Mariana Frias de Campos

Fenantreno como desregulador endócrino na garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Perciformes: Serranidae), um hermafrodita protogínico

Endocrine disruption of phenanthrene in the protogynous dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Perciformes: Serranidae)

Versão Corrigida

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Mariana Frias de Campos

Fenantreno como desregulador endócrino na garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Perciformes: Serranidae), um hermafrodita protogínico

Endocrine disruption of phenanthrene in the protogynous dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Perciformes: Serranidae)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Prof^a Dr^a Renata Guimarães Moreira Whitton

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

Campos, Mariana Frias de

Fenantreno como desregulador endócrino na garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Perciformes: Serranidae), um hermafrodita protogínico / Mariana Frias de Campos ; orientadora Renata Guimarães Moreira Whitton. -- São Paulo, 2016.

71 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. HPA. 2. Esteroides gonadais. 3. Hermafroditismo protogínico
4. Toxicidade aguda. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

Comissão Julgadora

Dr Renato Massaaki Honji

Profª Drª Claudia Bueno dos Reis Martinez

Prof Dr Tiago Gabriel Correia

Dedicatória

Dedico esse trabalho a todos que se dispõem a viver pela ciência e que, passo a passo e laboriosamente, desenvolvem e aprimoram a nossa sociedade. Também o dedico aos que os apoiam, compreendem e incentivam a continuar fazendo seu tão importante trabalho. E principalmente, o dedico a todos que estiveram ao meu lado nos últimos anos, permitindo que eu também pudesse fazer parte dessa intensa realidade da pesquisa.

Mariana Frias de Campos

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família. A meus pais, Maristela e Júnior, por terem lutado muito para que eu conquistasse meus sonhos e terem me ensinado o valor do trabalho honesto e feito com paixão. A minha irmã, Giovanna, por me ensinar que as diferenças não são obstáculos entre as pessoas, mas oportunidades de aprendermos coisas maravilhosas. Aos três, agradeço por todo o incentivo, por serem meu porto seguro e por sempre colocarem esperança no meu coração.

A Professora Doutora Renata Guimarães Moreira Whitton pela confiança depositada e pela oportunidade de desenvolver esse projeto. Agradeço pela dedicação incondicional, por toda orientação e paciência e também pela maneira fraternal que nos acolhe, tão importante para que o trabalho não perca o lado humano.

A Professora Doutora Fabiana L. Lo Nostro e ao Dr. Rodrigo H. Da Cuña por terem se dedicado intensamente e que, juntamente com a Prof^a Renata, permitiram que todos os percalços fossem superados com trabalho árduo, mas sobretudo, com muito entusiasmo, companheirismo e amor pelo trabalho. “Equipe Paráguas”, serei eternamente grata por toda a atenção, disposição e amizade!

Aos integrantes do Projeto Garoupa (Bruno Araújo, Carlos Eduardo Garcia, Jandyr Rodrigues Filho e Paulo Mello) por terem me recebido e me introduzido no mundo da Fisiologia e aos técnicos do projeto, Jéssica Teske e Evandro Tomelim, por todo o cuidado e dedicação com os animais e nossos experimentos.

Ao Centro de Biologia Marinha da USP por ter me oferecido a infraestrutura necessária para desenvolver meus experimentos e especialmente aos técnicos do CEBIMar, Elso da Silva e Joseilto Oliveira, por serem sempre tão dispostos e por ajudarem tanto e de maneiras muitas vezes inusitadas.

A família LAMEROA (e as ex-lameroenses Amanda Narciso, Bianca Kida, Cristiéle Ribeiro (Cris) e Raísa Pereira) por ter me recebido desde o princípio de maneira tão afetuosa e ter contribuído, cada um à sua maneira, com um pedacinho desse trabalho. Um agradecimento especial aos amigos Paulo Mello, Bruno Araújo, Gabriela Brambila (Gabi) e Renato Honji por me ajudarem ativamente em diversas etapas desse trabalho. Sem vocês, não teria conseguido! Também ao Carlos Eduardo Tolussi (Kadu), a Aline Gomes, ao Honji e a Cris por todas as conversas de salinha e perguntas capciosas nas prévias e seminários que contribuíram tanto, não somente para esse projeto, mas para o meu crescimento profissional como um todo.

A Roseli Santos por ser sempre tão solícita e tirar minhas dúvidas em velocidade recorde.

Ao Thierry Salmon por todo o tempo e energia dedicados a esse projeto, me ensinando e me ajudando e principalmente, por toda a paciência, por ser minha calma e meu parceiro. Obrigada por estar incondicionalmente ao meu lado.

Aos novos amigos, Graziela Rosa, Patrick Rivière, Thomas Gallois, Yara Zanovello e aos velhos, Beatriz Fabretti, Cauê Tavares, Cristiane Millán e Giuliana Milani, por terem transformado minha curta estadia em São Paulo um período muito mais agradável e já saudosos.

A “Betty” e Regis Salmon por me abrigarem em seu lar por longos meses de maneira tão acolhedora e carinhosa.

As minhas grandes amigas Keila Kakazu, Cristina Pini Greco e Thaís Censi por me apoiarem mesmo quando estivemos distantes, por sempre conseguirem um tempinho para nós e por toda a amizade dedicada ao longo de todos esses anos.

As meninas “d’A grade”, Deborah Gallo, Fernanda Gianinni, Kátia Capel e Paula Kasten, por se tornarem minha família e por todos os momentos únicos e maravilhosos que compartilhamos vivendo juntas.

E por último, mas não menos importante, a minha companheira felina, Juana, simplesmente por existir. Obrigada por ter me adotado!

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Panorama atual da contaminação por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	1
1.2. Desreguladores Endócrinos	4
1.3. Histopatologia	6
1.4. Os efeitos dos HPAs sobre a biota	8
1.5. O fenantreno no ambiente e seus impactos sobre a fisiologia dos organismos	8
1.6. Juvenis hermafroditas sequenciais	10
1.7. A espécie <i>Epinephelus marginatus</i> em um ambiente de degradação	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Animais	13
3.2. Canal de São Sebastião: Análise de água e sedimentos	14
3.3. Fenantreno	15
3.3.1. Meia vida do fenantreno	15
3.4. Determinação da Concentração Média Letal: CL ₅₀	16
3.5. Experimento <i>in vivo</i> : Bioensaio de exposição aguda subletal	18
3.6. Descarte de água experimental	20
3.7. Experimento <i>in vitro</i>	20
3.8. Determinação da concentração dos esteroides	21
3.9. Avaliação histológica	22
3.10. Análises estatísticas	22
4. RESULTADOS	24
4.1. O fenantreno no Canal de São Sebastião	24
4.2. Meia vida do fenantreno	24
4.3. Descarte de água experimental	25
4.4. Determinação do CL ₅₀	25

4.5. Experimento <i>in vivo</i> : Bioensaio de exposição aguda subletal	26
4.5.1. Índices somáticos	26
4.5.2. Concentração dos esteroides plasmáticos	26
4.5.3. Avaliação histológica	28
4.5.3.1. Gônadas	28
4.5.3.2. Fígado	29
4.5.3.3. Baço	31
4.6. Observações dos animais durante os ensaios (CL ₅₀ e <i>in vivo</i>)	33
4.7. Efeitos da exposição <i>in vitro</i>	34
5. DISCUSSÃO	36
5.1. <i>Epinephelus marginatus</i>	36
5.2. Valores ambientais de fenantreno	36
5.3. Determinação do CL ₅₀	38
5.4. Histopatologia e Índices somáticos	38
5.4.1. Gônadas	38
5.4.2. Fígado	39
5.4.3. Baço	40
5.5. Concentração de esteroides gonadais	41
5.6. Uso do etanol como veículo	43
5.7. Observações dos animais durante os ensaios (CL ₅₀ e <i>in vivo</i>)	44
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
8. ANEXOS	66

RESUMO

A poluição marinha por petróleo e seus derivados é uma preocupação crescente de caráter global. O litoral norte do estado de São Paulo é hoje caracterizado como a região mais altamente impactada por esses contaminantes de toda a costa Sul e Sudeste do país. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), como o fenantreno, são os maiores componentes do petróleo cru, são potencialmente tóxicos à biota, podendo atuar como desreguladores endócrinos e gerando risco para o processo reprodutivo dos animais expostos. O presente trabalho buscou verificar efeitos do fenantreno como desregulador endócrino na esteroidogênese gonadal de juvenis de *Epinephelus marginatus*. Essa espécie se caracteriza pelo hermafroditismo protogínico, de modo que os juvenis costumam apresentar altas concentrações plasmáticas de esteroides, o que gera preocupação quanto os efeitos reprodutivos decorrentes de alterações no padrão de produção de esteroides, especialmente em uma espécie que já vem sofrendo declínios populacionais por conta da sobrepesca. A CL₅₀ de fenantreno encontrada para juvenis de *E. marginatus* foi 1,51 mg/L. Foi realizado um bioensaio subletal (96h) com quatro grupos experimentais (n=10): grupo controle; duas concentrações distintas de fenantreno (0,1 mg/L e 1 mg/L) e grupo exposto ao veículo de diluição (0,004% de etanol). Foram dosadas as concentrações de 17 β -estradiol (E₂), testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT) plasmáticos por ELISA. Gônadas, fígado e baço foram processados para análise histológica. Foi conduzido bioensaio *in vitro* com incubação de fragmentos gonadais sob ação de fenantreno (50 μ M) ou etanol. Os níveis dos mesmos esteroides também foram dosados por ELISA no meio de incubação. A exposição *in vivo* ao fenantreno resultou em aumento na área dos hepatócitos, bem como no número de centro melanomacrofágicos e hemossiderose no baço. O etanol induziu efeitos similares no baço. Os níveis de E₂ e T não se alteraram no plasma ou no meio de incubação *in vitro*. O fenantreno reduziu a concentração de 11-KT *in vitro* e *in vivo*. No plasma, o etanol também causou esse decréscimo. Considerando a importância do 11-KT no desenvolvimento dos ovários em teleósteos, o fenantreno parece causar desregulação da esteroidogênese em juvenis de *E. marginatus*, possivelmente gerando disfunções durante a inversão sexual.

Palavras-chave: HPA, esteroides gonadais, hermafroditismo protogínico, toxicidade aguda.

ABSTRACT

Marine pollution by crude oil and its residual products is a growing global concern. The Northern coast of São Paulo state is characterized as the highly impacted area by these contaminants through Brazil's South and Southeast coast. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), such as phenanthrene, are the main crude oil components and have a significant toxic potential to biota, acting as endocrine disruptors and generating negative impacts to reproduction. This study aimed to investigate the effects of phenanthrene as endocrine disruptor on gonadal steroidogenesis in *E. marginatus* juveniles. As a hermaphrodite protogynous species, *E. marginatus* juveniles maintain high levels of plasma steroids as substrates for sex inversion, which causes concern about reproductive effects of disruptions in steroid production patterns, especially in an overfished species. Phenanthrene LD₅₀ to *E. marginatus* exposed to phenanthrene was established in 1.51 mg/L. An *in vivo* sublethal exposure (96 h) to phenanthrene was carried out with four experimental groups (n=10): control group, two phenanthrene concentrations (0.1mg/L and 1 mg/L) and one group exposed to the vehicle (ethanol 0,004%). Plasma levels of 17 β -estradiol (E₂), testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-KT) were measured by ELISA. Gonads, liver and spleen were processed for histological analysis. In an *in vitro* bioassay, gonad fragments were incubated with phenanthrene (50 μ M) or ethanol. Steroid levels in the culture media were also measured by ELISA. The *in vivo* exposure to phenanthrene triggered an increase of the area of the hepatocytes, increased number of melanomacrophagic centers and hemosiderosis in the spleen. Ethanol also induced similar effects on spleen. E₂ and T levels did not change neither in plasma nor *in vitro* media. Phenanthrene sharply reduced 11-KT levels *in vitro* and *in vivo*. In plasma, ethanol also decreased 11-KT levels. Considering the importance of 11-KT in fish developing ovaries, phenanthrene seems to disrupt steroidogenesis in juvenile grouper, possibly being able to cause dysfunctions during sex change.

Key-words: PAH, gonadal steroids, protogynous hermaphroditism, acute toxicity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Panorama atual da contaminação por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Estima-se que cerca de 90% da produtividade marinha esteja intimamente relacionada com a área costeira, principalmente nas regiões subtropical e tropical. Essas são regiões de extrema importância para a conservação da biodiversidade constituindo locais de reprodução e desenvolvimento da biota marinha (Zagatto & Bertolotti, 2008). Apesar disso, tais áreas estuarinas e costeiras vêm sendo utilizadas como depósitos de resíduos domésticos, agrícolas, industriais, dentre outros tipos de poluentes e, desde que os organismos que compõem tal comunidade apresentam seus tecidos com altas concentrações desses compostos químicos, eles têm sido amplamente utilizados no monitoramento de contaminação do ambiente (Kennish, 1991; Pereira *et al.*, 2012).

A poluição marinha causada por petróleo é uma preocupação mundial crescente e sua entrada no ecossistema oceânico pode ocorrer através de inúmeras e variadas fontes, como o lançamento de efluentes no mar, deságue de rios contaminados, liberação de resíduos das refinarias, além dos derramamentos acidentais durante a exploração e transporte do petróleo e seus derivados ou como consequência de infortúnios náuticos como encalhes e vazamentos (Evans & Rice, 1974; Law, 1981). Estima-se que 2,95 milhões de toneladas de petróleo sejam depositados no ambiente marinho anualmente por atividades antrópicas e que cerca de 49,8% desse total seja liberado durante o transporte (Doerffer, 2013).

Os dez maiores registros de derramamentos acidentais com navios petroleiros (entre 1967 e 2012) liberaram individualmente mais de 100.000 toneladas de petróleo no ambiente marinho em diversas áreas oceânicas (Figura 1) e o maior deles ocorreu com a embarcação *Atlantic Express* 1979 quando 287.000 toneladas foram liberadas na região de Tobago. Acidentes não relacionados a navios (principalmente em plataformas de extração) são menos frequentes, mas geralmente muito mais graves, como o ocorrido no Golfo do México em 2010 quando cerca de 700.000 toneladas de petróleo vazaram para o ambiente marinho (ITOPF). Muitos desses acidentes não são devidamente investigados ou divulgados por ocorrerem em regiões distantes do litoral, não apresentando efeitos diretos sobre os sistemas costeiros que impactam as pessoas que usufruem desses recursos, todavia isso não isenta a biota marinha das consequências dessa contaminação, tampouco as comunidades costeiras que, devido à dinâmica intensa

das correntes oceânicas pode ser seriamente afetada ainda que essa contaminação não seja visível (Farrington, 2013; Lohmann *et al.*, 2013)

Figura 1: Mapa dos dez maiores derramamentos acidentais (ranqueados em ordem decrescente) por navios petroleiros registrados entre 1967 e 2012. Modificado de *International Tanker Owners Pollution Federation Limited (ITOPF)*.

No Brasil, há algumas décadas, a região da Baixada Santista no Estado de São Paulo passou por um extenso processo de expansão urbana envolvendo a implantação de polos industriais, marinas, portos e terminais de extração de petróleo. Nos últimos anos, o litoral norte do Estado vem passando por uma transição similar, ainda que cerca de 60% dessa região (municípios de Ubatuba, Caraguatatuba, São Sebastião e Ilhabela) sejam áreas protegidas legalmente (Pereira *et al.*, 2012).

O Canal de São Sebastião (CSS) (Figura 2) apresenta 25 km de extensão, profundidades que variam de 20 a 40m e pode ser considerado um excelente porto natural, já que a região de maior profundidade acompanha a extensão da Ilhabela e essa se apresenta como uma barreira ao canal (Weber & Bícigo, 1991; Cunha, 2003). Assim, estrategicamente, o canal abriga o Porto Estadual de São Sebastião (o segundo mais importante porto comercial do Estado) e o Terminal Almirante Barroso (TEBAR), maior unidade operacional da Transpetro, responsável pelo recebimento de petróleo nacional e internacional e por sua transferência para as refinarias do Estado de São Paulo. As refinarias Recap (Capuava) e RPBC (Presidente Bernardes) são abastecidas pelo oleoduto Santos-São Sebastião (Osbat), enquanto que o oleoduto São Sebastião-Guararema (Osvat) abastece as refinarias Replan (Paulínia) e Revap (Vale do Paraíba), além de ser responsável pelo transporte do petróleo e seus derivados no terminal (Cunha, 2003; TRANSPETRO). Dessa forma, diversas atividades responsáveis, não

somente pelo lançamento de resíduos, mas também por episódios de derramamentos acidentais de petróleo tem sido intensamente desenvolvidas no CSS (Weber & Bicego, 1991; Pereira *et al.*, 2012).

Figura 2: Canal de São Sebastião (CSS), SP, costa Sudeste do Brasil (Modificado de: www.usp.br/cbm)

Segundo Tommasi (1994), o litoral norte de São Paulo representa a região mais impactada pelos derramamentos de petróleo de todo o Sudeste e Sul do país. A primeira ocorrência grave foi registrada no ano de 1974 com o navio *Takimya Maru*, o qual lançou mais de 6.000 toneladas de óleo no CSS e desde então uma espantosa quantidade de emergências químicas relacionadas ao petróleo e seus derivados (cerca de 270 ocorrências até o ano de 2004) foram registradas (CETESB, 1994; Poffo, 2000).

O petróleo cru é constituído principalmente por hidrocarbonetos (98% da composição total) combinados com uma variedade de compostos de oxigênio, nitrogênio e enxofre, além de alguns metais traço (Evans & Rice, 1974; Zagatto & Bertoletti, 2008). Os hidrocarbonetos podem ser classificados em três diferentes categorias: parafínico, naftalênico e aromático. Esses últimos apresentam cadeias circulares insaturadas e duplas ligações carbono-carbono, sendo que aqueles formados por dois ou três anéis aromáticos estão, geralmente, associados a atividades petrogênicas enquanto que aqueles com maior número de anéis são comumente resultantes de processos de combustão, mas todos parecem ser intimamente relacionados à atividade antrópica (Lourenço *et al.*, 2013).

Essa estrutura hidrofóbica/lipofílica dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) é responsável pelo alto nível de toxicidade que apresentam, devido a facilidade de absorção de tais substâncias pela biota, mesmo em baixas concentrações (Evans & Rice, 1974; Camus *et al.*, 2002), especialmente para os organismos aquáticos, já que essa natureza lipofílica garante uma maior persistência no meio aquoso e uma tendência a se bioacumular no tecido adiposo e afetar a fisiologia dos organismos (Meador *et al.*, 1995; Veintemilla, 2006; Zagatto & Bertoletti, 2008). No entanto, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) só estabelece teores máximos para certos HPAs (benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno e benzo(b)fluoranteno) para águas salinas onde haja pesca ou cultivo de organismos para consumo (Classe 1), de forma que não há nenhuma legislação brasileira que determine concentrações críticas de outros tipos de HPAs que podem ser igualmente nocivos, tampouco que atente para a qualidade da água a nível de conservação da biota (CONAMA 357/2005; Machado *et al.*, 2014).

1.2. Desreguladores Endócrinos

O controle do processo reprodutivo depende da coordenação dos processos fisiológicos com os estímulos ambientais que modulam o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (H-H-G). Esse eixo (Figura 3) é modulado a partir do estímulo do hipotálamo, responsável pela integração dos sinais de agentes exógenos (temperatura, fotoperíodo, características físico-químicas da água) com aqueles produzidos endogenamente através da ação de hormônios e neurotransmissores (melatonina, dopamina, ácido gamma-aminobutírico (GABA), norepinefrina, neuropeptídeo Y (NPY), serotonina e kisspeptina), de maneira a coordenar as respostas comportamentais e reprodutivas. O hipotálamo é a principal região de síntese do hormônio liberador de gonadotropinas, GnRH, responsável por estimular a síntese e liberação das gonadotropinas FSH (hormônio folículo-estimulante) e LH (hormônio luteinizante) pela hipófise (Rocha & Rocha, 2006; Zohar *et al.*, 2010).

As gonadotropinas por sua vez estimulam a produção dos esteroides gonadais. O FSH atua nos primeiros estágios da maturação gonadal e é responsável tanto pela conversão de colesterol em testosterona, quanto pela produção de 17β - estradiol (E_2) através da aromatização da testosterona (enzima aromatase). Em fêmeas, além da produção de E_2 , o FSH promove a incorporação de vitelogenina nos oócitos, enquanto que nos machos estimula a proliferação das células de Sertoli e promovem a

[illegible]

5

Muitos contaminantes como metais pesados, agrotóxicos e HPAs podem atuar em diversos pontos do eixo H-H-G, interferindo diretamente sobre o sistema endócrino. Essas substâncias são denominadas Desreguladores Endócrinos (DE) ou “*Endocrine Disrupting Chemicals*” (EDC) e podem alterar processos desde a síntese e degradação hormonal, bem como a sua liberação e metabolismo, podem mimetizar hormônios endógenos ou bloquear receptores hormonais, induzindo ou inibindo respostas fisiológicas e, dessa forma, impactar seriamente a reprodução (Tyler *et al.*, 1998; Nicolas, 1999; Matthiessen & Johnson, 2007; Senthilkumaran, 2015; Maqbool *et al.*, 2016).

Devido à complexidade do eixo H-H-G, compreender os mecanismos que levam um contaminante a causar determinada desregulação endócrina é tão desejável quanto laborioso, já que as possibilidades de atuação sobre os níveis hierarquicamente organizados do sistema endócrino envolvem inúmeras vias de sinalização. Por exemplo, alterações na concentração plasmática de esteroides podem estar relacionadas com inibição da liberação de GnRH hipotalâmico, decréscimo na síntese de gonadotropinas, aumento do catabolismo hepático ou diminuição da atividade de enzimas esteroidogênicas, dentre outras possibilidades (Monteiro *et al.*, 2000a). Portanto, avaliar os efeitos de um DE em diversos níveis do sistema endócrino, pode oferecer uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos, de forma que experimentos *in vitro* têm sido amplamente utilizados para elucidação da toxicidade dos contaminantes sobre pontos específicos do eixo H-H-G (Monteiro *et al.*, 2000a,b; Aizen *et al.*, 2012; Cabas *et al.*, 2012.)

1.3. Histopatologia

Desde que órgãos e tecidos respondem de maneiras variadas a estímulos fisiológicos ou patológicos, alterações morfológicas podem oferecer pistas dos impactos causados pela exposição de um organismo a determinado contaminante, de forma que as lesões histopatológicas são amplamente utilizadas como biomarcadores em peixes (Takashima & Hibiya, 1995; Van der Oost *et al.*, 2003).

O fígado dos peixes é um órgão relativamente grande, geralmente localizado do lado esquerdo da cavidade abdominal e tem como principais funções o estoque de glicogênio e outros nutrientes, o metabolismo de ácidos graxos e a biossíntese de enzimas e lipoproteínas. Também é responsável pela desintoxicação e biotransformação de substâncias tóxicas, já que apresenta diversas enzimas de metabolismo de

contaminantes, como as do citocromo P450, o que o torna susceptível a acumulação de tais compostos e pode ser sobrecarregado, refletindo em diversos tipos de lesão hepática (Takashima & Hibiya, 1995). As células hepáticas apresentam formato poligonal, um núcleo central e um nucléolo proeminente, podendo conter vacúolos de lipídeos e glicogênio em seu citoplasma. Os hepatócitos costumam se organizar em filamentos e em várias espécies de teleósteos o tecido pancreático encontra-se intercalado com o parênquima hepático no que se denomina hepatopâncreas. Uma grande variedade de lesões hepáticas pode estar relacionada com a exposição do organismo a contaminantes, como vacuolização, degeneração por acúmulo de gordura, apoptose, colestase, atrofia celular, degeneração do núcleo (núcleo picnótico), cirrose, hepatite, necrose, tumores, neoplasias, entre outros (Hibiya *et al.*, 1982; Wolf & Wolfe, 2005; Hodgson & Levi, 2010).

O baço funciona como um órgão hematopoiético acessório, sendo o principal órgão imunológico em peixes, grupo no qual suas polpas vermelha e branca são encontradas entremeadas e não separadas em camadas como em vertebrados superiores. Costuma apresentar coloração vermelha escura e geralmente encontra-se aderido a parede intestinal, sendo composto principalmente por tecido conectivo, uma rede de capilares e células como eritrócitos, eritoblastos, linfócitos, monócitos e macrófagos. Tem como funções degradação celular, filtragem do sangue, além de ser local de reserva de eritrócitos e está envolvido em todas as inflamações sistêmicas e distúrbios metabólicos (Hibiya *et al.*, 1982; Takashima & Hibiya, 1995). No baço são tipicamente encontrados os centro melanomacrofágicos (CMMs), que consistem em agrupamentos de macrófagos pigmentados (melanina, lipofucsina e hemosiderina resultante da degradação de eritrócitos), o que os torna bastante conspícuos. Apresentam função de fagocitose, de maneira que isolam substâncias que devem ser armazenadas ou desintoxicadas, e dessa forma costumam ter sua quantidade e distribuição alteradas quando ocorre a exposição do organismo a diversas classes de químicos (Wolke, 1992; Agius & Roberts, 2003).

Nas gônadas, os contaminantes podem agir diretamente sobre o tecido, mas atuam principalmente de maneira indireta devido às consequências das desregulações endócrinas no eixo H-H-G. Alterações na síntese, metabolismo ou interação com receptores de GnRH, das gonadotropinas ou dos próprios esteroides sexuais podem levar a mudanças no tamanho e massa gonadal, bem como fase do desenvolvimento das

células germinativas, podendo comprometer severamente a fertilidade e fecundidade dos animais (Denslow & Sepúlveda, 2007; Sun *et al.*, 2011; Geraudie *et al.*, 2014).

1.4. Os efeitos dos HPAs sobre a biota

Pesquisas anteriores já demonstraram os efeitos da exposição de peixes aos HPAs: imunotoxicidade, efeitos comportamentais, citotóxicos, genotóxicos, carcinogênicos, histopatológicos, morfológicos, distúrbios no equilíbrio iônico, consequências mutagênicas, alterações fisiológicas e de estresse oxidativo, assim como redução da sobrevivência (Thomas & Rice, 1987; Hose *et al.*, 1996; Kocan *et al.*, 1996; Duncan, 1998; Carls *et al.*, 1999; Heintz *et al.*, 1999; Incardona *et al.*, 2004; Matsuo *et al.*, 2006; Kennedy & Farrell, 2005; Simonato *et al.*, 2008; Salvo *et al.*, 2016). Além disso, diversos HPAs podem interferir no sistema endócrino de peixes e gerar alterações na reprodução dos organismos contaminados (Nicolas, 1999; Monteiro *et al.*, 2000a,b; Pacheco & Santos, 2001; Kennedy & Smyth, 2015).

Particularmente, os HPAs têm o seu processo de desintoxicação relacionado com algumas das enzimas do complexo P450, como a CYP1A, que também está intimamente relacionada com as vias de biossíntese de alguns esteroides. Além disso, parte da regulação do citocromo P450 é realizada por esteroides, principalmente pelo cortisol (rins) e estradiol (gônadas), de maneira que a exposição a esses hidrocarbonetos pode induzir ou interferir na atividade de enzimas dependentes do sistema do citocromo P450 resultando em desequilíbrios na cinética dos esteroides (Stegeman & Lech, 1991; Nicolas, 1999; Martin-Skilton *et al.*, 2006; Kennedy & Smyth, 2015). Contudo, já foram relatados efeitos estrogênicos de HPAs não relacionadas com o sistema P450, de forma que a disrupção endócrina se deu em pontos diversos do eixo H-H-G (Monteiro *et al.*, 2000a,b; Kennedy & Smyth, 2015).

1.5. O fenantreno no ambiente e seus impactos sobre a fisiologia dos organismos

O fenantreno é o hidrocarboneto com maior concentração no petróleo cru e em alguns outros derivados de petróleo e está entre os 129 poluentes prioritários da USEPA (do inglês *United States Environmental Protection Agency*) (U.S. EPA) devido a sua distribuição e toxicidade (Karami *et al.*, 2016). Lohmann *et al.* (2013) descreveram perfis das concentrações de HPAs encontrados a 50 metros de profundidade ao longo do Oceano Atlântico e verificaram que o fenantreno, o benzo(g,h,i)fluoranteno e trifenileno

estavam presentes em quase todas as amostras analisadas e o fenantreno apresentou as maiores concentrações (em média 170 pg/L), alcançando até 1400 pg/L na costa Norte Americana.

Dentre os HPAs mais abundantes no CSS encontram-se pireno, naftleno, antraceno e o fenantreno sendo esse último correspondente a 98% da composição do óleo cru descarregado nos oleodutos do porto petrolífero local (Gabardo *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2008; da Silva & Bícigo, 2010; Salvo *et al.*, 2016). O pireno parece ser uma substância majoritariamente proveniente de fontes biogênicas, de maneira que sua alta concentração não seria atribuída às atividades petrolíferas (da Silva & Bícigo, 2010). Apesar da relação estabelecida entre a toxicidade dos hidrocarbonetos e o número de anéis aromáticos que apresentam (Black *et al.*, 1983), HPAs de baixo peso molecular, como os naftalenos, já foram demonstrados como tóxicos e perigosos à biota (McKee *et al.*, 1983; Santos *et al.*, 2011) de maneira que é de grande importância que compostos de maior peso molecular e ampla distribuição pelos sistemas aquáticos, como o antraceno e o fenantreno, tenham seus efeitos avaliados (Veintemilla, 2006), ainda que sua toxicidade seja considerada inferior a de outros HPAs como o benzo(a)pireno (Black *et al.*, 1983).

Sabe-se que a exposição ao fenantreno é capaz de causar morte celular em moluscos, até mesmo quando em baixas concentrações, além de gerar estresse oxidativo pela lipoperoxidação e reduzir a função imune nesses organismos (Hannam *et al.*, 2010; Dailianis *et al.*, 2014). Em peixes, efeitos sobre o crescimento e danos ao DNA foram descritos em duas espécies de linguados, *Paralichthys olivaceus* e *Poecilia vivipara* (Jee *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2014). Além disso, esse composto pode afetar o comportamento do dourado, *Salminus brasiliensis*, devido à alteração na acuidade visual gerando dificuldade na captura de presas durante a fase larval (Carvalho *et al.*, 2008).

Veintemilla (2006) verificou maior acúmulo de fenantreno no fígado e na bile de tambaquis, *Colossoma macropomum*, expostos a esse contaminante. Também foi observado comprometimento das brânquias e diminuição significativa em ganho de peso, taxa de crescimento, eficiência alimentar e conteúdo de hemoglobina, ao passo em que os valores de glicose, lactato e metahemoglobina foram superiores nesses indivíduos. Karami *et al.* (2016) verificaram aumentos significativos em lesões histopatológicas no fígado e nas brânquias de bagres africanos, *Clarias gariepinus*, diploides e triploides expostos ao fenantreno por 96 horas.

Efeitos sobre a reprodução também já foram verificados em solha-das-pedras, *Platichthys flesus*, bacalhau-polar, *Boreogadus saida*, carpa-comum, *Cyprinus carpio*, dentre outras espécies de peixes. No entanto, vários tipos de alterações foram observados sem possibilidade de estabelecimento de um padrão consistente (Nicolas, 1999; Monteiro *et al.*, 2000b; Han *et al.*, 2010; Geraudie *et al.*, 2014).

1.6. Juvenis hermafroditas sequenciais

O hermafroditismo sequencial parece ser um padrão sexual bem sucedido em teleósteos, especialmente em espécies marinhas distribuídas em zonas tropicais (Reinboth, 1998; Pavlov *et al.*, 2009). São dois os tipos de hermafroditismo sequencial: protândria e protoginia, sendo a segunda mais difundida entre teleósteos. As espécies protândricas primeiramente maturam sexualmente como machos e mais tardiamente os indivíduos sofrem inversão sexual tornando-se fêmeas. Na protoginia, de maneira inversa, os animais tem sua primeira maturação sexual como fêmea, e em um determinado momento, geralmente em resposta a alterações sócio demográficas dos haréns, o tecido ovariano é reduzido, enquanto que há proliferação do tecido testicular (Pavlov *et al.*, 2009).

Sabe-se que o eixo H-H-G também tem função fundamental sobre o controle do sexo fenotípico em teleósteos que apresentam hermafroditismo sequencial, de forma que a inversão sexual ocorre principalmente devido a uma mudança no padrão de produção de esteroides. Em animais protogínicos, há uma diminuição na concentração de E₂, ao passo que a concentração de 11-KT eleva-se, promovendo a masculinização (Bhandari *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2013).

Em diversos aspectos a 11-KT tem sido considerada o principal andrógeno em teleósteos e ainda que em algumas espécies os níveis basais de T em fêmeas sejam maiores do que os de 11-KT (Slater *et al.*, 1994; Lokman *et al.*, 2002), diversos estudos têm demonstrado a importância desse andrógeno no processo de maturação reprodutiva das fêmeas. Lokman *et al.* (1998) observaram altos níveis de 11-KT em enguia-australiana, *Anguilla australis* migratórias na época de maturação reprodutiva, sugerindo um possível papel deste andrógeno na preparação desses animais para a reprodução. Ensaios *in vivo* e *in vitro* com essa espécie demonstraram que a 11-KT promove o desenvolvimento de caracteres morfológicos relacionados à maturação sexual, bem como aumento na massa das gônadas, no diâmetro dos oócitos e de seus núcleos, e na abundância das gotas de lipídio, além de ser verificado um aumento

significativo no mRNA da enzima lipoproteína lipase (LPL) e a indução de efeitos da sinalização de FSH tanto na hipófise quanto nos ovários (Rohr *et al.*, 2001; Lokman *et al.*, 2007; Divers *et al.*, 2010; Setiawan *et al.*, 2012).

De maneira similar, Endo *et al.* (2011) verificaram um aumento significativo no diâmetro de oócitos da enguia-japonesa, *Anguilla japonica* expostos a 11-KT enquanto que nenhum efeito foi observado na presença de E₂. No bacalhau-do-Atlântico, *Gadus morhua*, análises histológicas demonstraram crescimento e desenvolvimento de oócitos pré-vitelogênicos expostos a T e, de maneira mais pronunciada, a 11-KT. Foi verificada ainda uma relação entre a dose do esteroide e modulação da expressão do mRNA de genes responsáveis pela esteroidogênese e crescimento celular nesta espécie (Kortner *et al.*, 2009).

Apesar de animais gonocóricos apresentarem baixas concentrações de esteroides gonadais enquanto juvenis, valores significativos desses hormônios já foram relatados em espécies hermafroditas protogínicas durante essa fase (Borg, 1994; Heppell, 2005; Rodrigues-Filho, 2010), ainda que os motivos desse padrão não sejam completamente elucidados. Heppell (2005) verificou ciclos sazonais bem definidos de testosterona e 11-KT em juvenis de badejo-de-areia, *Mycteroperca microlepis*, que são possivelmente relacionados aos efeitos inibitórios sobre a masculinização dos indivíduos na fase anterior à maturação sexual. Além disso, a elevada concentração de andrógenos observados em fêmeas jovens poderia ser atribuída à necessidade desse indivíduo apresentar uma estrutura bioquímica engatilhada para uma resposta rápida a uma mudança na composição demográfica que demande a inversão sexual.

1.7. A espécie *Epinephelus marginatus* em um ambiente em degradação

A espécie estudada no presente trabalho, *Epinephelus marginatus*, é um teleósteo marinho da família Serranidae, que pode chegar a 1,5 m de comprimento e 60 kg de massa corpórea, o que justifica o seu alto valor comercial (Heemstra & Randall, 1993). Assim como outros membros da subfamília Epinephelinae, apresentam fecundação cruzada e hermafroditismo protogínico, estratégia reprodutiva na qual todos os indivíduos maturam sexualmente como fêmeas e mais tardiamente passam pelo processo de inversão sexual, tornando-se machos (Figueiredo & Menezes, 1980). É uma espécie amplamente distribuída, sendo encontrada na costa da América do Sul desde o litoral Nordeste do Brasil até o Sudeste argentino, em todo o Mediterrâneo, Atlântico Leste e parte do Índico Oeste e é possivelmente o predador bentopelágico mais comum

desde a superfície até 100m de profundidade (Heemstra & Randall, 1993; Barreiros, 1998; Harmelin & Harmelin-Vivien, 1999). Além disso, essa é uma espécie associada a fundos rochosos com preferência por locais que apresentam tocas naturais. Da mesma forma que diversas outras espécies que ocupam esse habitat, a profundidade em que os indivíduos se dispõem varia de acordo com a idade, de maneira que os peixes se limitam à região infralitoral quando juvenis e mais tardiamente se espalham por todo o perfil rochoso (Harmelin & Harmelin-Vivien, 1999). Desta forma, garoupas juvenis são mais facilmente expostas a ações antrópicas e podem ser ameaçadas por quaisquer ações que impactem o habitat marinho-costeiro (Sluka *et al.*, 1994).

Devido a esse grande valor comercial e ampla utilização na culinária, a garoupa verdadeira vem sofrendo uma grande pressão de sobrepesca que, combinada às suas características de inversão sexual tardia e agregação durante o período reprodutivo, colocou a espécie na lista de espécies ameaçadas da IUCN (*The World Conservation Union*) (Cornish & Harmelin-Vivien, 2004; Rodrigues-Filho *et al.*, 2009).

Diante do exposto, a hipótese do presente trabalho é que o fenantreno atua como desregulador endócrino sobre os esteroides gonadais de juvenis de *E. marginatus*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do fenantreno sobre a fisiologia reprodutiva de juvenis da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* e verificar sua possível atuação como desregulador endócrino, alterando a esteroidogênese gonadal.

2.2. Objetivos Específicos

a) Estabelecer o valor da Concentração Média Letal (CL₅₀) de fenantreno em 96 horas para juvenis de *Epinephelus marginatus*.

b) Verificar se o fenantreno altera as concentrações dos hormônios 11-cetotestosterona, testosterona e 17β - estradiol no plasma dos animais expostos *in vivo* ou no meio de incubação de gônadas *in vitro* na presença de fenantreno.

c) Verificar alterações histológicas no fígado, baço e gônadas de indivíduos expostos ao fenantreno.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Exemplares jovens de *E. marginatus* foram coletados por pescadores da Ilha do Montão do Trigo (23°51'50''S e 45°46'55''O) no município de São Sebastião, SP (Figura 4), entre outubro de 2013 e maio de 2015. Os peixes foram, então, levados ao Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar/USP) localizado na praia do Cabelo Gordo, São Sebastião, SP (Figura 4) e ao chegar foram submetidos a um banho de água doce com finalidade de eliminação de possíveis parasitas (Silva *et al.*, 2014). Após este procedimento todos os animais foram mantidos em tanques de estocagem de 2000 L com água salgada filtrada até o início dos experimentos (mínimo de sete dias) (Figura 5). Durante esse período, foram alimentados três vezes por semana com sardinha (*Sardinella brasiliensis*) picada sem a cabeça.

Figura 4: Imagem aérea digital da costa do município de São Sebastião, SP. (Fonte: Google Earth)

Figura 5: Tanques de estocagem dos indivíduos

3.2. Canal de São Sebastião: Análise de água e sedimentos

A fim de avaliar as condições ambientais de exposição ao fenantreno da região do Canal de São Sebastião e confirmar a possibilidade de utilização da água captada pelo CEBIMar/USP neste estudo, foram realizadas coletas de água e sedimento de três pontos ao longo do canal: Ponto 1: Porto de São Sebastião ($23^{\circ}48'46.62''S$ e $45^{\circ}23'53.22''O$) a 5 metros de profundidade; Ponto 2: Farol do Moleque ($23^{\circ}49'37.98''S$ e $45^{\circ}24'55.56''O$) a 11,7 metros e Ponto 3: Estação meteorológica do CEBIMar ($23^{\circ}49'48.18''S$ e $45^{\circ}25'22.68''O$) a 9,7 metros (Figura 6). Estas amostras foram analisadas com relação à concentração de fenantreno, pela empresa de serviços analíticos Görtler Laboratório do Brasil LTDA por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (das siglas em inglês GCMS) segundo USEPA-8270D, sendo o protocolo USEPA-3510C para amostras de água e USEPA-3550C para amostras de solo.

Figura 6: Imagem aérea digital indicando os pontos de coleta de água e sedimentos no canal (Fonte: Google Earth).

3.3. Fenantreno

O fenantreno (Figura 7), HPA utilizado no presente trabalho, foi adquirido da Sigma-Aldrich (Phenanthrene 98%; P11409) com pureza maior ou igual a 97,5%, peso molecular de 178,23 g/mol e coeficiente de partição n-octanol/água de 4,57 (log Pow). Toda a manipulação da substância ocorreu em respeito às normas de segurança e toxicidade (Anexo I).

Figura 7: Estrutura química do fenantreno

3.3.1. Meia vida do fenantreno

Com o objetivo de compreender as características do fenantreno na água salgada foi estabelecido um experimento prévio para determinar o tempo de meia vida (tempo no qual a concentração diminui 50% da concentração inicial) do fenantreno. Com estas informações foi determinado o tempo de reposição do contaminante nos experimentos de exposição.

Para tal, 250 mg de fenantreno foram dissolvidos em 10 mL de etanol absoluto e em seguida diluídos em 40 mL de água salgada, resultando em uma solução estoque da qual 24 mL foram adicionados a um aquário de 120000 mL (concentração nominal de 1 mg/L) com temperatura controlada com termostato a 22°C (Figura 8). Após homogeneização, foram então coletadas duas amostras de água nos momentos: 0h (cerca de 3 minutos após a adição do contaminante), 12h, 24h, 36h e 48h, visto que o período de dois dias foi o tempo decaimento do fenantreno verificado por Veintemilla (2006) em água doce.

Todas as amostras foram enviadas para a empresa de serviços analíticos Görtler Laboratório do Brasil LTDA e foram avaliadas por GCMS segundo USEPA-8270D (protocolo USEPA-3510C). Finalmente, foi feito o cálculo de meia vida do fenantreno em água salgada utilizando o *software* Microsoft Excel 2010.

Figura 8: Experimento de decaimento do fenantreno na água salgada, em aquário de vidro (120 L).

3.4. Determinação da Concentração Média Letal: CL₅₀

Para determinar quais as concentrações não letais de fenantreno poderiam ser empregadas em experimentos que avaliassem os efeitos subletais desse contaminante, foi realizado um bioensaio de exposição (96h) a fim de estabelecer a Concentração Média Letal (CL₅₀) do fenantreno para juvenis da garoupa verdadeira (*E. marginatus*). A CL₅₀ consiste na concentração de um determinado xenobiótico capaz de levar a óbito 50% dos organismos expostos por um curto período de tempo (24h, 48h, 72h ou 96h), fornecendo rapidamente informações sobre a toxicidade de tal substância (Zagatto & Bertoletti, 2008).

A determinação da CL₅₀ foi realizada com base em seis grupos de cinco peixes cada: 1) um grupo controle; 2) um grupo veículo (0,004% etanol absoluto, concentração utilizada nos grupos expostos ao fenantreno); 3) um grupo exposto à concentração nominal baixa do fenantreno (0,47 mg/L); 4) um grupo com uma concentração nominal média (0,94 mg/L) de fenantreno; 5) um grupo com animais expostos a uma concentração nominal alta (1,88 mg/L) de fenantreno e finalmente 6) um grupo exposto a uma concentração nominal muito alta (3,76 mg/L). Estes valores foram estabelecidos a partir dos dados de Veintemilla (2006) que estabeleceu em 0,94 mg/L o CL₅₀ para tambaqui, *C. macropomum*. Para calcular o valor da CL₅₀ foi utilizado o método de PROBIT (*probability unit*) (Finney, 1971). Os indivíduos foram pesados, a massa corpórea média foi de $229,8 \pm 43,22$ g e sua distribuição nos aquários estabeleceu uma densidade de 9,57 g/L (Figura 9).

Três dias antes do início do experimento, os animais (n=5/aquário) foram transferidos para aquários com tampas de 120 L de água do mar filtrada e durante esse período foram alimentados diariamente no mesmo horário com dois pedaços de sardinha limpos (sem cabeça, escamas, cauda e vísceras) por peixe. A temperatura média da água foi de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ mantida com termostatos a 22°C e sala climatizada a 23°C . Foi adotado fotoperíodo correspondente ao natural da data em questão (12:12) e a concentração média de oxigênio dissolvido foi de $6,5 \pm 1$ mg/L mantida com dois compressores de ar (160 L/hora). Com a finalidade de diminuir o estresse dos animais foi mantida uma cobertura plástica preta (150 μm espessura) (Figura 10). O manejo dos aquários foi realizado em sistema semiestático com troca de 75% do volume de água a cada 24 horas a fim de manter as condições constantes no meio e sem acúmulo excessivo de detritos e excretas.

Figura 9: *Epinephelus marginatus*. Biometria de animais utilizados no experimento de exposição aguda subletal.

Finalizado o período de 72h, os animais foram expostos aos seis grupos experimentais definidos anteriormente. Após o manejo diário, a água dos aquários foi reposta de maneira a reestabelecer a concentração proposta. Tal rotina se manteve durante 96h, nas quais a alimentação foi interrompida. Após esse período, os animais do grupo controle foram alocados em tanques de 2000 L para utilização em experimentos futuros e os animais que sobreviveram à exposição ao fenantreno foram mantidos isolados para depuração do contaminante (Sun *et al.*, 2006).

Durante os quatro meses que sucederam esse bioensaio, todos os animais em recuperação vieram a óbito e foram incinerados juntamente com os indivíduos que não sobreviveram ao experimento.

Figura 10: Disposição dos aquários durante o bioensaio de exposição aguda letal.

3.5. Experimento *in vivo*: Bioensaio de exposição aguda subletal

Para avaliar os efeitos subletais da exposição ao fenantreno foi realizado um bioensaio de exposição aguda de 96h que consistiu de quatro grupos experimentais com cinco animais em duplicata (N=10), sendo os valores das concentrações utilizadas, calculados a partir dos resultados obtidos no ensaio CL₅₀: 1) Grupo Controle; 2) Grupo Veículo: animais expostos ao veículo de diluição (0,004% de etanol); 3) Grupo Concentração Baixa: 0,1 mg/L e 4) Grupo Concentração Alta: exposto a 1 mg/L de fenantreno.

Os indivíduos apresentaram massa corpórea média de $252,6 \pm 48,14$ g e foram distribuídos de maneira a estabelecer uma densidade de aproximadamente 10,5 g/L. De forma similar ao bioensaio de CL₅₀, os animais foram transferidos para aquários de 120 L de água salgada filtrada, passaram por um período de 72 horas com alimentação diária, nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e oxigenação. O manejo dos

aquários foi feito em sistema semiestático de 75% de renovação do volume a cada 24 horas (estabelecido de acordo com o tempo de meia vida do fenantreno). Após estas 72 horas, foi iniciada a exposição dos animais a partir da solução estoque, de maneira similar ao bioensaio de CL₅₀, e diariamente, após a troca de água, suas concentrações eram reestabelecidas. Os dados de pH (Kit de teste de pH Red Sea®), oxigênio dissolvido e temperatura (sensor YSI 85-10 FT) foram monitorados durante o período inicial de 72 horas e após o início do experimento, nos aquários do grupo controle.

Ao final do período de exposição, os peixes foram criodessensibilizados em água salgada com gelo, foi realizada a biometria e com o auxílio de seringas (5 mL) e agulhas (22 G) heparinizadas (Heparina Sódica Liquemine-5000 UI/Roche®), o sangue de cada indivíduo foi coletado pela vasculatura caudal (cerca de 2 mL) (Figura 11) e disposto em *ependorfs* previamente heparinizados. As amostras de sangue foram centrifugadas por seis minutos a uma velocidade de 587 x g, resultando na separação do plasma (sobrenadante) que foi transferido para criotubos heparinizados e essas alíquotas foram congeladas em freezer -80°C.

Posteriormente à coleta de sangue, os animais foram eutanaziados com uma secção da medula na altura do opérculo e as gônadas e o fígado foram pesados para o cálculo dos índices gonadossomático ($IGS = [massa\ gonadal / massa\ corpórea\ do\ animal \times 100]$) e hepatossomático ($IHS = [massa\ hepática / massa\ corpórea\ do\ animal \times 100]$), respectivamente (Figura 12). Fragmentos das gônadas foram fixados em Bouin acético, e fragmentos do fígado e baço foram fixados em formaldeído tamponado a 10%. Todos os indivíduos foram encaminhados para incineração e todos os procedimentos aqui relatados foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências (CEUA/2014.1.804.41.5).

Figura 11: *Epinephelus marginatus*. Coleta de sangue após exposição ao fenantreno

Figura 12: *Epinephelus marginatus*. A) Gônadas e B) Fígado de exemplar juvenil.

3.6. Descarte de água experimental

Ao longo e ao final dos experimentos a água dos aquários, assim como o volume sobressalente das soluções estoque de fenantreno foram transferidos para bombas plásticas de 200 L onde foram mantidos para decaimento do contaminante. Amostras de água foram analisadas aos 30 e 180 dias de armazenamento. Ao final desse período os recipientes foram abertos durante 48h para a possível volatilização de qualquer traço de fenantreno restante na água que foi finalmente descartada no sistema de tratamento de esgoto do CEBIMar/USP. Estes períodos foram determinados a partir das análises de decaimento do fenantreno.

3.7. Experimento *in vitro*

A fim de verificar as possíveis alterações causadas pelo fenantreno em fases específicas do processo de esteroidogênese, foram desenvolvidos experimentos de incubação *in vitro*, nos quais fragmentos das gônadas dos juvenis foram expostos aos meios de incubação, com e sem o contaminante.

Foram utilizados seis juvenis com massa corpórea média de $335,8 \pm 58,9$ g que foram anestesiados em benzocaína (0,1 g/L), em seguida eutanaziados com secção da medula na altura do opérculo e foram coletadas suas gônadas. Devido à grande variação da massa gonadal entre os indivíduos (73 a 249 mg), as gônadas de cada animal foram fracionadas em três fragmentos de maneira que não houvesse diferença maior que 10% na massa entre os fragmentos.

Os fragmentos de gônadas foram acondicionados em frascos de vidro de 2 mL com tampa de teflon preenchidos com 1 mL de solução tampão Krebs - Ringer - glicose - HEPES (120 mM NaCl, 49 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 8,3 mM KH₂PO₄, 10 mM

glicose e 10 mM HEPES, pH 7,4) e foram submetidos a uma incubação prévia durante 30 minutos sob leve agitação a 26°C em misturador (*Thermomixer compact – Eppendorf*) a fim de liberar fatores remanescentes dos fragmentos (Figura 13).

Em seguida, a solução tampão foi descartada e os fragmentos, de 1 a 3 respectivamente, foram submetidos às seguintes condições experimentais: 1) Grupo controle (Ctr): tecido gonadal exposto à solução tampão Krebs - Ringer - glicose - HEPES (1000 µl); 2) Grupo veículo da diluição (EtOH): tecido gonadal exposto a etanol (750 µl de tampão e 250 µl de solução de etanol); 3) Grupo fenantreno (Fen): tecido gonadal exposto 50µM de fenantreno, equivalente a dez vezes a concentração mais alta da exposição *in vivo* (750 µl de tampão e 250 µl de solução de fenantreno).

A incubação foi realizada durante 4 horas a 26°C, sob leve agitação no misturador, e após esse período o meio foi transferido em três alíquotas para criotubos e finalmente foram congelados em freezer -80°C.

Figura 13: Incubação de fragmentos de gônadas de *Epinephelus marginatus* durante experimento *in vitro*

3.8. Determinação da concentração dos esteroides

Todas as amostras de plasma e do meio de incubação *in vitro* foram transferidas em gelo seco para o Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA) no Instituto de Biociências da USP (IB/USP) onde foram determinadas as concentrações dos esteroides gonadais, testosterona, 11-cetotestosterona e 17β-estradiol utilizando-se kits comerciais (IBL Internacional ou Cayman Chemicals®) de Elisaimunoensaio (ELISA). As leituras foram realizadas em leitora de microplacas (Spectra MAX 250) a um comprimento de onda de 405 a 450 nm.

3.9. Avaliação histológica

As amostras de gônadas fixadas por 24 horas em Bouin acético foram transferidas e conservadas em etanol 70°GL onde permaneceram até o processo de inclusão. Os fragmentos de gônadas, fígado e baço foram desidratados, infiltrados e incluídos em *paraplast* (Erv-Plast, *Easy Path*). Posteriormente o material foi seccionado em cortes de espessura de 5 µm em micrótomo (Leica RM225) e corado com Hematoxilina-Eosina ou coloração histoquímica de Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Anexo II) a fim de verificar possíveis alterações histológicas utilizando-se microscópio óptico (Leica DM 1000).

Sob microscópio óptico, nas secções do baço, os centros melanomacrofágicos (CMMs) foram contados em quatro lâminas por grupo experimental (n=4) com três secções histológicas em cada e esse número foi relativizado pela área do corte histológico estabelecida pelo *software Leica Application Suite V3*. Nas secções de fígado, foi mensurada a área média dos hepatócitos a partir de uma amostragem aleatória de 30 células com núcleos evidentes por secção histológica em três lâminas de cada grupo (n=3). Todas as secções histológicas foram analisadas e documentadas através de sistema computadorizado para análises de imagens (Câmera *Leica DFC 295*; Programa *Leica Application Suite V3*) no LAMEROA (IB/USP).

3.10. Análises estatísticas

Para calcular o valor da CL₅₀ foi utilizado o método de PROBIT (*probability unit*) (Finney, 1971) utilizando o software Minitab 17. Para assegurar que a massa corpórea dos animais utilizados nos diferentes grupos experimentais não apresentava diferença estatística, foi aplicado teste de Análise de Variância (*One-way ANOVA*). Este teste foi aplicado também para avaliação de possíveis diferenças do IGS e do IHS.

Os valores de concentração dos esteroides entre os tratamentos do bioensaio de exposição subletal (*in vivo*) ao fenantreno também foram comparados por Análise de Variância *One-way ANOVA* seguido por comparações múltiplas (teste de *Tukey*). Quando o teste de homogeneidade de variância não se cumpriu, foi feita a transformação logarítmica dos dados. Os resultados das dosagens do experimento *in vitro* foram relativizados pela massa do fragmento das gônadas antes de serem aplicadas as análises estatísticas. Estas análises foram realizadas por Delineamento em Blocos Casualizados (DBC). Para a comparação da quantidade de CMMs e da área dos hepatócitos foi aplicado o teste *One-way ANOVA* seguido por *Holm-Sidak*.

Para a condução das análises foi utilizado o *software* SigmaStat 3.1., exceto para os testes de homogeneidade e DBC que foram realizados a partir do Statistica 7.0. Foi adotado o nível de significância de 95% ($P < 0,05$) e os dados expressos em média $\pm$ EPM (erro padrão da média).

4. RESULTADOS

4.1. O fenantreno no Canal de São Sebastião

Não foram observados níveis detectáveis de fenantreno em nenhuma das amostras coletadas no Canal de São Sebastião, de forma que todas as amostras apresentaram valores inferiores a $0,01 \mu\text{g/L}$ na água ou $0,01 \text{ mg/kg}$ na base seca de solo.

4.2. Meia vida do fenantreno

Os resultados obtidos nas análises de água salgada, contaminada com o objetivo de determinar o tempo de meia-vida do fenantreno ao longo de 48 horas a 22°C estão apresentados na tabela 1. O tempo de meia vida do fenantreno foi calculado em 45,25 horas (Figura 14).

Tabela 1: Concentrações (média $\pm$ EPM) do fenantreno (mg/L) em água salgada (36ppt) de 0h a 48h do decaimento (método GCMS).

	Amostras 0 Hora	Amostras 12 Horas	Amostras 24 Horas	Amostras 36 Horas	Amostras 48 Horas
Concentração de fenantreno (mg/L)	$1,42 \pm 0,3$	$1,35 \pm 0,005$	$0,99 \pm 0,415$	$0,93 \pm 0,29$	$0,62 \pm 0,103$

Figura 14: Decaimento do fenantreno nas condições do ensaio em função do tempo. Dados expressos em porcentagem da concentração real inicial. A linha pontilhada indica o tempo de meia vida de 45,25 horas (equação da curva exponencial: $C = 107,92e^{-0,017t}$).

4.3. Descarte de água experimental

Nas amostras de água contaminadas e/ou estocadas em bombas plásticas foi observado que o período de 30 dias permitiu um decaimento de 96,67% do contaminante depositado, e aos 180 dias atingiu 99,95% do decaimento. Além disso, a abertura dos recipientes durante 48 horas adicionais, permitiu eliminar os traços remanescentes de fenantreno na água (100%), antes da liberação do conteúdo no sistema de tratamento de esgoto do CEBIMar/USP.

4.4. Determinação do CL₅₀

A mortalidade de peixes expostos ao fenantreno ocorreu de acordo com a os dados apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Mortalidade de juvenis de *Epinephelus marginatus* expostos a quatro diferentes concentrações de fenantreno por 96h.

Grupo experimental	Controle	Veículo	Baixa	Média	Alta	Muito alta
Concentração etanol (%)	—	0,004%	0,004%	0,004%	0,004%	0,004%
Concentração fenantreno (mg/L)	—	—	0,47	0,94	1,88	3,76
Nº de indivíduos expostos	5	5	5	5	5	5
Porcentagem de óbitos (%)	0	0	0	20	60	100

O CL₅₀ para exposição de juvenis de *E. marginatus* durante 96h em fenantreno determinada a partir do teste de Probit com intervalo de confiança de 0,05 foi de 1,51 mg/L (Figura 15).

Figura 15: *Epinephelus marginatus*. Curva de concentração-resposta de fenantreno em exposição de 96h. O intercepto das linhas pontilhadas aponta o valor da Concentração Letal Média (CL₅₀= 1,51 mg/L). Valores de obtidos no teste de Probit.

4.5. Experimento *in vivo*: Bioensaio de exposição aguda subletal

No período inicial de 72 horas, os valores de pH ($8 \pm 0,2$), temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e a concentração de oxigênio ($6,5 \pm 1 \text{ mg/L}$) se mantiveram dentro dos parâmetros esperados.

As concentrações determinadas de fenantreno foram de $1,42 \pm 0,3 \text{ mg/L}$ para a concentração nominal de 1 mg/L e $125 \pm 0,05 \text{ } \mu\text{g/L}$ para a concentração nominal de $0,1 \text{ mg/L}$.

4.5.1. Índices somáticos

Não houve diferença estatística nos valores do IGS entre os grupos experimentais ($P=0,317$) (Figura 16 A). O valor médio do IGS do Grupo Controle foi de $0,039 \pm 0,011$; nos animais do Grupo Veículo o valor do IGS foi de $0,029 \pm 0,011$; nos animais do Grupo Concentração Baixa, $0,033 \pm 0,011$ e por fim nos animais do grupo Concentração Alta, o IGS foi de $0,030 \pm 0,015$.

Quanto ao IHS também não houve diferença estatística entre os grupos ($P=0,893$) (Figura 16 B). O valor médio de IHS dos animais do Grupo Controle foi de $1,39 \pm 0,54$; do Grupo Veículo $1,34 \pm 0,62$; dos animais do Grupo Concentração Baixa, $1,36 \pm 0,45$ e do Grupo Concentração Alta, $1,23 \pm 0,31$.

Figura 16: *Epinephelus marginatus*. A) IGS (índice gonadosomático) e B) IHS (índice hepatossomático) (médica $\pm$ EPM) entre os grupos experimentais do bioensaio agudo subletal. Grupo Controle; Grupo Etanol (0,004% de etanol); Grupo Fen 0,1mg/L (0,1 mg/L de fenantreno); Grupo Fen 1,0 mg/L (1 mg/L de fenantreno)

4.5.2. Concentração dos esteroides plasmáticos

As análises de concentração plasmática dos esteroides sexuais não mostraram diferenças estatísticas nas concentrações de testosterona ($P=0,335$) e 17β - estradiol ($P=0,763$). No entanto, foi observada uma diminuição significativa ($P=0,015$) na

concentração plasmática de 11-cetotestosterona, nos animais dos grupos Veículo, Concentração Baixa e Concentração Alta em relação ao grupo controle (Figura 17).

Figura 17: *Epinephelus marginatus*. Concentração plasmática de 17β –Estradiol, Testosterona e 11-cetotestosterona nos diferentes grupos experimentais (média $\pm$ EPM). ^{ab}Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$; One- way ANOVA e Teste de Tukey). Grupo Controle; Grupo Etanol (0,004% de etanol); Grupo Fen 0,1mg/L (0,1 mg/L de fenantreno); Grupo Fen 1,0 mg/L (1 mg/L de fenantreno).

4.5.3. Avaliação histológica

4.5.3.1. Gônadas

As gônadas dos animais do grupo controle se apresentaram com estrutura típica desta espécie hermafrodita protogínica: animais juvenis com ovários (Figura 18 A). Foram observados oócitos em crescimento primário (perinucleolares) em lamelas ovarianas, ninho de oogônias e elementos sanguíneos nos vasos. Não foram observadas diferenças anatômicas ou morfológicas entre os diferentes grupos experimentais (Figura 18).

Figura 18: *Epinephelus marginatus*. Secções histológicas das gônadas apresentando as estruturas dos ovários. A) Grupo Controle, organização do ovário imaturo com predominância de oócitos perinucleolares pré-vitelogênicos; B) Grupo Veículo (0,004% de etanol); C) Grupo Concentração Baixa (0,1mg/L de fenantreno D) Grupo Concentração Alta (1mg/L de fenantreno). Não foram observadas diferenças de desenvolvimento ou alterações celulares dentre os grupos experimentais. As barras representam 25µm. A - D: Hematoxilina eosina. A - D: e, eritrócitos; v, vaso sanguíneo; L, lúmen; cg, cápsula gonadal; Oop, oócito de crescimento primário; c, citoplasma; N, núcleo; n, nucléolo; No, ninho de oogônias.

4.5.3.2. Fígado

De maneira geral, as secções hepáticas dos animais do grupo controle apresentaram estrutura típica de fígado com pequenas porções de tecido pancreático intercalado entre o tecido hepático, o qual exibiu pouca vacuolização lipídica (Figura 19 A).

Figura 19: *Epinephelus marginatus*. Secções histológicas do fígado. A) Grupo Controle onde é observada típica organização dos hepatócitos, tecido pancreático disperso e canais biliares; Detalhe) Canal biliar em aumento de 1000X. B) Grupo Veículo (0,004% de etanol); C) Grupo Concentração Baixa (0,1mg/L de fenantreno); D) Grupo Concentração Alta (1mg/L de fenantreno). As barras representam 50µm e 10µm no detalhe. A - D: Hematoxilina eosina. A - D: e, eritrócitos; h, hepatócito; v, vaso sanguíneo; cb, canal biliar; tp, tecido pancreático.

Foi possível verificar que os animais do Grupo Baixa Concentração apresentaram maior área dos hepatócitos em relação aos demais grupos experimentais ($P \leq 0,001$) (Figura 20). Os animais do grupo exposto ao veículo de diluição apresentaram grande variação histológica, com secções mais vacuolizadas enquanto que algumas apresentavam hepatócitos com maior deposição de carboidratos em seu citoplasma, avaliados pelo método do PAS (Figura 21).

Figura 20: *Epinephelus marginatus*. Médias das áreas dos hepatócitos dos animais dos grupos experimentais do bioensaio agudo subletal. Grupo Controle; Grupo Etanol (0,004% de etanol); Grupo Fen 0,1mg/L (0,1 mg/L de fenantreno); Grupo Fen 1,0 mg/L (1 mg/L de fenantreno). ^{ab}Letras distintas indicam diferenças significativas.

Figura 21: *Epinephelus marginatus*. Secções histológicas de fígado. A) Grupo Controle; B) Grupo Veículo (0,004% de etanol); C) Grupo Veículo (0,004% de etanol); D) Grupo Concentração Baixa (0,1mg/L de fenantreno); E) Grupo Concentração Alta (1mg/L de fenantreno). As barras representam 50µm. A - E: PAS. A - E: e, eritrócitos; h, hepatócito; v, vaso sanguíneo; cb, canal biliar.

4.5.3.3. Baço

As secções do baço dos animais do grupo controle apresentaram estrutura típica com as polpas vermelha e branca entremeadas, e eventuais ocorrências de centros melanomacrofágicos (CMMs) (Figura 22 A). Nos animais expostos às diferentes concentrações de fenantreno foi observada a presença de hemossiderose, sendo essa mais evidente nos animais do Grupo Concentração Alta. A contagem dos CMMs mostrou aumento significativo no número destes centros nos animais dos três grupos experimentais ($P \leq 0,001$) (Figura 23).

Figura 22: *Epinephelus marginatus*. Secções histológicas do baço. A) Grupo Controle onde é observado organização celular típica. B) Grupo Veículo (0,004% de etanol). Detalhe: Centro melanomacrofágico em aumento de 1000X; C) Grupo Concentração Baixa (0,1mg/L de fenantreno); D) Grupo Concentração Alta (1mg/L de fenantreno); Nos baços dos animais dos grupos expostos ao fenantreno foi observada a presença de hemossiderose, evidenciada pelo acúmulo de pigmento marrom-amarelado, mais pronunciada no Grupo Concentração Alta. As barras representam 50μm e 10μm no detalhe. A - D: Hematoxilina eosina. A - D: v, vaso sanguíneo; HEM, hemossiderose; CMM, centro melanomacrofágico.

Figura 23: *Epinephelus marginatus*. Média da quantidade (relativa à área da secção) de CMMs nos animais dos grupos experimentais do bioensaio agudo subletal. Grupo Controle; Grupo Etanol (0,004% de etanol); Grupo Fen 0,1mg/L (0,1 mg/L de fenantreno); Grupo Fen 1,0 mg/L (1 mg/L de fenantreno). ^{ab}Letras distintas indicam diferenças significativas.

4.6. Observações dos animais durante os ensaios (CL₅₀ e *in vivo*)

Um ponto que mereceu destaque nos ensaios (CL₅₀ e *in vivo*) e inicialmente não planejado nos métodos foi a observação do comportamento dos peixes durante a exposição (não quantitativa). Houve uma evidente produção de muco tanto em animais que estavam expostos ao fenantreno quanto ao etanol (Figura 24).

Figura 24: *Epinephelus marginatus*. Imagens representativas das condições da água 72 horas após a adição do fenantreno em bioensaio de exposição aguda subletal. A) Aquário do Grupo Controle, sem muco aparente na água. B) Aquário do Grupo Veículo (0,004% de etanol absoluto) apresentando considerável acúmulo de muco.

No Grupo Concentração Alta, 24 horas após a adição do fenantreno, os animais regurgitavam e apresentavam características comportamentais que sugerem alterações

quanto ao controle do equilíbrio hidrodinâmico e da natação. Os animais muitas vezes se colocavam com a região ventral virada para cima (Figura 25 A), apresentavam batimento acelerados e constantes das nadadeiras peitorais e, em alguns casos, perdiam o controle da flutuabilidade, mantendo-se na superfície da água (Figura 25 B).

Figura 25: *Epinephelus marginatus*. Imagens representativas das alterações observadas ao longo dos bioensaios. A) Grupo Concentração Alta (1 mg/L de fenantreno) do bioensaio de exposição aguda subletal, demonstrando aspecto entorpecido das nadadeiras peitorais e sintomas de desequilíbrio. B) Grupo Concentração Alta do bioensaio de determinação do CL₅₀ (1,88 mg/L de fenantreno). Animal com flutuabilidade comprometida, mantendo-se na superfície da água.

4.7. Efeitos da exposição *in vitro*

Nos ensaios de exposição dos fragmentos gonadais às condições experimentais, foi observado que as concentrações de E₂ e T não apresentaram variações entre os diferentes grupos ($P=0,5979$ e $P=0,310486$, respectivamente). Por outro lado, a exposição ao fenantreno causou uma redução na concentração de 11-KT quando os valores foram comparados àqueles do grupo controle ($P=0,033$) (Figura 26).

Figura 26: Concentração de A) 17 β -estradiol; B) testosterona e C) 11-cetotestosterona nos diferentes tratamentos *in vitro* (média $\pm$ EPM) (DBC ANOVA e Teste de Tukey). Controle (Ctr) (solução tampão); Veículo (EtOH) (solução tampão e etanol (3:1)); Fenantreno (Fen) (solução tampão e solução estoque de fenantreno (3:1)). ^{ab}Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle.

5. DISCUSSÃO

5.1. *Epinephelus marginatus*

A garoupa verdadeira, *E. marginatus*, foi incluída pela primeira vez na Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN no ano de 1996 e entre 1990 e 2001, uma diminuição de 88% nas capturas desses animais foi registrada no Mediterrâneo e no Atlântico adjacente a Europa e Norte da África (Cornish & Harmelin-Vivien, 2004; Rodrigues-Filho *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2013). No Brasil, a espécie encontra-se listada entre as Espécies de Peixes Ameaçados de Sobreexploração desde 2004 e no Estado de São Paulo desde 2008 (Brasil, 2004; Rodrigues-Filho *et al.*, 2009), o que torna a compreensão da sua biologia essencial para que medidas de conservação possam ser tomadas, ao passo que se faz necessário o uso de poucos indivíduos ao longo desses estudos para que não haja impacto sobre os estoques naturais.

Rodrigues-Filho (2010) verificou que juvenis de *E. marginatus* respondem efetivamente a estímulos hormonais, induzindo a inversão sexual em um período de 90 dias, logo, compreender os possíveis processos de desregulação endócrina nessa fase do ciclo de vida desta espécie é relevante para sua preservação. Para diminuir o número de indivíduos a serem utilizados, no presente trabalho os animais pertencentes ao grupo controle do bioensaio de determinação da CL₅₀ foram posteriormente empregados nos experimentos de exposição subletal ou no bioensaio *in vitro* de acordo com a sua massa corpórea e todos os experimentos foram conduzidos com um número mínimo de indivíduos.

5.2. Valores ambientais de fenantreno

Concentrações de HPAs já foram registradas na água e em sedimentos do Canal de São Sebastião (CSS) por diversos autores (Weber & Bícigo, 1991; Gabardo *et al.*, 2003; Medeiros & Bícigo, 2004; Carvalho *et al.*, 2008) e o fenantreno é o HPA de maior concentração na fração solúvel do petróleo que circula nos oleodutos do canal (Salvo *et al.*, 2016). Medeiros & Bícigo (2004) observaram entre 0.6 a 16.2 ng/g de fenantreno em sedimentos coletados nessa mesma região. Por outro lado, alguns estudos verificaram que os níveis de HPAs encontrados no CSS eram inferiores às concentrações registradas em outras áreas altamente urbanizadas e não sugeriam qualquer distúrbio sobre a comunidade bentônica (da Silva & Bícigo, 2010). Nas amostras de água e sedimentos coletados em três pontos do CSS do presente trabalho não foi detectada a presença desse contaminante,

Após acidentes de derramamento de petróleo, a Baía da Guanabara (RJ) apresentou altas concentrações de hidrocarbonetos em sedimentos, ao contrário de regiões como o CSS, onde não foram registrados valores críticos de HPAs na água ou no sedimento até 120 dias após derramamento (Gabardo *et al.*, 2003). Muitos são os fatores que podem afetar a concentração de hidrocarbonetos encontrada em um determinado local. A composição inicial de uma mistura de HPAs sofre ação da volatilização, ação microbiana e fotodegradação ou ativação (Weber & Bicego, 1991). No caso do fenantreno, Salvo *et al.* (2016) observaram uma drástica diminuição na proporção desse hidrocarboneto na fração solúvel do petróleo exposta à radiação. Portanto, a intensa radiação solar nos meses em que foram realizadas as coletas pode ter contribuído para que não fosse possível detectar fenantreno na água superficial do CSS.

Além disso, o CSS apresenta uma hidrodinâmica bastante complexa, com correntes de grande intensidade geralmente associadas à circulação termohalina e, principalmente, à ação dos ventos, apresentando velocidades médias de até 1 m/s e que predominantemente se direcionam no sentido Sudoeste – Nordeste, exceto no verão quando há infiltração da ACAS (Água Central do Atlântico Sul) e a corrente superficial volta-se para o Sudoeste enquanto que a profunda permanece no sentido NE. O canal também está ligeiramente sujeito à influência das correntes de maré, além de sofrer ação das correntes reversas durante eventuais distúrbios meteorológicos, o que poderia estar relacionado com diversos padrões de dispersão de contaminantes já observados e com os resultados aqui apresentados (Weber & Bicego, 1991; Fontes, 1995; Rodrigues, 2009; da Silva & Bicego, 2010; Dottori *et al.*, 2015).

O CSS, portanto, parece apresentar uma dinâmica intensa o suficiente para que a dispersão de HPAs seja acelerada, reduzindo consideravelmente o impacto sobre a biota. Contudo, áreas adjacentes poderiam estar sujeitas ao acúmulo desses contaminantes. A Baía do Araçá, que está compreendida na região central do CSS, apresenta rica biodiversidade e apesar de estar intimamente relacionada à dinâmica do canal, está geograficamente protegida, tendo como principal influência hidrodinâmica as correntes de maré (Villamarin, 2014). Em monitoramento da área, a CETESB (2004) registrou valores entre 19 e 79 mg/L de resíduos de óleos e graxas na baía, enquanto que na região do TEBAR (Terminal Marítimo Almirante Barroso) os valores chegavam a no máximo 5 mg/L. Deste modo, um monitoramento regular e periódico seria necessário para compreender os resultados dessa dinâmica de dispersão no CSS e resoluções que

estabeleçam concentrações máximas para HPAs em água e sedimentos, são de extrema importância e urgência para a proteção e conservação das regiões costeiras e marinhas.

5.3. Determinação do CL₅₀

A concentração de fenantreno utilizada como ponto de partida nesse bioensaio foi obtida a partir de Veintemilla (2006) que estabeleceu em 0,94 mg/L o CL₅₀ para o tambaqui, *C. macropomum*. O CL₅₀ encontrado para o fenantreno no presente trabalho (1,51 mg/L) foi mais elevado em comparação com os valores estabelecidos para truta, *Salmo gairdneri* e achigã, *Micropterus salmoides* (0,04 e 0,18 mg/L, respectivamente) (Black *et al.*, 1983). Pode-se considerar que tais experimentos utilizaram indivíduos em estágio embrionário e larval que, além da diferença de tamanho quando comparados aos juvenis e *E. marginatus*, também representam uma fase de desenvolvimento mais sensível.

Apesar de se esperar que peixes marinhos apresentem uma maior susceptibilidade a HPAs devido às concentrações mais elevadas de ácidos graxos insaturados nesses animais (que aumentam a fluidez das membranas), os juvenis da garoupa-verdadeira utilizados nesse experimento apresentaram um tamanho aproximadamente 10 vezes maior do que os juvenis de tambaqui, de maneira que uma menor relação superfície volume estaria relacionada a uma menor exposição ao contaminante (Walker & Peterson, 1991). Apesar de Salvo *et al.* (2016) estabelecerem em 2,4 mg/L a CL₅₀ para a fração solúvel do petróleo em água (WSF, do inglês *water soluble fraction*) para juvenis de *E. marginatus* de aproximadamente 10% da massa dos indivíduos empregados no presente estudo, a diferença na composição dos contaminantes pode afetar de maneira significativa a resposta dos indivíduos.

5.4. Histopatologia e Índices somáticos

5.4.1. Gônadas

Apesar de estudos recentes demonstrarem alterações na esteroidogênese em teleósteos expostos aos HPAs (Nicolas, 1999; Monteiro *et al.*, 2000b; Sol *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2011; Geraudie *et al.*, 2014), os registros dos efeitos da desregulação endócrina sobre caracteres como a maturação e crescimento gonadal, índice gonadossomático e estrutura das gônadas em animais expostos a esses poluentes, são ainda escassos.

Nas fêmeas do bacalhau polar, *B. saida* expostas a efluentes com altas concentrações de HPAs, após 28 dias foi observado um aumento significativo na porcentagem de atresia nos ovários, um decréscimo no número de oócitos e de fêmeas que alcançaram o estágio vitelogênico (Geraudie *et al.*, 2014). Por outro lado, não foram observadas diferenças nas estruturas ovarianas ou na oogênese de fêmeas do linguado, *P. flesus* expostas ao fenantreno via dieta por 12 semanas, nem em fêmeas de medaka, *Oryzias latipes* expostas ao poluente tanto pela alimentação quanto pela contaminação da água (Horng *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2000b). No presente trabalho, utilizando-se animais juvenis (ou seja, sexualmente imaturos), não foram encontradas alterações histológicas nas gônadas analisadas, de maneira que os animais de todos os grupos experimentais apresentaram estrutura típica ovários de juvenis de *E. marginatus* (Rodrigues-Filho, 2010; Garcia *et al.*, 2013). Tampouco foram observadas diferenças significativas IGS entre os grupos experimentais.

Sol *et al.* (2000) tampouco verificaram diferenças significativas no IGS na truta *Salvelinus malma*, no linguado *Limanda aspera* e no escamudo-do-Alasca *Theragra chalcogramma* selvagens, que apresentavam metabólitos de HPAs relativos à fenantreno e naftaleno em sua bile, ainda que os animais estivessem nas estações de recrudescência gonadal durante os experimentos.

5.4.2. Fígado

Vários estudos vêm mostrando alterações hepáticas causadas pela exposição de peixes aos HPAs que podem estar relacionadas a processos degenerativos. Simonato *et al.* (2008) descrevem, dentre outras alterações, hipertrofia nuclear, deslocamento do núcleo e irregularidades em sua forma, vacuolização citoplasmática e nuclear, ruptura celular, degeneração celular e nuclear em fígado do curimatá, *Prochilodus lineatus* expostos a óleo diesel solúvel em água de maneira aguda (6, 24 e 96 horas) e crônica (15 dias). Alterações como necrose, hemorragias, núcleo picnótico, vacuolização extensiva dos hepatócitos e degeneração celular foram observadas no bagre-africano, *C. gariepinus* quando expostos a concentrações maiores que 6,2 mg/L de fenantreno por 96 horas (Karami *et al.*, 2016). Na garoupa verdadeira, *E. marginatus* expostas em ensaio subcrônico a WSF por 14 dias, foram observadas alterações na citoarquitetura hepática, além de intensa vacuolização citoplasmática, deslocamento nuclear e hiperemia dos vasos hepáticos (Salvo *et al.*, 2016).

No presente trabalho, apesar de não terem sido observadas diferenças histopatológicas nos fígados, uma tendência à vacuolização dos hepatócitos foi observada nos grupos expostos ao fenantreno e em alguns indivíduos expostos ao veículo da diluição. Os hepatócitos dos animais do Grupo Baixa Concentração apresentaram maior área em relação aos demais grupos experimentais. A ação do etanol sobre o fígado dos indivíduos foi heterogênea. Uma exposição mais prolongada seria apropriada para verificar tais ações do fenantreno sobre o fígado dessa espécie, possivelmente minimizando a variação individual e elucidando seus efeitos a nível hepático.

Veintemilla (2006) verificou uma tendência à diminuição do IHS de tambaquis expostos ao fenantreno por 28 dias, mas sem estabelecer diferenças estatísticas entre os grupos. Jee *et al.* (2004) não verificaram alterações significativas nesse índice no linguado, *P. olivaceus* durante 4 semanas. Da mesma forma, não foram constatadas diferenças em IHS de juvenis de *E. marginatus* após 14 dias de exposição à fração solúvel do petróleo em água (WSF) (Salvo *et al.*, 2016). Neste trabalho não foi observada variação no IHS em nenhuma das concentrações ensaiadas.

5.4.3. Baço

CMMs são acúmulos pontuais de macrófagos, geralmente observados nos rins, baço e, por vezes, no fígado de teleósteos. Alterações em variáveis como número, tamanho e área relativa ocupada por estes centros podem estar relacionadas à contaminação ambiental (Wolke, 1992). Fournie *et al.* (2001) estabelecem as variações no número e tamanho dos CMMs esplênicos de peixes como um bom biomarcador de exposição a distúrbios ambientais, visto que os CMMs localizam os produtos de degradação histológica, especialmente de eritrócitos, e são facilmente observados pela deposição de pigmentos.

Ali *et al.* (2014) observaram um aumento na quantidade dos CMMs no baço de *killifish*, assim como no número e tamanho dos CMMs da truta-marrom, *Salmo trutta* provenientes de áreas expostas a contaminação por petróleo quando comparados com indivíduos de áreas controle, o que poderia indicar o potencial dos HPAs em gerar esse aumento. Todavia, o significativo aumento na quantidade de CMMs esplênicos em relação ao grupo controle observado no presente trabalho, provavelmente está relacionado com a exposição ao etanol, visto que os indivíduos do grupo veículo de

diluição apresentaram uma quantidade de CMMs estatisticamente similar aos grupos expostos ao fenantreno.

A hemossiderose, processo que se dá pela degradação excessiva de eritrócitos, pode indicar anemia em teleósteos devido a essa hemólise acelerada e já foi relatada como consequência da exposição a variados contaminantes (Walter *et al.*, 2000; Fournie *et al.*, 2001; Noreña-Barroso *et al.*, 2004). No linguado, *Pseudopleuronectes americanus* provenientes de locais contaminados por petróleo, esse processo foi observado de maneira expressiva tanto no baço quanto no fígado dos indivíduos (Khan, 1998). No presente trabalho a hemossiderose foi observada no baço dos animais de ambos os grupos expostos ao fenantreno, mas ocorreu de forma muito mais pronunciada nos indivíduos expostos a concentração mais alta, sugerindo que esse contaminante pode atuar como causador dessa degradação acelerada dos eritrócitos.

5.5. Concentração de esteroides gonadais

Ainda que vários estudos apontem os HPAs como desreguladores endócrinos em peixes, não há padrão consistente quanto às consequências fisiológicas nos organismos. Um decréscimo significativo nas concentrações de E₂ foi relatada em machos e fêmeas do peixe-dourado, *Carassius auratus* expostos a sedimentos contaminados por betume (Lister *et al.*, 2008), na truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* e em fêmeas de corvina, *Micropogonias undulatus* sob ação de benzo(a)pireno (Thomas, 1988, Kennedy & Smyth, 2015) e tanto em machos quanto em fêmeas do linguado *Pleuronichthys verticalis* expostos a sedimentos provenientes de regiões contaminadas por petróleo (Roy *et al.*, 2003). Foram relatados também declínios nos níveis de testosterona em machos e fêmeas do peixe-dourado, *C. auratus* em ensaios *in vivo* e *in vitro* (Lister *et al.*, 2008), em juvenis de linguado, *Scophthalmus maximus* expostos a resíduos de petróleo (Martin-Skilton *et al.*, 2006) e em fêmeas de truta-arco-íris, *O. mykiss* expostas a benzo(a)pireno (Kennedy & Smyth, 2015). Não foram observadas alterações nos níveis de E₂ ou T em fêmeas do peixe-dourado *C. auratus* expostas a extrato de ácidos naftênicos (Lister *et al.*, 2008), e no bacalhau, *Gadus morhua* expostos ao petróleo cru (Martin-Skilton *et al.*, 2006). Tampouco se verificou alteração nos níveis de E₂ em machos e fêmeas do bacalhau-polar, *Boreogadus saida* expostos a efluentes contaminados por mistura de HPAs, mas os níveis de vitelogenina (VTG) foram expressivamente aumentados após sete dias de exposição, sugerindo uma possível ação estrogênica dos contaminantes (Geraudie *et al.*, 2014). Goodbred *et al.* (1997) não

descrevem correlação entre a presença de HPAs em locais contaminados e alterações na concentração de E₂, 11-KT ou em sua razão, ao contrário do que se observa, por exemplo, quando há ação de agrotóxicos.

Em relação ao fenantreno, linguados, *P. flesus* expostos por 12 semanas, via dieta, a esse contaminante apresentaram uma diminuição na concentração de E₂, mas não demonstraram alterações na concentração plasmática de T (Monteiro *et al.*, 2000b). Han *et al.* (2010) obteve resultado similar com a exposição da carpa comum, *C. carpio* ao fenantreno por 72h. Um decréscimo na concentração do E₂ foi observado em machos e fêmeas, enquanto que o andrógeno 11-KT somente apresentou diminuição significativa nos machos. No presente trabalho, no entanto, não foi observada influência do fenantreno sobre as concentrações dos esteroides sexuais E₂ ou T em juvenis de *E. marginatus*. No entanto, ocorreu uma diminuição significativa na concentração plasmática de 11-KT nos animais dos grupos veículo e expostos ao fenantreno nas duas concentrações, em relação ao grupo controle. Essa diferença poderia ser atribuída à ação do veículo sobre a síntese deste andrógeno. No ensaio *in vitro* apenas o fenantreno desencadeou uma redução na concentração de 11-KT.

Muitas variáveis podem estar relacionadas com as distintas respostas obtidas nesses estudos. Primeiramente, o tempo de exposição ao contaminante deve ser considerado, visto que uma exposição aguda nem sempre permite que os impactos sofridos pelos organismos alcancem os níveis fisiológicos. Assim, é muito importante não inferir que a ausência de uma resposta à determinada contaminação de curto prazo corresponda à realidade do ambiente natural, onde os indivíduos podem estar sujeitos a uma exposição crônica, além de possíveis interações físico-químicas da substância com outras variáveis e contaminantes (Zagatto & Bertoletti, 2008). O efeito celular é frequentemente, mas não obrigatoriamente determinante para efeitos adversos em altos níveis biológicos de organização. Os animais podem apresentar mecanismos de ajustes que, dependendo das condições do ambiente podem, ou não, resultar em respostas fisiológicas distintas dos organismos.

Outra importante variável é a concentração do contaminante que se utiliza: Han *et al.* (2010) observaram uma relação inversa entre a concentração de fenantreno e os níveis de E₂ plasmático de fêmeas da carpa comum, *C. carpio*. Estes autores relatam que só foram observadas diferenças significativas de E₂ em concentrações de fenantreno acima de 1,5 mg/L enquanto que, o decréscimo de 11-KT plasmático nos machos foi estatisticamente verificado quando expostos a pelo menos 1 mg/L deste HPA.

A contaminação por hidrocarbonetos de maior peso molecular e com maior número de anéis aromáticos, como o benzo(a)pireno, ou a presença desses em uma mistura, pode estar relacionado com uma maior toxicidade e, dessa forma, com respostas fisiológicas mais expressivas (Black *et al.*, 1983). Além disso, diferentes espécies e estágios de desenvolvimento podem demonstrar respostas distintas frente a um poluente, assim como o mesmo indivíduo pode apresentar mais ou menos sensibilidade em seu sistema endócrino de acordo com o período de realização do bioensaio em relação à sazonalidade de sua época reprodutiva (Tyler *et al.*, 1998).

Heppell (2005) demonstra que a 11-KT parece ter um importante papel na regulação do desenvolvimento, crescimento e comportamento de juvenis do badejo-areia, *M. microlepis* espécie que também é hermafrodita protogínica, e descreve ciclos sazonais bem definidos desse esteroide que se atenuam conforme o animal se desenvolve, de maneira que essa redução parece estar associada com o período de transição intersexo desta espécie (McGovern *et al.*, 1998). Além disso, já foram apontados efeitos inibitórios de andrógenos como a 11-KT sobre as gônadas de peixe-espinho, *Gasterosteus aculeatus* machos, regulando os ciclos anuais de espermatogênese (Borg, 1994).

Alam *et al.* (2005), estudando a imunorreatividade de enzimas esteroidogênicas em gônadas da *honeycomb grouper*, *Epinephelus merra*, uma espécie também hermafrodita protogínica, observam que a 11-KT é importante no desenvolvimento oocitário e na mudança de sexo. Dessa forma, é possível que os níveis de 11-KT combinados aos perfis de outros esteroides, atuem como um regulador da inversão sexual, garantindo a supressão da masculinização precoce de hermafroditas protogínicos (Heppell, 2005), de maneira que perturbações nessas flutuações poderiam ocasionar desequilíbrios reprodutivos, além de potenciais alterações de desenvolvimento e comportamento dos indivíduos.

5.6. Uso do etanol como veículo

Contaminantes que apresentam características hidrofóbicas dependem da utilização de veículos para serem solubilizados. Substâncias lipofílicas, como o fenantreno, requerem solventes orgânicos ou alcoólicos para que sua dissolução seja viável, o que pode acarretar em efeitos tóxicos próprios desses veículos sobre os indivíduos de maneira direta ou indireta (Hutchinson *et al.*, 2006; Maes *et al.*, 2012; Piazza *et al.*, 2015).

Os efeitos do etanol sobre a fisiologia de peixes são pouco investigados (Bhanu & Philip, 2011). Sabe-se que a ingestão crônica e abusiva de álcool pode resultar em alteração do eixo H-H-G em mamíferos (Emanuele & Emanuele, 1997). Em ratos machos, o álcool parece exercer uma disfunção gonadal, já que a sua oxidação compete com a produção de testosterona, resultando em uma redução nos níveis do andrógeno inclusive em condições de exposição aguda excessiva (Pasqualotto *et al.*, 2004). Em fêmeas de rato não grávidas expostas a essa substância, foram observadas reduções significativas no E₂ plasmático (Ronis *et al.*, 2007). Portanto, os resultados aqui observados são de ampla importância já que os álcoois também representam um contaminante ambiental devido ao seu uso como biocombustível e seu potencial de deslocamento entre corpos d'água continentais já foi relatado (Cápiro *et al.*, 2007). Além disso, pelos álcoois serem amplamente utilizados como veículo de diluição nos mais variados tipos de bioensaios, fica evidente que a sua utilização deve ser feita de maneira a excluir a possibilidade de que sua ação desintoxicação interfira nos resultados dos ensaios.

5.7. Observações dos animais durante os ensaios (CL₅₀ e *in vivo*)

Sabe-se que o muco epitelial em peixes apresenta diversas funções como a lubrificação hidrodinâmica, proteção contra abrasão e defesa contra patógenos ou substâncias tóxicas, de forma que em condições de estresse ou em decorrência de alterações na qualidade da água, a produção do muco, a sua composição e até mesmo a proliferação de células caliciformes responsáveis por sua secreção pode ser alterada (Shephard, 1994; Bols *et al.*, 2001). O aumento na produção de muco registrada visualmente em indivíduos expostos a 0,004% do veículo condiz com as observações feitas por Bhanu & Philip (2011) ao expor tilápias, *Oreochromis mossambicus* a concentrações entre 1,27 a 127 g/L de etanol. Em relação ao fenantreno, Veintemilla (2006) descreve, também, um aumento na produção de muco do tambaqui *C. macropomum* expostos a diferentes concentrações desse contaminante.

No que concerne às alterações de comportamento, Veintemilla (2006) descreve perda do equilíbrio hidrodinâmico e presença de movimentos desordenados em tambaquis expostos a concentrações entre 0,65 a 1,67 mg/L de fenantreno, de forma similar ao que foi constatado no presente trabalho, em concentrações acima de 0,94mg/L. Carvalho *et al.* (2008) também observaram alterações no comportamento e acuidade visual de larvas do dourado, *Salminus brasiliensis*, no entanto não foram

verificadas alterações na capacidade natatória desses animais quando expostos às concentrações de até 0,1 mg/L do contaminante.

A acetilcolinesterase (AChase) é uma enzima chave na condução nervosa, sendo responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina e é utilizado como biomarcador de efeitos neurotóxicos de contaminantes como metais pesados, agrotóxicos e HPAs (Payne *et al.*, 1996; Van Der Oost *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2010). Han *et al.* (2010) verificam diferença significativa nos níveis de AChase em tecido encefálico de carpas, *C. carpio* expostas a diferentes concentrações de fenantreno, de maneira que foi estabelecida uma relação entre o aumento da concentração do contaminante e a diminuição da atividade de AChase. Também foi observada uma supressão na atividade dessa enzima nos olhos e no encéfalo de *P. olivaceus* com aumento das doses de e do tempo de exposição ao fenantreno (Jee & Kang, 2003). Tais evidências podem estar intimamente relacionadas com as alterações comportamentais observadas nas demais espécies de teleósteos quando expostas a esse hidrocarboneto, inclusive a espécie utilizada no presente estudo.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A CL_{50} estabelecido para juvenis de *Epinephelus marginatus* expostos ao fenantreno por 96 horas é de 1,51 mg/L.
- O fenantreno diminuiu os níveis de 11-KT *in vitro* e *in vivo*. No entanto, no ensaio de exposição subletal, indivíduos expostos somente ao etanol, também apresentaram essa redução, não permitindo encerrar o papel do fenantreno como desregulador endócrino nas condições do bioensaio *in vivo*.
- Não foram observadas alterações plasmáticas na concentração de E_2 e testosterona, tampouco nos meios de incubação das gônadas. Nenhuma alteração sobre o IGS, morfologia, ou histologia das gônadas foi observado.
- Foram observadas alterações histopatológicas no baço dos indivíduos expostos tanto ao fenantreno quanto ao veículo de diluição. O aumento no número de CMMs e a presença de hemossiderose podem ser atribuídos a processos patológicos e degradação de células e tecidos. Apesar de uma tendência a aumento na área dos hepatócitos nos animais expostos ao fenantreno, não foi observada alteração histopatológica hepática consistente ou do IHS, de maneira que uma exposição subcrônica possivelmente seria esclarecedora nesse aspecto.
- A exposição a altas concentrações de fenantreno (acima de 0,94 mg/L) acarretou distúrbios comportamentais, de equilíbrio e locomoção dos animais em um período inferior a 24 horas. Estudos sobre as causas e mecanismos que levam a essas alterações são de grande importância.
- O monitoramento regular e periódico dos níveis ambientais de HPAs se faz necessário em toda a região do litoral Norte e não somente no CSS, já que a hidrodinâmica da região poderia influenciar a qualidade da água e do sedimento de áreas adjacentes. Além disso, estudos dos impactos desses compostos sobre a biota são relevantes para se estabelecer valores de referência do teor máximo de contaminantes na água e no sedimento e, a partir disso, medidas de conservação do ambiente costeiro e marinho possam ser tomadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGIUS, C., ROBERTS, R. J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, v. 26, n. 9, p. 499-509.
- AIZEN, J., KOBAYASHI, M., SELICHAROVA, I., SOHN, Y. C., YOSHIZAKI, G., LEVAVI-SIVAN, B. 2012. Steroidogenic response of carp ovaries to piscine FSH and LH depends on the reproductive phase. *General and Comparative Endocrinology*, v. 178, n.1, p. 28-36.
- ALAM, M. A., KOMURO, H., BHANDARI, R. K., NAKAMURA, S., SOYANO, K., NAKAMURA, M. 2005. Immunohistochemical evidence identifying the site of androgen production in the ovary of the protogynous grouper *Epinephelus merra*. *Cell and Tissue Research*, v. 320, n. 2, p. 323-329.
- ALI, A. O., HOHN, C., ALLEN, P. J., FORD, L., DAIL, M. B., PRUETT, S., PETRIE-HANSON, L. 2014. The effects of oil exposure on peripheral blood leukocytes and splenic melano-macrophage centers of Gulf of Mexico fishes. *Marine Pollution Bulletin*, v.79, n. 1, p. 87-93.
- BANERJEE, A., KHAN, I.A. 2008. Molecular cloning of FSH and LH β subunits and their regulation by estrogen in Atlantic croaker. *General and Comparative Endocrinology*, v.155, n.3, p.827-837.
- BARREIROS, J.P. 1998. Sexual inversion in *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces: Serranidae, Epinephelinae) nos Açores. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, v.5, n.1, p.81-90.
- BHANDARI, R.K., KOMURO, H., NAKAMURA, S., HIGA, M., NAKAMURA, M. 2003. Gonadal restructuring and correlative steroid hormone profiles during natural sex change in protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). *Zoological Science*, v. 20, p1399–1404.

- BHANU, S. V., PHILIP, B. 2011. Effect of ethanol on branchial adenosine triphosphatases in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Toxicology International*, v.18, n. 1.
- BLACK, J.A., BIRGE, W.J., WESTERMAN, A.G., FRANCIS, P.C. 1983. Comparative aquatic toxicology of aromatic hydrocarbons. *Toxicological Sciences*, v.3, n.5, p.353-358.
- BOLS, N. C., BRUBACHER, J. L., GANASSIN, R. C., LEE, L. E. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 25, n. 8, p. 853-873.
- BORG, B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 109, n. 3, p. 219-245.
- BRASIL. 2004. Instrução Normativa nº 05, de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Ministério do Meio Ambiente, p. 136-142.
- CABAS, I., LIARTE, S., GARCÍA-ALCÁZAR, A., MESEGUER, J., MULERO, V., GARCÍA-AYALA, A. 2012. 17 α -Ethinylestradiol alters the immune response of the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) both in vivo and in vitro. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 36, n.3, p. 547-556.
- CAMUS, L., JONES, M.B., BORSETH, J.F., GROSVIK, B.E., REGOLI, F., DEPLEDGE, M.H. 2002. Total oxyradical scavenging capacity and cell membrane stability of haemocytes of the Arctic scallop, *Chlamys islandicus*, following benzo(a)pyrene exposure. *Marine Environmental Research*, v.54, n.3, p.425-430.
- CÁPIRO, N. L., STAFFORD, B. P., RIXEY, W. G., BEDIANT, P. B., ALVAREZ, P. J. 2007. Fuel-grade ethanol transport and impacts to groundwater in a pilot-scale aquifer tank. *Water Research*, v. 41, n. 3, p. 656-664.

- CARLS, M.G., RICE, S.D., HOSE, J.E. 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.18, n.3, p.481-493.
- CARREAU, S., BOURGUIBA, S., LAMBARD, S., GALERAUD-DENIS, I., GENISSEL, C., LEVALLET, J. 2002. Reproductive system: aromatase and estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.193, p.137-143.
- CARVALHO, P.S., KALIL, D.D.C.B., NOVELLI, G.A., BAINY, A.C., FRAGA, A.P.M. 2008. Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus brasiliensis*. *Marine Environmental Research*, v.66, n.1, p.205-207.
- CETESB, 1994 – POFFO, I.R.F., SERPA, R.R., AVENTURATO, H., TERRA, A.C.T.A.A., MODESTO, R.P., LOPES, C.F., MILANELLI, J.C.C., RODRIGUES, F.O., MOURA, D.O., VINCENT, R.C. 1997. Estudo da vulnerabilidade de região do Canal de São Sebastião aos derramamentos de petróleo e derivados. São Paulo, CETESB, 52p.
- CETESB, 2004 - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Monitoramento de águas costeiras: Litoral Norte em Relatório de Qualidade das Águas Litorâneas no Estado de São Paulo: Balneabilidade das Praias, p.273-331.
- CONAMA, 2005, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357, Ministério do Meio Ambiente, Brasil.
- CORNISH, A., HARMELIN-VIVIEN, M. 2004. *Epinephelus marginatus*. IUCN 2007. IUCN Red List of Threatened Species. Acessado em 15/02/2016 www.iucnredlist.org
- CUNHA, I. 2003. Conflito Ambiental em Águas Costeiras: Relação Porto - Cidade no Canal de São Sebastião. *Ambiente & Sociedade*, v.6, n.2.

- DAILIANIS, S., TSARPALI, V., MELAS, K., KARAPANAGIOTI, H.K., MANARIOTIS, I. D. 2014. Aqueous phenanthrene toxicity after high-frequency ultrasound degradation. *Aquatic Toxicology*, v.147, p.32-40.
- DENSLOW, N., SEPÚLVEDA, M. 2007. Ecotoxicological effects of endocrine disrupting compounds on fish reproduction. In: *The Fish Oocyte*, Springer Netherlands, p. 255-322.
- DIVERS, S. L., MCQUILLAN, H. J., MATSUBARA, H., TODO, T., LOKMAN, P. M. 2010. Effects of reproductive stage and 11-ketotestosterone on LPL mRNA levels in the ovary of the shortfinned eel. *Journal of Lipid Research*, v. 51, n. 11, p. 3250-3258.
- DOERFFER, J. W. 2013. Oil spill response in the marine environment. Elsevier.
- DOTTORI, M., SIEGLE, E., CASTRO, B. M. 2015. Hydrodynamics and water properties at the entrance of Araçá Bay, Brazil. *Ocean Dynamics*, v. 65, n. 12, p. 1731-1741.
- DUCAN, W.L.P. 1998. Estresse metabólico e dano celular em *Colossoma macropomum* e *Hoplosternum littorale* expostos ao petróleo; Dissertação de mestrado, INPA/UFAM; Manaus, Amazônia.
- EMANUELE, N., EMANUELE, M. A. 1997. The endocrine system: alcohol alters critical hormonal balance. *Alcohol Research and Health*, v. 21, n. 1, 53p.
- ENDO, T., TODO, T., LOKMAN, P. M., KUDO, H., IJIRI, S., ADACHI, S., YAMAUCHI, K. 2011. Androgens and very low density lipoprotein are essential for the growth of previtellogenic oocytes from Japanese eel, *Anguilla japonica*, *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 84, n. 4, p. 816-825.
- EVANS, D.R., RICE, S.P. 1974. Effects of oil on marine ecosystems: a review for administrators and policy makers. *Fishery Bulletin*, v.72, n.3, p.625-638.

- FARRINGTON, J. W., 2013. Oil pollution in the marine environment i: inputs, big spills, small spills, and dribbles. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, v. 55, n. 6, p. 3-13.
- FIGUEIREDO, J.L., MENEZES, N.A. 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil III. Teleostei (2). Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 90 p.
- FINNEY, D. J. 1971. Probit Analysis, Cambridge University Press, London. 333 p.
- FONTES, R. F. C. 1995. As correntes no Canal de São Sebastião. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, São Paulo; 159p.
- FOURNIE, J. W., SUMMERS, J. K., COURTNEY, L. A., ENGLE, V. D., BLAZER, V. S. 2001. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 13, n. 2, p. 105-116.
- GABARDO, I. T., CARNEIRO, M. E. R., FALCÃO, L. V., MENICONI, M. F. G., BARBAND, S. M., PLATTE, E. B. 2003. Oil Spills in a tropical country-brazilian case studies. In *International Oil Spill Conference 1*, American Petroleum Institute, p. 1039-1049.
- GARCIA, C.E.O., ARAÚJO, B.C., MELLO, P.H., NARCIZO, A.M., RODRIGUES-FILHO, J.A., MEDRADO, A.T., ZAMPIERI, R.A., FLOETER-WINTER, L.M., MOREIRA, R.G. 2013. Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex change of protogynous dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor. *General and Comparative Endocrinology*, v.190, p.170-180.
- GERAUDIE, P., NAHRGANG, J., FORGET-LERAY, J., MINIER, C., CAMUS, L. 2014. In vivo effects of environmental concentrations of produced water on the reproductive function of polar cod (*Boreogadus saida*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v.77, p.557-573.

- GOODBRED, S. L., GILLIOM, R. J., GROSS, T. S., DENSLOW, N. P., BRYANT, W. L., SCHOEB, T. R. 1997. Reconnaissance of 17B-estradiol, 11-ketotestosterone, vitellogenin, and gonad histopathology in common carp of United States streams: Potential for contaminant-induced endocrine disruption. *US Geological Survey Open-File Report 96 - 627*.
- HAN, Z. X., WANG, J. H., LV, W. Z., MIN, L. 2010. Multibiomarker approaches in common carp to assess the effects of phenanthrene. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, v.40, n. 4, p. 257-265.
- HANNAM, M.L., BAMBER, S.D., GALLOWAY, T.S., MOODY, A.J., JONES, M.B. 2010. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere*, v.78, n.7, p.779-784.
- HARMELIN, J.G., HARMELIN-VIVIEN, M. 1999. A review on habitat, diet and growth of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Marine Life*, v. 9, n. 2, p. 11-20.
- HEEMSTRA, P.C., RANDALL, J.E. 1993. Groupers of the World. Food and Agriculture Organization of United States Fisheries Synopsis, v. 16.
- HEINTZ, R.A., SHORT, J.W., RICE, S.D. 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.18, n.3, p.494-503.
- HEPPELL, S.A. 2005. Seasonal fluctuations in androgen levels in females of the hermaphroditic gag, *Mycteroperca microlepis*, with an emphasis on juvenile animals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.142A, p.84-91.

- HIBIYA, T., YOKOTE, M., OGURI, M., SATO, H., TAKASHIMA, F., AIDA, K. 1982. An atlas of fish histology. Normal and pathological features. Kodansha, Japan. 147 p.
- HIRAI, H., TAKADA, H., OGATA, Y., YAMASHITA, R., MIZUKAWA, K., SAHA, M., KWAN, C., MOORE, C., GRAY, H., LAURSEN, D., FARRINGTON, J. W., REDDY, C. M., EMILY E. PEACOCK, E. E., WARD, M., ZETTLER, E. R. 2011. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, n. 8, p. 1683-1692.
- HODGSON, E., LEVI, P. E. 2010. Hepatotoxicity In: *A textbook of modern toxicology*, (Ed.). Hoboken, Wiley. USA: 263-272.
- HORNG, C. Y., LIN, H. C., LEE, W. 2010. A reproductive toxicology study of phenanthrene in medaka (*Oryzias latipes*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 58, n. 1, p. 131-139.
- HOSE, J. E., MCGURK, M. D., MARTY, G. D., HINTON, D. E., BROWN, E. D., BAKER, T.T. 1996. Sublethal effects of the (Exxon Valdez) oil spill on herring embryos and larvae: morphological, cytogenetic, and histopathological assessments, 1989-1991. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v.53, n.10, p.2355-2365.
- HUTCHINSON, H.T., SHILLABEER, N., WINTER, M.J., PICKFORD, D.B., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 69–92.
- 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*, v.196, n.2, p.191-205.
- ITOPF, International Tanker Owners Pollution Federation. Acessado em 05/02/2016. <http://www.itopf.com/>

- JEE, J. H., KANG, J. C. 2003. Effects of phenanthrene exposure on the Acetylcholinesterase activity of Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fisheries Science and Technology*, v.6, n. 4, p. 225-227.
- JEE, J.H., KIM, S.G., KANG, J.C. 2004. Effects of phenanthrene on growth and basic physiological functions of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.304, n.1, p.123-136.
- KARAMI, A., ROMANO, N., HAMZAH, H., SIMPSON, S. L., YAP, C. K. 2016. Acute phenanthrene toxicity to juvenile diploid and triploid African catfish (*Clarias gariepinus*): Molecular, biochemical, and histopathological alterations. *Environmental Pollution*, v. 212, p.155-165
- KARAPANAGIOTI, H. K., KLONTZA, I. 2008. Testing phenanthrene distribution properties of virgin plastic pellets and plastic eroded pellets found on Lesbos island beaches (Greece). *Marine Environmental Research*, v. 65, n. 4, p. 283-290.
- KARAPANAGIOTI, H. K., OGATA, Y., TAKADA, H., KORDULIS, C., LYCOURGHIOTIS, A. 2010. Eroded plastic pellets as monitoring tools for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH): laboratory and field studies. *Global Nest Journal*, v.12, n. 3, p. 327-334.
- KENNEDY, C.J., FARRELL, A.P. 2005. Ion homeostasis and interrenal stress responses in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasii*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.323, n.1, p.43-56.
- KENNEDY, C.J., SMYTH, K.R. 2015. Disruption of the rainbow trout reproductive endocrine axis by the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene. *General and Comparative Endocrinology*, v.219, p.102-111.
- KENNISH, M.J. 1991. Ecology of estuaries: anthropogenic effects (V. 1). CRC press. 495p.

- KHAN, R. A. 1998. Influence of petroleum at a refinery terminal on feral winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.61, n. 6, p. 770-777.
- KOCAN, R.M., HOSE, J.E., BROWN, E.D., BAKER, T.T. 1996. Pacific herring (*Clupea pallasii*) embryo sensitivity to Prudhoe Bay petroleum hydrocarbons: laboratory evaluation and in situ exposure at oiled and unoiled sites in Prince William Sound. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v.53, n.10, p.2366-2375.
- KORTNER, T. M., ROCHA, E., ARUKWE, A. 2009. Previtellogenic oocyte growth and transcriptional changes of steroidogenic enzyme genes in immature female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) after exposure to the androgens 11-ketotestosterone and testosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.152, n. 3, p. 304-313.
- LAW, R. J. 1981. Hydrocarbons concentrations in water and sediments from UK marine waters determined by fluorescence spectroscopy. *Marine Pollution Bulletin*, v.12, n. 5, p.153-157.
- LEVAVI-SIVAN, B., BIRAN, J., FIREMAN, E. 2006. Sex steroids are involved in the regulation of gonadotropin-releasing hormone and dopamine D2 receptors in female tilapia pituitary. *Biology of Reproduction*, v.75, n. 4, p. 642-650.
- LEVAVI-SIVAN, B., BOGERD, J., MAÑANÓS, E. L., GÓMEZ, A., LAREYRE, J. J. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, v.165, n.3, p. 412-437.
- LISTER, A., NERO, V., FARWELL, A., DIXON, D. G., VAN DER KRAAK, G. 2008. Reproductive and stress hormone levels in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Aquatic Toxicology*, v. 87, n. 3, p. 170-177.

- LOHMANN, R., KLANOVA, J., PRIBYLOVA, P., LISKOVA, H., YONIS, S., BOLLINGER, K. 2013. PAHs on a west-to-east transect across the tropical Atlantic Ocean. *Environmental Science & Technology*, v.47, n.6, p. 2570-2578.
- LOKMAN, P. M., VERMEULEN, G. J., LAMBERT, J. G., YOUNG, G. 1998. Gonad histology and plasma steroid profiles in wild New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachii* and *A. australis*) before and at the onset of the natural spawning migration. I. Females. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 19, n. 4, p. 325-338.
- LOKMAN, P. M., HARRIS, B., KUSAKABE, M., KIME, D. E., SCHULZ, R. W., ADACHI, S., YOUNG, G. 2002. 11-Oxygenated androgens in female teleosts: prevalence, abundance, and life history implications. *General and Comparative Endocrinology*, v. 129, n. 1, p. 1-12.
- LOKMAN, P. M., GEORGE, K. A., DIVERS, S. L., ALGIE, M., YOUNG, G. 2007. 11-Ketotestosterone and IGF-I increase the size of previtellogenic oocytes from shortfinned eel, *Anguilla australis*, *in vitro*. *Reproduction*, v. 133, n. 5, p. 955-967.
- LOURENÇO, R. A., JÚNIOR, M. A. A., JÚNIOR, R. O. M., MACENA, L. F., LIMA, E. F. D. A., CARNEIRO, M. E. R. 2013. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons and trace elements as indicators of contamination status near oil and gas platforms in the Sergipe–Alagoas Basin (Southwest Atlantic Ocean). *Continental Shelf Research*, v.71, p. 37-44.
- MACHADO, A.A.S., HOFF, M.L.M., KLEIN, R.D., CORDEIRO, G.J., AVILA, J.M.L., COSTA, P.G., BIANCHINI, A. 2014. Oxidative stress and DNA damage responses to phenanthrene exposure in the estuarine guppy *Poecilia vivipara*. *Marine Environmental Research*, v.98, p.96-105.
- MAES, J., VERLOOY, L., BUENAFE, O.E., DE WITTE, P.A.M., ESGUERRA, C.V., CRAWFORD, A.D., 2012. Evaluation of 14 organic solvents and carriers for

screening applications in zebrafish embryos and larvae. *PLoS ONE*, v. 7, n. 10. e43850.

MAQBOOL, F., MOSTAFALOU, S., BAHADAR, H., ABDOLLAHI, M. 2016. Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. *Life Sciences*, v.145, p. 265-273.

MARTIN-SKILTON, R., THIBAUT, R., PORTE, C. 2006. Endocrine alteration in juvenile cod and turbot exposed to dispersed crude oil and alkylphenols. *Aquatic Toxicology*, v.78, S57-S64.

MATO, Y., ISOBE, T., TAKADA, H., KANEHIRO, H., OHTAKE, C., KAMINUMA, T. 2001. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environmental Science & Technology*, v.35, n. 2, p. 318-324.

MATSUO, A. Y., WOODIN, B. R., REDDY, C. M., VAL, A. L., STEGEMAN, J. J. 2006. Humic substances and crude oil induce cytochrome P450 1A expression in the Amazonian fish species *Colossoma macropomum* (Tambaqui). *Environmental Science & Technology*, v. 40, n.8, p. 2851-2858.

MATTHIESSEN, P., JOHNSON, I. 2007. Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. *Environmental Pollution*, v.146, n.1, p.9-18.

MCGOVERN, J. C., WYANSKI, D. M., PASHUK, O., MANOOCH II, C. S., SEDBERRY, G. R. 1998. Changes in the sex ratio and size at maturity of gag, *Mycteroperca microlepis*, from the Atlantic coast of the southeastern United States. *Fishery Bulletin*, v.96, n. 4, p. 797-807.

MCKEE, M.J., HENDRICKS, A.C., EBEL, R.E. 1983. Effects of naphthalene on benzo[a]pyrene hydroxylase and cytochrome P-450 in *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic Toxicology*, v.3, n.2, p.103-114.

- MEADOR, J.P., STEIN, J.E., REICHERT, W.L., VARANASI, U. 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer New York, v. 143, p.79-165.
- MEDEIROS, P. M., BÍCEGO, M. C. 2004. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. II. São Sebastião, SP—Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v.49, n. 11, p. 892-899.
- MEDRADO, A. T. 2015. An Atlas of catfish brain-*Steindachneridion parahybae* (Teleostei: Siluriformes): a detailed cytoarchitectonic study of the different brain areas and nuclei as a basis for further morphological and functional studies. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MELAMED, P., SHERWOOD, M.N. 2005. Gonadotropin-releasing hormone in fish: evolution, expression and regulation of the GnRH gene. In: *Hormones and their receptors in fish reproduction: molecular aspects of fish and marine biology*, p.3-39.
- MONTEIRO, P.R.R., REIS-HENRIQUES, M.A., COIMBRA, J. 2000a. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit *in vitro* ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic Toxicology*, v.48, n.4, p.549-559.
- MONTEIRO, P.R.R., REIS-HENRIQUES, M.A., COIMBRA, J. 2000b. Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, v.49, n.5, p.453-467.
- NICOLAS, J.M. 1999. Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. *Aquatic Toxicology*, v.45, p.77-90.
- NOREÑA-BARROSO, E., SIMÁ-ÁLVAREZ, R., GOLD-BOUCHOT, G., ZAPATA-PÉREZ, O. 2004. Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan

catfish *Ariopsis assimilis* from the Bay of Chetumal, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, v. 48, n. 3, p. 263-269.

PACHECO, M., SANTOS, M.A. 2001. Biotransformation endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.49, n.1, p.64-75.

PASQUALOTTO, F. F., LUCON, A. M., SOBREIRO, B. P., PASQUALOTTO, E. B., ARAP, S. 2004. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Revista do Hospital das Clínicas*, v.59, n. 6, p. 375-382.

PAVLOV, D. A., EMEL'YANOVA, N. Y. G., NOVIKOV, G. G. 2009. Reproductive dynamics, In: *Fish Reproductive Biology: Implications for Assessment and Management*, Wiley-Blackwell, United Kingdom, p. 48-90.

PAYNE, J. F., MATHIEU, A., MELVIN, W., FANCEY, L. L. 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, v.32, n. 2, p. 225-231.

PEREIRA, C.D.S., MARTÍN-DÍAZ, M.L., CATHARINO, M.G.M., CESAR, A., CHOUERI, R.B., TANIGUCHI, S., DELVALLS, T.A. 2012. Chronic contamination assessment integrating biomarkers' responses in transplanted mussels - A seasonal monitoring. *Environmental Toxicology*, v.27, n.5, p.257-267.

PIAZZA, Y., PANDOLFI, M., DA CUÑA, R., GENOVESE, G., NOSTRO, F. L. 2015. Endosulfan affects GnRH cells in sexually differentiated juveniles of the perciform *Cichlasoma dimerus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.116, p. 150-159.

- POFFO, I. 2000. Vazamentos de Óleo no Litoral Norte do Estado de São Paulo: Análise Histórica (1974 a 1999). Dissertação de mestrado apresentada ao PROCAM, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- REINBOTH, R. 1998. Modes of reproduction in fishes. In: E. Knobil and J.D. Neill (eds.) *Encyclopedia of Reproduction*. London: Academic Press, v.2, p.365-372.
- RIOS, L. M., MOORE, C., JONES, P. R. 2007. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Marine Pollution Bulletin*, v.54, n. 8, p. 1230-1237.
- ROCHA, M. J., ROCHA, E. 2006. Morphofunctional aspects of reproduction form synchronous to asynchronous fishes – An overview. In: *Fish Endocrinology*. Science Publishers 02, 871p.
- RODRIGUES, M. 2009. Modelagem numérica do comportamento de derrames de óleo como método de gestão ambiental, em planos de contingência, aplicada ao canal de São Sebastião (SP). Tese de Doutorado, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RODRIGUES-FILHO, J. A., SANCHES, E. G., GARCIA, C. E. O., PANNUTI, C.V., SEBASTINI, E.F., MOREIRA, R.G. 2009. Threatened fishes of the world: *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae: Epinephelinae). *Environmental Biology of Fishes*, v.85, p.301-302.
- RODRIGUES-FILHO, J. A. 2010. Alterações morfológicas e hormonais das gônadas e da hipófise da garoupa *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae) durante a inversão sexual. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ROHR, D. H., LOKMAN, P. M., DAVIE, P. S., YOUNG, G. 2001. 11-Ketotestosterone induces silvering-related changes in immature female short-finned eels, *Anguilla australis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.130, n. 4, p. 701-714.

- RONIS, M. J., WANDS, J. R., BADGER, T. M., DE LA MONTE, S. M., LANG, C. H., CALISSENDORFF, J. 2007. Alcohol-Induced Disruption of Endocrine Signaling. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v.31, n. 8, p. 1269-1285.
- ROY, L. A., STEINERT, S., BAY, S. M., GREENSTEIN, D., SAPOZHNIKOVA, Y., BAWARDI, O., LEIFER, I., SCHLENK, D. 2003. Biochemical effects of petroleum exposure in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediments collected from a natural petroleum seep in CA, USA. *Aquatic Toxicology*, v.65, n. 2, p. 159-169.
- SALVO, L. M., SEVERINO, D., DE ASSIS, H. C. S., DA SILVA, J. R. M. 2016. Photochemical degradation increases polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) toxicity to the grouper *Epinephelus marginatus* as assessed by multiple biomarkers. *Chemosphere*, v. 144, p. 540-547.
- SANTOS, T.C., GOMES, V., PASSOS, J., ROCHA, A., SALAROLI, R., NGAN, P. 2011. Histopathological alterations in gills of juvenile Florida pompano *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) following sublethal acute and chronic exposure to naphthalene. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v.6, n.2, p.109-120.
- SENTHILKUMARAN, B. 2015. Pesticide-and sex steroid analogue-induced endocrine disruption differentially targets hypothalamo–hypophyseal–gonadal system during gametogenesis in teleosts – A review. *General and Comparative Endocrinology*, v. 219, p.136-142.
- SETIAWAN, A. N., OZAKI, Y., SHOAE, A., KAZETO, Y., LOKMAN, P. M. 2012. Androgen-specific regulation of FSH signalling in the previtellogenic ovary and pituitary of the New Zealand shortfinned eel, *Anguilla australis*. *General and Comparative Endocrinology*, v.176, n. 2, p. 132-143.
- SHEPHARD, K. L. 1994. Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v.4, n. 4, p. 401-429.

- da SILVA, D.A., BÍCEGO, M.C. 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum biomarkers in São Sebastião Channel, Brazil: Assessment of petroleum contamination. *Marine Environmental Research*, v.69, n.5, p.277-286.
- SILVA, F. D. C., LEITE, J. R., HOSTIM-SILVA, M., VALENÇA, A. R., SANCHES, E. G. 2014. First record of *Neobenedenia* “melleni”-like species (Monogenea: Capsalidae) in Goliath grouper *Epinephelus itajara* in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, n. 1, p.248-250.
- SIMONATO, J. D., GUEDES, C. L., MARTINEZ, C. B. 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 69, n. 1, p.112-120.
- SLATER, C. H., SCHRECK, C. B., SWANSON, P. 1994. Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 109, n. 1, p. 167-175.
- SLUKA, R., CHIAPPONE, M., SULLIVAN, K.M. 1994. Comparison of juvenile grouper populations in southern Florida and the central Bahamas. *Bulletin of Marine Science*, v.54, p.871–880.
- SOL, S. Y., JOHNSON, L. L., HORNESS, B. H., COLLIER, T. K. 2000. Relationship between oil exposure and reproductive parameters in fish collected following the Exxon Valdez oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, v.40, n. 12, p. 1139-1147.
- STEGEMAN, J. J., LECH, J. J. 1991. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environmental Health Perspectives*, v. 90, p. 101-109.

- SUN, Y., YU, H., ZHANG, J., YIN, Y., SHI, H., WANG, X. 2006. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere*, v. 63, n. 8, p. 1319-1327.
- SUN, L., ZUO, Z., LUO, H., CHEN, M., ZHONG, Y., CHEN, Y., WANG, C. 2011. Chronic exposure to phenanthrene influences the spermatogenesis of male *Sebastiscus marmoratus*: U-shaped effects and the reason for them. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 23, p.10212-10218.
- TAKASHIMA, F., HIBIYA, T. 1995. An atlas of fish histology: normal and pathological features. Kodansha. Tokyo, Japan.
- THOMAS, R.E., RICE, S.D. 1987. Effect of water soluble fraction of Cook Inlet crude oil on swimming performance and plasma cortisol in juvenile Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.87, p.177–180.
- THOMAS, P. 1988. Reproductive endocrine function in female Atlantic croaker exposed to pollutants. *Marine Environmental Research*, v. 24 n. 1-4, p. 179-183.
- TOMMASI, L.R. 1994. Diagnóstico ambiental oceânico e costeiro das regiões sul e sudeste do Brasil. In: *Poluição*. Petrobrás.
- TRANSPETRO. Petrobras Transporte S.A.. Acessado em 10/02/2016. http://www.transpetro.com.br/pt_br/areas-de-negocios/terminais-e-oleodutos/terminais-aquaviarios.html
- TYLER, C., JOBLING, S., SUMPTER, J. P. 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 28, n. 4, p. 319-361.
- U.S. EPA. United States Environmental Protection Agency. Acessado em 30/01/2016. <https://www3.epa.gov/>

- VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 57-149.
- VEINTEMILLA, C.A.C. 2006. Impactos do fenantreno sobre o tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818: CL₅₀, crescimento e hematologia. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus.
- VILLAMARIN, B. C. 2014. Alterações morfológicas da Baía do Araçá: Implicações em sua dinâmica. Monografia de Bacharelado. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- WALKER, M. K., PETERSON, R. E. 1991. Potencies of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners, relative to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, for producing early life stage mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, v. 21, n. 3, p. 219-237.
- WALTER, G. L., JONES, P. D., GIESY, J. P. 2000. Pathologic alterations in adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to dietary 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Aquatic Toxicology*, v. 50, n. 4, p. 287-299.
- WEBER, R. R., BÍCEGO, M. C. 1991. Survey of petroleum aromatic hydrocarbons in the São Sebastião Channel, SP, Brazil, November 1985 to August 1986. *Boletim do Instituto Oceanográfico*, v.39, n.2, p.117-121.
- WOLF, J. C., WOLFE, M. J. 2005. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology*, v. 33, n.1, p.75-85.
- WOLKE, R. E. 1992. Piscine macrophage aggregates: a review. *Annual Review of Fish Diseases*, v.2, p. 91-108.
- ZAGATTO, A.P., BERTOLETTI, E. 2008. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. São Carlos (ED.) 486p.

ZOHAR, Y., MUÑOZ-CUETO, J.A., ELIZUR, A., KAH, O. 2010.
Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative
Endocrinology*, v.165, p.438-455.

8. ANEXOS

Anexo I – Fichas de especificação e segurança do fenantreno.

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:
Phenanthrene – 98%

Product Number: **P11409**
CAS Number: 85-01-8
MDL: MFCD00001168
Formula: C₁₄H₁₀
Formula Weight: 178.23 g/mol

TEST

Specification

Appearance (Color)
Appearance (Form)
Infrared spectrum
Purity (HPLC)

White to Light Beige
Powder or Crystals
Conforms to Structure
≥ 97.5 %

Specification: PRD.0.ZQ5.10000026583

**FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTOS
QUÍMICOS**

Versão 5.1

Data de revisão 21.08.2014

Data de impressão 10.04.2016

1. IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DA EMPRESA**1.1 Identificadores do produto**Nome do produto : **Phenanthrene**

Referência do Produto : P11409

Marca : Aldrich

1.2 Outros meios de identificação

Dados não disponíveis

1.3 Utilizações identificadas relevantes da substância ou mistura e utilizações desaconselhadas

Só para utilização R&D. Não para utilização farmacêutica, doméstica ou outras utilizações.

1.4 Identificação do fornecedor da ficha de dados de segurançaCompanhia : Sigma-Aldrich Brasil Ltda.
Av. das Nações Unidas, 23.043
04795-100 SÃO PAULO - SP
BRAZIL

Telefone : +55 11 3732 3100

Número de Fax : +55 11 5522 9895

Email endereço : sigmabr@sial.com

1.5 Número de telefone de emergência

0800-720-8000

2. IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS**2.1 Classificação GHS**

Toxicidade aguda, Oral (Categoria 4)

Irritação cutânea (Categoria 2)

Irritação ocular (Categoria 2A)

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição única (Categoria 3)

Toxicidade aguda para o ambiente aquático (Categoria 1)

Toxicidade crônica para o ambiente aquático (Categoria 1)

2.2 Elementos da Etiqueta GHS, incluindo declarações de prevenção

Pictograma

Palavra de advertência

Atenção

Frases de Perigo

H302

Nocivo por ingestão.

H315

Provoca irritação cutânea.

H319

Provoca irritação ocular grave.

H335

Pode provocar irritação das vias respiratórias.

H410

Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

Anexo II - Protocolo de análise histopatológica e histoquímica de fígado, baço e gônadas.

1. Fixadores

As amostras de gônadas foram fixadas em Bouin acético e as de fígado e baço fixadas em formaldeído tamponado a 10%.

- Preparação de Bouin acético:

Ácido pícrico saturado.....750ml

Formol a 40%.....250ml

Ácido acético glacial.....50ml

2. Desidratação e inclusão do material biológico

O material fixado passou por imersão em sequencia de etanol e xilol para a desidratação e em seguida, todos os tecidos foram infiltrados e incluídos em *paraplast* (Erv-Plast, *Easy Path*, Erviegas Instrumental Cirúrgico, São Paulo, Brasil) como descrito a seguir:

-1 hora em etanol 95°;

-1 hora em etanol absoluto (2 vezes);

-1 hora em xilol (2 vezes);

-1 hora em *paraplast* (4 vezes).

Ao final, o material foi emblocado em *paraplast* novo com auxílio de fôrmas metálicas.

3. Secção do material biológico

O tecido biológico foi seccionado em cortes de 5µm de espessura em micrótomo (Leica RM 2255) com uso de lâminas descartáveis. As secções foram montadas em lâminas tratadas com poli-lisina (*Poly-Lysine Solution Sigma Diagnostics INS, St, Louis M. O. USA*) diluída em proporção de 1:5 em água destilada, promovendo uma melhor fixação. Finalmente as lâminas foram acondicionadas em estufa a 60°C por 15 minutos também a fim de garantir a fixação dos cortes sobre as lâminas.

4. Técnicas de coloração

Para que o excesso de parafina fosse retirado mais facilmente, as lâminas foram acondicionadas em estufa a 60°C por duas horas e em seguida, passaram pela sequência de imersões abaixo visando sua hidratação, antes de serem submetidas às colorações:

- 20 minutos em xilol;
- 10 minutos em etanol-xilol (1:1);
- 10 minutos em etanol absoluto;
- 5 minutos em etanol 90°;
- 5 minutos em etanol 70°;
- 2 minutos lavando em água corrente.

4.1. Hematoxilina e Eosina

Soluções

a) Hematoxilina de Harris

- Hematoxilina..... 10 g
- Óxido de mercúrio..... 5 g
- Sulfato de alumínio e potássio..... 200 g
- Água destilada.....1900 ml
- Etanol absoluto..... 100 ml

- 1) Dissolver a hematoxilina no etanol;
- 2) Dissolver o sulfato na água quente;
- 3) Juntar a hematoxilina já dissolvida no sulfato em água quente;
- 4) Aquecer a solução rapidamente;
- 5) Colocar o óxido lentamente.

- Hematoxilina para uso:

- Hematoxilina de Harris.....200 ml
- Ácido acético glacial.....4 ml

b) Eosina

- Solução estoque de Eosina 1%:

Eosina.....1 g

Água.....100 ml

- Solução estoque Floxina B 1%:

FloxinaB.....1 g

Água.....100 ml

• Eosina para uso:

- Eosina 1 %.....100 ml

- Floxina 1%.....10 ml

- Etanol 95°.....780 ml

- Ácido acético.....4 ml

Coloração

- 4 minutos em Hematoxilina;

- 1 minuto lavando em água corrente;

- 2 minutos em Eosina;

- 3 minutos lavando em água corrente.

Desidratação e montagem

- 3 minutos em etanol absoluto;

- 10 minutos em xilol;

- Montagem com Ery-mount® e lamínula.

4.2. Ácido Periódico de Schiff (P.A.S)

Soluções

c) Ácido Periódico:

-Ácido Periódico.....1g

-Água destilada.....100ml

d) Reativo de Schiff

- Fucsina básica.....1g
- Metabissulfito de sódio.....2g
- Ácido clorídrico normal.....20ml
- Água destilada.....100ml
- Carvão ativado.....500mg

- 1) Aquecer a água destilada até a ebulição;
- 2) tirar do fogo, acrescentar e dissolver em seguida a fucsina básica;
- 3) Depois que a solução esfriar aquecer até 60°C;
- 4) Filtrar e adicionar ao filtrado o metabissulfito e o ácido clorídrico normal;
- 5) Acrescentar o carvão ativado, agitar vigorosamente durante 1 minuto e filtrar.

O filtrado deverá ser incolor ou apresentar coloração amarelo palha. Se não apresentar tais características, repetir carvão e filtragem até alcançá-las. O pH deve oscilar entre 1,00 e 1,25.

Coloração

- Água destilada;
- 10 minutos em Ácido Periódico;
- 5 minutos em água destilada;
- 45 minutos em Reativo de Schiff;
- 10 minutos lavando em água corrente;
- 15 minutos em Hematoxilina;
- 10 minutos lavando em água corrente.

Desidratação e montagem

- 3 minutos em etanol absoluto;
- 3 minutos em etanol:xilol (1:1);
- 10 minutos em xilol;
- Montagem com Ery-mount® e lamínula.