celulares com sua toxicidade. Por isso quando se compara o seu percentual de rotatividade com o de outras enzimas ela se destaca com uma taxa de uma molécula de enzima para 6 milhões de moléculas de H₂O₂ (Abdel-Mageed et al., 2012).

Os resultados obtidos no presente trabalho para *C. parallelus* são consistentes quando se observa a via bioquímica de ação enzimática. Como não foi observada uma alteração nos padrões enzimáticos da SOD, quando esperava-se um acréscimo para que fossem produzidos mais H₂O₂, substrato este que seria utilizado pela CAT, sendo assim, era presumido que houvesse uma estabilidade na atividade da catalase. Já na espécie *G. brasiliensis* não foi observado a continuidade do ciclo bioquímico, pois a catalase para essa espécie não foi ativada.

Machado et al. (2014) aclimataram *P. vivípara* na temperatura de 20 °C e posteriormente expuseram ao PHE, por 96 h a concentrações de 10, 20 e 200 µg L⁻¹, e não observaram diferenças significativas entre seus tratamentos. Segundo os autores, as concentrações testadas não foram capazes de perturbar a homeostase da defesa antioxidante dessa espécie. Machado et al. (2014) vão mais além quando relatam que pela observação dos resultados deles o organismo não buscou uma outra via de desintoxicação culminando em uma ausência de respostas, assim concluem que existe uma regulação negativa dos parâmetros da defesa antioxidante conforme aumenta a concentração de PHE. Outro estudo que também corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho é o de Kubrak et al. (2010) compararam o stress oxidativo promovido pelo crômio III (Cr³⁺) com o stress promovido pelo crômio VI (Cr⁶⁺) em *C. auratus*, expostos por 24, 48 e 96 h. Em seus resultados os autores observaram que em peixes expostos por 96 h ao Cr³⁺ não houve alteração nos níveis de CAT do cérebro, fígado e rim. Eles relatam que os animais expostos ao Cr⁶⁺ por 24 e 48 h em nenhum órgão analisado a atividade enzimática foi alterada. De acordo com eles essa estagnação da atividade da enzima ocorre porque como uma parte das enzimas foram inativadas pelos EROs nas primeiras horas de exposição e está ocorrendo uma nova síntese de proteínas, dessa forma poucas moléculas de catalase estão disponíveis para a defesa antioxidativa.

Modesto e Martinez (2010) assim como no presente trabalho não observaram variações nos padrões enzimáticos da CAT quando trabalharam com *P. lineatus* expostos a 10 mg L⁻¹ de Roundup[®]. Em seu estudo eles perceberam que os resultados de atividade enzimática para Roundup[®] não seguem um padrão, diante disso, eles concluíram que a CAT não é um bom biomarcador para o Roundup[®]. Essa conclusão pode ser aplicada para o PHE, porém a dificuldade de se encontrar resultados coerentes para a CAT pode estar também associada ao método de determinação da atividade enzimática.

A enzima glutathiona peroxidase integra o grupo de defesa antioxidante formando um mecanismo de proteção das biomembranas e organelas celulares contra a ação das EROs, catalisando a redução de hidroperóxidos e H₂O₂. Devido a existência de uma grande variedade de

isoformas descobertas, os pesquisadores começam a se referir à GPx como uma família. Elas estão distribuídas em uma grande variedade de células, porém parece existir uma preferência de algumas isoformas por alguns tecidos (Yeh et al., 2009).

A atividade da enzima não foi modificada nos exemplares tanto de robalo como de acará expostos ao PHE e não houve a interferência da elevação da temperatura. Esses resultados mostram que o PHE na concentração usada e nas espécies estudadas não promove a formação de EROs, motivado por uma possível volatilização do PHE devido ao acréscimo de temperatura. Pois caso fosse promovida a inativação da SOD os radicais de oxigênio promoveriam a peroxidação lipídica que seria combatida pelos íons de ferro convertendo essa lipoperoxidação em hidroperóxidos que também são substratos da GPx e com isso sua atividade aumentaria. A manutenção da atividade da GPx nos níveis basais vem confirmando a inativação da SOD para robalo, uma vez que a enzima em questão tem afinidade por um dos metabólitos, peróxido de hidrogênio, produzidos pela SOD.

Danion et al. (2014) ao analisarem a atividade da GPx no fígado de *Oncorhynchus mykiss* expostos a pesticida em uma temperatura de 15 °C, constataram um aumento a atividade da GPx. Segundo os autores isso ocorreu por uma hiper-atividade do ciclo redox produzido, no qual a glutathione redutase (GR) supre a demanda de GSH exigida pela GPx, possibilitando um aumento na atividade enzimática. No presente trabalho a temperatura pode ter interferido na atividade catalítica da GR impedindo o fornecimento de GSH para a GPx levando a sua inativação. Lüchmann et al. (2014) em seu trabalho com *C. brasiliensis* na temperatura de 21 °C a qual foram aclimatados, e expostos ao PHE, por 24 h, em uma concentração de 100 e 1000 μL^{-1} encontraram resultados semelhantes aos observados nesse trabalho. Segundo eles, existe uma vasta literatura demonstrando que para a espécie estudada por eles, os resultados das enzimas antioxidantes só aparecem após 48 h de exposição, porém em experimentos realizados com fração acomodada do petróleo eles só observaram alterações na atividade enzimática após 96 h. Diante dos resultados obtidos e discutidos por Lüchmann et al. (2014) fica evidente que os padrões de respostas enzimáticas são de fato tempo dependentes e variam

dentro da própria espécie, assim como dependem também do contaminante usado.

Ao trabalhar com exposição de indivíduos de tilápia ao PHE nas concentrações de 50, 100 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ por um período de 4, 8 e 14 dias Wenju et al. (2009) verificaram um aumento na atividade da GPx. Para explicar esse fato eles propuseram que os indivíduos das espécies *Oreochromis niloticus* e *Oreochromis aureus* passaram por um processo de adaptação das respostas fisiológicas que possibilitou uma melhor eliminação das EROs originadas na fase I em virtude da catálise do PHE. Esses resultados não corroboram com os observados neste trabalho para nenhuma das duas espécies avaliadas isso ocorre provavelmente porque o sistema de regulação fisiológico das espécies aqui estudadas necessita de um tempo, para uma adequação metabólica de xenobiontes, superior às 96 h avaliadas no presente trabalho.

8. CONCLUSÃO

No presente trabalho a exposição de *C. parallelus* e *G. brasiliensis* a uma concentração de 0,1 mg L⁻¹ de PHE, por 96 h, nas temperaturas de 22, 24, 26 e 28 °C permitiu chegar as seguintes conclusões. Primeiro, para cada uma das espécies existe um padrão de resposta distinta uma da outra. Isto sugere uma via de defesa própria para cada espécie, evidenciando uma variabilidade nos padrões de respostas interespecíficas. Outra conclusão que podemos ressaltar é que a interação da temperatura com a exposição ao PHE na concentração de 0,1 mg L⁻¹ promove genotoxicidade nas espécies de peixes testadas, sendo mais expressiva em *C. parallelus*. Uma vez que nesses peixes foram observados resultados positivos para todas as análises realizadas enquanto que em *G. brasiliensis* essa relação de temperatura e aumento da toxicidade só foi observada no ensaio cometa. Por fim pode-se concluir com relação a atividade das enzimas da fase II de biotransformação que para ambas as espécies a temperatura interage com PHE nas principais enzimas da fase II. Assim por meio do produto catalítico dessas enzimas é que todo o resto do ciclo funciona, *C. parallelus* destaca-se a atividade da GST e peixes de *G. brasiliensis* SOD, mostrando que cada espécie segue um caminho de desintoxicação diferente.

9. REFERÊNCIAS

Abdel-Mageed, H.M., El-Laithy, H.M., Mahran, L.G., Fahmy, A.S., Mäder, K., Mohamed, S.A., 2012. Development of novel flexible sugar ester vesicles as carrier systems for the antioxidant enzyme catalase for wound healing applications. *Process Biochemistry*. 47, 1155-1162.

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

American Public Health Association "APHA". 1998. *Standard Methods for the examination of Water and Wastewater*, 20th, Washington.

Akyol, O., Yanik, M., Elyas, H., Namli, M., Canatan, H., Akin, H., Yuce, H., Yilmaz, H.R., Tutkun, H., Sogut, S., Herken, H., Özyurt, H., Savas, H.A., Zoroglu, S.S., 2005. Association between Ala-9Val polymorphism of Mn-SOD gene and schizophrenia *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 29, 123-131.

Amorim, L.C.A., 2003. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 6, 158-170.

Artigas, J., Arts, G., Babut, M., Caracciolo, A.B., Charles, S., Chaumot, A., Combourieu, B., Dahllöf, I., Despréaux, D., Ferrari, B., Friberg, N., Garric, J., Geffard, O., Gourlay-Francé, C., Hein, M., Hjorth, M., Krauss, M., De Lange, H.J., Lahr, J., Lehtonen, K.K., Lettieri, T., Liess, M., Lofts, S., Mayer, P., Morin, S., Paschke, A., Svendsen, C., Usseglio-Polatera, P., Brink, N.V.D., Vindimian, E., Williams, R., 2012. Towards an understanding of the role of clay minerals in crude oil formation, migration and accumulation. *Environmental Pollution*. 160, 201-206.

Bain, P.A., Schuller, K.A., 2012. Molecular cloning of glutathione peroxidase cDNAs from *Seriola lalandi* and analysis of changes in expression in cultured fibroblast-like cells in response to *tert*-butyl hydroquinone. *Aquaculture*. 324-325, 182-193.

Behrenbruch, P., Dedigama, T., 2007. Classification and characterisation of crude oils based on distillation properties. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 57, 166–180.

Beketov, M.A., Liess, M., 2012. Ecotoxicology and macroecology - Time for integration. *Environmental Pollution*. 162, 247-254.

Borges, J.C.S., Pressinotti, L.N., Gomes, V., Silva, J.R.M.C., 2010. Lipidic and proteic absorption in digestive tract of tropical fat snook (*Centropomus parallelus*, POEY 1860). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 386, 39-44.

Brauner, C.J., Ballantyne, C.L., Vijayan, M.M., Val, A.L., 1999. Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 123, 127–134.

Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M., 2013. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 1830, 3289–3303.

Carrera-Martínez, D., Mateos-Sanz, A., López-Rodas, V., Costas, E., 2010. Microalgae response to petroleum spill: An experimental model analyzing physiological and genetic response of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to oil samples from the tanker Prestige. *Aquatic Toxicology*. 97, 151–159.

Chen, H., Teng, Y., Wang, J., 2012. Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of the Rizhao coastal area (China) using diagnostic ratios and factor analysis with nonnegative constraints. *Science of the Total Environment*. 414, 293–300.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília 18 mar. 2005, p. 58-63.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil). Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. *Diário Oficial da União*, Brasília 30 dez. 2009, p. 81-84.

Correia, A.D., Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, M., Henriques, M.A.R., 2007. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 347, 109-122.

Costa Filho, J., Fabregat, T.E.H.P., Rosa, C.A.V.L., 2013. Uma revisão sobre os principais aspectos no cultivo do robalo. *Revista de Ciência Agropecuárias*. 12, 317-325.

Danion, M., Floch, S.L., Lamour, F., Quentel, C., 2014. Effects of *in vivo* chronic exposure to pendimethalin on EROD activity and antioxidant defenses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 99, 21-27.

de Bruyn, W.J., Clark, C.D., Ottelle, K., Aiona, P., 2012. Photochemical degradation of phenanthrene as a function of natural water variables modeling freshwater to marine environments. *Marine Pollution Bulletin*. 64, 532-538.

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

Doyle, A., Saavedra, A., Tristão, M.L.B., Mendes, L.A.M., Aucélio, R.Q., 2013. Spectrometric methods for the determination of chlorine in crude oil and petroleum derivatives – A review. *Spectrochimica Acta B*. 86, 102-107.

Duarte, R.M., Honda, R.T., Val, A.L., 2010. Acute effects of chemically dispersed crude oil on gill ion regulation, plasma ion levels and haematological parameters in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquatic Toxicology*. 97, 134–141.

Ezemonye, L., Tongo, I., 2010. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere*. 81, 214-217.

Fasulo, S., Marino, S., Mauceri, A., Maisano, M., Giannetto, A., D'Agata, A., Parrino, V., Minutoli, R., de Domenico, E., 2010. A multibiomarker approach in

Coris julis living in a natural environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73, 1565-1573.

Fiera, C., 2009. Biodiversity of Collembola in urban soils and their use as bioindicators for pollution. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 44, 868-873.

Flohé, L., Ötting, F., 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymology*. 105, 93-104.

Fox, D.R., 2010. A Bayesian approach for determining the no effect concentration and hazardous concentration in ecotoxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73, 123-131.

Gadagbui, B.K.M., James, M.O., 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquatic Toxicology*. 49, 27-37.

Gonçalves-Soares, D., Zanette, J., Yunes, J.S., Yepiz-Plascencia, G.M., 2012. Expression and activity of glutathione S-transferases and catalase in the shrimp *Litopenaeus vannamei* inoculated with a toxic *Microcystis aeruginosa* strain. *Marine Environmental Research*. 75, 54-61.

Grisolia, C.K., Oliveira, A.B.B., Bonfim, H., Klautau-Guimarães, M.N., 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal waste water treatment plant. *Genetics and molecular biology*. 28, 334-338.

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

Habig, W.H., Pabst, W.B., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249, 7130-7139.

Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of Glutathione S-transferase. *Methods Enzymol*. 77, 398-405.

Hauser-Davis, R.A., Oliveira, T.F., Silveira, A.M., Silva, T.B., Ziolli, R.I., 2010. Case study: Comparing the use of nonlinear discriminating analysis and Artificial Neural Networks in the classification of three fish species: acaras (*Geophagus brasiliensis*), tilapias (*Tilapia rendalli*) and mullets (*Mugil liza*). *Ecological Informatics*. 5, 474–478.

Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, L., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y. F.; Asano, N., Sifuni, T., Ojima, Y., 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research*. 399, 125-133.

Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human redcells in health and disease. *Journal Haematological*. 25, 563-575.

Huang, H.C., Lee, Ch.L., Lai, Ch.H., Fang, M.D., Lai, I.Ch., 2012. Transboundary movement of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Kuroshio Sphere of the western Pacific Ocean. *Atmospheric Environment*. 54, 470-479.

Ichise, N., Hirota, K., Ichihashi, D., Nodasaka, Y., Morita, N., Okuyama, H., Yumoto, I., 2008. H₂O₂ Tolerance of *Vibrio rumoiensis* S-1^T is Attributable to the Cellular Catalase Activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 106, 39-45.

Janbandhu, A., Fulekar, M.H., 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials*. 187, 333–340.

Jakšić, Z., Hamer, B., Landeka, N., Batel, R., 2008. Western mosquitofish as a bioindicator of exposure to organochlorine compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71, 426-435.

Kim, B.M., Rhee, J.S., Park, G.S., Lee, J., Lee, Y.M., Lee, J.S., 2011. Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase (SOD) from the copepod *Tigriopus japonicus*: Molecular cloning and expression in response to environmental pollutants. *Chemosphere*. 84, 1467–1475.

Kim, J., Kim, S., An, K.W., Choi, C.Y., Lee, S., Choi, K., 2010. Molecular cloning of *Daphnia magna* catalase and its biomarker potential against oxidative stresses. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 152, 263-269.

Kordas, R.L., Harley, Ch.D.V., O'Connor, M.I., 2011. Community ecology in a warming world: The influence of temperature on interspecific interactions in marine systems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 400, 218–226.

Kruger, N. J. The Bradford method for protein quantification. In: *Methods in Molecular Biology*. V- 32. Basic Protein and Peptide Protocols. University of Hertfordshire, Hatfield, UK, Humana Press, New Jersey, 1994.

Kubrak, O.I., Lushchak, O.V., Lushchak, J.V., Torous, I.M., Storey, J.M., 2010. Chromium effects on free radical processes in goldfish tissues: Comparison of Cr (III) and Cr (VI) exposures on oxidative stress markers, glutathione status and antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 152, 360-370.

Lacaze, E., Geffard, O., Bony, S., Devaux, A., 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutation Research*. 700, 32-38.

Lee, L.H., Lin, H.J., 2013. Effects of an oil spill on benthic community production and respiration on subtropical intertidal sandflats. *Marine Pollution Bulletin*. 73, 291-299.

Lecklin, T., Ryömä, R., Kuikka, S., 2011. A Bayesian network for analyzing biological acute and long-term impacts of an oil spill in the Gulf of Finland. *Marine Pollution Bulletin*. 62, 2822-2835.

Lemos, C.T., Iranço, F.A., Oliveira, N.C.D.A., Souza, G.D., Souza, G.D., Fachel, J.M.G., 2008. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. *Science of the Total Environment*. 406, 337-343.

- Lemos, D., Netto, B., Germano, A., 2006. Energy budget of juvenile fat snook *Centropomus parallelus* fed live food. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 144, 33-40.
- Li, C., Ni, D., Song, L., Zhao, J., Zhang, H., Li, L., 2008. Molecular cloning and characterization of a catalase gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish & Shellfish Immunology*. 24, 26-34.
- Li, X., Zhang, X., Zhang, J., Zhang, X., Starkey, S.R., Yan, K., 2009. Identification and characterization of eleven glutathione S-transferase genes from the aquatic midge *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 39, 745-754.
- Liang, Y., Zhang, X., Dai, D., Li, G., 2009. Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63, 80–87.
- Liu, X., Jia, H., Wang, L., Qi, H., Ma, W., Hong, W., Guo, J., Yang, M., Sun, Y., Li, Y.F., 2013. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in concurrently monitored surface seawater and sediment along Dalian coast after oil spill. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 90, 151–156.
- Lüchamann, K.H., Dafre, A.L., Trevisan R., Craft, J.A., Meng, X., Mattos, J.J., Zacchi, F.L., Dorrington, T.S., Schroeder, D.C., Bainy, A.C.D., 2014. A light in the darkness: New biotransformation gene, antioxidant parameters and tissue-specific response in oysters exposed to phenanthrene. *Aquatic Toxicology*. 152, 324-334.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 14, 30–35.
- Ma, W.L., Li, Y.F., Qi, H., Sun, D.Z., Liu, L.Y., Wang, D.G., 2010. Seasonal variations of sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to a northeastern urban city, China. *Chemosphere*. 79, 441-447.
- Machado, A.A.S., Hoff, M.L.M., Klein, R.D., Cordeiro, G.J., Avila, J.M.L., Costa, P.G., Bianchini, A., 2014. Oxidative stress and DNA damage responses to

phenanthrene exposure in the estuarine guppy *Poecilia vivípara*. Marine Environmental Research. 98, 96-105.

Mahanty, S., Kaul, T., Pandey, P., Reddy, R.A., Mallikarjuna, G., Reddy, C.S., Sopory, S.K., Reddy, M.K., 2012. Biochemical and molecular analyses of copper–zinc superoxide dismutase from a C4 plant *Pennisetum glaucum* reveals an adaptive role in response to oxidative stress. Gene. 505, 309-317.

Maria, V.L., Correia, A.C., Santos, M.A., 2004. *Anguilla anguilla* L. genotoxic and liver biotransformation responses to a biotic acid exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety. 58, 202-210.

Miranda, L.A., Chalde, T., Elisio, M., Strüssmann, C.A., 2013. Effects of global warming on fish reproductive endocrine axis, with special emphasis in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. General and Comparative Endocrinology. 192, 45-54.

Modesto, K.A., Martinez C.B.R., 2010. Roundup[®] cause oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. Chemosphere. 78, 294-299.

Moreno, R., Jover, L., Diez, C., Sanpera, C., 2011. Seabird feathers as monitors of the levels and persistence of heavy metal pollution after the *Prestige* oil spill. Environmental Pollution. 159, 2454-2460.

Mu, J., Wang, J., Jin, F., Wang, X., Hong, H., 2014. Comparative embryotoxicity of phenanthrene and alkyl-phenanthrene to marine medaka (*Oryzias melastigma*). Marine Pollution Bulletin. 85, 505-515.

Negreiros, L.A., Silva, B.F., Paulino, M.G., Fernandes, M.N., Chippari–Gomes, A.R., 2011. Effectes of hypoxia and petroleum on the genotox and morphological parameters of *Hippocampus reidi*. Comparative Biochemistry and Physiology. 153, 408-414.

Nickum, J.G., Bart, H.L., Bowser, P.R., Greer, I.E., Hubbs, C., Jenkins, J.A., Macmillan, J.R., Rachlin, J.W., Rose, J.D., Soresen, P.W., Tomasso, J.R., 2004. Guidelines for the use of fishes in research. American Fisheries Society, Bethesda, MD.

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.

Oguntimehin, I., Kondo, H., Sakugawa, H., 2010. The use of *Sunpatiens* (*Impatiens* spp.) as a bioindicator of some simulated air pollutants – Using an ornamental plant as bioindicator. *Chemosphere*. 81, 273–281.

Patel, V., Cheturvedula, S., Madamwar, D., 2012. Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India. *Journal of Hazardous Materials*. 201– 202, 43– 51.

Pedetta, A., Pouyte, K., Seitz, M.K.H., Babay, P.A., Espinosa, M., Costagliola, M., Studdert, C.A., Peressutti, S.R., 2013. Phenanthrene degradation and strategies to improve its bioavailability to microorganisms isolated from brackish sediments. *International. Biodeterioration & Biodegradation*. 84: 161-167

Perazzo, G.X., Noleto, R.B., Vicari, M.R., Gava, A., Cestari, M.M., 2013. Trends of karyotypical evolution in the pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, from southern Brazil. *Zoology*. 116, 286-292.

Pereira, J.S.F., Moraes, D.P., Antes, F.G., Diehl, L.O., Santos, M.F.P., Guimarães, R.C.L., Fonseca, T.C.O., Dressler, V.L., Flores, M.M., 2010. Determination of metals and metalloids in light and heavy crude oil by ICP-MS after digestion by microwave-induced combustion. *Microchemical Journal*. 96, 4–11.

Pontes, F.V.M., Carneiro, M.C., Vaitsman, D.S., Monteiro, M.I.C., Neto, A.A., Tristão, M.L.B., Guerrante, M. de F., 2013. Comparative study of sample decomposition methods for the determination of total Hg in crude oil and related products. *Fuel Processing Technology*. 106, 122–126.

Prosser, Ch.M., Unger, M.A., Vogelbein, W.K., 2011. Multistressor interactions in the zebrafish (*Daniorerio*): Concurrent phenanthrene exposure and *Mycobacterium marinum* infection. *Aquatic Toxicology*. 102, 177–185.

Rantin, F.T., 1980. Temperaturas letais do acar *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824 - Pisces, Cichlidae). Boletim de Fisiologia Animal. 4, 9-33.

Reddy, M.S., Naresh, B., Leela, T., Prashanthi, M., Madhusudhan, N.Ch., Dhanasri, G., Devi, P., 2010. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. Bioresource Technology. 101, 7980–7983.

Ren, Q., Sun R.R., Zhao, X.F., Wang, J.X., 2009. A selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and two glutathione S- transferases (GSTs) from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). Comparative Biochemistry and Physiology. 149, 613-623.

Rocha, A.J.S., Gomes, V., Ngan, P.V., Passos, M.J.A.C.R., Furia, R.R., 2007. Effects of anionic surfactant and salinity on the bioenergetics of juveniles of *Centropomus parallelus* (Poey). Ecotoxicology and Environmental Safety. 68, 397-404.

Ruiz, Y., Suarez, P., Alonso, A., Longo, E., Villaverde, A., Juan, F.S., 2011. Environmental quality of mussel farms in the Vigo estuary: Pollution by PAHs, origin and effects on reproduction. Environmental Pollution. 159, 250-265.

Santos, A.A., Egami, M.I., Ranzani-Paiva, M.J.T., Juliano, Y., 2009. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*): Seasonal variation, sex and gonadal maturation. Aquaculture. 296, 359-366.

Schiedek, D., Sundelin, B., Readman, J.W., Macdonald, R.W., 2007. Interactions between climate change and contaminants. Marine Pollution Bulletin. 54, 1845-1856.

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

Silva, J., Freitas, T.R.O., Marinho, J.R., Speit, G., Erdtmann, B., 2000. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. Genetics and Molecular Biology. 23, 241-245.

Sinaei, M., Araghi, P.E., Mashinchian, A., Fatemi, M., Riazi, G., 2012. Application of biomarkers in mudskipper (*Boleophthalmus dussumieri*) to assess polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) pollution in coastal areas of the Persian Gulf. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 84, 311–318.

Sforzini, S., Boeri, M., Dagnino, A., Oliveri, L., Bolognesi, C., Viarengo, A., 2012. Genotoxicity assessment in *Eisenia andrei* coelomocytes: A study of the induction of DNA damage and micronuclei in earthworms exposed to B[a]P- and TCDD-spiked soils. *Mutation Research*. 746, 35-41.

Sukumaran, S., Grant, A., 2013. Differential responses of sexual and asexual *Artemia* to genotoxicity by a reference mutagen: Is the comet assay a reliable predictor of population level responses?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 91, 110-116.

Sun, Y., Yu, H., Zhang, J., Yin, Y., Shi, H., Wang, X., 2006. Bioaccumulation, depuratin and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere*. 63, 1319-1327

Tice, R.R., Arurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35, 206-221.

Uleberg, K.E., Larssen, E., Øysæd, K.B., Mæland, M., Bjørnstad-Hjelle, A., 2010. Ecotoxicology goes MudPIT?. *Marine Environmental Research*. 69, S34–S36.

Wang, M., Su, X., Li, Y., Jun, Z., Li, T., 2010. Cloning and expression of the Mn-SOD gene from *Phascolosoma esculenta*. *Fish & Shellfish Immunology*. 29, 759-764.

Wei, Sh., Huang, B., Liu, M., Bi, X., Ren, Zh., Sheng, G., Fu, J., 2012. Characterization of PM_{2.5}-bound nitrated and oxygenated PAHs in two industrial sites of South China. *Atmospheric Research*. 109–110, 76–83.

Wenju, X., Yuanyou, L., Qingyang, W., Shuqi, W., Huaiping, Z., Wenhua, L., 2009. Effects of phenanthrene on hepatic enzymatic activities in tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂). *Journal of Environmental Sciences*. 21, 854–857.

Westphal, K., Stangl, V., Föhling, M., Dreger, H., Weller, A., Baumann, G., Stangl, K., Meiners, S., 2009. Human-specific induction of glutathione peroxidase-3 by proteasome inhibition in cardiovascular cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 47, 1652–1660.

Wu, L.M., Zhou, C.H., Keeling, J., Tong, D.S., Yu, W.H., 2012. Towards an understanding of the role of clay minerals in crude oil formation, migration and accumulation. *Earth-Science Reviews*. 115, 373–386.

Yeh, S.P., Liu, K.F., Chiu, S.T., Jian, S.J., Cheng, W., Liu, Ch.U., 2009. Identification and cloning of a selenium dependent glutathione peroxidase from giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*. 27, 181-191.

Ying, Y., Jia, H., Sun, Y., Yu, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2007. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 145, 288–293.

Yu, C.Z., Snodgrass, G.L., Chen, M.S., 2007. Comparative study on glutathione S-transferase activity, cDNA, and gene expression between malathion susceptible and resistant strains of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 87, 62-72.

Yu, I.T., Rhee, J.S., Raisuddin, S., Lee, J.S., 2008. Characterization of the glutathione S-transferase-Mu (*GSTM*) gene sequence and its expression in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus* as a function of development, gender type and chemical exposure. *Chemico-Biological Interactions*. 147, 118-125.

Zhang, R., Zhang, F., Zhang, T.Ch., 2013. Sedimentary records of PAHs in a sediment core from tidal flat of Haizhou Bay, China. *Science of the Total Environment*. 450–451, 280–288.