



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA  
LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

**LUIZ EDUARDO ALVES BEZERRA DO NASCIMENTO**

**EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DO FENANTRENO E PIRENO  
EM RECÉM-NASCIDOS DO PEIXE *Poecilia vivipara***

RECIFE  
2015

**LUIZ EDUARDO ALVES BEZERRA DO NASCIMENTO**

**EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DO FENANTRENO E PIRENO  
EM RECÉM-NASCIDOS DO PEIXE *Poecilia vivipara***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: **Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho**

RECIFE  
2015

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Nascimento, Luiz Eduardo Bezerra do**

**Efeitos letais e subletais do fenantreno e pireno em recém-nascidos do peixe *Poecilia vivipara*/ Luiz Eduardo Bezerra do Nascimento– Recife: O Autor, 2015.**

**64 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Paulo Sérgio Martins de Carvalho**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biologia Animal, 2015.**

**Inclui referência**

- 1. *Poecilia* 2. Toxicologia ambiental 3. Peixe- efeito da poluição da água I. Carvalho, Paulo Sérgio Martins de (orientador) II. Título**

**597.667**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2016-065**



**LUIZ EDUARDO ALVES BEZERRA DO NASCIMENTO**

**EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DO FENANTRENO E PIRENO  
EM RECÉM-NASCIDOS DO PEIXE *Poecilia vivipara***

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biologia Animal, da  
Universidade Federal de Pernambuco,  
como parte dos requisitos para à obtenção  
do grau de Mestre em Biologia Animal.  
Data de Aprovação: 30 / 11 / 2015

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho (Orientador)  
Departamento de Zoologia – UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliete Zanardi Lamardo (1º Titular)  
Departamento de Oceanografia – UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Maria Varella de Araújo Castro (2º Titular)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. José Roberto Botelho de Souza (3º  
Titular) Departamento de Zoologia – UFPE

---

Prof. Dr. Antônio da Silva Souto (Suplente Interno)  
Departamento de Zoologia – UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilia P. S. Santos (Suplente Externo)  
Departamento de Oceanografia – UFPE

RECIFE  
2015

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e sabedoria durante minha caminhada, me fortalecendo em todos os momentos deste jornada. Quero dedicar um agradecimento especial aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado, na alegria e na tristeza, literalmente. Dando aquele apoio que só mãe e pai sabem dar. Amo vocês.

Agradeço a meu orientador: Paulo Carvalho, não apenas por ter aberto as portas de seu laboratório para mim, mas também por ter me acompanhado em cada passo deste trabalho, contribuindo de maneira singular com meu crescimento ao longo do mestrado, não apenas como profissional, mas também enquanto pessoa.

Não poderia deixar de agradecer à toda a equipe LABECOTOX que me acolheu como uma família, aos que me acompanharam seja por mais, ou por menos tempo. Tenho um carinho especial por vocês: Gabi, Priscila, Talita, Laura, Raissa, Helena, Ana Alice, Renato, Romulo, Driele e por último, mas não menos especial Juliana... Vocês foram importantes nesses dois anos, não só pela sua paciência e ensino em todos os momentos, mas também pelos momentos de alegria que me proporcionaram no laboratório. Se eu pudesse começar tudo novamente, eu começaria graças ao amor que tenho por vocês.

Gostaria de agradecer aos amigos do PPGBA, que mesmo não fazendo parte do laboratório, estiveram comigo, não apenas contribuindo na minha formação ao longo das disciplinas, mas também nos momentos de descontração, são eles: Celina, Rodolfo, Cori (valente), Heloína, Jaire, Éder, Ikaro, Arthur, Neto, Raissa, Lira e Diego. Quero destacar aqui: Ana Maiara, que apesar de ser de outro programa de pós, contribuiu de forma única nos momentos de descontração e amizade fervorosa.

Aos “antigos” amigos que sempre se mantiveram perto, agradeço todos os dias: por escutar meus desabafos, me ajudar a “esquecer um pouco meus problemas” e manter a calma quando era necessário. Quero dedicar um agradecimento especial a: Fabiane, Pedro, Paulo e Luana que apesar dos contratempos, sempre foram e serão meus irmãos de coração.

Cabe aqui um agradecimento especial, a um grande amigo que me ajudou nestes últimos meses do mestrado, não apenas a focar no que realmente é importante, mas também a me estimular a explorar o melhor que eu tenho em mim, meu xará e companheiro de muitos momentos: Luiz Henriques.

Por fim, quero agradecer a todos que sendo ou não citados aqui, tiveram uma enorme contribuição para a construção de cada página deste trabalho.

## RESUMO

*Poecilia vivipara* apresenta distribuição ampla na costa brasileira, e sua reprodução por viviparidade viabiliza a utilização de jovens recém-nascidos com 24 horas de vida em estudos ecotoxicológicos para avaliar o potencial de toxicidade de contaminantes ambientais. Este trabalho teve por objetivos avaliar os efeitos letais e subletais nestes estágios iniciais de vida do peixe estuarino *Poecilia vivipara* após exposição a diferentes concentrações dos HPAs fenantreno e pireno dissolvidos na água. Os jovens recém-nascidos foram obtidos de plantel de reprodutores mantidos em laboratório, expostos ao fenantreno nas concentrações 0, 10, 50, 200 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  durante 7 dias, e ao pireno nas concentrações 0, 1, 10, 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  durante 14 dias. Após a exposição foi avaliada a taxa de mortalidade, e nos sobreviventes foram quantificados os parâmetros subletais atividade da Glutathione S-Transferase (GST), velocidade de natação espontânea, captura de presas e crescimento. Jovens expostos a 500  $\mu\text{g fenantreno L}^{-1}$  apresentaram 40% de mortalidade, e não foi detectada mortalidade nas demais concentrações. Jovens expostos ao pireno nas concentrações 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  apresentaram 44% e 33% de mortalidade, respectivamente, e não foi detectada mortalidade nas demais concentrações. Com relação aos parâmetros subletais, a concentração de efeito observado (CEO) para atividade de GST, velocidade média de natação, distância linear nadada e incremento de peso foi igual a 500  $\mu\text{g fenantreno L}^{-1}$ . Já para a exposição ao pireno a (CEO) para atividade de GST foi igual a 10  $\mu\text{g pireno L}^{-1}$ , 50  $\mu\text{g pireno L}^{-1}$  para velocidade média de natação e distância linear nadada, e 1  $\mu\text{g pireno L}^{-1}$  para incremento de peso. O aumento da atividade da GST após exposição a 500  $\mu\text{g fenantreno L}^{-1}$  sugere um aumento dos gastos energéticos com os processos de biotransformação de fase 2, e esta alteração esteve associada a decréscimos na atividade locomotora, na habilidade de capturar presas, e também no crescimento. A exposição ao pireno também apresentou um padrão semelhante, com alterações detectadas em concentrações menores, indicando uma maior potência do pireno comparado ao fenantreno para induzir a GST, gerar hipoatividade locomotora e inibir o crescimento, parâmetro de maior relevância para o recrutamento da espécie. Estes resultados sugerem que o uso de jovens recém-nascidos de *Poecilia vivipara* como modelos ecotoxicológicos para a compreensão dos efeitos de contaminantes em parâmetros de diferentes níveis de organização biológica relacionados ao recrutamento de peixes é promissor.

**Palavras-chave:** HPAs, GST, natação, captura de presas e crescimento.

## ABSTRACT

*Poecilia vivipara* has a wide distribution pattern along the Brazilian coast, and its reproduction by viviparity enables the use of newborn in ecotoxicological studies to evaluate the potential toxicity of environmental contaminants. This study aimed to assess the lethal and sublethal effects on these early stages of life of the estuarine fish *Poecilia vivipara* after exposure to different concentrations of the PAHs phenanthrene and pyrene dissolved in water. The newborn were obtained from a breeding stock kept under controlled conditions, and exposed to phenanthrene concentrations of 10, 50, 200 and 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  and control for 7 days, and pyrene concentrations of 1, 10, 50 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  and control for 14 days. After exposure, the mortality rate was calculated, and the survivors were evaluated for the sublethal parameters glutathione S-transferase activity (GST), spontaneous swimming speed, prey capture rate and growth. Young individuals exposed to 500  $\mu\text{g}$  phenanthrene  $\text{L}^{-1}$  exhibited 40% mortality, only detected in this concentration. Juveniles exposed to pyrene concentrations of 50 and 100  $\mu\text{g}$  pyrene  $\text{L}^{-1}$  exhibited 44% and 33% mortality, respectively, and no mortality was detected in other tested concentrations. Regarding sublethal parameters, the lowest observed effect concentration (LOEC) for GST activity, average swimming speed, linear swimming distance and weight increase was equal to 500  $\mu\text{g}$  phenanthrene  $\text{L}^{-1}$ . Already for an exposition to pyrene the LOEC for GST activity was equal to 10  $\mu\text{g}$  pyrene  $\text{L}^{-1}$ , 50  $\mu\text{g}$  pyrene  $\text{L}^{-1}$  for average swimming speed, and 1  $\mu\text{g}$  pyrene  $\text{L}^{-1}$  for weight increase. The increase in GST activity after exposure to 500  $\mu\text{g}$  phenanthrene  $\text{L}^{-1}$  suggests an increase in energy expenditure with the biotransformation processes of phase 2, and this change was associated with decreases in locomotor activity, the ability to catch prey, and also in growth. Exposure to pyrene also exhibited a similar pattern, with changes detected in lower concentrations, indicating a greater pyrene potency compared to phenanthrene to induce GST and to generate locomotor hypoactivity and inhibit growth, the most relevant parameter for the recruitment of the species. These results suggest the potential use of newborn young *Poecilia vivipara* as ecotoxicological models for understanding the effects of contaminants on parameters of distinct biological organization levels related to the recruitment of fish.

**Keywords:** PHAs, GST, swimming, prey capture, growth.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura molecular do HPA Fenantreno .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 19 |
| <b>Figura 2.</b> Estrutura molecular do HPA Pireno .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 20 |
| <b>Figura 3.</b> Diagrama de fluxo conceitual de um modelo ecológico baseado em indivíduos (MEBI) para peixes, envolvendo submodelos para o encontro de presas, forrageamento, crescimento, risco de predação e reprodução. Os aspectos comportamentais mais importantes que afetam cada modelo estão representados nas caixas azuis. Características ecológicas (das presas e dos predadores) estão nas caixas vermelhas..... | 25 |
| <b>Figura 4.</b> Atividade de Glutathione S-Transferase (GST) ( $\text{nmol CDNB min}^{-1} \text{mg proteina}^{-1}$ ) (média $\pm$ desvio padrão, $n = 8$ ) em juvenis do barrigudinho <i>Poecilia vivipara</i> após 7 dias de exposição à água com fenantreno. ....                                                                                                                                                           | 48 |
| <b>Figura 5.</b> Velocidade média de natação espontânea (média, mediana e quartis), em $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ de juvenis do barrigudinho <i>Poecilia vivipara</i> após 7 dias de exposição à água com fenantreno. ....                                                                                                                                                                                                | 49 |
| <b>Figura 6.</b> Distância percorrida (média, mediana, quartis), em cm, por juvenis do barrigudinho <i>Poecilia vivipara</i> após 7 dias de exposição à água com fenantreno .....                                                                                                                                                                                                                                              | 50 |
| <b>Figura 7.</b> Quantidade de náuplios de <i>Artemia sp.</i> (média, mediana, quartis) capturados por juvenis do barrigudinho <i>Poecilia vivipara</i> após 7 dias de exposição à água com fenantreno .....                                                                                                                                                                                                                   | 51 |
| <b>Figura 8.</b> Incremento de peso (média $\pm$ desvio padrão), em miligramas, de juvenis do barrigudinho <i>Poecilia vivipara</i> após 7 dias de exposição à água com fenantreno .....                                                                                                                                                                                                                                       | 52 |
| <b>Figura 9.</b> Atividade de Glutathione S-Transferase (GST) ( $\text{nmol CDNB.min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ) (média $\pm$ desvio padrão, $n = 8$ ) em juvenis do barrigudinho <i>Poecilia vivipara</i> após 14 dias de exposição à água com pireno .....                                                                                                                                                               | 53 |
| <b>Figura 10.</b> Velocidade média de natação espontânea (média $\pm$ desvio padrão), em $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , juvenis do barrigudinho <i>Poecilia vivipara</i> após 14 dias de exposição à água com pireno .....                                                                                                                                                                                                  | 54 |
| <b>Figura 11.</b> Distância percorrida (média $\pm$ desvio padrão), em cm, por juvenis do barrigudinho <i>Poecilia vivipara</i> após 14 dias de exposição à água com pireno .....                                                                                                                                                                                                                                              | 55 |
| <b>Figura 12.</b> Quantidade de náuplios de <i>Artemia sp.</i> (média $\pm$ desvio padrão) capturados por juvenis do peixe barrigudinho <i>Poecilia vivipara</i> após 14 dias de exposição ao pireno .....                                                                                                                                                                                                                     | 56 |
| <b>Figura 13.</b> Incremento de peso (média $\pm$ desvio padrão), em miligramas, de juvenis do peixe barrigudinho <i>Poecilia vivipara</i> após 14 dias de exposição ao pireno .....                                                                                                                                                                                                                                           | 57 |

## LISTA DE SIGLAS

**ANOVA** – Análise de Variância.

**ASTM** - American Society for Testing and Materials.

**CDNB** - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno.

**CEO** - Concentração de efeito observado.

**CL<sub>50</sub>** – Concentração letal para metade da população.

**CYP1A** - Citocromo P450 1A.

**DMSO** – Dimetil sulfóxido.

**EROD** – Etoxiresorufina-orto-deetilase.

**GSH** – Glutathiona reduzida.

**GST** – Glutathiona S-Transferase.

**HPAs** – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

**INCT-TA** - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática.

**IP** – Incremento de peso.

**MEBIs** - Modelos Ecológicos Baseados em Indivíduos.

**NPC** - Número de presas capturadas.

**NPS** - Número de presas sobreviventes.

**OCDE** - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico.

**PF** – Peso final.

**PM** – Peso molecular.

**LOEC** – Lowest Observed Effect Concentration.

# Sumário

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                     | <b>11</b> |
| <b>2. REVISÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>                | <b>14</b> |
| 2.1 Ecotoxicologia                                       | 14        |
| 2.2 Uso de peixes em ensaios ecotoxicológicos            | 16        |
| 2.3 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs):      | 19        |
| 2.3.1 Fenantreno                                         | 20        |
| 2.3.2 Pireno                                             | 21        |
| 2.4 Biomarcadores ecotoxicológicos                       | 21        |
| 2.4.1 Biomarcadores bioquímicos                          | 22        |
| 2.4.2 Conceitos sobre biomarcadores comportamentais      | 23        |
| 2.4.2.1 Atividade natatória                              | 26        |
| 2.4.2.2 Captura de presas                                | 27        |
| 2.5 Crescimento                                          | 28        |
| 2.6 Importância dos estágios iniciais de desenvolvimento | 29        |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                      | <b>31</b> |
| 3.1 Geral                                                | 31        |
| 3.2 Específicos                                          | 31        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>                             | <b>31</b> |
| 4.1 Manutenção e obtenção dos animais                    | 31        |
| 4.2 Exposição ao fenantreno e pireno                     | 32        |
| 4.3 Atividade da GST                                     | 33        |
| 4.4 Natação                                              | 33        |
| 4.5 Captura de presas                                    | 34        |
| 4.6 Incremento de peso                                   | 34        |
| 4.7 Análises estatísticas                                | 35        |
| <b>5. RESULTADOS</b>                                     | <b>35</b> |
| 5.1 Fenantreno                                           | 35        |
| 5.1.1 Mortalidade                                        | 35        |
| 5.1.2 Atividade da GST                                   | 36        |
| 5.1.3 Natação                                            | 36        |
| 5.1.4 Captura de presas                                  | 38        |
| 5.1.5 Incremento de peso                                 | 39        |
| 5.2 Pireno                                               | 40        |
| 5.2.1 Mortalidade                                        | 40        |
| 5.2.2 Atividade da GST                                   | 40        |
| 5.2.3 Natação                                            | 41        |
| 5.2.4 Captura de presas                                  | 43        |
| 5.2.5 Incremento em peso                                 | 44        |

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>45</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS .....</b> | <b>51</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) correspondem a uma fração do petróleo de significativa relevância ambiental. Uma vez na água, os HPAs são absorvidos pelos organismos expostos, sendo distribuídos para as diversas partes do corpo. Após a absorção, os efeitos tóxicos dos HPAs podem se manifestar em diferentes níveis de organização biológica, alterando mecanismos bioquímicos de biotransformação e fisiológicos (Incardona et al., 2005), levando a alterações a nível comportamental (Sloman e Mcneil, 2012), e potencialmente afetando processos ecológicos a nível de população (Carls et al., 2002).

Dentre os 16 HPAs considerados prioritários (Kanaly & Harayama, 2000), destaca-se o fenantreno, por apresentar ampla distribuição nos ambientes aquáticos contaminados por derivados de petróleo, com concentrações que podem variar de 14,6 a 140  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Vrana, 2001; Anyakora et al., 2005). É considerado o terceiro hidrocarboneto mais abundante do grupo dos petrogênicos (Carls et al., 2002). A detecção deste composto em organismos em um ambiente natural sugere uma contaminação local por fontes petrolíferas (Correia et al., 2007; Mashroofeh et al., 2015). O pireno é outro importante HPA prioritário por sua predominância em ambientes contaminados por petróleo (Latimer e Zheng, 2003; Okay et al., 2006). O pireno pode ser encontrado nas seguintes concentrações: 21.13 g/L no criseoto, 8.51 g/L no piche e 0,017 g/L no petróleo bruto (Neff, 2002).

Os efeitos tóxicos dos HPAs envolvem biomarcadores bioquímicos e comportamentais, que podem servir como ferramentas para a compreensão de potenciais efeitos de maior relevância ecológica. O sistema de enzimas do citocromo P-450 participa da fase 1 de biotransformação de HPAs, por exemplo hidroxilando o fenantreno, de forma a torná-lo mais solúvel em água, e mais susceptível a interagir com as enzimas responsáveis pela fase 2 de biotransformação. A enzima 7-etoxiresorufina-orto-deetilase (EROD) catalisa esta reação de hidroxilação de HPAs durante a fase 1, sendo um importante biomarcador bioquímico cuja indução pode indicar a exposição de peixes a HPAs (Goksoyr e Forlin, 1992). Durante a fase 2 de biotransformação, o produto da metabolização após a fase 1 é conjugado com a glutatona por uma reação catalisada pela enzima Glutathione S-Transferase (GST). O conjugado formado pela molécula de HPA ligada à glutatona apresenta uma alta solubilidade em água, facilitando sua excreção (Huber et al., 2008). A análise da atividade da Glutathione S-Transferase (GST) é

comumente usada como parâmetro para monitoramento de espécies expostas a contaminantes (Gravato e Guilhermino, 2009). A alta variedade de ligantes possibilita à GST elevada capacidade de biotransformar um grande número de contaminantes químicos, tornando-as o maior grupo de enzimas de detoxificação (Bastos et al., 2013). Relações dose-resposta baseada nos níveis de exposição aos HPAs e atividade de enzimas de biotransformação de fase 1 e fase 2 têm sido registradas em estudos de laboratório (Lee e Anderson, 2005; Gravato e Guilhermino, 2009). Entretanto, poucos estudos vêm relacionando níveis de exposição aos HPAs, atividade enzimática e efeitos comportamentais, sendo importante a compreensão de relações entre os efeitos bioquímicos e comportamentais (Sloman et al., 2012).

A indução na atividade da GST pode gerar um efeito cascata em aspectos comportamentais dos indivíduos, quando expostos ao fenantreno. Em juvenis do peixe marinho goraz de cabeça dourada (*Sparus aurata*) expostos ao HPA fenantreno nas concentrações: 20, 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , observou-se esse efeito em cadeia, na sequência aumento da atividade de GST, redução significativa da natação espontânea na maior concentração e aumento dos efeitos letárgicos sendo também verificado uma redução nas atividades de interação social entre os juvenis (Correia et al., 2007). Juvenis da perca do mar (*Dicentrarchus labrax*) quando expostos a concentrações de pireno que variam de 70 a 10.000  $\mu\text{g L}^{-1}$  demonstraram um aumento significativo da atividade de GST, sugerindo seu envolvimento na desintoxicação do pireno, acarretando em uma redução significativa na atividade de natação dos juvenis em praticamente todas as concentrações de exposição do pireno (Almeida et al., 2012).

Efeitos comportamentais decorrentes da exposição do peixe marinho goraz de cabeça dourada (*Sparus aurata*) expostos ao fenantreno e ao pireno incluem uma resposta dose-dependente para o aumento de letargia, redução na atividade locomotora de natação interferindo diretamente em uma diminuição das interações sociais (Gonçalves et al., 2008). Efeito letárgico e alteração das trajetórias de natação também puderam ser observados em adultos de *P. vivipara* expostos à diferentes concentrações de fenantreno (Torreiro-Melo et al., 2015), diminuição da acuidade visual e da captura de presas (Carvalho et al., 2008).

A importância da avaliação de parâmetros comportamentais relacionados a atividades ecologicamente relevantes como a natação (Little e Finger, 1990) e a habilidade na captura de presas têm sido enfatizada (Weis et al., 2003 e Carvalho et al., 2008), uma vez que alterações nestes parâmetros podem levar a efeitos no crescimento,

essencial para a viabilidade de estágios iniciais de desenvolvimento e o recrutamento para populações adultas (Carvalho, 2013; Woltering, 1984). A captura de presas, em especial, é um comportamento de alta relevância ecológica, uma vez que podem estar diretamente relacionadas com o crescimento e a sobrevivência dos indivíduos (Weis et al., 2001; Kane, 2005), daí a importância de se mensurar os efeitos que os xenobióticos podem causar sobre este parâmetro comportamental.

Os HPAs presentes em óleo cru parcialmente queimado no Kwait diminuíram em 19% o crescimento do peixe marinho *Menidia beryllina* (Al-Yakoo et al., 1996). Juvenis de albacora solitária (*Pleuronectes asper*), linguado rocha (*Pleuronectes bilineatus*) e linguado do Pacífico (*Hippoglossus stenolepis*) apresentaram diminuição em seu crescimento após 30-90 dias de exposição aos sedimentos contaminados com petróleo bruto proveniente da região norte do Alaska (Moles e Norcross, 1998). Embriões de *zebrafish* expostos a um sedimento natural contendo uma mistura dos HPAs fenantreno e pireno revelaram uma interrupção no crescimento que poderia acarretar em consequências prejudiciais sobre a performance dos peixes e a contribuição nos recrutamentos futuros (Vignat et al., 2014).

Estágios iniciais de vida de peixes são tipicamente mais sensíveis a contaminantes (McKim, 1977) e o seu uso em testes ecotoxicológicos torna-se de grande importância para a compreensão dos possíveis efeitos de contaminantes no recrutamento das populações (Caley et al., 1996). O peixe estuarino *Poecilia vivipara* é um teleósteo eurialino amplamente distribuído na costa brasileira (Gomes Jr. e Monteiro, 2008), e sua reprodução por viviparidade facilita o seu cultivo em laboratório, bem como a manutenção dos jovens recém-nascidos que já nascem estruturalmente completos e semelhantes aos juvenis (Arcanjo et al., 2014). No Brasil há uma carência de testes padronizados com espécies nativas de peixes estuarinos, e adultos de *Poecilia vivipara* têm sido utilizados em estudos ecotoxicológicos de laboratório e de campo focados em diferentes grupos de poluentes ambientais (INCT-TA, 2015). Este estudo utilizará estágios iniciais de desenvolvimento de *P. vivipara* como modelos ecotoxicológicos para avaliar os efeitos letais e subletais da exposição a diferentes concentrações dos HPAs fenantreno e pireno dissolvidos na água, incluindo efeitos na atividade da GST e efeitos a nível comportamental na atividade natatória, captura de presas, bem como efeitos no crescimento.

## 2. REVISÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Ecotoxicologia

O crescimento populacional verificado nas últimas décadas, acoplado ao avanço tecnológico e ao aumento na geração de produtos agroindustriais como inseticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de petróleo, tem levado a um aumento da contaminação dos ecossistemas aquáticos por compostos químicos. Tal fato vem contribuindo para a redução da qualidade dos diversos compartimentos ambientais (água, sedimento, ar e solo), bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas (Cajaraville et al., 2000).

A ecotoxicologia surge como uma ciência que estuda os efeitos deletérios não-intencionais causados por estes compostos químicos em ecossistemas e organismos constituintes (Walker et al., 2005). O ambiente aquático é um meio invariavelmente atingido por poluentes ambientais, sejam eles provenientes de efluentes domésticos e/ou industriais. Outra fonte de poluição pode estar relacionada com as águas de chuva que atuam como fontes não pontuais, trazendo poluentes atmosféricos e lixiviando os contaminantes de atividades dispersas nos habitats terrestres, como agricultura e áreas urbanas, para os ecossistemas aquáticos.

A preocupação com a contaminação dos sistemas aquáticos tem crescido no meio científico, e a ecotoxicologia proporciona ferramentas para avaliação dos efeitos biológicos gerados nos organismos aquáticos. Os efeitos biológicos quantificados permitem estabelecer relação entre a concentração dos produtos químicos e a resposta biológica que se manifesta nos organismos, considerando efeitos letais e subletais. Estudos de mortalidade fundamentam-se em testes de toxicidade agudos, em que o tempo de exposição ao contaminante é relativamente curto, e geram dados acerca da dose ou concentração letal dos contaminantes. Este potencial de letalidade é frequentemente expresso como a concentração letal a 50% dos organismos expostos num tempo padronizado de exposição ao contaminante, tipicamente 96 h, e é representada pela sigla CL50<sub>96h</sub> (Costa, 2008).

Por outro lado, efeitos subletais são aqueles que não conduzem a uma letalidade do indivíduo, mas o afetam, alterando seu desempenho ecológico. Efeitos subletais podem ser avaliados tanto em situações de exposições de curto prazo a contaminantes (agudas) quanto em exposições mais longas (crônicas), e compreendem a quantificação de efeitos biológicos que abrangem mudanças nos indivíduos afetados a nível genético,

bioquímico, histológico, fisiológico e comportamental (Brewer et al., 2001). Estudos de efeitos subletais podem ser utilizados para observar se este desempenho ecológico alterado está relacionado a um conjunto de processos do organismo, que vão desde alterações nas vias metabólicas e efeitos a nível celular, levando a alterações no desenvolvimento morfológico e atingindo o nível comportamental, seja na habilidade de natação, no processo de captura de presas, fuga de predadores, ou habilidades reprodutivas (Scott e Sloman, 2004).

Na ecotoxicologia, aspectos comportamentais fornecem uma importante perspectiva entre os organismos e como eles interpretam o seu ambiente, seja no aspecto ecofisiológico, seja no âmbito da ecologia de populações (Little e Brewer, 2005). Vogl et al. (1999) ressaltam ainda que os mecanismos da ação tóxica são caracterizados pela ação primária dos contaminantes em seu sítio de ação em biomoléculas do próprio organismo, e também pelos efeitos secundários que são caracterizados pela ação tóxica a nível fisiológico e comportamental, incluindo efeitos na reprodução e no crescimento. Os contaminantes quando entram em contato com os organismos podem apresentar diferentes mecanismos de ação tóxica, que podem ocorrer a níveis celular e molecular, e potencialmente atingir efeitos a nível individual, populacional e de comunidades (Kramer et al., 2011). Estudos sobre os efeitos dos compostos químicos em um nível de organização biológica podem explicar as consequências ecotoxicológicas nos níveis biológicos superiores (Carvalho, 2013).

Para quantificar alterações biológicas, os testes ecotoxicológicos utilizam biomarcadores e bioindicadores que evidenciam os efeitos da exposição dos organismos a contaminantes. A compreensão sobre as consequências dos efeitos tóxicos nos diferentes níveis de organização ecológica deve ser reforçada a partir destes conceitos.

Biomarcadores são definidos como medidas quantitativas do efeito biológico de contaminantes em organismos expostos aos mesmos. O biomarcador, portanto, é uma medida de efeitos a nível suborganísmico e organísmico, incluindo alterações em processos moleculares e bioquímicos, estruturas e funções celulares, organização estrutural de tecidos, que podem levar a problemas de caráter fisiológico, e ainda alterações comportamentais, que podem inviabilizar o indivíduo de se adaptar ao meio ambiente (Walker et al., 2005).

O conceito de bioindicadores de poluição como parâmetros quantitativos que podem ser medidos é mais frequentemente associado a níveis mais altos de organização biológica, como proposto por Van Gestel e Brumelen (1996) em estudos de diferentes

populações e comunidades de ecossistemas impactados por compostos químicos. Pode-se considerar, portanto bioindicadores como parâmetros avaliados em níveis biológicos superiores ao nível de indivíduo, como população e comunidade. Para o nível de população destacam-se as taxas de fecundidade, nascimento e mortalidade. Já para o nível de comunidade pode ser ressaltada a alteração da diversidade de espécies em um determinado local contaminado por um ou mais compostos.

## **2.2 Uso de peixes em ensaios ecotoxicológicos**

Os peixes têm importância ecológica e econômica, representando o grupo mais diverso de vertebrados (Nelson, 2006), podendo ser encontrados nos diferentes ambientes marinhos, de água doce ou estuarinos através do globo. Em termos ecológicos, peixes exercem uma variedade de funções em seu habitat atuando no equilíbrio de teias alimentares como predadores e como presas, se tornando assim um importante grupo para estudos de avaliação dos efeitos de contaminantes nos sistemas biológicos (Rand, 2008). Peixes podem ser desde herbívoros até predadores de topo nas cadeias alimentares (Gerking, 1994). Espécies consideradas consumidores de topo na cadeia alimentar podem bioacumular e biomagnificar contaminantes orgânicos hidrofóbicos como alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Xia et al., 2015) ou metilmercúrio para os seus tecidos (Barak, 1990). Para Scott e Sloman (2004) o uso de peixes em estudos toxicológicos é relevante, pela importância destes organismos como bons modelos de espécies que expressam alterações evidentes e quantificáveis, utilizando biomarcadores ou bioindicadores.

Vários critérios são levados em consideração para a seleção e utilização das diferentes espécies de peixes nos testes toxicológicos, das quais podemos destacar: (I) A abundância da espécie para estudos de campo e a facilidade de manuseio para estudos em laboratório (Flammarion et al., 2002); (II) O conhecimento sobre a fisiologia e estratégias de alimentação e reprodução (Rand, 2008).

O teste de toxicidade aguda com peixes formou a base para o primeiro protocolo de testes de toxicidade da American Society for Testing and Materials (ASTM) (APHA, 1960). Devido a sua importância, algumas espécies de peixes são utilizadas como organismos-teste em testes padronizados de laboratório a nível mundial, em especial as espécies de água doce *Danio rerio*, *Pimephales promelas* e *Oryzias latipes*.

Os animais aquáticos são particularmente vulneráveis por causa dos riscos elevados decorrentes da sua vida imersa no meio de exposição (água de superfície), visto que suas brânquias são altamente permeáveis. Peixes e anfíbios, por exemplo, são os únicos grupos de vertebrados com ovos anamnióticos (falta uma concha ou membrana amniótica) e que se submetem à metamorfose em águas superficiais potencialmente contaminadas. Desta forma, os estágios embrio-larvais destes animais tendem a ser altamente sensíveis a poluentes químicos (Kendall et al., 2001). Viarengo et al. (2007) apontam que em ambientes aquáticos, o uso de peixes e moluscos para a avaliação de biomarcadores ecotoxicológicos têm se aplicado de forma bem mais eficiente no monitoramento de poluição aquática.

Os peixes desempenham papel central em testes de toxicidade para avaliação de efeitos ecológicos, e são importantes modelos para biomonitoramento, devido às tendências para receber e acumular contaminantes ambientais aquáticos, além da sua importância em termos de diversidade taxonômica e funcional, ocupando diferentes níveis tróficos nos ecossistemas aquáticos (Di Giulio et al., 2008). Apesar dos inúmeros desafios para estudos sobre ecotoxicologia em peixes, os pesquisadores têm desempenhado esforços significativos para identificar e propor espécies-modelo que possam prever os riscos da poluição para os peixes. Algumas espécies que são comumente usadas como modelos em estudos ecotoxicológicos são: o “fathead minnow” *Pimephales promelas*, o paulistinha ou “zebrafish” *Danio rerio*, a carpa comum (*Cyprinus carpio*), a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), o peixe dourado (*Carassius auratus*), o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) e o “medaka” nativo do Japão (*Oryzias latipes*) (Almeida et al., 2012).

No Brasil os ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos são requeridos por diversos instrumentos legais voltados à proteção da biota em corpos hídricos brasileiros, e a única norma técnica padronizada ABNT-NBR 15499 (ABNT, 2007) para testes ecotoxicológicos com peixes envolve as espécies exóticas de água doce *Danio rerio* e *Pimephales promelas*, e envolve a utilização de estágios iniciais de desenvolvimento destas espécies (Bertoletti, 2009).

No Brasil a maioria das espécies de peixes utilizados em ensaios ecotoxicológicos são de água doce, e é necessário que sejam desenvolvidos estudos com espécies nativas estuarinas ou marinhas. Em meio a esse problema o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática (INCT-TA) do CNPq vem desenvolvendo metodologias de avaliação de efeitos de contaminantes em laboratório utilizando a

espécie *Poecilia vivipara*, com o objetivo de aplicá-las no biomonitoramento de ambientes aquáticos.

*Poecilia vivipara* é considerado um peixe teleósteo eurialino e com elevada tolerância a ambientes extremos, particularmente de salinidade e temperatura (Trexler, 1989). Bizerril (2001) aponta a espécie como uma das poucas que ocorrem em todos os ambientes lênticos. Gomes Jr. e Monteiro (2008) afirmam que a presença da espécie em ambientes de lagoa pode ter ocorrido devido ao gradiente ambiental de salinidade que ocorreu no passado com as sucessivas elevações e regressões do nível do oceano.

*P. vivipara* tem sido empregado em estudos ecotoxicológicos com diversos tipos de contaminantes. (Torreiro-Melo et al., 2015) verificaram que o HPA fenantreno dissolvido na água em concentrações entre 50 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  se bioconcentra na bile e gera alterações comportamentais na velocidade, resistência e trajetória natatória. O HPA fenantreno nas concentrações entre 20 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  causa genotoxicidade e gera estresse oxidativo e peroxidação lipídica em *P. vivipara* (Machado, 2014). Foram sequenciados 27 genes expressos diferencialmente em *P. vivipara* expostos à fração solúvel em água de óleo diesel (Mattos et al., 2010).

A exposição de *P. vivipara* ao cobre nas concentrações entre 5 e 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  causou aumento da atividade da enzima antioxidante catalase no fígado, de espécies reativas de oxigênio, da capacidade antioxidante e lipoperoxidação lipídica, e da capacidade antioxidante contra radicais peroxila (Machado et al., 2013). Além disso, genes responsáveis pelo metabolismo de cobre, como o transportador de cobre de alta afinidade (CTR1) e a ATPase transportadora de cobre (ATP7B) foram sequenciadas em *P. vivipara*, tendo sido demonstrado o papel destes genes na acumulação de cobre tanto em água doce como em água salgada (da Silva et al., 2014). O cobre causou inibição da excreção de amônia e da anidrase carbônica branquial em *P. vivipara* tanto em água doce como estuarina (Zimmer et al., 2012).

Machos de *P. vivipara* expostos ao herbicida glifosato (roundup) apresentaram redução da qualidade do esperma em termos de mobilidade e concentração de células espermáticas, bem como redução da integridade da membrana plasmática (Harayashiki et al., 2013).

### 2.3 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs):

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são compostos orgânicos formados por dois ou mais anéis benzênicos fusionados de forma linear, angular ou conglomerada (Neff, 2002; Chefetz, 2000). Podem ser organizados em duas categorias quanto ao seu peso molecular (PM): compostos de baixo PM, com até três anéis aromáticos; e os compostos de alto PM, com quatro ou mais anéis (CEPA, 1994).

A persistência dos HPAs no ambiente também está relacionada ao seu peso molecular, sendo os de menor peso menos persistentes em razão da maior volatilidade, maior solubilidade na água e biodegradação simplificada (Wilson, 1993; Wilcock, 1996; Walker, 2001).

Devido à natureza hidrofóbica dos HPAs, estes tendem a adsorver ao sedimento, à matéria particulada, e ao tecido orgânico (Lyman, 1982; Orecchio, 2010). Os HPAs de alto peso molecular possuem maior potencial de bioacumulação, apesar de raramente acarretarem em biomagnificação na cadeia trófica por serem, em maioria, rapidamente metabolizados (Eisler, 1987; Meador, 1995).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos podem ocorrer na sua forma parental (i.e., fenantreno, criseno) ou como um homólogo alquilado (i.e., 1-hidroxipireno), que possuem diferentes graus e mecanismos de toxicidade (Cooke & Dennis, 1984 e Haritash & Kaushik, 2009).

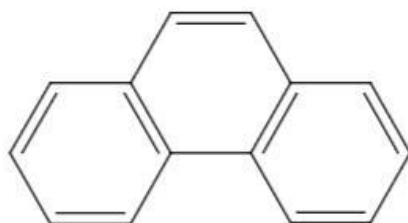
Os HPAs podem ser divididos em três subgrupos segundo a sua origem: pirogênica, petrogênica e biogênica. Os HPAs pirogênicos são formados a partir da combustão incompleta de matéria orgânica em altas temperaturas, que pode ocorrer por causas naturais (i.e., erupções vulcânicas, queimadas espontâneas), ou antrópicas (i.e., queima de biomassa e combustíveis fósseis). Neff e Anderson (1975) e Ravindra (2006) ressaltam que a pirogênese representa a maior fonte de hidrocarbonetos apresentando entre 3 e 5 anéis aromáticos, os quais são majoritariamente carregados adsorvidos na matéria particulada.

O subgrupo dos HPAs petrogênicos, em sua maioria consistindo de moléculas de baixo peso molecular, encontram-se nos combustíveis fósseis e nos produtos do refino do petróleo, podendo constituir até 38% dos mesmos (Neff e Anderson, 1975). Os HPAs petrogênicos são um subgrupo extensamente biodisponível, possuindo alta relevância biológica e ecotoxicológica, visto sua entrada nos sistemas ecológicos através da água e do ar (Thorsen, 2004).

O subgrupo composto pelos biogênicos e diagênicos são tratados por Neff (2005) como os de menor relevância em termos de contaminação ambiental, sendo formados por precursores orgânicos naturais, químicos e biológicos.

### 2.3.1 Fenantreno

O fenantreno é um hidrocarboneto aromático polinuclear, cristalino, isômero do antraceno, obtido principalmente da fração de óleo de antraceno de alcatrão de hulha e de forma sintética. Carls et al. (2002) ressaltam a importância do fenantreno como o terceiro hidrocarboneto mais abundante do subgrupo dos petrogênicos, Figura 1.



**Figura 1.** Estrutura molecular do HPA Fenantreno (*Fonte: Mackay et al., 2006*).

A solubilidade do fenantreno na água é de  $1,29 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\log K_{ow}$  é 4,6 e seu peso molecular é igual a  $178,23 \text{ g mol}^{-1}$  (Mackay et al., 2006). Visto sua potencial toxicidade, o fenantreno compõe a lista dos dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos prioritários segundo a USEPA (ATSDR, 2007).

O fenantreno é amplamente distribuído no meio aquático com concentrações que variam de  $14,6$  a  $1460 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  como apresentado por Vrana (2001) e Anyakora et al. (2005). Quando presente no ambiente aquático em concentrações elevadas o fenantreno tende a ser absorvido pela biota aquática levando a efeitos toxicológicos indesejáveis. Oliveira (2012) observou diminuição da atividade de EROD na tainha dourada (*Liza aurata*) em baixas concentrações de fenantreno.

Observações realizadas por Jee et al. (2004) apontam para diminuição nas taxas de crescimento em *Paralichthys olivaceus* com o aumento das concentrações de fenantreno na água em exposição de 2 semanas. Alterações hematológicas também puderam ser observadas no trabalho do mesmo autor, ressaltando diminuição na contagem de células vermelhas e indicação de anemia, nos peixes expostos às maiores concentrações.

### 2.3.2 Pireno

O pireno é um hidrocarboneto composto de 4 anéis aromáticos, com fórmula química  $C_{16}H_{10}$ , geralmente originado de fontes pirogênicas e petrogênicas. Pode estar presente em concentrações de 18 ppm no petróleo bruto, até 8.517 ppm e 21.131 ppm no piche e creosoto, respectivamente (Neff, 2002). Segundo Mackay et al. (2006), a solubilidade deste composto na água é de  $0,132 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\log K_{ow}$  é 5,18 e seu peso molecular é relativamente elevado e igual a  $202,25 \text{ g mol}^{-1}$ , Figura 2.



**Figura 2.** Estrutura molecular do HPA Pireno (*Fonte: Kanaly & Harayama, 2000*).

O pireno é um dos HPAs predominantes no ambiente (Okay et al., 2006) e representa grande parte dos hidrocarbonetos encontrados em áreas contaminadas (Latimer e Zheng, 2003). Zhang et al. (2004) e Dissanayake e Bamber (2010) ressaltam a importância deste composto no monitoramento de águas contaminadas.

Almeida et al. (2012) descrevem o pireno como um composto capaz de se difundir rapidamente pelos tecidos, bem como de cruzar a barreira hematoencefálica em peixes, apesar deste composto não apresentar caráter carcinogênico.

### 2.4 Biomarcadores ecotoxicológicos

O termo biomarcador tem origem na toxicologia humana e farmacologia, tendo sido incorporado a Ecotoxicologia, na qual se tornou conceito chave (Souza e Carvalho, 2009). O conceito de biomarcadores tem sido abordado de diferentes formas como um reflexo de seu intenso uso nas ciências ambientais nas décadas passadas e nos tempos atuais, como ressaltado por Schlenk (1999); Depledge (1992) e Adams (1987).

Weis et al. (2001) ressaltam a importância do uso de biomarcadores em estudos ecotoxicológicos, em razão do fornecimento de indícios precoces de efeitos biológicos significativos, visto que respostas em níveis mais baixos da organização biológica precedem aquelas que ocorrem em níveis mais elevados. Entretanto, a correta identificação do agente de estresse ou contaminante, é um dos pontos-chave para o uso de biomarcadores no monitoramento da saúde ambiental (Parente, 2014). Neste sentido, Depledge (1992) conceitua que em ecotoxicologia a avaliação de biomarcadores envolve medidas que podem incluir avaliações desde níveis subcelulares de organização biológica até o nível de indivíduos, abrangendo efeitos a nível molecular, bioquímico, fisiológico, histológico, morfológico e comportamental, que caracterizem uma alteração com relação a uma situação controle.

#### **2.4.1 Biomarcadores bioquímicos**

A compreensão dos efeitos ecotoxicológicos em níveis subcelulares são de extrema importância para a compreensão dos efeitos existentes nos níveis hierárquicos mais elevados.

A biotransformação de contaminantes orgânicos ou xenobióticos como os HPAs pode ser classificada em três fases distintas, porém estritamente relacionadas: fase I, II e III. Nas fases I e II, geralmente se observa a transformação do xenobiótico em uma espécie que apresenta maior solubilidade em água. Na fase III, estes metabólitos são transportados para o exterior da célula e então excretados.

O sistema de enzimas denominadas monoxigenases de função mista, ou enzimas do citocromo P-450, participam da fase 1 de biotransformação de HPAs, por exemplo hidroxilando o fenantreno, de forma a torná-lo mais solúvel em água, e mais susceptível a interagir com as enzimas responsáveis pela fase 2 de biotransformação. A enzima 7-etoxiresorufina-orto-deetilase (EROD) catalisa esta reação de hidroxilação de HPAs durante a fase 1, e se tornou um importante biomarcador bioquímico relativamente específico, e cuja indução pode indicar a exposição de peixes a HPAs (Goksoyr e Forlin, 1992). O uso da atividade de EROD como um biomarcador ambiental foi sugerido há 40 anos (Burke, 1974). O principal objetivo dos estudos que tratam da atividade de EROD tem sido o de avaliar os efeitos bioquímicos detectados em peixes expostos a poluentes relativamente específicos, incluindo os HPAs (Galgani, 1991; Lee e Anderson, 2005).

Durante a fase 2 de biotransformação, o produto da metabolização após a fase 1 é conjugado com a glutatona por uma reação catalisada pela enzima Glutathione S-Transferase (GST). O conjugado formado pela molécula de HPA ligada à glutatona apresenta uma alta solubilidade em água, facilitando sua excreção. Desta forma, a GST é outra enzima de biotransformação comumente usada como parâmetro para monitoramento de espécies expostas a contaminantes, incluindo os HPAs (Gravato e Guilhermino, 2009).

Billiard et al. (1999) observaram que larvas de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* expostas ao reteno (7-isopropyl-1-methylphenanthrene) apresentaram aumento na atividade da EROD, em associação com edema perivitelínico, hemorragia subcutânea, diminuição do crescimento e deformidades craniofaciais.

A indução da atividade de enzimas de biotransformação e de estresse oxidativo se correlacionou com efeitos em aspectos comportamentais relacionados ao baixo desempenho na velocidade de natação em camarões (*Palaemon serratus*) expostos em concentrações de 128 a 1024  $\mu\text{g.L}^{-1}$  do HPA antraceno ao longo de 96 h (Gravato et al., 2014).

#### **2.4.2 Conceitos sobre biomarcadores comportamentais**

Na ecotoxicologia, efeitos comportamentais fornecem uma perspectiva importante entre os organismos e como eles interpretam e respondem ao meio ambiente, entre a ecofisiologia e a ecologia de populações (Little e Brewer, 2005). Estas ligações essenciais precisam ser melhor compreendidas (Amiard-Triquet, 2009), a fim de atribuir fatores de risco adequados aos contaminantes ambientais em relação à proteção da biodiversidade.

Parâmetros comportamentais foram incluídos no conceito de biomarcador ecotoxicológico por Depledge et al. (1995). Os biomarcadores comportamentais de contaminantes em peixes são definidos como medidas quantitativas de habilidades adaptativas que contribuem para a sua aptidão evolutiva, sendo assim importantes para a sobrevivência, crescimento e/ou reprodução. Idealmente também devem apresentar baixa variabilidade, e indicar resposta dose-dependente (Beitinger, 1990). Além disso, os efeitos comportamentais medidos em indivíduos integram processos fisiológicos importantes essenciais à vida, permitindo o ajuste de processos homeostáticos internos

que conduzem à eficiente exploração de recursos em um determinado habitat (Little e Brewer, 2005).

Vários estudos têm demonstrado que as funções comportamentais são frequentemente as primeiras respostas de alteração biológica exibidas após a exposição aos contaminantes (Little et al. 1990). Além disso, os efeitos comportamentais deletérios que diminuem a adaptabilidade dos indivíduos tendem a aparecer com frequência em concentrações significativamente abaixo da  $CL_{50}$  (concentração letal a 50 por cento da população de teste). As concentrações de contaminantes que induzem alterações na natação, comportamento de captura de presas ou fuga de predadores em peixes expostos pode ser inferior a 2 por cento da  $CL_{50}$  (Beitinger 1990; Little et al. 1993).

Declínios populacionais de recursos pesqueiros podem ocorrer devido ao efeito agudo de mortalidade em indivíduos expostos a concentrações letais dos contaminantes, quando da ocorrência de acidentes graves. No entanto, efeitos subletais crônicos, como alterações no comportamento, podem levar à chamada morte ecológica (Scott e Sloman, 2004), situação em que os indivíduos não podem mais se alimentar, crescer, reproduzir e evitar predadores de forma satisfatória.

Ajustes adequados nas legislações ambientais e sua aplicação sobre o controle de efluentes tendem a minimizar a frequência de ocorrência de efeitos agudos de mortalidade de peixes devido a grandes derramamentos de produtos químicos, em comparação com a ocorrência de efeitos subletais de contaminantes em sistemas aquáticos. Se este cenário não mudar, a avaliação dos efeitos comportamentais se tornará ainda mais importante, pois elas são consideradas indicadores mais sensíveis do potencial de impactos na sobrevivência ecológica no habitat natural, quando comparados com as medidas de letalidade (Robinson, 2009). Como exemplo desta idéia, o bluegill (*Lepomis macrochirus*) exposto ao flúor apresentou uma redução na alimentação em estudos de laboratório, e estes resultados previram com precisão uma redução no crescimento e sobrevivência em estudos mais ambientalmente realistas em que a espécie foi exposta ao mesmo contaminante numa comunidade aquática de mesocosmos experimentais (Finger et al., 1985).

O recrutamento das fases iniciais de vida para a fase adulta é um processo fundamental na manutenção de uma população de peixes. Portanto, é importante avaliar se a contaminação química é um agente que afeta significativamente o processo de recrutamento das populações, seja de maneira isolada, ou em combinação com outros fatores ecológicos no ciclo de vida dos peixes. Informações derivadas da teoria



Little et al. (1990) afirmam que vários estudos têm demonstrado que as funções comportamentais são as primeiras a serem alteradas e exibidas em peixes expostos aos contaminantes, antes de qualquer mortalidade ficar evidente. Por exemplo, uma revisão feita por Little e Finger (1990) revelou que as menores concentrações de diferentes contaminantes que induziram alterações comportamentais significativas na natação de peixes variaram de 0,1% a 5% da CL50 de cada contaminante. A sensibilidade do comportamento alimentar como um índice de efeitos da exposição subletal em truta arco-íris expostas a vários agroquímicos variou de menos de 0,3% a 50% da CL50 destes compostos (Little et al., 1990). O comportamento de natação também pode ser afetado antes de serem detectadas reduções no crescimento. Por exemplo, a atividade natatória foi significativamente reduzida em trutas arco-íris expostas por 96h a 0,005 mg.L<sup>-1</sup> de um defoliante organofosforado, sendo que esta mesma concentração afetou o crescimento somente após 30 dias (Little et al., 1990).

A sobrevivência de peixes no estágio inicial de vida diminuirá se o desenvolvimento do comportamento de forrageamento for atrasado ou inibido. Comportamento alimentar prejudicado também se correlaciona com crescimento reduzido, o que pode prolongar o período de vida em que um peixe é vulnerável à predação (Werner e Hall, 1974).

#### **2.4.2.1 Atividade natatória**

A atividade natatória espontânea é útil em estudos de toxicidade devido a sua fácil avaliação e sensibilidade. Medições do comportamento natatório são indicadores consistentes que podem ser incorporados em protocolos padronizados para testes de toxicidade (Little e Finger, 1990).

A atividade natatória pode ser expressa em relação a uma situação considerada normal, a partir da qual há um aumento (hiperatividade) ou diminuição (hipoatividade), sendo que ambas situações podem conferir vantagens e desvantagens. A hipoatividade natatória é um problema na capacidade de formação de cardumes. A hipoatividade também pode apresentar desvantagens no forrageio e captura de presas, além de dificultar a fuga de predadores, tornando o indivíduo mais suscetível à predação (Finger et al., 1985; Weis et al., 2001). A hiperatividade natatória, por sua vez, pode ocasionar vantagens no sentido de permitir maior facilidade de fuga ao predador. No que se refere ao

comportamento de forrageio, a hiperatividade pode propiciar maior percurso e exploração de hábitat, aumentando assim as chances de encontro e captura de presas, e consequentemente permitindo maior crescimento dos organismos (Little, 1990).

Métodos de avaliação de natação espontânea e quantificação da velocidade natatória variam de medidas semi-quantitativas baseadas em contagens diretas de quadrados que o peixe cruza num sistema de grid, a análises sofisticadas executadas por programas específicos, que analisam vídeos registrados em 2 ou até 3 dimensões (Carvalho et al., 2013).

#### **2.4.2.2 Captura de presas**

Os poluentes quando em contato com os diferentes organismos podem alterar sua habilidade de forrageamento, conceituado por Weis e Khan (1990) como uma interação predador-presa, que podem levar por sua vez a alterações na dinâmica populacional tanto dos predadores, quanto das próprias presas. Mudanças no comportamento de forrageamento podem ocasionar alterações significativas na dinâmica de comunidade de um determinado ecossistema (Sandheinrich e Atchison, 1990).

As alterações na capacidade de um peixe para detectar, perseguir, capturar e consumir presas afetará o crescimento e a sobrevivência do mesmo, e estas variáveis comportamentais podem fornecer uma medida ecologicamente relevante de lesões induzidas por contaminantes. Contaminantes têm causado efeitos em diversos aspectos da sequência de alimentação, incluindo a detecção de alimentos (Lemly e Smith, 1987), captura de presas (Little et al., 1990), o tempo de manuseio e ingestão das mesmas (Sandheinrich e Atchison, 1990), bem como a motivação geral para se alimentar (Little et al., 1990). Assim, inúmeras variáveis do comportamento alimentar podem ser mensuradas em ensaios de toxicidade. O ambiente experimental para tais estudos pode variar em complexidade, dependendo do grau de realismo ecológico, como também pode ser facilmente adaptado para procedimentos de ensaio padronizados de toxicidade (Mathers et al., 1986).

Beitinger (1990) afirma que a habilidade de um peixe para realizar predação em um determinado estágio de seu ciclo de vida envolve a integração de domínio sobre o hábitat que o mesmo ocupa, atrelado às habilidades sensoriais como predador, tais como: visual, olfativa, sensibilidade a alterações na pressão, bem como habilidade de natação. Esses fatores podem garantir o sucesso ou eliminação deste indivíduo em um ambiente poluído.

Uma sequência de comportamentos utilizados desde a localização até a captura da presa podem ser elencados em eventos discretos: procurar, reconhecer a presa, perseguir, atacar, manipular e subjugar a presa até sua ingestão completa, seguida da passagem para a porção inferior do trato digestivo (Webb, 1986). Exames cuidadosos dos comportamentos envolvidos em cada um destes eventos têm conduzido a um melhor entendimento das estratégias de busca, gasto de energia durante a procura, e influência ambiental e do desenvolvimento no sucesso da captura. Entender as bases comportamentais da predação contribui para paradigmas centrais da ecologia, tais como a teoria de forrageamento ótimo (Fuiman et al., 2006).

Zhou et al. (2001) afirmam que a redução na ingestão de alimento pode causar redução no crescimento e prolongamento das fases larval e juvenil, aumento do risco de predação por predadores de níveis mais elevados na cadeia alimentar, ocasionando diminuição na sobrevivência.

## 2.5 Crescimento

A avaliação de efeitos de contaminantes no crescimento é importante nos estudos ecotoxicológicos, visto sua elevada relevância ecológica. Woltering (1984) descreve o crescimento como um parâmetro que, em conjunto com avaliações da sobrevivência e mudanças fisiológicas e comportamentais, pode ser usado como efeito quantificável em testes laboratoriais de toxicidade em peixes.

Estudos realizados por Moles e Norcross (1998) demonstram que o crescimento foi reduzido em juvenis de linguado expostos cronicamente a baixas concentrações (1.6 ppm) de uma fonte de petróleo contendo HPAs em sedimentos. A exposição do peixe marinho *Menidia beryllina* por 16 dias a água contendo uma fração solúvel de petróleo bruto do Kwait parcialmente queimado causou uma redução concentração dependente do crescimento (Al-Yakoob et al. (1996).

Diferentes misturas de HPAs de origem pirolítica e petrogênica dissolvidas na água afetaram o crescimento de paulistinha *Danio rerio*. Além disso, observou-se maior interferência no crescimento das fêmeas pela exposição a HPAs pirolíticos dissolvidos na água, e maior redução nas taxas de crescimento dos machos em exposições a frações dissolvidas na água derivadas de petróleo combustível pesado e leve (Vignet et al. (2014).

## 2.6 Importância dos estágios iniciais de desenvolvimento

Estágios iniciais de desenvolvimento em peixes incluem a fase embrionária, larval e juvenil, e cada fase destas faz parte do desenvolvimento ontogenético de peixes. A sobrevivência ao longo destas fases é de grande importância no ciclo de vida dos teleósteos, pois define o recrutamento dos indivíduos (Caley et al., 1996; Marty et al., 1997). Conforme discutido anteriormente com base no diagrama da Figura 4, estudos com estágios iniciais de vida de peixes são importantes para entender possíveis efeitos populacionais a partir de consequências da exposição a contaminantes em diversos aspectos relacionados a natação, alimentação, evasão de predadores, e crescimento.

Payne et al. (2003) afirmam que peixes na fase embrionária e larval exibem maior sensibilidade a contaminantes quando comparados aos adultos. Um clássico exemplo se refere ao incidente petrolífero que ocorreu com o Exxon Valdez na costa do Alaska, EUA. Tal acidente ocasionou interferência direta no recrutamento do arenque do Pacífico *Clupea pallasii* e do salmão rosa *Oncorhynchus orbuscha* (Carls et al., 2002).

Esta maior sensibilidade dos estágios iniciais pode estar relacionada a ação tóxica dos contaminantes na geração de malformações em diferentes tecidos, como é o caso dos efeitos cardiotoxicos de HPAs em estágios iniciais de diversas espécies de peixe. O mesmo padrão de efeitos cardiotoxicos em embriões de peixes teleósteos tem sido evidenciado pela acumulação de fluidos (edema) no espaço pericárdico. Diversos estudos têm demonstrado que o coração em desenvolvimento é um órgão alvo chave para a toxicidade de diversos tipos de petróleo bruto em espécies tropicais como o atum de cauda azul *Thunnus thynnus*, atum de cauda amarela *Thunnus albacares* e o amberjack *Seriola dumerili*, cujas larvas foram afetadas no recente acidente envolvendo a plataforma Deep Water Horizon no Golfo do México (Incardona et al., 2014). O mesmo padrão de efeitos cardiotoxicos foi detectado em larvas de espécies polares como o arenque do pacífico

*Clupea pallasii* no caso do derrame do navio Exxon Valdez no Alaska (Incardona et al., 2013), e em espécies modelo da Ecotoxicologia, como o paulistinha *Danio rerio*, em que foram descritos os primeiros sinais de cardiotoxicidade de HPAs (Incardona et al., 2004).

Outro aspecto importante que torna estágios iniciais de desenvolvimento mais propensos ou sensíveis aos efeitos tóxicos de contaminantes são os efeitos no desenvolvimento ou no funcionamento de órgãos e sistemas sensoriais como a visão, olfato e linha lateral, com consequências para os processos comportamentais já mencionados. Além disso, efeitos de diversos contaminantes nos sistemas endócrino e

nervoso de estágios iniciais de desenvolvimento de peixes também têm sido detectados, em correlação com alterações tanto no funcionamento destes órgãos sensoriais quanto a nível comportamental, conforme revisado recentemente por (Sloman & McNeil, 2012).

Os poecilídeos apresentam uma variedade de adaptações reprodutivas e se reproduzem ao longo de todo o ano (Mendonça, 2001), sendo espécies na maioria bissexuadas e vivíparas (Greven, 2011), incluindo *Poecilia vivipara*. A espécie se reproduz por fecundação interna, onde todo o desenvolvimento embrionário deste grupo ocorre dentro da fêmea, o que possibilita que os recém-nascidos tenham a forma de alevinos, logo após o nascimento (Rocha et al., 2010). Para o mesmo autor, a salinidade não interfere na taxa de fecundidade da espécie, sendo obtidos uma média de  $(12,2 \pm 0,836)$  alevinos por fêmea. O autor descreve ainda o comportamento de canibalismo dos juvenis, quando as fêmeas grávidas não são separadas do grupo.

Arcanjo et al. (2014) em trabalhos com desenvolvimento embrionário em *P. vivipara*, identificaram um tamanho padrão de maturidade sexual entre os adultos, em torno de 12,28 a 35,98 mm, sendo o menor macho identificado de 14,62 mm. Os machos de *P. vivipara* possuem um gonopódio com o órgão copulador, formado a partir do terceiro raio da nadadeira anal, a gestação das fêmeas dura entre 30 e 40 dias, e após este período os filhotes já nascem totalmente formados (Ihering, 1938), passíveis de serem alimentados exclusivamente com náuplios de *Artemia*, sem necessidade de se cultivar rotíferos ou microalgas, como é o caso de outras espécies de peixes marinhos. Além disso, o seu cultivo e reprodução em laboratório também é viável. Tais características evidenciam o potencial da utilização de juvenis de *P. vivipara* logo após o nascimento como um bom modelo ecotoxicológico para ambientes estuarinos. A espécie *P. vivipara*

é abundante em estuários de praticamente toda a costa brasileira, e a sua disponibilidade a torna um modelo biológico promissor para avaliação dos efeitos de hidrocarbonetos de petróleo. Conforme discutido no tópico 1.2, no Brasil há uma carência de testes padronizados com espécies nativas de peixes costeiros e marinhos, e adultos de *P. vivipara* já têm sido utilizados em estudos ecotoxicológicos de laboratório e de campo focados em diferentes grupos de poluentes ambientais. Esta proposta utilizará pela primeira vez estágios iniciais de desenvolvimento desta espécie, visando aperfeiçoar um teste ecotoxicológico útil para a avaliação do risco ecológico da exposição de peixes a contaminantes ambientais, testando os hidrocarbonetos aromáticos fenantreno e pireno, relevantes em acidentes ambientais relacionados à indústria do petróleo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Desenvolver ensaios ecotoxicológicos focados na avaliação de biomarcadores bioquímicos e comportamentais utilizando jovens recém-nascidos de *Poecilia vivipara* como organismos teste, após exposição aos contaminantes fenantreno e pireno.

#### 3.2 Específicos

**3.2.1** Operacionalizar a obtenção de juvenis recém-nascidos de *Poecilia vivipara* a partir de cultivo em laboratório da espécie;

**3.2.2** Expor juvenis recém-nascidos da espécie *P. vivipara* durante 7 e 14 dias a diferentes concentrações do hidrocarboneto aromático fenantreno e pireno, respectivamente.

**3.2.3** Após a exposição, quantificar efeito bioquímico na enzima de fase II GST, efeitos comportamentais na velocidade natatória e distância percorrida, na eficiência para captura de presas e no crescimento.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1 Manutenção e obtenção dos animais

Os recém-nascidos de *Poecilia vivipara* foram obtidos a partir de plantel de reprodutores mantidos em laboratório. Machos foram mantidos em conjunto com as fêmeas na proporção (1 macho : 2 fêmeas) em aquários de 100 L, em salinidade 25 e temperatura de  $26 \pm 1$  °C (média  $\pm$  desvio padrão). A alimentação foi realizada utilizando-se uma solução contendo náuplios de *Artemia sp.* cujo peso úmido era diluído em água salgada até a obtenção de uma concentração de  $15 \text{ g L}^{-1}$ , equivalente a aproximadamente 450 náuplios de *Artemia sp.* A água dos aquários foi constantemente recirculada por um sistema de filtração mecânica e biológica. A concentração de amônia total se manteve abaixo de  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ . O pH ( $8,2 \pm 0,1$ ) e oxigênio dissolvido ( $5,8 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram mensurados diariamente por sonda multiparamétrica YSI Professional Plus. As fêmeas foram observadas para verificar o crescimento abdominal. Quando a fêmea estava com abdômen bem inchado e com um ponto escuro na região posterior, próximo da abertura genital, indicativo de proximidade de nascimento dos filhotes, ela era separada em um

aquário com volume de 1 L de água, para evitar a predação por outros peixes. Foi necessário sincronizar o acasalamento das fêmeas para obter recém-nascidos em um intervalo de tempo máximo de 48 horas, a fim de obter um total de pelo menos 50 recém-nascidos para a realização dos experimentos.

#### 4.2 Exposição ao fenantreno e pireno

Os compostos fenantreno e pireno com pureza superior a 95% foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Para a exposição ao fenantreno, duas soluções estoque foram preparadas a partir da diluição seriada do fenantreno (95%, *Sigma-Aldrich*) em dimetil sulfóxido (DMSO). As soluções estoque primária e secundária com concentrações de fenantreno de  $20 \text{ g L}^{-1}$  e  $2 \text{ g L}^{-1}$  respectivamente, foram calculadas para atingir as concentrações nominais na água de  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e  $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para a exposição dos recém-nascidos. O grupo controle (0), referente ao tratamento sem fenantreno foi devidamente utilizado.

Para exposição ao pireno, foram preparadas três soluções estoque a partir da diluição seriada do pireno (98%, *Sigma-Aldrich*) em dimetil sulfóxido (DMSO). As soluções estoque primária, secundária e terciária com concentrações de pireno de  $10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  respectivamente, foram calculadas para atingir as concentrações nominais na água de  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e  $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para a exposição dos recém-nascidos. O grupo controle (0) foi devidamente utilizado. A ausência do tratamento controle contendo solvente, deveu-se ao fato de que as concentrações de DMSO nos diferentes tratamentos não ultrapassou a concentração máxima de 0,002% ou  $20 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  estando abaixo da concentração máxima recomendada pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) para experimentos com fases iniciais do ciclo de vida (OCDE, 2013), e por outros estudos com peixes em estágio larval (Hallare et al., 2006). Além disso, Hutchinson et al. (2006) apontam que efeitos comportamentais causados pelo contato direto com o DMSO não são comuns em peixes.

Na exposição ao fenantreno foram utilizados 50 juvenis com idade máxima de 24 horas, subdivididos equitativamente em 5 aquários, cada aquário com volume de 5 L de água. A exposição ao fenantreno apresentou duração de 7 dias. A exposição ao pireno ocorreu nas mesmas condições da exposição ao fenantreno, sendo utilizados 54 juvenis, subdivididos em 6 aquários, cada qual com volume de 5 L de água salgada. A exposição

ao pireno apresentou duração de 14 dias. Nos dois experimentos a renovação das soluções foi feita a cada 24 horas ao longo das exposições.

A sala de exposição foi mantida sob controle diário dos parâmetros abióticos: salinidade 25, temperatura  $25 \pm 0,2$  °C (média  $\pm$  desvio padrão), pH 8 e oxigênio dissolvido de  $4,96 \pm 0,57$  mg L<sup>-1</sup> ao longo de cada exposição.

### 4.3 Atividade da GST

Após a exposição e realização dos testes comportamentais, os peixes foram eutanasiados em água a 2°C conforme os procedimentos recomendados internacionalmente (Guidelines for the Use of Fishes in Research, 2014), e protocolo aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram pesados em balança analítica (precisão de 0,0001g), e armazenados isoladamente em criotubos em Ultrafreezer a -80° C até a sua utilização.

Juvenis inteiros de *Poecilia vivipara* foram homogeneizados com uma proporção massa/volume 1:7 (m/v) em solução tampão fosfato de potássio (KPi) com pH 7,4 e temperatura 4 °C, utilizando-se o homogeneizador de tecidos para microtubos *Tissue Master 125*, Omni International. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 12.000 g e 4 °C e o sobrenadante foi armazenado em *ultrafreezer* a -80° C. Os ensaios de cinética enzimática foram realizados utilizando-se microplacas num leitor de microplacas Spectramax M3 (Molecular Devices, EUA).

A atividade da Glutathione S-Transferase (GST) foi determinada em amostras do peixe homogeneizado pelo método adaptado para microplaca de Habig et al. (1974), a partir da conjugação da Glutathione (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), produzindo um composto que pode ser detectado a 340nm ( $\epsilon = 9,6$  mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). O ensaio enzimático de 3 minutos foi realizado a 25° C em KPi 100 mM, pH 7,4 contendo GSH 1 mM, tendo como substrato iniciador o CDNB 1 mM. Os resultados foram expressos em nmol de CDNB.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>.

### 4.4 Natação

Após o período de exposição, cada peixe foi transferido individualmente para um aquário (8 cm de comprimento x 6 cm de largura x 8,5 cm de profundidade) contendo um volume de 100 mL de água limpa, e 2 cm de altura de coluna d'água. Cada peixe foi

monitorado individualmente por câmeras com lentes de 6-60 mm de zoom conectadas a uma placa de vídeo (GeoVision modelo GV-900, Irvine, CA) para gravações digitais de vídeo conectadas a um computador capaz de processar e gravar as imagens de todos os tratamentos simultaneamente, possibilitando a observação em tempo real através do monitor. Para maximizar o contraste entre os juvenis e o fundo, as arenas experimentais foram posicionadas sobre uma placa de acrílico translúcido, sob o qual foram instaladas 2 lâmpadas fluorescentes de luz branca com 58 W de potência. Os dados para atividade de natação espontânea foram obtidos a partir do sistema de gravação de vídeo com o processamento no software Smart 2.5.21, durante 30 minutos de filmagem. Para esses dados foram extraídos atributos de velocidade média ( $\text{cm.s}^{-1}$ ), velocidade máxima ( $\text{cm.s}^{-1}$ ) e distância linear percorrida (cm).

#### 4.5 Captura de presas

Para avaliar a eficiência para a captura de presas, juvenis expostos aos diferentes tratamentos foram mantidos em aquários individuais (3,5 cm x 7 cm x 8 cm), onde foram introduzidos 100 náuplios de *Artemia sp.* previamente contados, e monitorados durante 10 minutos. Após este período, o peixe foi retirado do aquário, e os náuplios de *Artemia* não consumidos foram armazenados em tubos de ensaio contendo formaldeído (10% v/v) e corante rosa de bengala para a coloração e posterior contagem dos náuplios não capturados. O cálculo do número de presas capturadas foi feito pela fórmula:

$$\text{NPC} = 100 - \text{NPS}$$

Onde: NPC é o número de presas capturadas e NPS é o número de presas sobreviventes.

#### 4.6 Incremento de peso

O crescimento em termos de incremento de peso foi avaliado pela diferença da pesagem individual de cada recém-nascido entre o último e o primeiro dia de exposição, sendo esta pesagem realizada em uma balança analítica (precisão de 0,0001g). Durante o período de exposição foi oferecida uma quantidade padronizada de náuplios de *Artemia* aos juvenis dos diferentes tratamentos. Os náuplios de *Artemia* eclodidos foram filtrados em tela de 200  $\mu\text{m}$  e pesados após retirada do excesso de água. Foi preparada diariamente uma solução contendo 15g (peso úmido) de náuplios de *Artemia sp.* em 1 L de água do

mar na salinidade 25, sendo que esta solução apresentava uma concentração média de 450 náuplios  $\text{mL}^{-1}$ . Para alimentar os peixes durante o período de exposição, foram pipetados 2  $\text{mL} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{juvenil}^{-1}$ , em cada aquário, subdivididos em 2 momentos com intervalo de 6 horas. O peso inicial foi mensurado individualmente para os juvenis recém-nascidos utilizados, 24 horas após o nascimento, e a média de peso inicial foi igual a 7,0 mg, valor utilizado como peso inicial para todos os indivíduos utilizados. A fórmula para o cálculo do incremento de peso é:

$$\text{IP} = \text{PF} - 7 \text{ (mg)}$$

Onde: IP é o Incremento de peso em mg e PF é o peso final em mg.

#### **4.7 Análises estatísticas**

Os dados obtidos para os parâmetros avaliados foram analisados quanto à normalidade pelo método de Kolmogorov Smirnov e homoscedasticidade pelo método de medianas de Levene. ANOVA de um fator foi usada para dados que mostraram uma distribuição normal e homogeneidade de variância para avaliar as diferenças entre os tratamentos (concentrações de contaminantes). Para dados que não apresentaram os pré-requisitos da ANOVA, foi utilizada a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis. Quando houve diferença significativa entre os tratamentos em um nível de significância de 5%, testes de comparações múltiplas foram aplicadas para determinar diferenças com relação ao controle, Dunnett para Anova 1 fator e Dunn para Kruskal-Wallis. Todas as análises foram realizadas pelo software SigmaPlot® Versão 11 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany).

### **5. RESULTADOS**

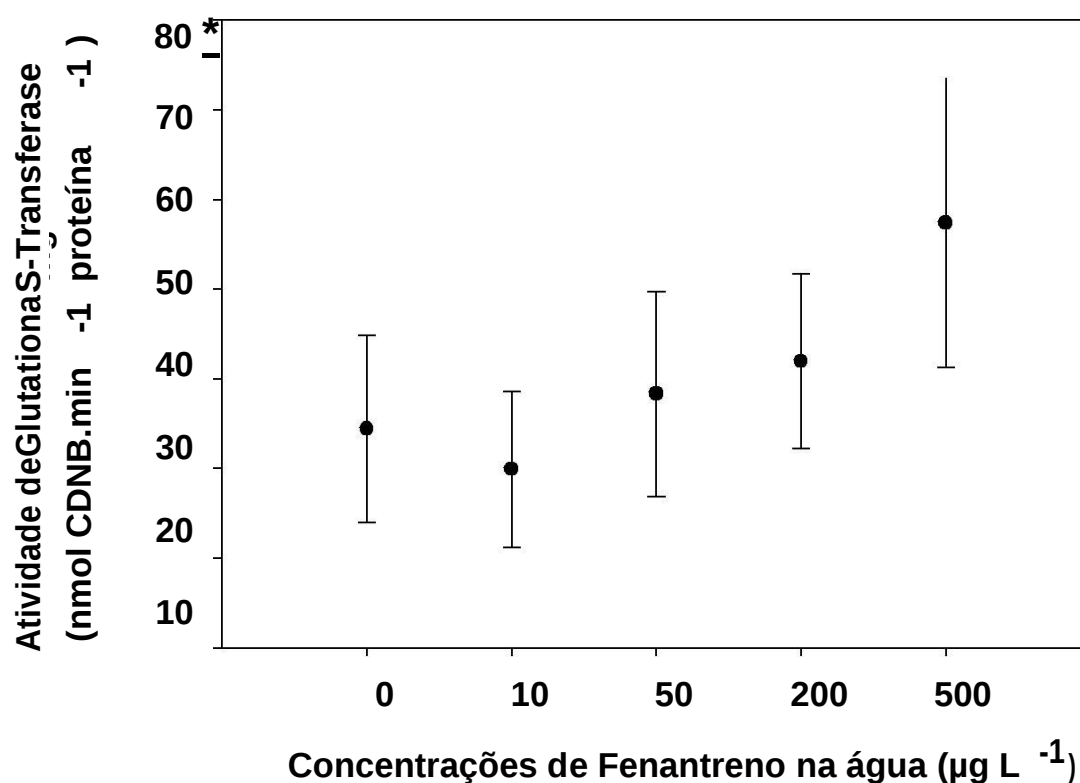
#### **5.1 Fenantreno**

##### **5.1.1 Mortalidade**

O tratamento 500  $\mu\text{g}$  fenantreno  $\text{L}^{-1}$  apresentou mortalidade de 4 indivíduos após os 7 dias de exposição, igual a 40%. Nenhuma mortalidade foi observada nos demais tratamentos.

### 5.1.2 Atividade da GST

Foi detectado um aumento significativo de 78% na atividade da Glutathione S-Transferase (GST) em indivíduos expostos à maior concentração de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fenantreno, a concentração de efeito observado (CEO). A atividade na concentração 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  foi igual a  $57,404 \pm 16,145 \text{ nmol CDNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$  da GST dos juvenis do grupo controle que foi  $(34,441 \pm 10,428 \text{ nmol CDNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1})$ , Figura 4.

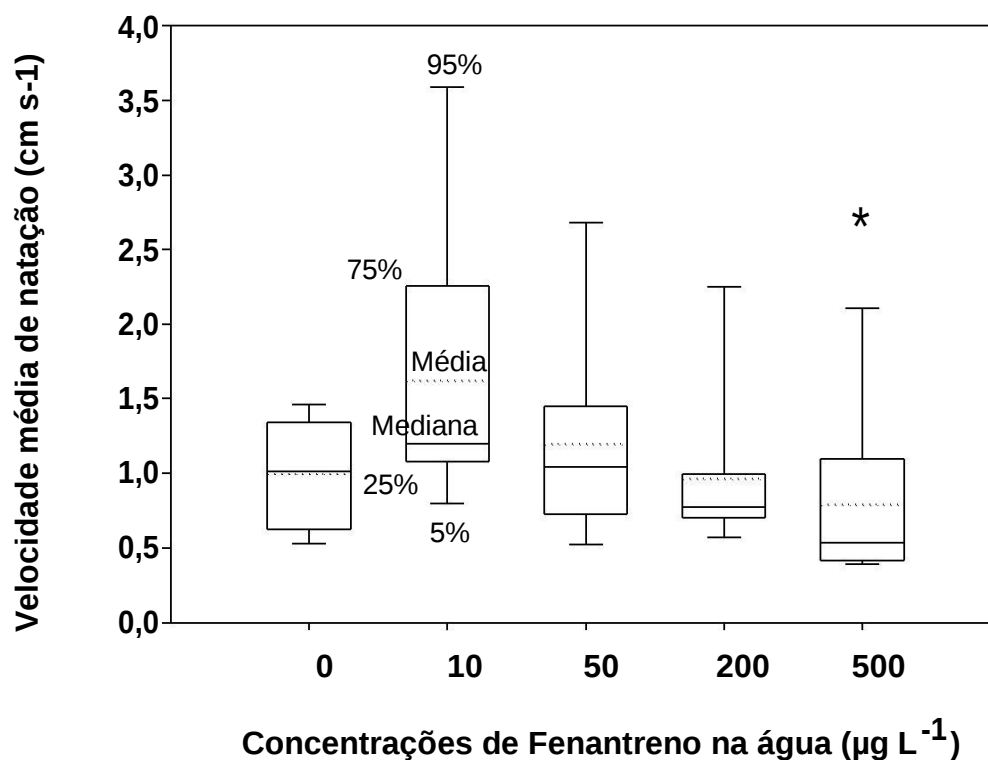


**Figura 4.** Atividade de Glutathione S-Transferase (GST) ( $\text{nmol CDNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ ) (média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 8$ ) em juvenis do barrigudinho *Poecilia vivipara* após 7 dias de exposição à água com fenantreno. (0): Controle; (Anova I,  $F_{(4,35)} = 6,574$ ;  $p \leq 0,001$ ); (\*): Diferenças significativas em relação ao controle (Teste Dunnett,  $p < 0,05$ ).

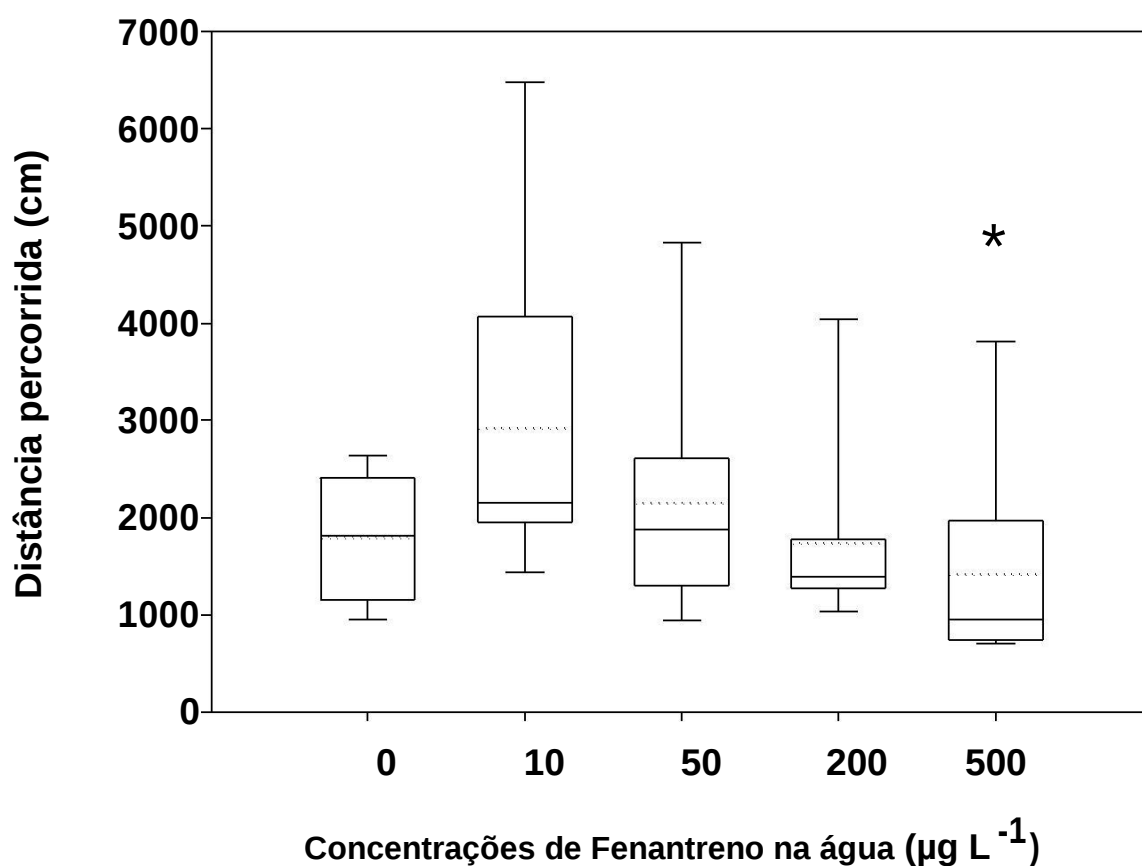
### 5.1.3 Natação

Os parâmetros relacionados a natação espontânea demonstraram que tanto a velocidade média de natação, quanto a distância percorrida nos juvenis expostos ao tratamento de maior concentração foram significativamente menores em relação ao grupo controle, com diminuições percentuais de 47,5%. A CEO para os dois parâmetros foi

igual a  $500 \mu\text{g fenantreno L}^{-1}$ , Figuras 5 e 6. O parâmetro velocidade máxima de natação não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos ( $p = 0,33$ ).



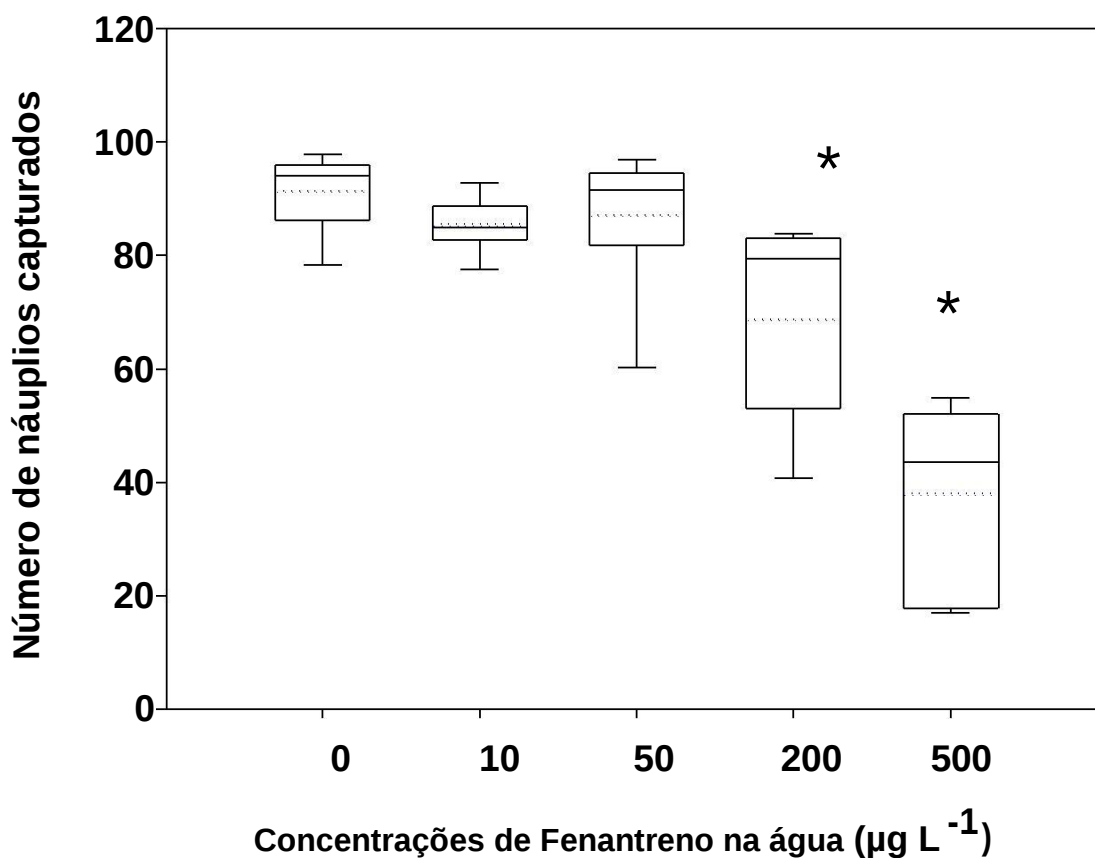
**Figura 5.** Velocidade média de natação espontânea (média, mediana e quartis), em  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$  de juvenis do barrigudinho *Poecilia vivipara* após 7 dias de exposição à água com fenantreno. (0): controle; (Kruskal-Wallis,  $H_4 = 10,054$ ;  $p = 0,04$ ); (\*): diferenças significativas em relação ao controle. (Teste de Dunn,  $p < 0,05$ ).  $N = 10$  nos grupos controle,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $N = 6$  no tratamento  $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .



**Figura 6.** Distância percorrida (média, mediana, quartis), em cm, por juvenis do barrigudinho *Poecilia vivipara* após 7 dias de exposição à água com fenantreno. (0): controle; (Kruskal-Wallis,  $H_4 = 10,152$ ;  $p = 0,038$ ); (\*): diferenças significativas em relação ao controle (Teste de Dunn,  $p < 0,05$ ).  $N = 10$  nos grupos controle,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $N = 6$  no tratamento  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 5.1.4 Captura de presas

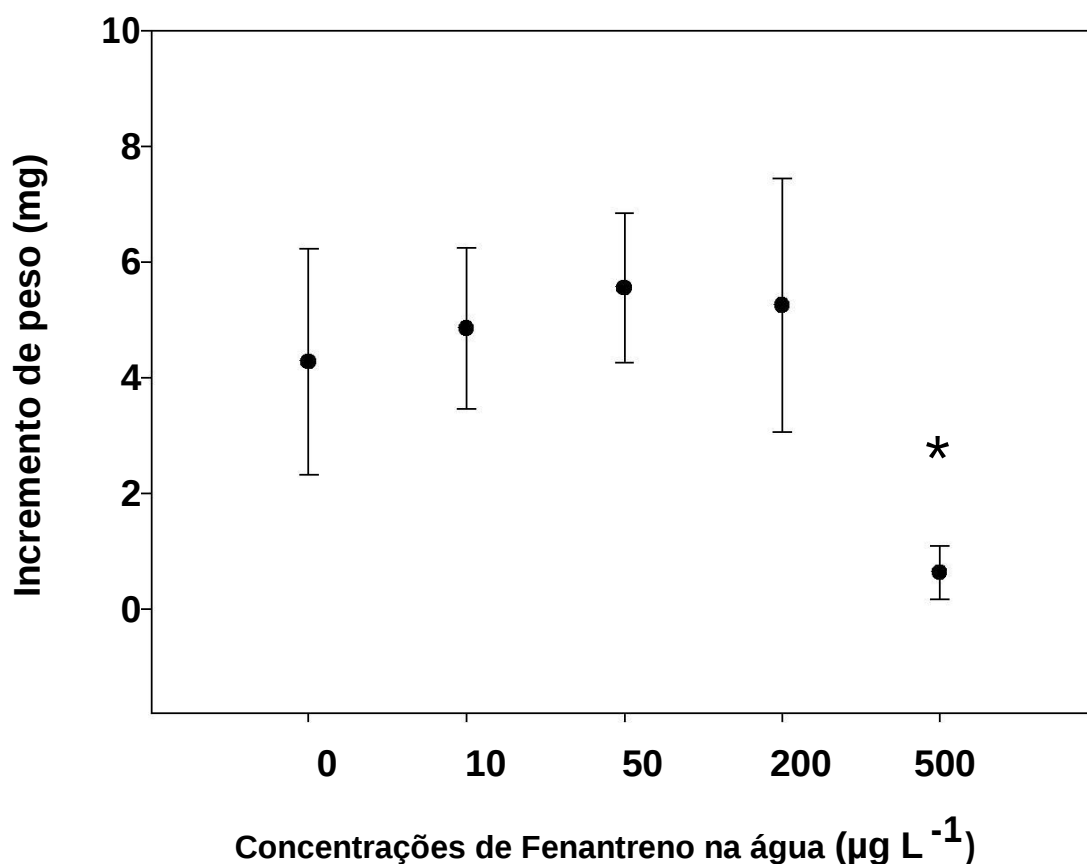
O parâmetro captura de presas indicou que foram observadas reduções significativas em juvenis expostos ao tratamento  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ , quando comparados ao grupo controle, o que corresponde a diminuições percentuais de 15,4% e 53,7% na captura de náuplios de *Artemia sp.*, respectivamente, Figura 7. A CEO foi igual a  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  para este parâmetro.



**Figura 7.** Quantidade de náuplios de *Artemia sp.* (média, mediana, quartis) capturados por juvenis do barrigudinho *Poecilia vivipara* após 7 dias de exposição à água com fenantreno. (0): controle; (Kruskal-Wallis,  $H_4 = 26,357$ ;  $p < 0,001$ ); (\*): diferenças significativas em relação ao controle (Teste de Dunn,  $p < 0,05$ ).  $N = 10$  nos grupos: controle,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $N = 6$  no tratamento  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 5.1.5 Incremento de peso

A CEO para incremento de peso foi igual a  $500 \mu\text{g fenantreno L}^{-1}$ , quando comparados a juvenis do grupo controle, correspondendo a uma redução de 92% no crescimento, Figura 8.



**Figura 8.** Incremento de peso (média  $\pm$  desvio padrão), em miligramas, de juvenis do barrigudinho *Poecilia vivipara* após 7 dias de exposição à água com fenantreno. (0): controle; (Anova I,  $F_{(4,41)} = 9,934$ ;  $p \leq 0,001$ ); (\*): diferenças significativas em relação ao controle (Teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ).  $N = 10$  nos grupos controle,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $N = 6$  no tratamento  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ .

## 5.2 Pireno

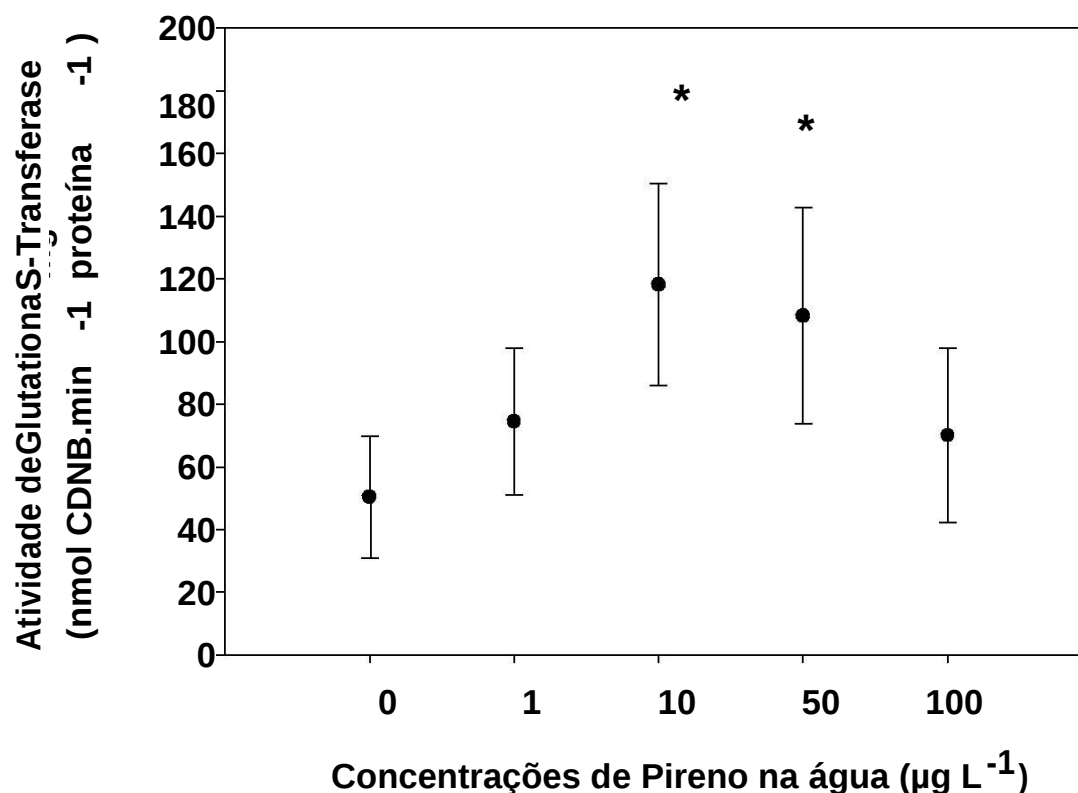
### 5.2.1 Mortalidade

O tratamento  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de pireno teve mortalidade de 4 indivíduos após os 14 dias de exposição (44%), e o tratamento  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  teve mortalidade total de 3 indivíduos (33%). Nenhuma mortalidade foi observada nos demais tratamentos.

### 5.2.2 Atividade da GST

Juvenis de *P. vivipara* expostos ao pireno apresentaram aumento significativo da atividade da Glutathione S-Transferase (GST) nos tratamentos  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $118,168 \pm 32,12$

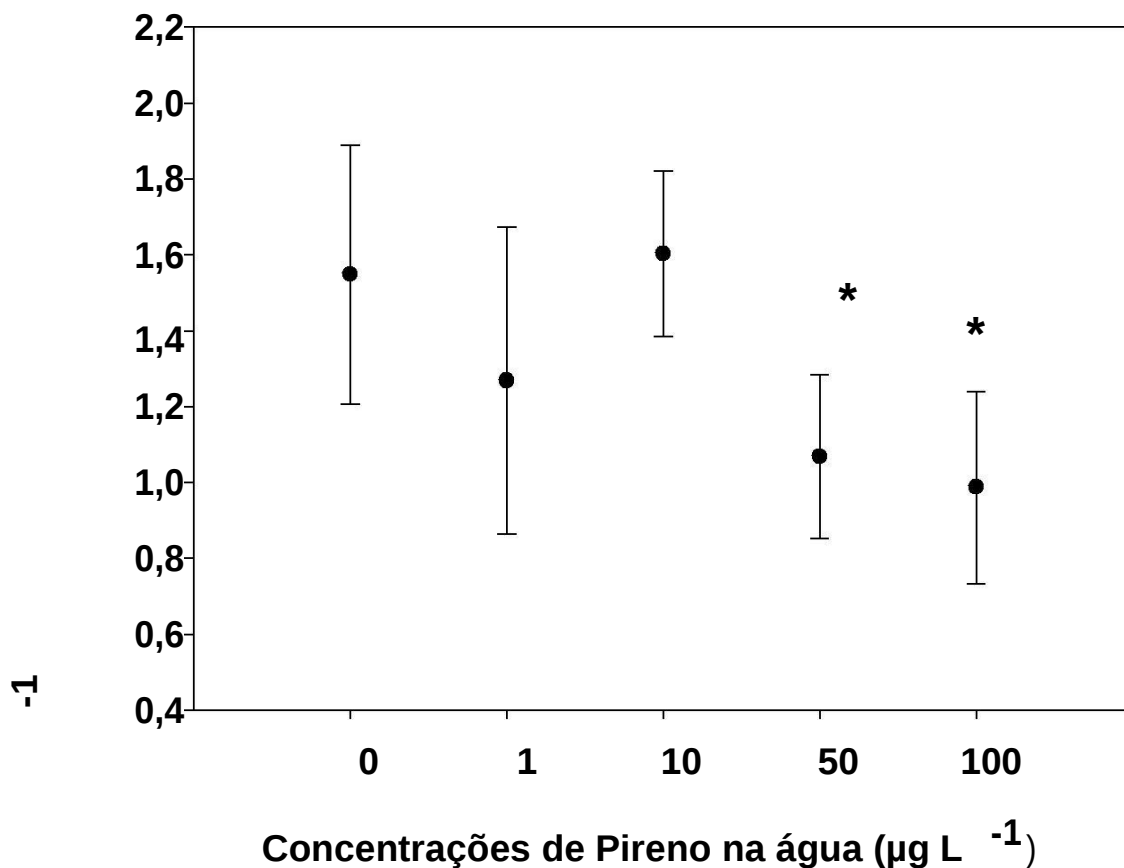
nmol CDNB min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>) e 50 µg L<sup>-1</sup> (108,211 ± 34,391 nmol CDNB min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>), correspondente a aumentos percentuais de 130,43% e 113,8%, respectivamente, em comparação com a atividade de GST dos juvenis do grupo controle (50,385 ± 19,404 nmol CDNB.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>), Figura 9. Desta forma, a CEO para GST foi igual a 10 µg L<sup>-1</sup>.



**Figura 9.** Atividade de Glutathione S-Transferase (GST) (nmol CDNB.min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>) (média ± desvio padrão, n = 8) em juvenis do barrigudinho *Poecilia vivipara* após 14 dias de exposição à água com pireno. (0): Controle; (Anova I,  $F_{(4,33)} = 7,840$ ;  $p \leq 0,001$ ); (\*): Diferenças significativas em relação ao controle (Teste Dunnett,  $p < 0,05$ ).

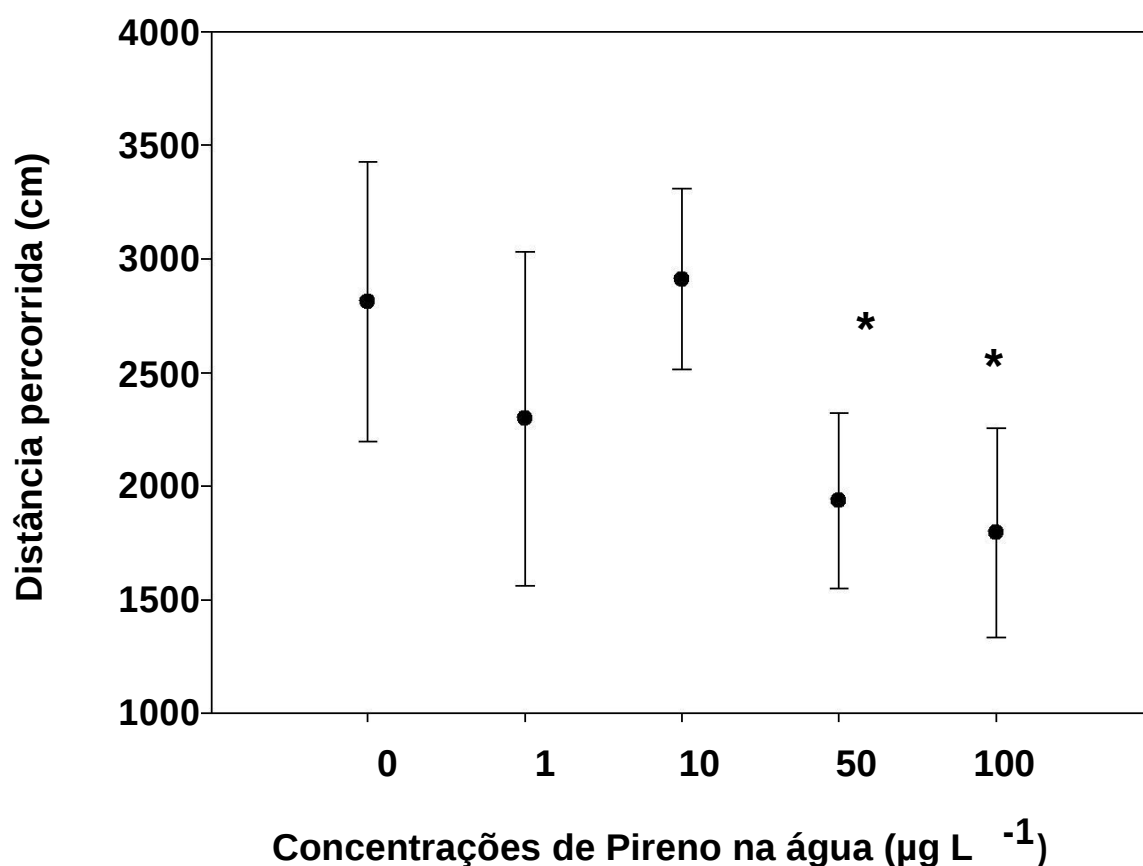
### 5.2.3 Natação

As velocidades médias de natação referentes aos juvenis expostos aos tratamentos 50 µg L<sup>-1</sup> (1,068 ± 0,215 cm.s<sup>-1</sup>) e 100 µg.L<sup>-1</sup> (0,987 ± 0,253 cm.s<sup>-1</sup>) foram significativamente menores em relação ao grupo controle (1,548 ± 0,341 cm.s<sup>-1</sup>), com diminuições percentuais de 31% e 36,24%, respectivamente, Figura 10. O parâmetro velocidade máxima de natação não apresentou diferença estatística entre os tratamentos (P = 0,172).



**Figura 10.** Velocidade média de natação espontânea (média  $\pm$  desvio padrão), em  $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , juvenis do barrigudinho *Poecilia vivipara* após 14 dias de exposição à água com pireno. (0): controle; (Anova I,  $F_{(4,33)} = 5,752$ ;  $p = 0,001$ ); (\*): diferenças significativas em relação ao controle (Teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ).  $N = 9$  nos grupos controle,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $N = 5$  no tratamento  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $N = 6$  no grupo  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

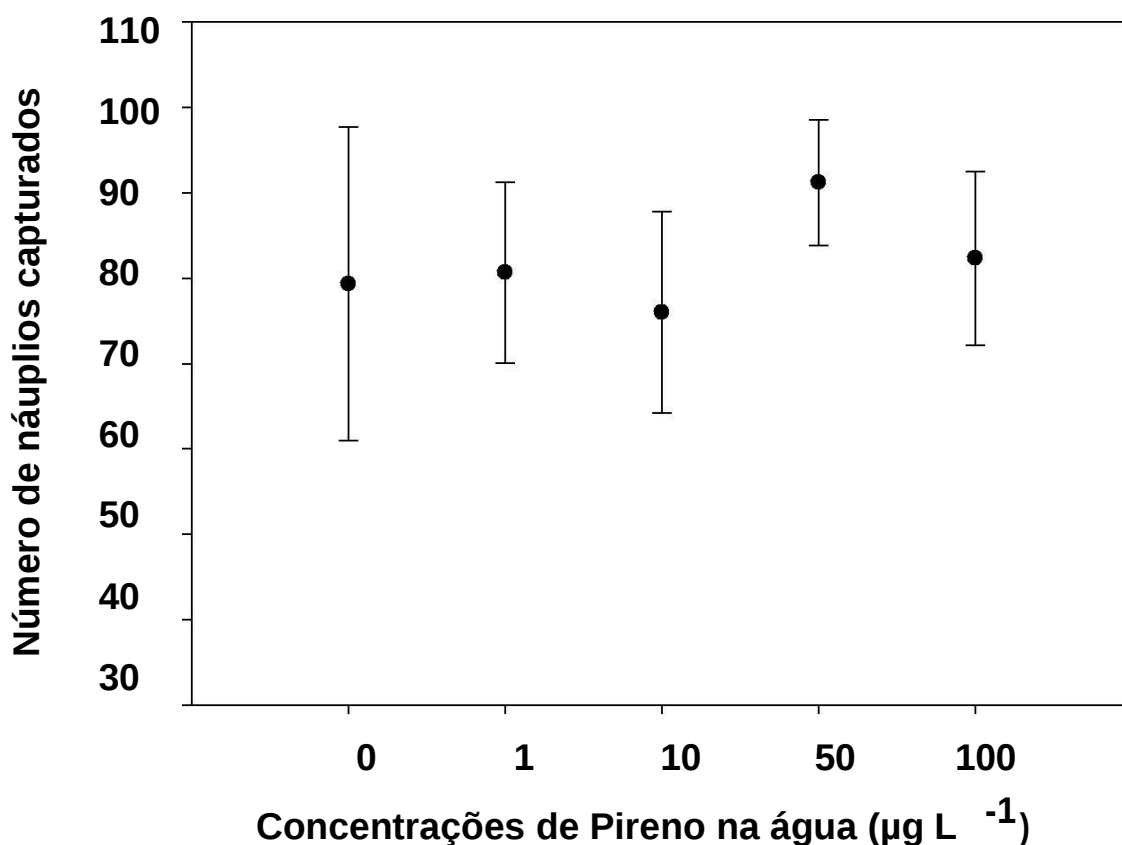
O parâmetro distância percorrida também demonstrou uma redução significativa nos tratamentos  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $1935,84 \pm 387,44 \text{ cm}$ ) e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $1794,41 \pm 461,2 \text{ cm}$ ), correspondendo a reduções percentuais de 33,65% em relação ao controle, Figura 11. A CEO para velocidade média de natação e distância percorrida para os peixes expostos ao pireno foi igual a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Figura 11.** Distância percorrida (média  $\pm$  desvio padrão), em cm, por juvenis do barrigudinho *Poecilia vivipara* após 14 dias de exposição à água com pireno. (0): controle; (Anova I,  $F_{(4,33)} = 5,769$ ;  $p = 0,001$ ); (\*): diferenças significativas em relação ao controle (Teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ). N = 9 nos grupos: controle, 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; N = 5 no tratamento 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; N = 6 no grupo 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 5.2.4 Captura de presas

O parâmetro captura de presas não apresentou diferenças significativas quando comparado ao grupo controle e os demais grupos de teste ( $P = 0,336$ ), Figura 12.

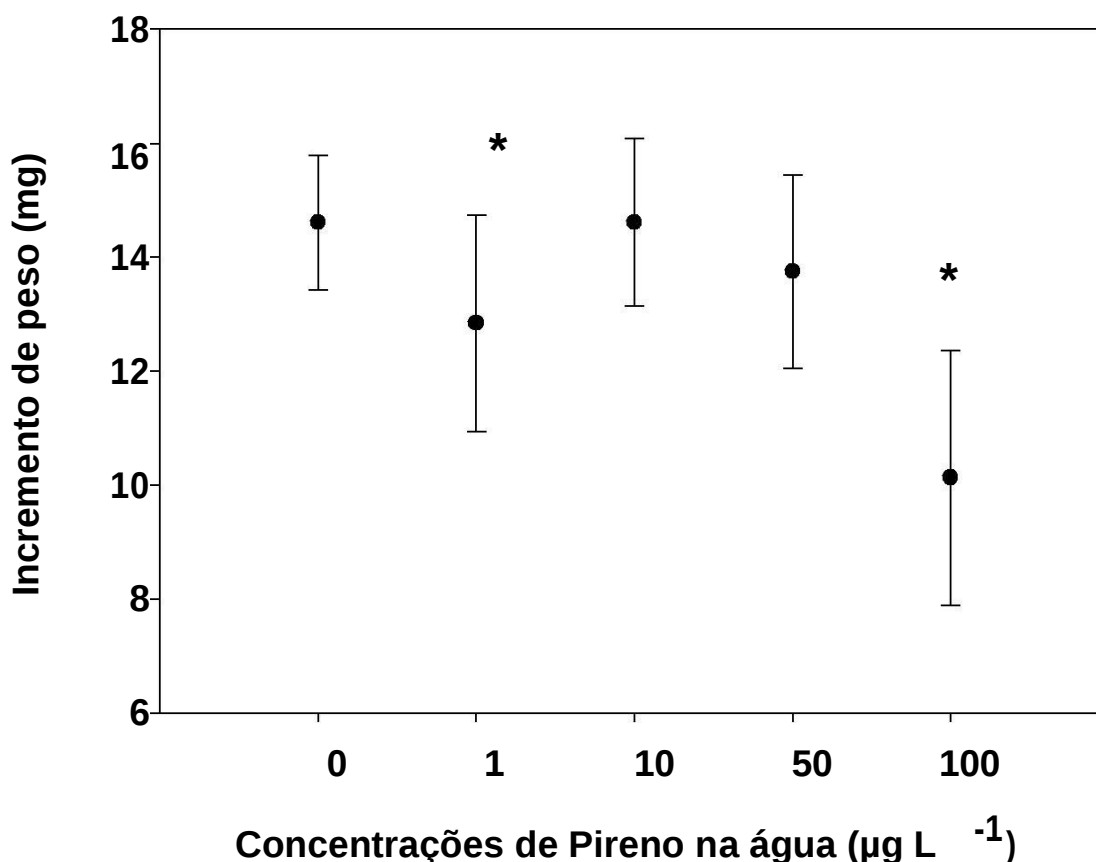


**Figura 12.** Quantidade de náuplios de *Artemia sp.* (média  $\pm$  desvio padrão) capturados por juvenis do peixe barrigudinho *Poecilia vivipara* após 14 dias de exposição ao pireno.

(0): controle; (Shapiro-Wilk,  $F_{(4,33)} = 1,183$ ;  $P = 0,336$ ).  $N = 9$  nos grupos controle,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $N = 5$  no tratamento  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $N = 6$  no grupo  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 5.2.5 Incremento em peso

A média de incremento de peso dos indivíduos do grupo controle foi de  $15,6 \pm 1,64$  miligramas, sendo que o peso total dos peixes passou de 7 mg no início dos experimentos para 21,6 mg no final de 14 dias. O incremento de peso para os tratamentos 1 e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  foram de  $13 \pm 2,2$  e  $10,3 \pm 2,0$  miligramas, respectivamente, com redução significativa de 16,67% e 33,97% no acréscimo de peso quando comparados ao grupo controle, Figura 13. A CEO para incremento de peso para os peixes expostos ao pireno foi igual a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Figura 13.** Incremento de peso (média  $\pm$  desvio padrão), em miligramas, de juvenis do peixe barrigudinho *Poecilia vivipara* após 14 dias de exposição ao pireno. (0): controle; (Anova I,  $F_{(4,34)} = 8,259$ ;  $p \leq 0,001$ ); (\*): diferenças significativas em relação ao controle (Teste de Dunnett). N = 9 nos grupos controle, controle de solvente,  $1\mu\text{g L}^{-1}$  e  $10\mu\text{g L}^{-1}$ ; N = 6 nos tratamentos  $50\mu\text{g L}^{-1}$  e  $100\mu\text{g L}^{-1}$ .

## 6. DISCUSSÃO

Os HPAs são amplamente estudados quanto aos seus efeitos embriotóxicos, causando sequelas como: hemorragias, edemas pericárdicos e vitelínicos, disfunções cardíacas e malformação da morfometria mandibular (Barron et al., 2004; Incardona et al., 2004; Incardona et al., 2006; Hendon et al., 2008; Incardona et al., 2011; Goodale et al., 2013). Arcanjo et al. (2014) apontam a viviparidade em *P. vivipara* como uma estratégia reprodutiva de proteção dos embriões durante os 22 a 24 dias da gestação. Ao nascer, os jovens de *P. vivipara* já têm os olhos bem estruturados, cavidades orais e estruturas operculares formadas, assim como brânquias ativas no final de

desenvolvimento, semelhante a um poecilídeo adulto em miniatura (Haynes, 1995; Rocha et al., 2010). Apesar da organização avançada, esta fase inicial de desenvolvimento é a fase ontogenética em que os organismos tipicamente apresentam maior sensibilidade quanto aos efeitos letais e subletais causados pelos diversos xenobióticos (Von Westernhagen, 1988; Marty et al., 1997).

A exposição de *P.vivipara* ao fenantreno teve duração de 7 dias e foi observada 40% de mortalidade somente na concentração  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ , o que não possibilitou o cálculo da CL50. A sensibilidade de outras espécies de peixes ao fenantreno em termos de efeitos letais é muito variável e a menor CL<sub>50</sub> para o fenantreno foi estimada em  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  após exposição de 648h (27 dias) de duração de estágios embrio-larvais da truta arco-íris

*Oncorhynchus mykiss* (Millemann et al., 1984). A mesma espécie *Oncorhynchus mykiss* foi exposta ao fenantreno por 96 h durante o estágio final de absorção do vitelo, 13 a 21 dias após a eclosão, e a CL<sub>50</sub><sub>96h</sub> foi igual a  $3.200 \mu\text{g L}^{-1}$  (Edsall, 1991). Esta diferença de cerca de 100x na sensibilidade de *O. mykiss* ilustra a importância de se considerar a duração do tempo de exposição em comparações de sensibilidade com base em estimativas da CL50. A CL<sub>50</sub> após 96h de exposição para o poecilídeo *Gambusia affinis* foi igual a  $150.000 \mu\text{g L}^{-1}$  (Ambient Water Quality Criteria For Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Environment Canada, 2015).

A CL<sub>50</sub> para o fenantreno foi estimada em  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  após exposição de 7 dias de duração do largemouth bass *Micropterus salmoides* (Millemann et al., 1984). A CL<sub>50</sub><sub>120h</sub> para embriões e larvas do paulistinha *Danio rerio* foi estimada em  $310 \mu\text{g L}^{-1}$  (Vergauwen et al., 2015). Esta compilação de valores de CL50 para fenantreno em peixes sugerem que os juvenis de *P. vivipara* após exposição de 7 dias se mostraram relativamente sensíveis quanto aos efeitos letais do fenantreno.

A exposição de *P.vivipara* ao pireno teve duração de 14 dias, e foi observada 44% de mortalidade na concentração  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ , o que não possibilitou o cálculo da CL50. Em juvenis de *Pomatoschistus microps* expostos ao pireno, a CL<sub>50</sub><sub>96h</sub> foi de  $871 \mu\text{g L}^{-1}$  (Oliveira et al., 2012). Para embriões do peixe marinho *Mallotus villosus* expostos a diferentes concentrações de pireno, a CL<sub>50</sub><sub>96h</sub> foi de  $5160 \mu\text{g L}^{-1}$  enquanto a CL<sub>50</sub> para 15 dias, que é o tempo aproximado de nossa exposição foi de  $1660 \mu\text{g L}^{-1}$  (Frantzen et al., 2012). Esta compilação de valores de CL50 para peixes sugerem que juvenis de *P. vivipara* quando expostos ao longo de 14 dias ao pireno se mostraram sensíveis quanto ao parâmetro letalidade. Em juvenis da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi encontrada uma CL50 de  $801 \mu\text{g L}^{-1}$  (Cheevaporn et al., 2010), menores que a CL50

registrada em juvenis de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), cujo valor de CL50 é 165  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Krasnov et al., 2005). Desta forma, esta comparação sugere que os juvenis de *P. vivipara* são sensíveis quanto aos efeitos letais do pireno.

A exposição de *P. vivipara* ao fenantreno a maior concentração de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  causou um aumento significativo de 78% na atividade de GST, e tendências de aumento de 17% e 28% nas concentrações 50 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A exposição de juvenis do peixe marinho *Sparus aurata* a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fenantreno demonstrou tendência de aumento de 12% na atividade da GST, e tendências de diminuição da GST em concentrações de 10 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Correia et al., 2007). A tilápia *Oreochromis mossambicus* exposta ao fenantreno por injeção intraperitoneal apresentou indução de 54% da GST em 32  $\mu\text{g g}^{-1}$ , e tendência de aumento de 16% na menor dose de 32  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Shailaja & D'Silva, 2003). O linguado *Paralichthys olivaceus* exposto ao fenantreno nas concentrações 178 e 356  $\mu\text{g L}^{-1}$  apresentou indução significativa da GST de 56% e 29%, respectivamente (Jee & Kang, 2005) demonstrando resultados semelhantes quando comparados com os juvenis de *P. vivipara* no tratamento 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  com a indução de 28% da atividade de GST. O peixe dourado *Carassius auratus* exposto ao fenantreno nas concentrações 70 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  apresentou indução significativa da GST de aproximadamente 30% (Yin et al., 2007).

A exposição de *P. vivipara* ao pireno nas concentrações de 10 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  causou um aumento significativo de 130% e 113% na atividade da GST, respectivamente, e tendência de aumento de 40% nas concentrações 1 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. De modo parcialmente semelhante a este estudo, a exposição de *Carassius auratus* ao pireno nas concentrações de 1 e 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  causou um aumento significativo de 91% e 18% na atividade da GST, respectivamente, mas a exposição a maiores concentrações de 10, 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  levou a uma inibição da GST entre 45% e 70% relativo ao controle (Sun et al., 2008). Inibição significativa da GST entre 30% e 70% também foi observada em juvenis de *Dicentrarchus labrax* expostos ao pireno na água entre 70 e 10.000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente (Almeida et al., 2012). Inibição da atividade da GST após a exposição de peixes a HPAs pode estar relacionada a ligação da proteína GST com HPAs e/ou seus metabólitos, o que reduziria a concentração livre internamente destes contaminantes, e resultando em inibição enzimática. Esta situação é menos frequente que relatos da indução da GST após exposição a HPAs decorrente da conjugação de HPAs com glutatona durante a fase 2 de biotransformação (Almeida et al., 2012). Neste estudo não foi detectada inibição da GST após exposição ao fenantreno ou ao pireno, mesmo nas

maiores concentrações testadas, corroborando o padrão geral tipicamente encontrado. Apesar da análise da GST ter sido realizada em juvenis inteiros de *Poecilia vivipara*, e não no fígado como nestes outros trabalhos, tipicamente onde ela apresenta maior atividade (Jee & Kang, 2005), os dados obtidos neste estudo sugerem que a indução de GST é um parâmetro que pode ser utilizado para detecção de efeitos dos HPAs fenantreno e pireno em juvenis recém-nascidos. Num experimento com juvenis de *Sparus aurata* expostos ao fenantreno, Correia et al. (2007) sugere que a indução de atividades de enzimas de biotransformação exigem custos energéticos adicionais para a detoxificação química e levam a uma alteração na alocação de energia entre os processos de biotransformação e a atividade natatória dos peixes. Tais processos pode ter acarretado em letargia podendo ser observada neste estudo, onde foi detectada diminuição da velocidade natatória após exposição ao fenantreno (Figura 5) e ao pireno (Figura 10).

Adicionalmente, HPAs podem conduzir efeitos narcóticos ao particionar e acumular nas membranas celulares e interferir de maneira direta no funcionamento das mesmas. Estudos anteriores relatam uma relação direta entre o comportamento letárgico em peixes quando expostos a HPAs, principalmente fenantreno e pireno (Gonçalves et al., 2008; Gravato & Guilhermino, 2009; Almeida et al., 2012; Oliveira et al., 2012). Reduções na atividade natatória (hipoatividade), reação a estímulos externos e redução das funções nervosas, são características predominantes da narcose em peixes, que é reversível (Barron et al., 2004). A narcose prolongada pode resultar em morte (Leblanc, 2004). Considerando que a mortalidade dos recém-nascidos só foi observada nas concentrações mais altas do pireno e na maior concentração do fenantreno, nas quais também houve redução significativa da atividade de natação espontânea, é possível que os efeitos letais tanto do fenantreno, quanto do pireno estejam relacionados a um efeito narcótico causado nos recém-nascidos de *P. vivipara*.

A velocidade natatória diminuiu significativamente nos juvenis expostos ao fenantreno no tratamento  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 5), e foi detectado um efeito-cascata coerente com mecanismos ecológicos de busca e captura de presas. A hipoatividade nestes organismos acarretou também em diminuição da distância linear percorrida (Figura 6). Um peixe que nada menos, se desloca menos, acaba por explorar menos o ambiente, o que pode explicar as reduções na captura de presas pelos juvenis (Figura 7). Consequentemente isto em redução no incremento de peso detectado (Figura 8). A alimentação é o resultado do forrageamento integrado às informações sensoriais gustativas, visuais, olfativas e da linha lateral, que podem ser influenciadas por fatores de

estresse, isoladamente ou em combinação (Beitinger, 1990). A CEO do fenantreno para captura de presas em juvenis de *P. vivipara* foi igual a  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 7). Outros estudos observaram mudanças na capacidade de forrageio dos peixes expostos ao fenantreno, incluindo adultos de *Poecilia vivipara* (Torreiro-Melo et al., 2015) e larvas do dourado *Salminus brasiliensis* (Carvalho et al., 2008), com CEOs para captura de presas iguais a  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. De acordo com tais resultados, *Salminus brasiliensis* demonstra sensibilidade para o parâmetro captura de presas com sensibilidade 4 vezes menor que o apresentado em juvenis e adultos de *P. vivipara*.

A CEO do fenantreno para incremento em peso foi igual a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  após 7 dias de exposição (Figura 8), as CEOs para o crescimento do linguado *Paralichthys olivaceus* após 14 e 28 dias de exposição ao fenantreno foram iguais a  $356 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $178 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente (Jee et al., 2004). A demanda energética que um indivíduo dedicaria para aumentar seu peso e consequentemente crescer pode ser desviada para processos de biotransformação, incluindo o aumento da atividade de GST.

Os juvenis de *P. vivipara* expostos ao pireno mostraram hipoatividade nas duas maiores concentrações testadas (Figura 10), corroborando resultados relatados por Almeida et al. (2012), onde a velocidade natatória de juvenis de robalo (*Dicentrarchus labrax*) foi reduzida a partir de  $70 \mu\text{g L}^{-1}$  de pireno, o que sugere sensibilidade semelhante para redução da velocidade natatória entre estas espécies.

A distância percorrida pelos estágios iniciais de *P. vivipara* foi negativamente afetada nas duas maiores concentrações  $50$  e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de pireno, como também observado em larvas de *Pomatoschistus microps* que mostraram reduções na distância percorrida quando expostas a  $125$ ,  $250$ ,  $500$  e  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  de pireno (Oliveira et al., 2012).

Neste estudo não foi detectado efeito do pireno na captura de presas (Figura 12), mas foram detectados efeitos significativos no crescimento dos juvenis na menor e na maior concentração de  $1$  e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de pireno (Figura 13), sugerindo que o decréscimo no crescimento dos mesmos pode ter sido determinado pela menor captura dos náuplios de *Artemia* ofertados diariamente ao longo da exposição de 14 dias, que não foi avaliada durante o tempo de exposição. Foi detectada redução na velocidade e distância percorrida em  $50$  e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de pireno (Figuras 10 e 11), o que pode tornar o hábito exploratório dos juvenis deficiente, e que está coerente com a detecção de déficit no crescimento no tratamento  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

O crescimento acelerado nas fases iniciais do ciclo de vida é uma estratégia adaptativa na maioria das espécies de peixes, e a probabilidade de sobrevivência dos

juvenis é parcialmente dependente do tamanho (Beitinger, 1990; Letcher et al., 1996; Tsang, 2007).

As reduções no incremento de peso dos recém-nascidos de *P. vivipara* em resposta à exposição ao fenantreno e ao pireno são reforçados por outros estudos que têm observado efeitos semelhantes após exposição a HPAs puros ou em misturas, como o decréscimo de 25% a 65% no crescimento do bluegill *Lepomis macrochirus* após a exposição a  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  do HPA fluoreno (Finger et al., 1985). O crescimento e o teor de lipídios foram afetados negativamente em juvenis de *Solea solea* após a exposição por 24 horas a  $50 \text{ ng L}^{-1}$  de uma mistura de HPAs de óleo combustível, efeitos que persistiram por três meses, mostrando o efeito a longo prazo no ajuste evolutivo total dos organismos (Gilliers, 2012). Além disso, Rice et al. (1993) descobriram que pequenas alterações na taxa média de crescimento inicial podem afetar adversamente a sobrevivência durante os primeiros meses de desenvolvimento. Efeitos no crescimento de larvas e juvenis podem interferir no recrutamento da espécie e comprometer populações e níveis mais elevados de organização biológica (Payne et al., 2003). É importante destacar a relevância do efeito deletério do pireno no incremento em peso de juvenis de *P. vivipara*, especialmente em concentrações tão baixas como  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , mas também nas maiores concentrações de pireno e fenantreno, que podem ser encontradas em situações de acidentes ambientais.

## 7. CONCLUSÃO

A atividade de GST e os biomarcadores comportamentais relacionados à natação e captura de presas, bem como o crescimento em recém-nascidos de *P. vivipara* foram significativamente afetados pela exposição ao pireno e fenantreno.

Este trabalho destaca a utilidade dos estágios iniciais ontogenéticos de *P. vivipara* em estudos ecotoxicológicos para avaliação de parâmetros de efeito em diferentes níveis de organização biológica úteis para a análise do risco ecológico de contaminantes.

Foi estabelecida uma padronização na obtenção dos juvenis, bem como na fase de exposição dos juvenis e na readaptação dos testes experimentais, antes realizados com organismos adultos, agora adaptados aos juvenis de *P. vivipara*, um dos principais foi a análise da atividade de Glutathione S-Transferase através de homogeneização da amostra utilizando o organismos inteiro.

## 8. REFERÊNCIAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 2007. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com peixes. Norma ABNT-NBR 15499. Rio de Janeiro. 21p.

ADAMS, S.M. 1987. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. In: ADAMS, S. M. (Ed.). Biological Indicators of Stress in Fish: Transactions of the American Fisheries Society, p. 8-18.

AGUIAR, L.H. 2004. Metabolical effects of folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. Environmental Research 95, 224-230.

AHMAD, I. et al. 2004. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety 57, 290-302.

AL-YAKOOB, S.N.; GUNDERSEN, D.; CURTIS L. 1996. Effects of the water-soluble fraction of partially combusted crude oil from Kuwait's oil fires (from Desert Storm) on survival and growth of the marine fish *Menidia beryllina*. Ecotoxicology and Environmental Safety 35, 142-149.

ALMEIDA, J. et al. 2012. Biological Parameters Towards Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Pollution: A Study with *Dicentrarchus labrax* L. Exposed to the Model Compound Benzo(a)pyrene. Water, Air, & Soil Pollution 223, 4709-4722.

ALMEIDA, J.R. et al. 2012. Challenges in assessing the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine organisms: A case study on the acute toxicity of pyrene to the European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). Chemosphere 86, 926-937.

ALMEIDA, E.A., RODRIGUES, A.C.F e RIBEIRO, C.A.O. 2014. Introducyion - Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems: A Brief Summary on Current Challenges and Perspectives. In: Almeida, E.A., Ribeiro, C.A.O. (Eds.) Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems. Boca Raton. FL.CRC Press. p. 1-14.

AMBIENT WATER QUALITY CRITERIA FOR POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs), Environment Canada. <  
<http://www.env.gov.bc.ca/wat/wq/BCguidelines/pahs/pahs-05.htm#tbl16>> (acessado em 10 novembro de 2015).

AMIARD-TRIQUET, C. 2009. Behavioral disturbances: The missing link between suborganismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal 15, 87-110.

ANYAHORA, C. et al. 2005. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. Journal of Chromatography 1073, 323-330.

APHA (Ed.) 1960. American Public Health Association. Standard Methods for the

Examination of Water and Wastewater.ed.

ARCANJO, R.B., DE SOUZA, L.P., REZENDE, C.F e SILVA, J.R.F. 2014. Embryonic

development and nourishment in the viviparous fish *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Acta zoologica 95, 493-500.

ATSDR – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Priority List of Hazardous Substances**. Atlanta, GA, USA, 2007. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/previous/07list.html>> Acesso em: 8 junho 2015.

BALDWIN, D.H., SPRONBERG, T.K., COLLIER & SCHOLZ, N.L. 2009. A fish of many scales: extrapolating sublethal pesticide exposures to the productivity of wild salmon populations. Ecological Applications 19, 2004-2015.

BARAK, N.A.E., MASON, C.F. 1990. Mercury, cadmium and lead concentrations in five species of freshwater fish from Eastern England. The Science of The Total Environment 92, 257-263.

BARRON, M.G., CARLS, M.G., HEINTZ, R e RICE, S.D.. 2004. Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. Toxicological Sciences 78, 60-67.

BASTOS, F.F., HAUSER-DAVIS, R.A., TOBAR, S.A.L., CAMPOS, R.C., ZIOLLI, R.L., BASTOS, V.L.F.C., BASTOS, J.C. 2013. Enzymatic GST levels and overall health of mullets from contaminated Brazilian Lagoons. Aquatic Toxicology 126, 414-423.

BAUMARD, P., BUDZINSKI, H., GARRIGUES, P., SORBE, J.C., BURGEOT, T. e BELLECOQ, J. 1998. Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in Various Marine Organisms in Relation to those in Sediments and to Trophic Level. Mar Pollut Bull 36, 951-960.

BEITINGER, T.L. 1990. Behavioral Reactions for the Assessment of Stress in Fishes. Journal of Great Lakes Research 16, 495-528.

BENSON, N.U., ESSIEN, J.P., ASUGUO, F.E. e ERITOBOR, A.L. 2014. Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface microlayer and subsurface seawater of Lagos Lagoon, Nigeria. Environ Monit Assess 9, 5519-5529.

BERTOLETTI, E. 2009. Determinação da Ecotoxicidade Crônica para *Danio rerio*. J. Braz. Soc. Ecotoxicol 4, 1-7.

BILLIARD, S.M., QUERBACK, K. e HODSON, P.V. 1999. Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. Environmental Toxicity and Chemistry 18, 2070-2077.

BIZERRIL, C.R.S.F., PRIMO, P.B.S. 2001. Peixes de água interiores do estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: FEMAR-SEMADS.

BRETAUD, S. et al. 2000. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on

Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47, 117-124.

BREWER, S.K. et al. 2001. Behavioral dysfunctions correlate to altered physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals. *Arch Environ Contam Toxicol* 40, 70-76.

BURKE, M.D.A., MAYER, R.T. 1974. Ethoxyresorufin-Direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition* 2, 583-588.

CAJARAVILLE, M.P. et al. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of The Total Environment* 247, 295-311.

CALEY, M.J. et al. 1996. Recruitment and the Local Dynamics of Open Marine Populations. *Annu Rev Ecol Syst* 27, 477-500.

CARLS, M.G. et al. 2002. Synthesis of the toxicological impacts of the Exxon Valdez oil spill on Pacific herring (*Clupea pallasii*) in Prince William Sound, Alaska, U.S.A. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 153-172.

CARVALHO, P.S.M. 2013. Behavioral Biomarkers and Pollution Risks to Fish Health and Biodiversity. In: PRESS, C. (Ed.). *Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems*. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 350-378.

CARVALHO, P.S.M., KALIL, D.C., NOVELLI, G.A., BAINY, A.C., FRAGA, A.P. 2008. Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus brasiliensis*. *Mar Environ Res* 66, 205-207.

CEPA – CANADIAN ENVIRONMENTAL PROTECTION ACT. 1994. Priority Substances List Assessment Report: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. National Printers Inc. Ottawa, Canada, 61 p.

CHEEVAPORN, V. et al. 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): analysis in liver and bile. *Environment Asia* 3, 8–14.

CHEFETZ, B., DESHMUKH, A.P., HATCHER, P.G. 2000. Pyrene Sorption by Natural Organic Matter. *Environmental, Science & Technology* 34, 2925-2930.

CHUIKO, G.M. 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: Specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology* 127, 233-242.

COOKE, M., DENNIS, A.J. 1984. *Polynuclear aromatic hydrocarbons: mechanisms, methods and metabolism*. Columbus, Ohio: Battelle Press, 1.464 p.

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, C.R. et al. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Química Nova 31, 1820-1830.

DA SILVA, E.S., ABRIL, S.I.M., ZANETTE, J., BIANCHINI, A. 2014. Salinity-dependent copper accumulation in the guppy *Poecilia vivipara* is associated with CTR1 and ATP7B transcriptional regulation. Aquatic Toxicology 152, 300-307.

DEPLEDGE, M.H. et al. 1992. The conceptual basis of the biomarker approach. In: PEAKALL, D. B. A. S., L. R. (Ed.). Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health. Berlin, Germany, p. 15-29.

DEPLEDGE, M.H., AAGAARD, A. e GYÖRKÖS, P. 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioral biomarkers. Marine Pollution Bulletin 31, 19-27.

DI GIULIO, R.T e HINTON, D.E. 2008. Introduction. In: Di Giulio, R.T e Hinton, D.E (Eds.). The Toxicology of Fishes. Boca Raton, FL. CRC Press. p. 3-7.

DISSANAYAKE, A., BAMBER, S.D. 2010. Monitoring PAH contamination in the field (South west Iberian Peninsula): Biomonitoring using fluorescence spectrophotometry and physiological assessments in the shore crab *Carcinus maenas* (L.) (Crustacea: Decapoda). Marine Environmental Research 70, 65-72.

DISSANAYAKE, A. et al. 2010. Elucidating cellular and behavioural effects of contaminant impact (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) in both laboratory-exposed and field-collected shore crabs, *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). Mar Environ Res 70, 368-373.

DUTTA, H.M., ARENDS, D.A. 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. Environmental Research 91, 157-162.

EDSALL, C. 1991. Acute toxicities to larval rainbow trout of representative compounds detected in Great Lakes fish. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 46, 173-178.

EDWIN, D.O. 1996. Control of water pollution from agriculture 55, 101.

EISLER, R. 1987. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Hazards to Fish, Wildlife and Invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish Wildlife Service Biological Report 85, 81.

FINGER, S.E. et al. 1985. Comparison of Laboratory and Field Assessment of Fluorene - Part I: Effects of Fluorene on the Survival, Growth, Reproduction, and Behavior of Aquatic Organisms in Laboratory Tests. In: BOYLE, T. P. (Ed.). Validation and Predictability of Laboratory Methods for Assessing the Fate and Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems. STP 865.: American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, p.134-151.

FLAMMARION, P., DEVAUX, A., NEHLS, S., MIGEON, B., NOURY, P.; GARRIC, J. 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 145-153.

FRANTZEN, M. et al. 2012. Toxicity of crude oil and pyrene to the embryos of beach spawning capelin (*Mallotus villosus*). *Aquatic Toxicology* 108, 42-52.

FUIMAN, L.A. et al. 2006. Survival skills required for predator evasion by fish larvae and their relation to laboratory measures of performance. *Animal Behaviour* 71, 1389-1399.

GALGANI, F., BOCQUENE, G., LUCON, M., GRZEBYK, F., LETROUT, F. e CLAISSE, D. 1991. EROD measurements in fish from the Northwest part of France. *Marine Pollution Bulletin* 22, 494-500.

GARCIA DE LLASERA, M.P., BERNAL-GONZÁLEZ, M. 2001. Presence of carbamate pesticides in environmental waters from the Northwest of Mexico: determination by liquid chromatography. **Water Research** [S.I.], v. 35, p. 1933-1940.

GILLIERS, C., CLAIREAUX, G., GALOIS, R., LOIZEAU, V. e LE PAPE, O. 2012. Influence of Hydrocarbons Exposure on Survival, Growth and Condition of Juvenile Flatfish: A Mesocosm Experiment. *J Life Sci* 4, 113-122.

GOMES JR, J.L., MONTEIRO, L.R. 2008. Morphological divergence patterns among populations of *Poecilia vivipara* (Teleostei Poeciliidae): Test of an ecomorphological paradigm. *Biological Journal of the Linnean Society* 93, 799-812.

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

GOMES JR, J.L., MONTEIRO, L.R. 2008. Morphological divergence patterns among populations of *Poecilia vivipara* (Teleostei Poeciliidae): Test of an ecomorphological paradigm. *Biological Journal of the Linnean Society* 93, 799-812.

GONÇALVES, R., SCHOLZE, M., FERREIRA, A.M., MARTINS, M. e CORREIA, A.D. 2008. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environ Res* 108, 205-213.

GOODALE, B.C., TILTON, S.C., CORVI, M.M., WILSON, G.R., JANSZEN, D.B., ANDERSON, K.A., WATERS, K.M. e TANGUAY, R.L. 2013. Structurally distinct polycyclic aromatic hydrocarbons induce differential transcriptional responses in developing zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology* 272, 656-670.

GRAVATO, C., GUILHERMINO, L. 2009. Effects of Benzo (a) pyrene on Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): Biomarkers, Growth and Behavior. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15, 121-137.

GREVEN, H., 2011. Gonads, genitals, and reproductive biology. *Ecology and Evolution of Poeciliid Fishes*, 3, 3-17.

GERKING, S.D. (Ed.), 1994. Feeding ecology of fish. Academic Press, San Diego.

GRAVATO, C. et al. 2014. Using a multibiomarker approach and behavioural responses to assess the effects of anthracene in *Palaemon serratus*. Aquatic Toxicology 149, 94-102.

GRUBER, S.J., MUNN, M.D. 1998. Organophosphate and Carbamate Insecticides in Agricultural Waters and Cholinesterase (ChE) Inhibition in Common Carp (*Cyprinus carpio*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 391-396.

GRUE, C.E., GILBERT, P.L., SEELEY, M.E. 1997. Neurophysiological and behavioral changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticide: Thermoregulation, food consumption and reproduction. American Zoologist 37, 369-388.

HALLARE, A., NAGEL, K., KÖHLER, H.-R., TRIEBSKORN, R., 2006. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Ecotoxicology and Environmental Safety 63, 378-388.

HARAYASHIKI, C.A.Y. et al. 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. Aquatic Toxicology 142, 176-184.

HARITASH, A.K., KAUSHIK, C.P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. J Hazard Mater 169, 1-15.

HAYNES, J.L. 1995. Standardized Classification of Poeciliid Development for Life-History Studies. Copeia 1, 147-154.

HENDON, L.A., CARLSON, E.A., MANNING, S. e BROUWER, M. 2008. Molecular and developmental effects of exposure to pyrene in the early life-stages of *Cyprinodon variegatus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 147, 205-215.

HICKEN, C.E., LINBO, T.L., BALDWIN, D.H., WILLIS, M.L., MYERS, M.S., HOLLAND, L., LARSEN, M., STEKOLL, M.S., RICE, S.D., COLLIER, T.K., SCHOLZ, N.L. e INCARDONA, J.P. 2011. Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 108, 7086-7090.

HORNSBY, A.G., WAUCHOPE, R.D., HERNER, A. (Ed.). 1995. Pesticide Properties in the Environment. Springer-Verlag, New York., Pesticide Properties in the Environment. ed.

HUBER, P.C.A., W, P.; DE FÁTIMA, A., 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. Química Nova 31, 1170-1179.

HUTCHINSON, T.H., SHILLABEER, N., WINTER, M.J., PICKFORD, D.B., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Aquatic Toxicology 76, 69-92.

- IHERING, R.V. 1938. Cyprinodontiformes brasileiros, sistemática e morfologia biológica. Archives Institute of Biology São Paulo 4, 243-270.
- INCARDONA, J.P., COLLIER, T.K., SCHOLZ, N.L. 2004. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Toxicology and Applied Pharmacology 196, 191-205.
- INCARDONA, J.P. et al. 2005. Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. Environ Health Perspect 113, 1755-62.
- INCARDONA, J.P., DAY, H.L., COLLIER, T.K., SCHOLZ, N.L., 2006. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. Toxicol Appl Pharmacol 217, 308-321.
- INCARDONA, J.P.; LINBO, T.L.; SCHOLZ, N.L. 2011. Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol Appl Pharmacol 257, 242-249.
- INCARDONA, J.P., SWARTS, T.L., EDMUNDS, R.C., LINBO, T.L., AQUILINA-BECK, A., SLOAN, C.A., GARDNER, L.D., BLOCK, B.A., SCHOLZ, N.L. 2013. Exxon Valdez to Deepwater Horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. Aquatic Toxicology 142-143, 303-316.
- INCARDONA, J.P., GARDNER, L.D., LINBO, T.L., BROWN, T.L., ESBAUGH, A.J., MAGER, E.M., STIEGLITZ, J.D., FRENCH, B.L., LABENIA, J.S., LAETZ, C.A., TAGAL, M., SLOAN, C.A., ELIZUR, A., BENETTI, D.D., GROSSEL, M., BLOCK, B.A., SCHOLZ, N.L. 2014. Deepwater horizon crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111, 1510-1518.
- INCT-TA, 2015. Brazilian National Institute of Science and Technology - Aquatic Toxicology. <<http://www.inct-ta.furg.br/>> (Accessed in April 2015).
- JEE, J.H. et al. 2004. Effects of phenanthrene on growth and basic physiological functions of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 304, 123-136.
- JEE, J.H., KANG, J.C. 2005. Biochemical changes of enzymatic defense system after phenanthrene exposure in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Physiological Research 54, 585-591.
- KANALY, R.A., HARAYAMA, S. 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. J Bacteriol 182, 2059-2067.
- KANE, A.S., SALIERNO, J.D., BREWER, S.K. 2005. Fish models in behavioral toxicology: Automated techniques, updates and perspectives. In: OSTRANDER, G. K. (Ed.). Methods in Aquatic Toxicology. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, v. 2. Cap. 32, p. 559-590.

KENDALL, R.J. et al. 2001. Ecotoxicology, in Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Klaassen, C.D., Ed., McGraw-Hill, New York, p. 1013–1045.

KLAASEN, C.D. 1999. Casarret and Doull's toxicology: the basic science of poisons. New York: McGraw-Hill Company.

KOPECKA-PILARCZYK, J., CORREIA, A.D. 2009. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to pyrene and fluorene. J Exp Mar Bio Ecol 372, 49-57.

KRAMER, V.J., ETTERSON, M.A., HECKER, M., MURPHY, C.A., ROESIJADI, G., SPADE, D.J., SPROMBERG, J.A., Wang, M., Ankley, G.T., 2011. Adverse outcome pathways and ecological risk assessment: Bridging to population-level effects. Environmental Toxicology and Chemistry 30, 64-76.

KRASNOV, A. et al. 2005. Transcriptome responses to carbon tetrachloride and pyrene in the kidney and liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology 74, 70–81.

LATIMER, J.S., ZHENG, J. 2003. The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the Marine Environment: An Ecotoxicological Perspective. John Wiley & Sons, Ltd, p. 7-33.

LEBLANC, G.A. Basics of Environmental Toxicology. In: HODGSON, E. (Ed.). A Textbook of Modern Toxicology. 3rd ed. Hoboken, New Jersey: John Wile & Sons, 2004. Cap. 26, p. 463-478.

LEE, R.F., ANDERSON, J.W. 2005. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. Marine Pollution Bulletin 50, 705-723.

LEMLY, A.D. e SMITH, G.J. 1987. Aquatic cycling of selenium: Implications for fish and wildlife. Fish and Wildlife Leaflet 12. U. S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, DC.

LETCHER, B.H. et al. 1996. Variability in survival of larval fish: disentangling components with a generalized individual-based model. Can J Fish Aquat Sci 53, 787-801.

LITTLE, E.E. 1990. Behavioral toxicology: Stimulating challenges for a growing discipline. Environmental Toxicology and Chemistry 9, 1-2.

LITTLE, E.E. et al. 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. Archives Of Environmental Contamination And Toxicology 19, 380-385.

LITTLE, E.E., BREWER, S.K. 2005. Neurobehavioral toxicity in fish. In: SCHLENK, D.; BENSON, W. H. (Ed.). Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts New Perspectives: Toxicology and the Environment. London: Taylor and Francis.

LITTLE, E.E., FINGER, S.E. 1990. Swimming Behavior as an Indicator of Sublethal Toxicity in Fish. Environ. Toxicol. Chem. 9, 13-19.

LUC, M. et al. (Eds.) 2005. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture.: CABI, 2 ed.

LYMAN, W.J. REEHL, W.F., ROSENBLATT, D.H. 1982. Handbook of chemical property estimation methods: environmental behavior of organic compounds. New York: McGraw-Hill.

MACHADO, A.A.S., HOFF, M.L.M., KLEIN, R.D., CARDOZO, J.G., GIACOMIN, M.M., PINHO, G.L.L., BIANCHINI, A. 2013. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. Aquatic Toxicology 138-139, 60-69.

MACHADO, A.A.S. et al. 2014. Oxidative stress and DNA damage responses to phenanthrene exposure in the estuarine guppy *Poecilia vivipara*. Mar Environ Res 98, 96-105.

MACKAY, D. et al. 2006. Introduction and Hydrocarbons. In: Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. 2nd ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, v. 1, p. 748-759.

MARTY, G.D. et al. 1997. Ascites, premature emergence, increased gonadal cell apoptosis, and cytochrome P4501A induction in pink salmon larvae continuously exposed to oil-contaminated gravel during development. Canadian Journal of Zoology 75, 989-1007.

MASHROOFEH, A., BAKHTIARI, A.R., POURKAZEMI, M. 2015. Distribution and composition pattern of polycyclic aromatic hydrocarbons in different tissues of sturgeons collected from Iranian coastline of the Caspian Sea. Chemosphere 120, 575-583.

MATHERS, R.A., BROWN, J.A. e JOHANSEN, P.H. 1986. The growth and feeding behaviour responses of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to PCP. Aquatic Toxicology 6, 157-164.

MATTOS, J.J., SIEBERT, M.N., LUCHMANN, K.H., GRANUCCI, N., DORRINGTON, T., STOCO, P.H., GRISARD, E.C., BAINY, A.C.D. 2010. Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. Marine Environmental Research 69, 31-33.

MCKIM, J.M., 1977. Evaluation of Tests with Early Life Stages of Fish for Predicting Long-Term Toxicity. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 34, 1148-1154.

MEADOR, J.P, STEIN, J.E., REICHERT, W.L., VARANASI, U. 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol 143, 79– 165.

MENDONÇA, J.P., ANDREATA, J.V. 2001. Aspectos reprodutivos de *Poecilia vivipara* (Bloch & Schneider) (Poeciliidae) da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia 18, 1041-1047.

MILLEMANN, R.E. et al. 1984. Comparative acute toxicity to aquatic organisms of

components of coal-derived synthetic fuels. Transactions of the American Fisheries Society 113, 74-85.

MOLES, A., NORCROSS, B.L. 1998. Effects of oil-laden sediments on growth and health of juvenile flatfishes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 55, p. 605–610.

NEFF, J.M., ANDERSON, J.W. 1975. An ultraviolet spectrophotometric method for the determination of naphthalene and alkyl naphthalenes in the tissues of oil-contaminated marine animals. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 14, 122-128.

NEFF, J.M., STOUT, S.A., GUNGSTER, D.G. 2005. Ecological Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments: Identifying Sources and Ecological Hazard. Integrated Environmental Assessment and Management 1, 22-33.

NELSON, J.S. (Ed.) 2006. Fishes of the world: John Wiley and Sons, London., 4th Ed.

OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the Testing of Chemicals: Test 210 - Fish Early Life Stage Toxicity Test: OECD Publishing: 24 p. 2013.

OKAY, O.S. et al. 2006. Effects of pyrene on mussels in different experimental conditions. Environ Int 32, 538-544.

OLIVEIRA, M., PACHECO, M., SANTOS, M.A. 2007. Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following short-term exposure to phenanthrene. Chemosphere 66, 1284-1291.

OLIVEIRA, M., GRAVATO, C., GUILHERMINO, L. 2012. Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance. Ecological Indicators 19, 206-214.

OLIVEIRA, M., RIBEIRO, A., HYLLAND, K. e GUILHERMINO, L. 2013. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). Ecol Indic, v. 34, . 641-647.

ORECCIO, S. MANNINO, M.R. 2010. Chemical speciation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: partitioning and extraction of humic substances. Marine Pollution Bulletin 60, 1175-1181.

PARENTE, T., HAUSER-DAVIS, R. 2014. The Use of Fish Biomarkers in the Evaluation of Water Pollution. In: ALMEIDA, E. A. R., C. A. O. (Ed.). Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems. Florida, USA: CRC Press, p. 164-181.

PAYNE, J.F. et al. 2003. Ecotoxicological Studies Focusing on Marine and Freshwater Fish. In: DOUBEN, P.E.T. (Ed.). PAHs: An ecotoxicological perspective. England: John Wiley & Sons Ltd. p. 191-224.

PESSOA, P.C. et al. 2011. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. Aquatic Toxicology 105, 312-320.

PLESE, L.P.M. 2005. Kinetics of carbosulfan hydrolysis to carbofuran and the subsequent degradation of this last compound in irrigated rice fields. *Chemosphere* 60, 149-156.

RAND, G.M. 2008. Fish Toxicity Studies. In: DI GIULIO, R. T. H., D. E. (Ed.). *The Toxicology of Fishes*. Florida, USA: CRC Press, Boca Raton. p. 659-681.

RAVINDRA, K. et al. 2006. Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. *Atmospheric Environment* 40, 771-785.

RICE, J.A. e MILLER, T.J. 1993. Growth Rate Variation and Larval Survival: Inferences from an Individual-Based Size-Dependent Predation Model. *Can J Fish Aquat Sci* 50, 133-142.

ROBINSON, P.D. 2009. Behavioural toxicity of organic chemical contaminants in fish: application to ecological risk assessments (ERAs). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, 1179-1188.

ROCHA, T.L., CARVALHO, R., YAMADA, A.T., SABÓIA-MORAIS, S.M.T. 2010. Morphologic analysis of developmental phases and gill ontogenesis in neotropical species *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) exposed to different salinities. *Zoologia* 27, 554-562.

ROSE, K.A. et al. 1999. Ecological responses of oviparous vertebrates to contaminant effects on reproduction and development. In: Di Giulio, R. T e Tillit, D. E (Eds.) *Reproductive and Developmental Effects of Contaminants in Oviparous Vertebrates*. SETAC Pellston Workshop on Reproductive and Developmental Effects of Contaminants in Oviparous Vertebrates. SETAC, Pensacola, Florida, USA, p. 225-281.

SAGLIO, P. et al. 1996. Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. *Arch. Environm. Contam. Toxicol* 31, 232-238.

SANDHEINRICH, M.B., ATCHISON, G.J. 1990. Sublethal Toxicant Effects on Fish Foraging Behavior: Empirical vs. Mechanistic Approaches. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 107-119.

SCHLENK, D. 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin* 39, 48-53.

SCHAWARTZ, J. 1995. *Neurotransmitters Essentials of Neural Science and Behavior*. Appleton & Lange, Norwalk, CT, USA., p. 293-306.

SCORZA, R.P. 2006. *Pesticidas, Agricultura e Recursos Hídricos*. Circular Técnica/EMBRAPA [S.I.], v. 12.

SCOTT, G.R., SLOMAN, K.A. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369-392.

- SHAILAJA, M.S., D'SILVA, C. 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* 53, 835-841.
- SLOMAN, K.A., MCNEIL, P.L. 2012. Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. *Journal of Fish Biology* 81, 2175-2198.
- SOUZA, J.R.B., CARVALHO, P.S.M. 2009. Bioindicadores e Biomarcadores no sistema bêntico. In: Leitão, S.N., El-Deir, S. (Eds.). *Bioindicadores da Qualidade Ambiental*. Instituto Brasileiro Pró-Cidadania, Recife, p. 163-174.
- SUN, Y., et al. 2008. Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver, exposed to pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 446-453.
- THORSEN, W.A., COPE, W.G., SHEA, D. 2004. Bioavailability of PAHs: Effects of Soot Carbon and PAH Source. *Environmental, Science & Technology* 38, 2029-2037.
- TOMLIN, C.D.S. 2000. *The Pesticide Manual*. British Crop Protection Council, Farnham.
- TORREIRO-MELO, A.G.A.G., SILVA, J.S., BIANCHINI, A., ZANARDI-LAMARDO, E., CARVALHO, P.S.M., 2015. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. *Chemosphere* 132, 17-23.
- TREXLER, J.C. 1989. Phenotypic plasticity in poeciliid life histories. In: MEFPE, A. S., F. F. (Ed.). *Ecology and Evolution of Poeciliid Fishes (Poeciliidae)*. New Jersey: Prentice Hall, p. 201– 213.
- TSANG, W.N., Chaillé, P.M., Collins, P.M. 2007. Growth and reproductive performance in cultured nearshore rockfish (*Sebastes* spp.). *Aquaculture* 266, 236-245.
- USEPA – U.S. Environmental Protection Agency. 126 Priority Pollutants. Disponível em: < <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants.cfm> > Acesso em: 12 de maio de 2015.
- VAN GESTEL, C.A.M., BRUMELLEN, V. 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.
- VAN WINKLE, W., ROSE, K. A. 1993. Individual-based approach to fish population dynamics: an overview. *Transactions of the American Fisheries Society* 122, 397-403.
- VAZZOLER, A.E.A. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: Universidade Estadual de Maringá.
- VERGAUWEN, L. et al. 2015. A high throughput passive dosing format for the Fish Embryo Acute Toxicity test. *Chemosphere* 139, 9-17.
- VIARENGO, A. et al. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms.

Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology 146, 281-300.

VIGNET, C. et al. 2014. Chronic dietary exposure to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs causes physiological disruption in zebrafish - part I: Survival and growth. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 13804-13817.

VOGL, C. et al. 1999. Qualification of spontaneous unidirected locomotor behavior of fish for sublethal toxicity testing. Part I. Variability of measurement parameters under general test conditions 18, 2736-2742.

VON WESTERNHAGEN, H., 1988. Sublethal Effects of Pollutants on Fish Eggs and Larvae., in: Hoar, W.S.e.R., D.J. (Ed.), *Fish Physiology*. Elsevier Science, pp. 253-346.

VRANA, B.P.A., Popp, P. 2001. Polyaromatic hydrocarbons concentrations and patterns in sediments and surface water oil of the Mansfield region, Saxony-Anhalt, Germany. *Journal of Environmental Monitoring* 3, 602-609.

WALKER, G.H. et al. (Eds.) 2005. *Principles of Ecotoxicology*: Taylor and Francis, London, UK, Third Edition.ed.

WALKER, N.J. 2001. Real-time and quantitative PCR: applications to mechanism-based toxicology. *J Biochem Mol Toxicol* 15, 121-7.

WEBB, P.W. 1986. Functional Locomotor Morphology of Early Life History Stages of Fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115, 115-127.

WEIS, J.S., KHAN, A.A. 1990. Effects of mercury on the feeding behavior of the mummichog, *Fundulus heteroclitus* from a polluted habitat. *Marine Environmental Research* 30, 243-249.

WEIS, J.S. et al. 2001. Prey capture ability of mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) as a behavioral biomarker for contaminants in estuarine systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, 1442-1452.

WEIS, J.S. et al. 2003. Evaluating prey capture by larval mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) as a potential biomarker for contaminants. *Marine Environmental Research* 55, 27-38.

WERNER, E.E. e HALL, D.J. 1974. Optimal Foraging and the Size Selection of Prey by the Bluegill Sunfish (*Lepomis Macrochirus*). *Ecology* 55, 1042-1052.

WESSEL, N., SANTOS, R., MENARD, D., LE MENACH, K., BUCHET, V., LEBAYON, N., LOIZEAU, V., BURGEOT, T., BUDZINSKI, H. e AKCHA, F. 2010. Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). *Mar Environ Res* 69, 71-73.

WILCOCK, R.J., CORBAN, G.A., NORTHCOTT, G.L. 1996. Persistence of Polycyclic Aromatic Compounds of Different Molecular Size and Water Solubility in Surficial Sediment of an Intertidal Sandflat. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 670-

676.

WILSON, S.C.J.K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environmental Pollution* 81, 229-249.

WOLTERING, D.M. 1984. The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests: A critical review. *Aquatic Toxicology* 5, 1-21.

XIA, X., LI, H., YANG, Z., ZHANG, X., WANG, H. 2015. How does predation affect the bioaccumulation of hydrophobic organic compounds in aquatic organisms? *Environmental Science and Technology* 49, 4911-4920.

YANG, S.S. et al. 1996. *J. Chromatography* 3, p. 754.

YIN, Y. et al. 2007. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. *Comparative Biochemistry and Physiology – C Toxicology and Pharmacology* 145, 288-293.

ZHANG, Y. et al. 2004. Novel method for determining pyrene biodegradation using synchronous fluorimetry. *Chemosphere* 55, 389-394.

ZHOU, T. et al. 2001. Effects of methylmercury on ontogeny of prey capture ability and growth in three populations of larval *Fundulus heteroclitus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 41, 47-54.

ZIMMER, A.M., BARCAROLLI, I.F., WOOD, C.M., BIANCHINI, A. 2012. Waterborne copper exposure inhibits ammonia excretion and branchial carbonic anhydrase activity in euryhaline guppies acclimated to both fresh water and sea water. *Aquatic Toxicology* 122-123, 172-180.