Fabio Matsu Hasue

Avaliação da fototoxicidade do antraceno sobre a mortalidade e o dano ao DNA de juvenis de pampos, *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766)

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Phan Van Ngan

São Paulo

- 2011 -

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Avaliação da fototoxicidade do antraceno sobre a mortalidade e o dano ao DNA
de juvenis de pampas, *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766)

Fabio Matsu Hasue

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em
Ciências, área de Oceanografia Biológica.

Julgada em ____/____/____

Prof. Dr. Phan Van Ngan

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Dedico este trabalho aos
meus pais e minha irmã

"Saber que ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção".

Freire P. (1996)

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	7
II.1. <u>Objetivo geral</u> :.....	7
II.2. <u>Objetivos específicos</u>	7
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
III.1. <u>Espécie estudada</u>	8
III.2. <u>Coleta dos animais</u>	9
III.3. <u>Manutenção dos animais</u>	9
III.4. <u>Experimentos</u>	10
III.4.1. <i>Pré-exposição ao poluente</i>	10
III. 4.2. <i>Exposição à luz de lâmpada fluorescente branca ou RUVB em água limpa</i>	12
III.4.3. <i>Duração das exposições à luz de lâmpadas fluorescentes brancas ou à</i> <i>radiação ultravioleta B</i>	14
III.4.3.1. Períodos utilizados para exposições à luz de lâmpadas fluorescentes.....	14
III.4.3.2. Períodos utilizados para exposições à radiação ultravioleta B.....	14
III.4.4. <i>Coleta de dados sobre mortalidade e de amostras de peixes para realizar o</i> <i>ensaio cometa</i>	16
III.5. <u>Coleta de sangue</u>	17
III.6. <u>Ensaio cometa</u>	17
III.6.1. <i>Preparação das lâminas para o ensaio cometa</i>	18
III.6.2. <i>Lise</i>	19
III.6.3. <i>Desenrolamento do DNA</i>	20
III.6.4. <i>Eletroforese</i>	20
III.6.5. <i>Neutralização</i>	20
III.6.6. <i>Coloração por prata</i>	21
III.7. <u>Análise de cometas</u>	22
III.8. <u>Análise estatística</u>	23
IV. RESULTADOS.....	24
IV.1. <u>Efeito da subsequente exposição à luz de lâmpadas florescentes</u> <u>brancas sobre o dano ao DNA de peixes pré-expostos às diferentes</u> <u>concentrações de antraceno</u>	24

IV.2. <u>Efeito da subsequente exposição à radiação ultravioleta B sobre o DNA de peixes pré-expostos às diferentes concentrações de antraceno</u>	27
IV.3. <u>Mortalidade dos peixes pré-expostos às diferentes concentrações de antraceno e subsequentemente expostos à radiação ultravioleta B (RUVB) por diferentes períodos de tempo</u>	29
V. DISCUSSÃO	33
VI. CONCLUSÕES	45
VII. BIBLIOGRAFIA	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema utilizado para manutenção dos peixes	54
Figura 2. Classe de danos.....	54
Figura 3. Média do índice de dano de grupos de peixes pré-expostos ao antraceno e submetidos a um período cumulativo de 10 horas (5hs/dia) de exposição à luz de lâmpadas fluorescentes.....	55
Figura 4. Média do índice de dano de grupos de peixes pré-expostos ao antraceno e submetidos a um período cumulativo de 20 horas (5hs/dia) de exposição à luz de lâmpadas fluorescentes.....	55
Figura 5. Média do índice de dano de grupos de peixes pré-expostos ao antraceno e submetidos a um período cumulativo de 30 horas (5hs/dia) de exposição à luz de lâmpadas fluorescentes.....	56
Figura 6. Média do índice de dano dos grupos de peixes mantidos em água limpa e expostos à luz de lâmpadas fluorescentes por períodos cumulativos de 10, 20 e 30hs (5hs/dia).....	56
Figura 7. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos à solução de etanol 0,01% e expostos à luz de lâmpadas fluorescentes por períodos cumulativos de 10, 20 e 30hs (5hs/dia).....	57
Figura 8. Média do índice de dano dos grupos de peixes mantidos em água limpa e na ausência de luz por 48, 96 e 144hs.	57
Figura 9. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos a 8µg/L e submetidos à luz de lâmpadas fluorescentes por períodos cumulativos de 10, 20 e 30hs (5hs/dia).....	58
Figura 10. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos a 16µg/L e submetidos à luz de lâmpadas fluorescentes por períodos cumulativos de 10, 20 e 30hs (5hs/dia).....	58
Figura 11. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos a 32µg/L e submetidos à luz de lâmpadas fluorescentes por períodos cumulativos de 10, 20 e 30hs (5hs/dia).....	59
Figura 12. Média do índice de dano dos grupos de peixes submetidos a um período de 2 horas de exposição à RUVB.	59

Figura 13. Média do índice de dano dos grupos de peixes submetidos a um período de 4 horas (2 horas/dia) de exposição à RUVB.	60
Figura 14. Média do índice de dano dos grupos de peixes submetidos a um período de 5 horas de exposição à RUVB.	60
Figura 15. Média do índice de dano dos grupos de peixes mantidos em água limpa e submetidos à RUVB por períodos de 2, 4hs* (2hs/dia) e 5hs.....	61
Figura 16. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos em solução de etanol 0,01% e submetidos à RUVB por períodos de 2, 4hs* (2hs/dia) e 5hs.....	61
Figura 17. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos a 8µg/L e submetidos à RUVB por períodos de 2, 4hs* (2hs/dia) e 5hs.	62
Figura 18. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos a 16µg/L e submetidos à RUVB por períodos de 2, 4hs* (2hs/dia) e 5hs.	62
Figura 19. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos a 32µg/L e submetidos à RUVB por períodos de 2, 4hs* (2hs/dia) e 5hs.	63
Figura 20. Mortalidade cumulativa dos peixes pré-expostos à água limpa e expostos à RUVB por 5hs/dia, durante dois dias.	64
Figura 21. Mortalidade cumulativa dos peixes pré-expostos às soluções de antraceno de 8 e 16µg/L, e expostos à RUVB por 3hs/dia durante dois dias em água limpa.....	65
Figura 22. Média e Desvio Padrão do ID de cinco peixes cada, pré-expostos a 8 e 16µg/L e expostos à RUVB por 3hs.	65
Figura 23. Mortalidade cumulativa dos peixes pré-expostos a 8, 16 e 32 µg/L, e submetidos à RUVB por 2hs/dia, durante dois dias.	66
Figura 24. Média e Desvio ID de cinco peixes cada, pré-expostos em água limpa e solução de etanol, e submetidos à RUVB por um período de 4hs (2horas/dia).	66
Figura 25. Mortalidade cumulativa dos peixes pré-expostos em água limpa, solução de etanol 0,01%, soluções de antraceno (8, 16 e 32µg/L), e submetidos à RUVB por 2hs/dia, durante três dias.	67
Figura 26. <i>Trachinotus carolinus</i> apresentando alterações no padrão de coloração das regiões indicadas (setas).	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Intensidade da radiação ultravioleta ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) obtida variando a altura das lâmpadas em relação à superfície da água e/ou o número de lâmpadas instaladas.	68
Tabela 2. Mortalidade de peixes mantidos em água limpa e solução de etanol 0,01%, e posteriormente expostos a diferentes intensidades de RUVB durante 10, 20 e 30 horas (5hs/dia).....	68
Tabela 3. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 3.	69
Tabela 4 Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 4.	69
Tabela 5. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 5.	69
Tabela 6. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 6.	70
Tabela 7. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 7.	70
Tabela 8. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 8.	70
Tabela 9. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 9.	71
Tabela 10. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 10.....	71
Tabela 11. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 11.....	71
Tabela 12. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 12.....	72
Tabela 13. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 14.....	72
Tabela 14. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 17.....	72

Tabela 15. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 18.....	73
Tabela 16. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 19.....	73

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer

primeiramente, ao meu orientador, o Prof. Dr. Phan Van Ngan pela orientação, pelos ensinamentos, oportunidades, conversas, convivência, ajuda e amizade.

ao Instituto Oceanográfico pelo auxílio e facilidades desde o meu ingresso no instituto até os dias de hoje

ao CNPq, à CAPES e à FAPESP pelas bolsas de estudo concedidas.

aos membros do laboratório de Ecofisiologia de Animais Marinhos pela participação de cada um na minha formação pessoal e acadêmica, pela convivência, confiança, conversas e momentos descontraídos, pelos trabalhos de campo e no laboratório, desde a época de estágio até hoje..... obrigado Prof. Phan, Prof. Vicente, Zezé, Athur, Thaís, Keyi, Débora, Natali, Hermínio, Fabio M, Lucas, Thaís Ribas, Maysa, Priscila , Alex, Carol e Carol, Augusto, Bárbara e gostaria de agradecer, novamente, à Zezé pela grande ajuda e esforço no trabalho de campo...

à minha família por ser a minha família.....

aos professores, funcionários e alunos do IO pela convivência, ajuda e amizade ... são tantos que fica difícil citar

aos funcionários da Base de Ubatuba que me auxiliaram durante o trabalho de campo, pelas conversas, risadas e apoio..... Jonathan, Marcos, Fernando, Dona Cida, Beth, Vânia, Oziel, Daico, Manuel, Orlando, Lincoln, Robeto, Messiana, Zé Roberto, Celso, João, Denis, Letícia, Manfrim

aos amigos

Juliano, Pisseta, Betinho Luis, Luciano, Cintia Maria, Rogério, Gabriel Ra, Lu, Natalia, Cau, Caia, Sandrinha, Maurício, Bica, Fausto, Pula, Betina, Vinícius, Dea, Paulinha, Carol, Maisa, Cintia, Brow, Cássia, Thomas, Maysa, Zé Carlos, Jurandir, ZéDu, Kenji, Josie, Michel, Frango, Gabriel, Ana Cecília, Karen, André, João, Marcelo, Ricardo, Marta, Fabio, Felipe, Cintia, Helliane, Hélio, Nadine, Renata, Jhony, Jasão, Marujo, Pedro, Neco, Farelo, Dori, Calango, Maria, Tom, Manapi, Fanny, André, Evaldo, Éder, Sérgio, Márcio e especialmente o Rodrigo pela convivência durante o trabalho de campo

..... pela convivência no IO e fora dele, amizade e descontração

à Luciana Xavier pelo carinho, compreensão, companheirismo, pelas conversas, paciência, amizade e por ser e estar presente na minha vida e que permaneça assim por um bom tempo

ao amigos Chicão, Iberê, às Lu, Jean, Rafael, Carol e Titã, à querida XXXVII pela amizade duradoura, ensinamentos, aprendizagens e pelas lembranças.

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são tóxicos e/ou genotóxicos para diversos organismos marinhos e a toxicidade de muitos deles aumenta consideravelmente quando expostos à radiação ultravioleta artificial ou natural. O presente estudo visou avaliar a fototoxicidade do antraceno sobre a mortalidade e o dano ao DNA, segundo o ensaio cometa, de juvenis de pampas da espécie *Trachinotus carolinus*. Os peixes foram previamente expostos ao antraceno por 24 horas no escuro nas concentrações de 8, 16 e 32 µg/L. e então transferidos para a água limpa e expostos à luz de lâmpadas fluorescentes ou à radiação ultravioleta B artificial (RUVB-35 µW/cm²). Grupos controle (água e solvente) foram submetidos às mesmas condições experimentais. As exposições na ausência da radiação ultravioleta foram realizadas por períodos cumulativos de 10, 20 e 30h (5h/dia). Para as exposições à RUVB foram utilizados períodos desde 2 até 10h. Na ausência de radiação ultravioleta o antraceno não revelou ser tóxico, mas sua genotoxicidade, medida como danos ao DNA, apresenta resposta dose-dependente. A RUVB é letal para pampas. A exposição ao antraceno seguida de 2h de incidência de RUVB acelera a morte dos peixes em relação à mortalidade dos animais não contaminados. Este resultado revelou a fototoxicidade do antraceno para a espécie. O ensaio cometa pode ser considerado uma ferramenta sensível e útil para avaliar o efeito genotóxico de HPAs em peixes marinhos costeiros.

Palavras chave: antraceno, ensaio cometa, genotoxicidade, radiação ultravioleta B, fototoxicidade, *Trachinotus carolinus*.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons are toxic and/or genotoxic to a variety of marine organisms and under solar or artificial ultraviolet radiation acute toxicity of many of them can be substantially enhanced. The aim of the present study was to examine the effect of the phototoxicity of anthracene on the mortality and damage to the DNA, assessed by the comet assay, of juveniles of Florida pompanos, *Trachinotus carolinus*. The fish were pre-contaminated in the dark by three concentrations of 8, 16 and 32 µg/L of anthracene for 24 hours then transferred to clean seawater to be exposed to fluorescent light or to artificial ultraviolet B radiation (UVB - 35µW/cm²). Control groups (water and ethanol) were carried out in the same experimental conditions. The exposures to fluorescent light were carried out in cumulative periods of 10, 20 and 30 hours (5h/day). The exposures to UVB were conducted during periods of 2 to 10 hours. In the absence of ultraviolet radiation, the anthracene did not prove to be toxic, but its genotoxicity, evaluated as damage caused to the DNA, proved to be dose dependent. The UVB is lethal to Florida pompanos. The exposure of fish to the anthracene following UVB exposure for 2 hours resulted in earlier and higher mortality when compared to uncontaminated fish. These results indicated that anthracene is phototoxic to the pompanos. The comet assay can be considered a sensitive tool to evaluate the genotoxic effect of PAHs in coastal marine fish.

Key words: anthracene, comet assay, genotoxicity, ultraviolet B radiation, phototoxicity, *Trachinotus carolinus*

I. INTRODUÇÃO

Organismos que habitam águas costeiras são frequentemente expostos a contaminantes antropogênicos (PELLETIER et al., 2006). A costa brasileira por sua vez, é alvo do lançamento de elevadas cargas de esgoto sem tratamento, como também do aporte de poluentes orgânicos originados de diversas fontes, cujos efeitos são significativos devido a sua alta toxicidade para os organismos (WEBER, 2003). No município de Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo, por exemplo, durante os períodos de chuva e de verão a poluição por compostos orgânicos sofre um aumento de até cinco vezes em relação a outros períodos (MUNIZ et al., 2006).

Dentre os poluentes orgânicos, merecem destaque os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), pois são contaminantes amplamente distribuídos no ambiente, derivados de fontes naturais e antropogênicas (BOWLING et al., 1983). A maioria dos HPAs entra no ambiente pela liberação no ar de produtos originados por vulcões, incêndio florestal, queima de madeira e de combustíveis derivados do petróleo. A entrada de HPAs no ambiente aquático pode ocorrer por meio do despejo de efluentes industriais, águas residuais de estações de tratamento e pelo vazamento de resíduos tóxicos (MCELROY et al., 1993; ATSDR, 1995; MEDEIROS; BÍCEGO, 2004). Devido à natureza hidrofóbica de muitos destes poluentes, eles frequentemente concentram-se nos sedimentos das áreas costeiras próximas das fontes de poluição (BEDDING et al., 1983; KIENE; CAPONE, 1984; MEDEIROS et al., 2005) e nos organismos que vivem na coluna de água e/ou no fundo do mar.

Grande parte da toxicidade do petróleo e de seus derivados é atribuída à sua fração solúvel (ALMEIDA; DUNCAN, 2002), que contém compostos polares e de baixo peso molecular, como por exemplo os hidrocarbonetos monocromáticos (benzenos, toluenos e xilenos) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PACHECO; SANTOS, 2002) (naftaleno e antraceno). Tais compostos são altamente tóxicos, cancerígenos e mutagênicos e, embora muito voláteis, os HPAs são os que melhor se dissolvem na água do mar (LEE; PAGE, 1997) e se tornam mais prontamente disponíveis para a absorção por organismos marinhos.

A biotransformação dos HPAs por peixes resulta em compostos intermediários potencialmente genotóxicos (VANZELLA et al., 2007), ou seja, capazes de causar alterações na estrutura ou no conteúdo dos cromossomos (clastogenicidade), na seqüência de pares de base no DNA (mutagenicidade) (AL-SABTI; METCALFE, 1995), como também quebra de fitas da molécula (ULUPINAR; OKUMUS, 2002; LEE; STEINNERT, 2003). Em peixes, a toxicidade provocada por HPAs se manifesta em diferentes níveis de organização celular, incluindo disfunções fisiológicas, alterações estruturais em órgãos e tecidos e modificações comportamentais que levam ao prejuízo do crescimento e da reprodução (ADAMS et al., 1990). Além disso, há a possibilidade dos organismos acumularem os HPAs, tornando-os disponíveis na cadeia trófica (LAW; BISCAYA, 1994).

As observações sobre a tendência global de redução do ozônio atmosférico e o fenômeno do buraco de ozônio na região antártica (FARMAN et al., 1985; SOLOMON et al., 1986) preocupam a comunidade científica quanto à possibilidade de haver um aumento de radiação ultravioleta solar na superfície

terrestre. No Brasil, além do nível elevado inerente de radiação ultravioleta da zona tropical, já se detectou uma redução inesperada do ozônio estratosférico durante o período em que o buraco de ozônio normalmente apresenta seu maior tamanho (KIRCHHOFF et al., 1996). Os efeitos deletérios da radiação ultravioleta (RUV) incluem a deterioração de moléculas biológicas de relevo tais como proteínas, lipídios e cromóforos. Também podem ser afetadas estruturas como membranas, as funções celulares vitais, (fotossíntese, divisão celular), o desenvolvimento, crescimento e processos bioquímicos essenciais, como por exemplo, fixação de nitrogênio e produção de energia (CULLEN et al., 1992; BORNMAN; TERAMURA, 1993; KLAPER et al., 1996; SINHA et al., 2002).

Um dos principais alvos da radiação solar ultravioleta é o DNA (BUMA et al., 2001, PAKKER et al., 2000). Tanto a radiação UV-A quanto a radiação UV-B são deletérias ao DNA (LEHMANN et al., 1998), sendo esta última a mais danosa aos organismos. A exposição das moléculas de DNA a essas radiações pode levar à formação de lesões singulares ou múltiplas, tais como danos nas bases ou açúcares, sítios álcali-lábeis, quebras de fita única (SSBs) e quebras de fitas duplas (DSBs), sendo esta última considerada a lesão mais deletéria para as células *in vivo* ou *in vitro* (KARANJAWALA et al., 2002). Entre todas as lesões causadas por radiação UV, as quebras do DNA são consideradas as mais perigosas já que desintegram sua estrutura linear (ILNYTSKYY et al., 2005). O DNA danificado e não reparado pode acarretar em defeitos na transcrição e replicação da molécula, resultando em uma série de transtornos, incluindo a morte celular, câncer e mudanças hereditárias via mutagênese (KORNHAUSER et al., 1991). Um dos diferentes efeitos da radiação UV-B em quatro espécies de peixes estudados por Kaweewat e Hofer (1997) foi a

redução no número de células secretoras de muco. Já Willett et al. (2001), em seu trabalho com cultura de células de fígado de peixes expostas à RUV-B, constataram uma relação dose-resposta crescente em relação aos danos ao DNA.

Determinados HPAs quando expostos à radiação ultravioleta apresentam uma toxicidade significativa para os organismos, além de causar diversos tipos de danos ao material genético (TOYOOKA; IBUKI, 2007). A incidência da radiação UV sobre os HPAs pode gerar moléculas em estado excitado, que através da perda da energia absorvida podem apresentar maior toxicidade do que a molécula que as originou (ANKLEY et al., 1997; BETOWSKI et al., 2002). O aumento desta toxicidade dos HPAs está relacionado com a produção de radicais livres, oxigênio livre em estado excitado e ânions superóxidos (FOOTE, 1991). De acordo com Pelletier et al. (2006), experimentos recentes têm focado no efeito tóxico de alguns HPAs quando expostos à radiação UV, indicando uma ação aditiva ou sinérgica entre estes dois fatores. Tal efeito já foi estudado em organismos aquáticos como: fitoplâncton (SOUTHERLAND; LEWITUS, 2004), anfípodes (HATCH; BURTON Jr., 1999), crustáceos (LEE; HOOK, 2004), moluscos (LYONS et al., 2002), equinodermos (STEEVENS et al., 1999) e peixes (HÄKKINEN et al., 2004).

O HPA antraceno (ANT), molécula linear de três anéis benzênicos, quando fotomodificado pela radiação ultravioleta resulta na formação de uma mistura complexa de mais de 20 produtos, incluindo as antraquinonas, hidroxiantraquinona, ácidos benzóicos e fenóis (MALLAKIN et al., 2000). Trabalhos realizados com peixes (larvas, juvenis, adultos e cultura de células) contaminados com antraceno, e submetidos à radiação ultravioleta

demonstraram que este composto pode ser citotóxico (SCHIMER et al., 1998; CHOI; ORIS, 2003), muito fototóxico (BOWLING et al., 1983; ORIS; GIESY JR., 1987), capaz de quebrar proteínas e o DNA (TOSHIMA et al., 2004; HASEGAWA et al., 2006), como também provocar alterações na estrutura celular (ORIS; GIESY JR., 1985). O antraceno pode ser encontrado no nível de $\mu\text{g/L}$ em muitos sistemas aquáticos. Na ausência de RUV natural ou artificial o antraceno aparentemente não possui toxicidade (NEFF, 1979; BOWLING et al., 1983; PEACHEY; CROSBY, 1996). Na sua dissolubilidade, ($35\mu\text{g/L}$, NEFF, 1979) o antraceno é fototóxico a grande variedade de organismos aquáticos, incluindo plantas (ARFSTEN et al., 1996), insetos (ORIS et al., 1985), crustáceos (ALLRED; GIESY, 1985), peixes (BOWLING et al., 1983, ORIS; GIESY JR., 1985) e anfíbios (KANGAN et al., 1985). O antraceno é uma das substâncias modelo mais utilizadas nos estudos de fototoxicidade de HPAs.

Dentre as técnicas genotóxicas atuais, a eletroforese em gel de uma única célula (SCGE), também conhecida como Ensaio Cometa, é um método amplamente utilizado para estudar os danos ao DNA causados por agentes químicos e físicos no laboratório e no ambiente. O método detecta as quebras de fita simples e duplas, sítios sensíveis a álcalis e sítios com reparação tardia no DNA (TICE, 1995). Os fragmentos de DNA migram, de acordo com seu tamanho, a partir do núcleo em direção ao ânodo, após a revelação com corante de DNA deixando as células com a aparência de um cometa. O ensaio cometa apresenta vantagens como sensibilidade, simplicidade, confiabilidade e rapidez, além do baixo custo e de requerer pouco material para sua execução (LEE; STEINERT, 2003; ANDRADE et al., 2004a; 2004b).

Os peixes desempenham importante papel no fluxo de energia dos ecossistemas costeiros (Du Preez *et al.*, 1990), são um recurso na alimentação humana de alto valor protéico e podem ser considerados como bons indicadores da qualidade do meio ambiente. Esses animais são os principais predadores das zonas de arrebentação, alimentando-se tanto de zooplâncton como de animais bentônicos das regiões entre-marés e sublitorâneas (Carter, 1988; Brown & McLachlan, 1990), o que condiciona a distribuição de energia nesses sistemas e a manutenção do equilíbrio ecológico. O pampo foi escolhido para o presente trabalho por ser uma espécie que pode tolerar diversas condições ambientais (Jory *et al.*, 1985), é fácil para coletar e de fácil manutenção em cativeiro (Santos *et al.*, 2006). Além disso, é um peixe de grande valor comercial e esportivo e está sendo utilizado como organismo sentinela de genotoxicidade de HPA e outros poluentes em nosso laboratório. Os juvenis desta espécie são encontrados em grande abundância durante os meses de verão (Bellinger & Avault, 1971) nas zonas de arrebentação onde podem ser contaminados com antraceno, um HPA comum nesta região, e expostos a radiação ultravioleta tornando necessário um estudo sobre a fototoxicidade de antraceno nesta espécies.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo geral:

- Avaliar a fototoxicidade do antraceno sobre a mortalidade e o dano ao DNA de juvenis de pampas, *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766).

II.2. Objetivos específicos

- Avaliar o dano ao DNA de juvenis de pampo pré-expostos a soluções de antraceno em diferentes concentrações, por 24 horas no escuro, e posteriormente submetidos a diferentes períodos de exposição à luz sem radiação ultravioleta utilizando lâmpadas fluorescentes brancas e à radiação ultravioleta artificial com o uso de lâmpadas de ultravioleta B artificiais.
- Avaliar a taxa de mortalidade de juvenis de pampo pré-expostos a soluções de antraceno em diferentes concentrações, por 24 horas no escuro, e posteriormente submetidos a diferentes períodos de exposição à luz sem radiação ultravioleta utilizando lâmpadas fluorescentes brancas e à radiação ultravioleta artificial com o uso de lâmpadas de ultravioleta B artificiais.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Espécie estudada

Os indivíduos utilizados neste estudo foram os da espécie *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766), popularmente conhecidos como pampo-verdadeiro, pampo ou palometa no Brasil. Esta espécie é característica de regiões subtropicais, sendo encontrado desde o Atlântico Oeste a partir de Massachusetts nos Estados Unidos, até as costas das Américas Central e do Sul (HOESE; MOORE, 1977; MENEZES; FIGUEIREDO, 1980). Esta espécie foi selecionada por ser um habitante abundante, na fase juvenil, da zona de arrebentação da região da Enseada do Flamengo em Ubatuba (MACIEL, 1995; FELIX et al., 2007) e por possuir grande importância ecológica, econômica e esportiva. *T. carolinus* são encontrados em águas rasas de praias arenosas, com ação das ondas e processos de mistura intensos (MACIEL, 1995). Têm um comportamento extremamente ativo, nadando em altas velocidades. São peixes de fácil manuseio e aceitam prontamente alimentos formulados se caracterizando, portanto, como uma espécie ideal para manutenção em cativeiro (JORY et al., 1985).

III.2. Coleta dos animais

As coletas foram realizadas nas praias do Lázaro e Enseada em Ubatuba, sendo que foram escolhidas por se localizarem próximas às instalações da base norte de pesquisa do IOUSP e pela abundância de pampos em suas zonas de arrebentação. A proximidade permitia um rápido transporte dos organismos, minimizando o estresse. A coleta foi realizada com arrastos paralelos à linha de costa em profundidade inferior a 1,0 m. Foi utilizada uma rede do tipo picaré com malhagem de 15 mm nas bordas e 10 mm no centro, medida nó a nó, a fim de se obter juvenis da espécie. Imediatamente após a captura, os peixes eram selecionados através de uma triagem visual para separar os indivíduos da espécie *T. carolinus* e os demais organismos foram devolvidos rapidamente ao seu habitat. Os pampos coletados foram colocados em tanques de cinquenta litros com água da mesma área de coleta dos organismos, aerada através de aeradores a pilha portáteis, e transportados até a base de pesquisa “Clarimundo de Jesus” do IOUSP, em Ubatuba.

III.3. Manutenção dos animais

Na base do IOUSP, os animais coletados foram identificados para confirmação da espécie (MENEZES; FIGUEIREDO, 1980), e transferidos para tanques de 500 litros, localizados dentro de galpões vinícolas com sistema de aeração constante. A higienização e renovação de água foram realizadas

diariamente, assim como o controle da temperatura, do pH e da salinidade. A água do mar utilizada para a manutenção foi filtrada em filtros de um micrômetro (1 μm). Para redução do estresse de captura e aclimação às condições de cativeiro, os indivíduos permaneceram nos galpões por no mínimo cinco dias antes do início dos experimentos. Durante este período, os animais foram alimentados com ração comercial de camarão, de composição 45% protéica, conforme as necessidades do gênero (LAZO et al., 1998; HEILMAN; SPIELER, 1999).

III.4. Experimentos

Nos experimentos realizados, os juvenis de *T. carolinus* foram pré-expostos, em soluções de diferentes concentrações de antraceno, por 24 horas no escuro e posteriormente transferidos para a água limpa e submetidos à luz de lâmpada fluorescente ($\text{RUV} < 0,01 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) ou à radiação ultravioleta B (RUVB) com diferentes durações cumulativas de exposição.

III.4.1. *Pré-exposição ao poluente*

Os indivíduos mais saudáveis, apresentando coloração normal e nadadeiras intactas foram transferidos para o interior do laboratório com temperatura controlada, para aclimação às condições experimentais dois dias antes do início das exposições ao poluente. A temperatura ambiente foi

mantida a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidade 35 e aeração constante durante todo o procedimento experimental. Estes valores foram escolhidos por estarem dentro do intervalo no qual a espécie é encontrada (SCORVO FILHO et al., 1987).

A pré-exposição dos peixes foi feita em aquários de vidro de 40 litros, de maneira a proporcionar um ambiente com no mínimo dois litros de água por grama de peixe. Grupos de dez indivíduos foram expostos a três concentrações de antraceno ($8\mu\text{g/L}$, $16\mu\text{g/L}$ e $32\mu\text{g/L}$) durante 24 horas no escuro (na ausência de radiação), levando-se em consideração as concentrações encontradas na literatura (BOWLING et al., 1983; ORIS; GISEY JR., 1985; 1987). A solução mãe de antraceno (peso molecular 178,22; Sigma) de concentração 0.32g/L foi preparada imediatamente antes do uso, empregando-se etanol (PA) como solvente e diluída na proporção de 1:1 e 1:3 com solvente para obter as soluções de 0.16 e 0.8g/L , respectivamente. Alíquotas de $100\ \mu\text{L}$ de cada uma destas soluções foram diluídas em um litro de água do mar para preparar as soluções de trabalho de 32, 16 e $8\mu\text{g/L}$.

O volume de etanol foi mantido igual em todas as soluções no nível de 0.01%. Para evitar qualquer incidência de radiação ultravioleta durante a pré-exposição ao poluente, as janelas do laboratório e os aquários foram cobertos com lona plástica preta. As soluções foram trocadas após 12 horas do início da pré-exposição.

Três grupos controle, água, solvente e escuro, foram utilizados. Os controles água foram mantidos em água limpa, os solventes permaneceram em água com 0,01 % de etanol, utilizado como solvente, por 24 horas no escuro. Os controles escuro permaneceram na ausência total de luz por 48, 96 e 114 horas, períodos de tempo relativos às exposições com duração cumulativa de

10, 20 e 30 horas (5hs/dia), respectivamente. Após esta pré-exposição, os peixes foram transferidos para a água limpa e expostos à luz de lâmpada fluorescente branca ou à RUVB conforme descrito a seguir.

III. 4.2. *Exposição à luz de lâmpada fluorescente branca ou RUVB em água limpa*

As exposições dos peixes à luz de lâmpadas fluorescentes brancas ou RUVB, em água limpa, assim como a manutenção dos organismos, foram realizadas em um sistema (Fig. 1) composto por: uma armação com um tampo superior onde são instalados os reatores e as lâmpadas fluorescentes ou ultravioletas conforme a necessidade, possibilitando a instalação de até 12 lâmpadas; barras com rosca sem fim que permitem ajustar a altura das lâmpadas em relação à superfície da água; sistema de troca de água das caixas utilizadas para manutenção dos peixes no sistema.

Foram utilizadas lâmpadas GE modelo F20T12/SLD para exposição à luz de lâmpadas fluorescentes ($RUV < 0,01 \mu/cm^2$). Para as exposições dos peixes à RUVB foram utilizadas lâmpadas Philips modelo TL 20W/12 RS com faixa de espectro de radiação ultravioleta de 280 a 400nm, cujo intervalo abrange o comprimento de onda da radiação ultravioleta A e B. A intensidade da radiação ultravioleta incidente na superfície da água dos dois modelos de lâmpadas foi medida utilizando um medidor de luz ultravioleta certificado (Instrutherm – modelo MRU-201). Os dados técnicos das lâmpadas de RUVB indicam o pico de emissão da radiação ultravioleta no comprimento de onda de

320 nm. A intensidade média da RUVB utilizada nestes experimentos foi de 35 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$.

Para ajustar a intensidade da radiação ultravioleta a ser utilizada foram feitas medições variando a altura das lâmpadas em relação à superfície da água e/ou o número de lâmpadas instaladas (Tabela 1). Foram então realizados testes para avaliar a mortalidade dos peixes durante as exposições. Nestes testes grupos de 10 peixes permaneceram em água limpa e em solução de etanol 0,01% por 24 horas no escuro, em seguida foram transferidos para água limpa e submetidos às intensidades de radiação ultravioleta obtidas. Nos testes montados para cada tratamento foi previsto o uso de exposições com duração cumulativa de 10, 20 e 30 horas (5horas/dia) (Tabela 2).

Durante os períodos de não exposição à luz de lâmpada fluorescente branca ou à RUVB, a luz do laboratório permaneceu desligada e o sistema coberto por uma lona plástica azul. As manipulações feitas no sistema após o desligamento das lâmpadas foram realizadas com o auxílio de lanternas envoltas por filtro para barrar possíveis emissões de radiação ultravioleta.

A água das caixas de manutenção, com 40 litros cada, era completamente renovada a cada 24 horas utilizando um sistema de fluxo contínuo e a aeração da água foi mantida constante durante todo o período de permanência dos peixes no sistema.

III.4.3. *Duração das exposições à luz de lâmpadas fluorescentes brancas ou à radiação ultravioleta B*

III.4.3.1. Períodos utilizados para exposições à luz de lâmpadas fluorescentes

Após a pré-exposição às três concentrações de antraceno os peixes foram transferidos para as caixas de manutenção. Os dois grupos controles (água e etanol) também foram submetidos às mesmas condições de pré-exposição e exposição à luz de lâmpada fluorescente branca e à RUVB. Ambas as exposições foram realizadas com duração cumulativa de 10, 20 e 30 horas, em períodos de 5 horas por dia.

III.4.3.2. Períodos utilizados para exposições à radiação ultravioleta B

Para este trabalho estavam previstas exposições à RUVB com duração cumulativa de 10, 20 e 30 horas, submetendo os grupos de peixes aos mesmos tratamentos utilizados na exposição à luz de lâmpada fluorescente branca. No entanto, foi necessário alterar a duração das exposições devido à alta taxa de mortalidade dos peixes encontrada nos grupo controle água e etanol.

Testes com diferentes intensidades de radiação foram utilizados para estabelecer em qual intensidade a mortalidade era menor ou inexistente. Foram realizadas exposições de pampas mantidos em água limpa (grupo

controle água) e água com etanol (grupo controle solvente 0,01%) por 24 horas no escuro a diferentes intensidades de RUVB (241 a 24 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) em água limpa.

Devido a mortalidade de 100% dos organismos após duas exposições consecutivas de cinco horas cada, novos testes foram executados para estabelecer um período adequado de exposição utilizando uma das menores intensidades (35 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) obtidas nos testes anteriores

Com o intuito de atingir o período adequado da exposição, foi realizado um teste com exposição de grupos de peixes submetidos aos cinco tratamentos (controle água e solvente; 8, 16 e 32 $\mu\text{g}/\text{L}$) com duração não cumulativa de cinco horas. Em outro teste a duração cumulativa da exposição foi de 3, 6 e 9 horas, em períodos de 3 horas por dia, feita com grupos expostos a concentrações de 8 e 16 $\mu\text{g}/\text{L}$ de solução de antraceno. E por último, foi realizada uma terceira exposição com duração cumulativa de 2, 4 e 6 horas, em períodos de duas horas por dia, envolvendo juvenis de pampo submetidos aos cinco tratamentos (controle água e solvente; 8, 16 e 32 $\mu\text{g}/\text{L}$).

A execução do ensaio cometa envolve a amostragem de cinco peixes vivos após 24 horas contadas a partir da hora em que as lâmpadas foram ligadas. Mesmo reduzindo-se a duração das exposições não foi possível retirar as amostras de peixes quando realizados dois períodos consecutivos de exposição à RUVB. Para tanto, foi realizado um experimento com duração cumulativa de 4 horas (2 horas/dia) em que a retirada de amostras dos peixes foi feita imediatamente após o término do segundo período de exposição.

III.4.4. *Coleta de dados sobre mortalidade e de amostras de peixes para realizar o ensaio cometa*

Para avaliar a mortalidade causada pela exposição à luz de lâmpada fluorescente ou à RUVB foram utilizados dez peixes para cada tratamento. As amostras para realizar o ensaio cometa foram retiradas dos grupos expostos em que houve sobrevivência de pelo menos cinco peixes. A mortalidade foi monitorada em intervalos de três a cinco horas a partir do momento em que as lâmpadas foram desligadas, sendo que estes intervalos foram ajustados de acordo com os períodos de exposição. Eram considerados mortos os peixes que não apresentavam movimento natatório, como também batimento opercular. Os animais mortos eram retirados para obtenção dos dados biométricos de peso (g) e comprimentos total e padrão (mm). A retirada das amostras de peixes para o ensaio cometa era feita após 24 horas contadas a partir do horário em que se iniciou a exposição, de cada período, no sistema. No experimento com somente quatro horas cumulativas de exposição, as amostras foram retiradas após o desligamento das lâmpadas. Os peixes com movimentos natatórios sem alteração e com coloração normal eram retirados do sistema e levados ao laboratório em baldes cobertos por lona plástica preta para a coleta de sangue.

III.5. Coleta de sangue

O sangue dos animais vivos foi imediatamente coletado por punção cardíaca ou através do ducto de Cuvier, vaso formado pela fusão das veias cardinais anteriores e posteriores, que por sua vez desemboca no seio venoso. Foram utilizadas agulhas e seringas de insulina de 0,5 mL de volume. Dez microlitros de sangue foram diluídos em tampão fosfato conforme descrito na metodologia a seguir para realização do ensaio cometa. Em seguida os peixes foram espinhalados com conseqüente ruptura do sistema nervoso central e submetidos à biometria, através das medidas de peso total (g), comprimento padrão e comprimento total (mm).

III.6. Ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado conforme descrito por Singh e colaboradores (1988). Foi utilizado um protocolo baseado nos de Tice e colaboradores (2000), com as modificações recomendadas por Gontijo e Tice (2003). Anteriormente ao estudo dos organismos expostos aos poluentes, foi realizada uma adequação da metodologia para a suspensão celular da espécie utilizada.

III.6.1. *Preparação das lâminas para o ensaio cometa*

Dez microlitros de sangue de cada peixe foram diluídos em tampão fosfato salino (PBS, pH 7.4) na proporção de 1:1000, obtendo-se a suspensão celular eritrocitária de cada indivíduo. Durante os procedimentos de manipulação do material celular, a iluminação natural e de lâmpadas fluorescentes foram evitadas para que não houvesse incidência de radiação de ondas de comprimento ultravioleta, reconhecidamente genotóxica, sobre o material coletado. A temperatura do laboratório foi mantida em 18 a 20°C. Toda a suspensão celular foi mantida resfriada a aproximadamente 4°C em geladeira, ou sobre gelo durante a manipulação do material. Lâminas de vidro lisas de extremidade fosca foram deixadas por no mínimo duas horas em solução de extran 10% e devidamente limpas com esponja macia, lavadas com água de torneira e água destilada em abundância. Foram então imersas em álcool etílico por alguns minutos e secas com lenços de papel. Solução de 1,5% de agarose de ponto de fusão normal (Sigma) em PBS mantida em 60°C foi utilizada para preparar a primeira camada de gel nas lâminas. A primeira camada é necessária, pois atua como base para melhor adesão da segunda camada nas lâminas, que contém o material celular.

Para fazer a primeira camada, cada lâmina foi mantida sobre chapa metálica com moderado aquecimento. Alíquotas de 200 µL de agarose foram colocadas sobre cada lâmina e espalhadas ao longo desta com auxílio de outra lâmina de vidro lapidada, formando uma fina camada, como um esfregaço. As lâminas foram deixadas secando sobre superfície plana e horizontal, em temperatura ambiente por pelo menos 12 horas. Para a composição da solução

de segunda camada, 20 μL da suspensão de células sanguíneas foram adicionados em 120 μL de gel de 1% de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma) diluída em PBS. Esta suspensão permanece líquida até cerca de 36°C. Alíquotas de 120 μL , de células sanguíneas em gel, foram espalhadas sobre lâmina contendo a primeira camada através do seu recobrimento com lamínula de vidro de dimensões de 24x60 mm. Foram confeccionadas duas lâminas por peixe, sempre mantidas em baixa temperatura. Após a gelificação, cerca de 20 minutos a 4°C, a lamínula foi retirada para execução da etapa de *lise*.

III.6.2. *Lise*

Com o emprego de uma solução de alta concentração de sais e detergente, denominada solução de *lise*, as membranas das células, do núcleo e organelas são rompidas; os componentes citoplasmáticos e proteínas nucleares são dissolvidos e retirados. As lâminas foram dispostas em cubeta vertical e cobertas com solução de *lise* (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10; Triton X-100 e DMSO 10% adicionados logo antes do uso) na qual permaneceram imersas por duas horas, em temperatura de 4°C. Ao término, as lâminas foram retiradas da solução e deixadas escorrendo por um minuto em papel toalha para retirada do excesso de solução. Em seguida, lavadas com água destilada para completa remoção da solução de *lise* e dos componentes celulares indesejáveis para a realização do ensaio.

III.6.3. *Desenrolamento do DNA*

Após a *lise* as lâminas foram dispostas na cuba de eletroforese, imersas por 5 minutos em tampão de eletroforese (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13), a 4°C e recém-preparado para o desenrolamento, ou relaxamento, do DNA.

III.6.4. *Eletroforese*

A eletroforese foi realizada sob corrente elétrica em cuba de acrílico com 25 cm de distância entre os eletrodos no mesmo tampão de desenrolamento a 4°C. As condições de eletroforese foram as mesmas estabelecidas para esta espécie por Santos (2009), voltagem e amperagem de 0,80 V/cm e 230 mA, durante 20 minutos. A partir do núcleo, fragmentos de DNA migram no sentido do ânodo; quanto mais intensa for a quebra, menor será o tamanho dos fragmentos e maior a extensão da migração.

III.6.5. *Neutralização*

Ao término da eletroforese as lâminas foram cuidadosamente retiradas da cuba e dispostas em uma bandeja forrada com papel absorvente para que a solução de eletroforese escorresse por cerca de um minuto. A neutralização das lâminas foi feita em seguida com tampão neutro (Tris 0,4 M, pH 7.5), no

qual o material foi imerso por 15 minutos de forma a recobrir todo o gel da lâmina. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes durante 5 minutos cada. Ao final, as lâminas foram imersas em solução de etanol 100% a 4°C e deixadas para secar ao ar em temperatura ambiente por duas horas.

III.6.6. *Coloração por prata*

Para a coloração do material genético, foi utilizado o protocolo descrito por García e colaboradores (2004). As lâminas foram banhadas em solução de fixação (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5%, glicerol 5%) durante 10 minutos, lavadas por três vezes com água destilada a 4°C e colocadas para secar em temperatura ambiente pelo tempo mínimo de 10 horas. As lâminas foram hidratadas por imersão em cubeta com água destilada por 5 minutos a 37°C. A solução de trabalho de coloração, preparada imediatamente antes do uso, foi obtida misturando-se duas soluções estoque pré-aquecidas por cerca de 10 minutos em banho-maria a 37°C. A alíquota de 34 mL de solução de carbonato de sódio 5% foi vigorosamente agitada e misturada a 66 mL de solução de nitrato de prata (nitrato de amônio 0,1%, nitrato de prata 0,1%, ácido tungstosilícico 0,25%, formaldeído 0,15%). As lâminas foram imediatamente cobertas pela solução de coloração, e mantidas em banho-maria a 37°C, ao abrigo da luz, por cerca de 2 minutos. Em seguida, foram observadas em microscópio até se obter uma coloração adequada. Assim que coradas, as lâminas eram colocadas em água destilada a 4°C durante 1 minuto para retirar o excesso de solução de coloração. Para a

interrupção da coloração e obtenção de lâminas permanentes as mesmas foram colocadas em cubetas verticais com solução de ácido acético 1% por 5 minutos, lavadas por três vezes durante 1 minuto com água destilada a 4°C e deixadas para secar em temperatura ambiente por um período mínimo de 24 horas.

III.7. Análise de cometas

Para obter imagem dos cometas a serem analisados, foi utilizado um microscópio óptico com câmera digital acoplada. Foram fotografados com cometas em aumento de 20X em diferentes regiões das lâminas de forma a obter uma análise imparcial. Foram evitadas análises nas regiões próximas à margem das lâminas ou cometas junto a bolhas de ar, por serem regiões onde a migração dos fragmentos de DNA durante a eletroforese pode ocorrer de maneira irregular. Os cometas fotografados passaram então por análise visual.

Os cometas analisados visualmente foram examinados e classificados em cinco classes, de 0 a 4, em função de grau de danos no DNA. A classe de cada cometa foi anotada na planilha apresentada no Anexo B, para o cálculo do Índice de Danos (ID). Para classificar os cometas em classes de danos foi adotado o esquema estabelecido por Gomes e colaboradores (2010, no prelo) conforme consta na Figura 2. A classe 0 corresponde aos cometas considerados intactos, sem danos causados pela exposição; e a classe 4 corresponde aos cometas com danos máximos. O Índice de Danos (ID) foi calculado como a somatória dos produtos da multiplicação entre o número de

cometas (n) de cada classe e o dígito denominador da classe (0, 1, 2, 3 e 4), neste caso podendo variar de 0 a 400.

$ID = 0.(n \text{ Classe } 0) + 1.(n \text{ Classe } 1) + 2.(n \text{ Classe } 2) + 3.(n \text{ Classe } 3) + 4.(n \text{ Classe } 4).$

III.8. Análise estatística

Para as análises estatísticas foram utilizados testes ANOVA não paramétricos de Kruskal-Wallis para verificar se existe ou não diferença entre os grupos e testes de comparação múltipla de Newman-Keuls (ZAR, 1996) para identificar os grupos com diferenças. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV.1. Efeito da subsequente exposição à luz de lâmpadas fluorescentes brancas sobre o dano ao DNA de peixes pré-expostos às diferentes concentrações de antraceno

As médias dos índices de dano (IDs) dos cometas de peixes pré-expostos às concentrações de antraceno (8, 16 e 32 µg/L) e subsequente submetidos à luz de lâmpada fluorescente com diferentes durações cumulativas de exposição (10, 20 e 30 horas) estão nas Figuras 3, 4, e 5.

Na exposição com duração cumulativa de 10 horas os IDs nos grupos pré-expostos às concentrações de antraceno são significativamente mais altos que os IDs nos grupos controle (Tabela 3). A média do ID nos grupos expostos ao antraceno é aproximadamente 150 vezes maior que a média dos grupos controle (Fig. 3). No entanto, os IDs dos grupos pré-expostos às três concentrações de antraceno não são estatisticamente diferentes entre si, o que também ocorre entre os grupos controle água, escuro e solvente.

Na exposição com duração cumulativa de 20 horas os IDs nos grupos submetidos às concentrações de 16 e 32 µg/L são significativamente diferentes entre si, como também são significativamente mais altos em relação ao ID do grupo submetido a 8 µg/L e aos IDs dos grupos controle. Não há diferença significativa entre o ID dos controles como também entre os IDs dos controles e o ID do grupo exposto a 8 µg/L (Tabela 4). A média do ID no grupo 32 µg/L é

aproximadamente duas e quatro vezes maior que a média dos grupos expostos às soluções de antraceno de 16 e 8 µg/L, respectivamente (Fig. 4). Neste experimento os IDs indicam uma relação dose/resposta com as concentrações utilizadas (8, 16 e 32 µg/L).

Na exposição com duração cumulativa de 30 horas as médias dos IDs nos grupos submetidos às concentrações de 16 e 32 µg/L permaneceram estatisticamente diferentes dos demais tratamentos (Tabela 5). Entretanto, a média do ID no grupo exposto à concentração de 16 µg/L aumentou aproximadamente 60%, tornando-se semelhante à média do ID no grupo exposto a maior concentração (Fig. 5). A possível existência de uma relação dose/resposta entre IDs e as concentração de antraceno é constatada neste experimento.

Resultados da análise de variação do ID de cada grupo de tratamento em função da duração cumulativa da exposição à luz de lâmpadas fluorescentes estão nas tabelas de 6 a 11. Houve diferença significativa nos grupos: controle água, controle solvente, controle escuro, 8 e 16 µg/L.

Os grupos controle água (Fig. 6), controle solvente (Fig.7) e controle escuro (Fig.8) apresentaram uma variação ampla na média do ID a partir da exposição com duração cumulativa de 20 horas. Os valores do ID do controle água e controle solvente na exposição com duração cumulativa de 20 horas foram significativamente mais altos em relação aos seus respectivos IDs na exposição com duração de 10 horas. No entanto, nas 30 horas o ID do controle água volta ao nível estatisticamente não significativo em relação aos IDs de 10 e 20 horas (Tabela 6); o do controle solvente volta ao nível estatisticamente não significativo em relação ao de 10 horas (Tabela 7). No grupo controle

escuro, no entanto, as médias dos IDs aumentam em função da duração cumulativa e nas 30 horas atingiu um nível mais elevado em comparação ao de 10 horas. Este aumento foi significativo (Tabela 8), sugerindo uma relação entre o aumento no índice de dano e o aumento do período de permanência no escuro. As médias dos IDs neste caso foram 19, 33 e 106 para as exposições com duração de 10, 20 e 30 horas, respectivamente (Fig. 8).

Os IDs dos peixes expostos à concentração de 8 $\mu\text{g/L}$ apresentou uma redução significativa no decorrer dos experimentos (Tabela 9). A média do ID com duração cumulativa de 10hs foi mais alta do que as dos demais grupos, com valor de $\text{ID}=377$. A redução no valor da média do ID foi de aproximadamente 75 e 86% nas exposições com duração cumulativas de 20 e 30 horas, respectivamente (Fig. 9).

A exposição à concentração de 16 $\mu\text{g/L}$ no período cumulativo de 20 horas apresentou redução de 39% no valor da média do ID comparativamente com as exposições nos períodos de 10 e 30 horas (Fig. 10). Esta redução no ID foi significativa (Tabela 10). Nesta mesma concentração a exposição com duração de 30 horas cumulativas não apresentou diferença significativa no ID em relação à exposição cumulativa de 10 horas (Tabela 10).

Não houve diferença significativa entre os IDs nos peixes pré-contaminados em solução de antraceno na concentração de 32 $\mu\text{g/L}$ (Tabela 11). As médias do ID neste caso foram 391, 375 e 392 nas exposições cumulativas por 10, 20 e 30 horas, respectivamente (Fig. 11).

IV.2. Efeito da subsequente exposição à radiação ultravioleta B sobre o DNA de peixes pré-expostos às diferentes concentrações de antraceno

As Figuras 12, 13 e 14 mostram efeitos da subsequente exposição à RUVB durante um período de 2 horas (não cumulativo), 4 horas (cumulativo, 2 horas/dia) e 5 horas (não cumulativo) sobre o ID dos peixes pré-expostos às diferentes concentrações de antraceno e dos controles. Os resultados mostram uma tendência comum: sob efeitos da ultravioleta os IDs aumentam um pouco nos peixes pré-expostos à 8 µg/L, chegam a um pico nos peixes expostos à 16 µg/L e diminuem nos peixes expostos à 32 µg/L. A tendência é mais evidente nos peixes expostos à RUVB no período mais curto de 2 horas não cumulativo. Neste experimento o ID do grupo exposto à 16 µg/L foi significativamente mais alto de que os IDs dos outros grupos (Tabela 12). Na exposição à RUVB por um período de 2 horas a média do ID do grupo exposto à solução de antraceno de 16µg/L é maior em relação aos demais tratamentos (Fig. 12). Na exposição mais longa, por 5 horas, o ID do grupo exposto à solução de antraceno de 32 µg/L é significativamente diferente de todos os IDs dos demais tratamentos (Tabela 13). De modo geral, a variação de dados obtidos nestes experimentos foi ampla, especialmente nas concentrações maiores de antraceno.

As análises dos IDs nos peixes do grupo controle água expostos à RUVB com diferentes durações não apresentaram diferença significativa. Os grupos apresentaram valores médios de ID abaixo de 40 (Fig. 15). Entretanto, a média do ID do grupo exposto por 5 horas à RUVB é aproximadamente 50% maior que a média do ID dos grupos expostos por 2 e 4 horas. No caso dos peixes pertencentes ao grupo controle solvente o valor da média do ID também

não apresentou diferença significativa. Neste caso os valores das médias do ID são muito semelhantes, 28, 30 e 30 para as exposições com duração de 2 e 5 horas e 4 horas de duração cumulativa, respectivamente.

Os peixes expostos às três concentrações de solução de antraceno e submetidos à RUVB por duas horas apresentaram maior média de ID (Fig. 12). Na concentração de 8 µg/L o ID no grupo exposto à lâmpada de ultravioleta por 5 horas é significativamente diferente do ID do grupo exposto por 2 horas (Tabela 14). A média do ID do grupo exposto por 5 horas é aproximadamente 50% e 25% menor que a média dos IDs dos grupos com exposição de 2 horas e 4 horas cumulativas, respectivamente (Fig. 17). No grupo exposto à concentração de 16 µg/L e submetidos à RUVB por 2 horas o ID é significativamente diferente à dos IDs dos demais grupos (Tabela 15). A redução na média do ID no grupo submetido à radiação ultravioleta por 4 horas cumulativas foi de aproximadamente 50% em relação a média do ID no grupo exposto por 2 horas e 60% no grupo com exposição de 5 horas (Fig. 18). No grupo exposto à solução de antraceno de 32 µg/L a redução do ID do grupo exposto à RUVB por 4 e 5 horas foi significativa em relação ao ID do grupo exposto por 2 horas (Tabela 16). Neste caso, a redução na média do ID entre os grupos significativamente diferentes, foi de aproximadamente 55% (Fig. 19).

IV.3. Mortalidade dos peixes pré-expostos às diferentes concentrações de antraceno e subseqüentemente expostos à radiação ultravioleta B (RUVB) por diferentes períodos de tempo

O plano inicial previa a execução de três períodos cumulativos (10, 20 e 30 horas) de exposição à radiação ultravioleta, com intensidade de $35\mu\text{w}/\text{cm}^2$, sendo necessários dois dias (5 horas/dia) para executar cada um dos períodos cumulativos de exposição. A mortalidade dos peixes tinha início após o fim do segundo dia de exposição à radiação ultravioleta B. A intensidade da radiação ultravioleta foi reduzida (Tabela 1) e as durações cumulativas de exposição permaneceram inalteradas, mas mesmo com esta alteração os peixes morreram após duas exposições consecutivas. Com a redução da intensidade da radiação houve um aumento no intervalo de tempo até que a mortalidade atingisse 100%.

As Figuras 20-A, 20-B e 20-C apresentam resultados de experimentos realizados com os grupos controle água e controle solvente originalmente planejados para estudar o efeito da exposição à radiação ultravioleta B artificial com duração cumulativa de 10, 20 e 30 horas (5 horas/dia). No entanto, devido à morte de todos os peixes após 10 horas de exposição à RUVB, não foi possível dar continuidade aos experimentos com os maiores períodos de exposição. Em todos os casos foram encontrados peixes mortos a partir do primeiro intervalo do segundo dia, atingindo a mortalidade total no segundo intervalo de verificação. A alta taxa de mortalidade após o período cumulativo de 10 horas de exposição não permitiu a retirada dos peixes para execução do ensaio cometa.

Os resultados apresentados na Figura 21 se referem à mortalidade de peixes expostos à RUVB por um período cumulativo de 6 horas (3 horas/dia), parte de um experimento planejado, no qual os peixes seriam expostos à RUVB com duração cumulativa de 3, 6 e 9 horas (3 horas/dia). No entanto, os peixes foram encontrados mortos a partir do segundo dia de exposição, no primeiro intervalo de observação após o desligamento da lâmpada. Mesmo com a redução do tempo de exposição à RUVB a mortalidade após 6 horas de exposição se manteve elevada, não permitindo a realização da exposição por um período cumulativo de 9 horas, assim como a coleta de material para execução do ensaio cometa. Neste experimento, somente nos grupos pré-expostos às concentrações de 8 e 16 $\mu\text{g/L}$ e subsequentemente expostos à RUVB por 3 horas houve a sobrevivência de peixes suficientes para realização do ensaio cometa (Fig. 22). Não há diferença estatisticamente significativa entre o ID destes dois grupos.

A Figura 23 mostra os resultados do experimento no qual os peixes foram pré-expostos em soluções de antraceno nas concentrações de 8, 16 e 32 $\mu\text{g/L}$, por 24 horas no escuro e posteriormente expostos à RUVB por um período de 2 horas/dia durante dois dias em água limpa. A duração cumulativa de exposição proposta era de 2, 4 e 6 horas (2 horas/dia). No primeiro intervalo de observação do primeiro dia foi encontrado um peixe morto no grupo de 16 $\mu\text{g/L}$. As mortalidades mais significativas foram encontradas no segundo intervalo de observação do segundo dia, e no terceiro intervalo houve mortalidade total dos peixes de todos os grupos. Mesmo com a redução do tempo de exposição à RUVB, a mortalidade após 4 horas de exposição se manteve elevada, não permitindo a coleta de material para execução do ensaio

cometa para este período, assim como a realização da exposição por um período cumulativo de 6 horas. Somente os peixes do grupo exposto por 2 horas e dos grupos controle água e solvente expostos a RUVB com duração cumulativa de 4 horas (Fig. 24) sobreviveram para que cinco peixes fossem amostrados para realizar o ensaio cometa. Não foi encontrada diferença significativa entre os IDs destes grupos.

A Figura 25 mostra os resultados do experimento inicialmente planejado para estudar o efeito da exposição por um período cumulativo de 6 horas (2 horas/dia) sobre cinco grupos de peixes com diferentes tratamentos (controle água, controle solvente, 8, 16 e 32 $\mu\text{g/L}$). Foram encontrados peixes mortos dos grupos controle água, 8, 16 e 32 $\mu\text{g/L}$ de antraceno no segundo intervalo do segundo dia de exposição. Peixes mortos do grupo controle etanol foram encontrados no terceiro intervalo do segundo dia. No quarto intervalo do segundo dia a mortalidade dos peixes dos três grupos pré-expostos às soluções de antraceno atingiu 100%. Somente os peixes dos grupos controle água e controle solvente sobreviveram ao período cumulativo de 6 horas de exposição, no entanto a mortalidade de 100% dos organismos ocorreu antes de se completar as 24 horas do terceiro dia de exposição.

Em todos os casos acima, seria necessário que os peixes permanecessem vivos até o término das 24 horas do último dia de exposição de cada período cumulativo para realizar o Ensaio Cometa.

Após a exposição à RUVB foi possível notar nos indivíduos mortos a ocorrência de alteração no padrão de coloração da epiderme das regiões caudal e acima da cabeça entre os olhos, conforme podemos notar pelas setas demarcadas na Fig. 26. Tal fato provavelmente está relacionado com os efeitos

nocivos da radiação ultravioleta, uma vez que esta alteração não foi observada nos peixes que não foram expostos à RUVB.

V. DISCUSSÃO

Neste trabalho, durante as pré-exposições ao antraceno (8, 16 e 32 $\mu\text{g/L}$) por 24 horas no escuro e as exposições cumulativas (10, 20 e 30 horas – 5 horas/dia) à luz de lâmpadas fluorescentes em água limpa ($\text{RUV} < 0,01 \mu\text{W/cm}^2$) não houve mortalidade dos peixes. Em cada tratamento foram utilizados 10 peixes, sendo cinco deles retirados para execução do ensaio cometa. No primeiro período de exposição (10 horas) as médias dos IDs são bem similares, acima de 300 para as três concentrações (Fig. 3). A permanência dos peixes em água limpa ao longo das demais exposições ocasionou a redução das médias dos IDs, principalmente nas concentrações de 8 $\mu\text{g/L}$ ($\text{ID} = 95/54$) para as exposições por 20 e 30 horas e de 16 $\mu\text{g/L}$ ($\text{ID} = 208$) para as exposições por 20 horas (Fig. 9 e 10). O grupo pré-exposto a 16 $\mu\text{g/L}$ e mantido por 30 horas em água limpa apresentou um aumento não significativo no dano ao DNA ($\text{ID}=345$) (Fig. 10). Na concentração de 32 $\mu\text{g/L}$ não houve redução significativa do ID (Fig. 11).

A ausência de pampos mortos durante a execução dos experimentos indica que o antraceno não é tóxico para a espécie utilizada nas condições experimentais deste estudo. Esta ausência de toxicidade também foi encontrada em outros trabalhos que realizaram exposições de peixes ao antraceno por períodos superiores a 24 horas. Bowling et al. (1983) realizaram exposições contínuas de peixes da espécie *Lepomis macrochirus* ao antraceno (12,7 $\mu\text{g/L}$) e de seus fotoprodutos por 72 horas no escuro. Durante o período em que os peixes permaneceram no escuro apenas um peixe morreu e ao serem expostos ao sol a mortalidade atingiu 100% dos animais em um período

de 24 horas. A ausência de toxicidade do antraceno no escuro também foi detectada em outros organismos. No trabalho de Kangan et al. (1985) os autores concluíram que o antraceno não é tóxico para larvas de mosquito, crustáceo, pulga d'água e peixes mantidos em solução deste HPA no escuro. No trabalho de Gomes et al. (2009) o antraceno não apresentou toxicidade para os anfípodas antárticos pré-contaminados com antraceno por 24 horas no escuro e subsequentemente expostos à luz de lâmpadas fluorescentes.

Embora tenha sido detectada a emissão de RUV pelas lâmpadas fluorescentes utilizadas, a sua intensidade ($< 0,01 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) pode ser considerada praticamente insignificante. O seu uso não promoveu a fotossensitização do antraceno, o que poderia ocasionar em um aumento no dano ao DNA ou até mesmo na morte dos peixes. Resultado semelhante foi encontrado em peixes da espécie *Lepomis spp.* expostos ao antraceno por 96 horas no escuro sob a incidência da luz de lâmpadas fluorescentes brancas ou douradas que não apresentaram os efeitos tóxicos/citotóxicos. Por outro lado, peixes pré-expostos ao antraceno no escuro por 48 horas foram encontrados mortos por asfixia e apresentaram alteração morfológica de brânquias e do epitélio dorsal quando submetidos à RUV solar por 96 horas em água limpa (ORIS; GISEY, 1985).

Embora o antraceno não apresente efeitos tóxicos na ausência de RUV, este hidrocarboneto é genotóxico para o pampo. Os danos de DNA detectados nos eritrócitos de *T. carolinus*, através do ensaio cometa, demonstram o efeito genotóxico do antraceno, assim como uma relação dose/resposta entre as concentrações e os IDs durante a permanência em água limpa. A exposição por 24 horas ao antraceno foi suficiente para que o

efeito genotóxico deste HPA fosse detectado e a diferença entre os valores dos IDs dos grupos controle em relação aos dos grupos expostos evidenciam que o dano ao DNA foi decorrente da exposição ao poluente (Fig. 3). Este efeito genotóxico está vinculado à capacidade dos peixes em biotransformar HPAs em metabólitos reativos que interagem com o DNA promovendo quebras da molécula (VANZELLA et al., 2007). A redução no dano ao DNA ao longo da permanência dos peixes em água limpa pode indicar o efeito de depuração do composto, de reparo de DNA ou de ambos. Esta redução é evidente na concentração de 8 µg/L (Fig. 9) e 16 µg/L quando comparados os períodos cumulativos de 10 e 20 horas (Fig. 10). O aumento subsequente do dano no DNA dos peixes do grupo 16 µg/L mantido por 30 horas em água, como também a ocorrência de um elevado ID no grupo 32 µg/L nos três períodos cumulativos podem estar relacionados com a concentração. As duas maiores concentrações utilizadas, embora sejam subletais para o período de pré-exposição, podem ter afetado o estado fisiológico do animal a ponto de prejudicar tanto a capacidade de metabolização do antraceno quanto o mecanismo de reparo do DNA. Outra possibilidade seria a necessidade um maior tempo de depuração para detectar uma possível redução no dano ao DNA após um maior período de metabolização do HPA.

O efeito genotóxico do antraceno também foi detectado em células da hemolinfa de *Gondogeneia antarctica*, um anfípode da região antártica, utilizando o ensaio cometa (comunicação pessoal, Prof. Dr. Vicente Gomes). A genotoxicidade causada pelo antraceno se origina a partir da biotransformação dos HPAs por peixes e resulta em compostos intermediários potencialmente genotóxicos (VANZELLA et al., 2007), como as espécies reativas de oxigênio,

devido ao estresse oxidativo. Vieira et al. (2008) sugerem que a biotransformação do antraceno é capaz de promover estresse oxidativo em *Pomatoschistus microps*. Os peixes expostos por 96 horas a soluções deste HPA (0,25, 0,5, 1, 2 e 4 µg/L) apresentaram aumento da atividade de enzimas como a catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e glutathione peroxidase que protegem o organismo de danos oxidativos.

Testes preliminares realizados com a exposição de pampos mantidos em água limpa (grupo controle água) e água com etanol (grupo controle solvente 0,01%) a diferentes intensidades de RUVB (241 a 24 µW/cm²) resultaram na mortalidade de 100% dos organismos após duas exposições consecutivas de cinco horas cada (Tabela 2). Foi observada uma elevada taxa de mortalidade durante a repetição de exposições dos controles água e solvente à RUVB (35 µW/cm²) por 5 horas durante dois dias, quando aproximadamente 50% dos peixes de ambos os grupos morreram no primeiro intervalo de verificação do segundo dia, atingindo 100% de mortos no segundo intervalo (Fig.s 20-A, 20-B e 20-C). A escolha por um dos menores valores de intensidade de radiação dentre os utilizados em testes preliminares não interferiu na sobrevivência dos peixes durante as exposições à RUVB. Grupos de peixes pré-expostos a 8, 16 e 32 µg/L e posteriormente expostos à RUVB (35 µW/cm²) por períodos de 3 horas/dia toleraram dois períodos consecutivos (Fig. 21), apontando para o fato que a redução no tempo de exposição não alterou o período de sobrevivência para os grupos pré-expostos ao poluente. Este fato também foi constatado no grupo de pampos pré-expostos às três concentrações de antraceno e submetidos à mesma intensidade de radiação por períodos de 2 horas durante dois dias (Fig. 23). No entanto, na exposição

de pampos à radiação UVB ($35\mu\text{W}/\text{cm}^2$) por dois períodos de 2horas/dia os grupos controle água e solvente sobreviveram por mais 22 horas após a lâmpada ser desligada, ou seja, por sete horas a mais que os grupos expostos ao HPA. A sobrevivência dos peixes dos grupos controle por mais tempo permitiu a retirada de amostras para execução do ensaio cometa (Fig. 24), uma vez que a amostragem era feita 24horas após a lâmpada ser ligada para realizar o último período de exposição. Esta diferença na mortalidade também foi encontrada no experimento em que as exposições foram feitas por três períodos consecutivos de 2horas/dia, os peixes dos grupos controle suportaram três períodos de exposição enquanto que nos grupos 8, 16 e 32 $\mu\text{g}/\text{L}$ todos os peixes morreram após a segunda exposição (Fig. 24). A diferença na sobrevivência entre os peixes dos grupos controle e dos grupos pré-expostos ao antraceno sugere que ela pode ser decorrente da fotosensitização deste HPA porque a única fonte do HPA é o antraceno absorvido durante a pré-exposição.

Dependendo da dosagem, a radiação ultravioleta B artificial, por si só, mostrou ser muito prejudicial para peixes juvenis da espécie *T. carolinus*, pré-expostos ou não ao antraceno. Nos grupos de peixes pré-expostos ao antraceno e submetidos à luz de lâmpadas fluorescentes a mortalidade foi zero para todos os tratamentos e períodos cumulativos de exposição. Enquanto que os peixes dos grupos de controle (água e solvente) e dos grupos pré-expostos ao antraceno morreram após duas exposições consecutivas na intensidade de $35\mu\text{W}/\text{cm}^2$ de RUVB por períodos não cumulativos de 2 e 5horas e por períodos cumulativos de 4 (2horas/dia), 6 (3horas/dia) e 10horas (5horas/dia). A elevada taxa de mortalidade nos peixes expostos à RUVB pode estar

relacionada com a quantidade (energia da radiação) e qualidade da radiação (composição do espectro da radiação). O potencial do dano que a radiação pode causar está diretamente relacionado com o comprimento de onda. Willianson et al. (2001) descrevem que o efeito do comprimento de onda de 320 nm da RUV sobre cladóceras de água doce é muito maior que o de 370 nm. Peachey e Crosby (1996) realizaram exposições de náuplios de *Artemia salina* contaminados com antraceno e pireno à RUV solar ou artificial nos comprimentos de ondas de 312 e 375 nm. Os autores concluíram que além da capacidade da RUV solar em promover a fototoxicidade em animais contaminados com HPAs, o antraceno e o pireno apresentam um aumento ainda maior em sua toxicidade quando expostos a radiação UV com comprimentos de 312 e 375 nm, respectivamente.

A mortalidade intensa de animais aquáticos contaminados com HPAs e subsequente exposição à RUV artificial também foi encontrada por outros autores que utilizaram o antraceno e outros HPAs em diferentes animais (PEACHEY, 2005; GOMES et al., 2009). PEACHEY (2005) estudou a mortalidade de larvas de siri azul (*Callinectes sapidus*) contaminadas com HPAs (pireno ou fluorantene) e expostas à RUV artificial no laboratório ou RUV natural e constatou que o LC_{50} nos experimentos no laboratório foi mais baixo do que o LC_{50} na radiação solar que possuía nível de UVA e UVB mais elevado. Gomes et al. (2009) estudaram a fototoxicidade do antraceno sobre a mortalidade do anfípode antártico *Gondogeneia antarctica* na radiação solar e na radiação UVA e UVB artificiais e constatou que a mortalidade nas radiações artificiais foi mais rápida e mais intensa do que a mortalidade causada pela RUV natural. Esses autores atribuíram esta diferença de mortalidade à

diferença de intensidade, da composição espectral e da transmissão entre os dois tipos de RUV. Além da deficiência intrínseca das lâmpadas de RUV (HÄKKINEN; OIKARI, 2004) a intensidade da radiação tende a permanecer constante, diferentemente da RUV natural que apresenta variação no nível de radiação dependendo da hora do dia, estação do ano, condições atmosféricas, latitude, dentre outros. Outro fator que atua na variação da intensidade da RUV é a quantidade de material em suspensão (orgânico e inorgânico) presente nas águas costeiras quando esta penetra na coluna d'água, o que também auxilia na redução de sua intensidade.

Outros estudos realizados para avaliar o efeito da exposição de peixes contaminados com antraceno à RUV concluem que esta interação causa estresse respiratório, alterações morfológicas nas brânquias e na estrutura da epiderme (ORIS; GIESY JR, 1985), como também a redução na quantidade de hemoglobina e inibição de Na,K-ATPase / Mg-ATPase, indicando estresse osmótico nos organismos provavelmente associado a falhas na função da membrana celular (MCCLOSKEY; ORIS, 1993). Estes resultados demonstram que os peixes podem ser afetados de diferentes maneiras devido à toxicidade aguda promovida pela interação entre o antraceno e a RUV. Em nosso trabalho, peixes expostos a RUVB apresentam a alteração de padrão de coloração (Fig. 26). A análise histológica de tecido coletado (epiderme e brânquia) dos pampos amostrados para o ensaio cometa permitirá explicar sobre a causa desta alteração.

Nos experimentos envolvendo a exposição à RUVB, os índices de dano obtidos não foram os esperados para o efeito da fotosensitização do antraceno sobre o DNA de pampo. Entretanto, no experimento em que os

juvenis de pampo foram expostos por 2 horas à RUVB os resultados sugerem uma relação dose/resposta, pois o dano ao DNA dos eritrócitos dos peixes do grupo 16 µg/L é significativamente mais elevado que o dano presente nos demais tratamentos (controle água e solvente, 8 e 32 µg/L) (Fig. 12). Este resultado pode ser decorrente de danos ao DNA ocasionados pela fotosensitização do antraceno e metabolização deste HPA. A impossibilidade de executar mais de duas exposições consecutivas à RUVB pode ter contribuído para a obtenção destes resultados, uma vez que no experimento em que foram realizadas duas exposições (2 horas/dia) não houve diferença entre os danos ao DNA (Fig. 13). De modo geral os IDs apresentaram baixos valores (< 150) em todos os tratamentos e a variação dos dados obtidos nestes experimentos foi ampla, especialmente nas concentrações maiores de antraceno (Fig.s 15 a 19). O nível baixo de ID nos grupos pré-expostos a 32 µg/L e posteriormente submetidos à RUVB por dois períodos é difícil de explicar, mas levando em consideração o fato de que a exposição extensa à RUVB resultou em alta mortalidade mesmo nos grupos controles, o estado fisiológico dos sobreviventes do experimento possivelmente não é normal e seus eritrócitos não são mais adequados para o ensaio cometa.

Embora não se possa afirmar que realmente houve uma redução no dano ao DNA dos pampos a partir dos dados obtidos, a capacidade de reparo do material genético pode ter contribuído para os baixos valores dos IDs. A mobilização dos mecanismos de reparo do DNA de células expostas à RUVB podem ocorrer através da fotorreativação, processo no qual a enzima fotoliase se liga aos fotoprodutos (dímeros de ciclobutano de pirimidina – CPD e pirimidina(6-4)pirimidona - 6-4PPs) utilizando energia da luz ou através do

reparo por excisão da base ou nucleotídeo que não necessita da energia da luz (HÄDER; SINHA, 2005). Groff et al. (2010) detectaram através do ensaio cometa uma redução no dano ao DNA de eritrócitos de peixes neotropicais (*Colossoma macroporum* e *Arapaima gigas*) 12 horas após o término da exposição à RUVB e sugerem que o reparo por excisão de nucleotídeo esteja envolvido na restauração do DNA. Uma vez que os peixes amostrados para realização do ensaio cometa permaneceram privados de qualquer radiação por no mínimo 19 horas é provável que os mecanismos de reparo envolvidos, caso tenham ocorrido, sejam os de excisão de base e nucleotídeo.

A exposição à RUV, além de induzir à quebra da fita de DNA, DNA-proteína *cross-links* e formação de sítios álcali-lábeis que podem ser detectados pelo ensaio cometa, induz também a formação de fotoprodutos como os dímeros de ciclobutano de pirimidina (CPD) e as pirimidina(6-4)pirimidona (6-4PPs) que também causam lesões ao DNA mas não são possíveis de detectar através deste ensaio. É necessário o uso de endonucleases específicas para visualizar e assim quantificar os danos ao DNA através do ensaio cometa. Assim, o nível do ID irá depender do número de eritrócitos com o DNA danificado pelos fotoprodutos. Experimentos usando formamidopirimidina-DNA glicosilase e endonuclease III para detectar 8-oxoGua e pirimidinas oxidadas (AZQUETA et al., 2009), como também a enzima T4 endonuclease V para avaliar a formação de fotoprodutos (dímeros de timina e 6-4PP) corrigidos pelo mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (WILLET et al., 2001) estão sendo considerados.

Neste trabalho o ensaio cometa mostrou ser uma ferramenta eficiente para avaliar o efeito genotóxico do antraceno em *T. carolinus*. A não obtenção

dos resultados esperados nos experimentos em que pampos contaminados com antraceno e expostos à RUVB não estão relacionados com uma possível falha na execução ou na eficiência desta técnica. O efeito letal da RUVB durante as exposições provavelmente contribuiu para que o efeito fototóxico do antraceno não ficasse evidente com o uso do ensaio cometa. Deficiências técnicas relacionadas com a intensidade da radiação também contribuíram para este resultado. O uso da prata como corante do DNA apresentou boa definição e permitiu diferenciar as duas partes que compõem o cometa (cabeça e cauda) para a execução da análise visual. Embora a análise visual dos cometas possa aparentemente ter um caráter subjetivo ela promoveu uma avaliação condizente com as condições experimentais a que os pampos foram submetidos.

O ensaio cometa é um dos mais populares métodos utilizados para avaliar o dano ao DNA, como também o reparo em células eucarióticas. O amplo uso desta técnica nos estudos sobre genotoxicidade está associado com a necessidade de pouco material, relativa simplicidade, baixo custo, elevada sensibilidade, rapidez e por não ser um biomarcador específico (GARCÍA et al., 2004; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998). O ensaio cometa é muito útil como teste *in vivo* para investigar a genotoxicidade em órgãos ou células alvo como também os possíveis mecanismos que provocam os danos (HARTMANN, 2004). Segundo Hartmann et al. (2003), as maiores vantagens desta técnica são: a relativa facilidade de aplicação em qualquer tecido de interesse, a capacidade em detectar múltiplas classes de dano no DNA e geração de dados a nível celular. Estas características fornecem ao ensaio cometa algumas

vantagens sobre outros métodos de testes *in vivo* que são limitados a células proliferativas ou a um determinado tecido.

A coloração por prata para análise de cometas é utilizada como uma boa alternativa e demonstra alta sensibilidade para o ensaio cometa, ao invés da técnica tradicionalmente usada com brometo de etídio. Estudos indicam que a sensibilidade desta coloração em detectar o DNA poder ser até três vezes maior quando comparada com o brometo de etídio (MERRIL, 1990). Além disso, a coloração por prata apresenta algumas vantagens: a análise é feita em microscópio óptico comum, o método apresenta baixo custo, o composto utilizado é menos tóxico para o manipulador e a coloração do material mantém-se estável por período prolongado (NADIN et al., 2001).

O desenvolvimento de novos protocolos de coloração ofereceu novas oportunidades para o desenvolvimento do ensaio cometa sem a necessidade da utilização de microscópios fluorescentes, como também para a obtenção de um bom contraste entre a cabeça e a cauda do cometa (GARCÍA et al., 2007).

As análises dos cometas são realizadas em sua maioria por meio de programas de análise de imagem desenvolvidos para a coloração com compostos fluorescentes como o brometo de etídio. Entretanto, a análise visual dos cometas corados com prata também se mostrou eficiente em um exercício realizado por García et al. (2004) para avaliar a sensibilidade e a variação deste tipo de análise. As lâminas confeccionadas foram codificadas e enviadas para sete laboratórios diferentes para serem analisadas visualmente por pessoas com e sem conhecimento prévio da técnica do ensaio cometa. Os resultados obtidos com este exercício confirmaram a aplicabilidade da análise

visual, como também o uso deste tipo de análise em cometas corados com prata.

Há um número limitado de trabalhos envolvendo o uso do ensaio cometa em organismos marinhos, quando comparado com os estudos feitos com animais de água doce (FRENZILLI et al., 2009). Na revisão bibliográfica realizada não foram encontrados trabalhos envolvendo estudos *in vivo* do efeito genotóxico do antraceno e do uso do ensaio cometa para avaliar o efeito fototóxico do antraceno sobre juvenis de peixes marinhos.

O ensaio cometa se mostrou apropriado para detectar e quantificar o impacto genotóxico de contaminantes, como o antraceno, presentes no ambiente. O pampo pode ser considerado como um bioindicador sensível e capaz de ser usado para avaliar estes efeitos. Trata-se de uma prioridade para as nações em desenvolvimento, o uso de técnicas rápidas de avaliação de poluição para identificação de áreas em risco, onde maiores recursos deveriam ser empregados para melhor detalhamento e solução dos problemas ambientais. Testes para avaliar o efeito de compostos tóxicos/fototóxicos deveriam ser considerados em programas de monitoramento ambiental principalmente nas regiões onde o uso de combustíveis são mais intensos. De maneira geral e mesmo com as dificuldades encontradas em relação às exposições a radiação ultravioleta B artificial, os resultados deste trabalho fornecem subsídios que alertam sobre a necessidade de estudos que avaliem o efeito fototóxico dos poluentes sobre os organismos marinhos, principalmente o efeito sobre o DNA.

VI. CONCLUSÕES

- Dentro das condições utilizadas neste trabalho o antraceno não apresentou toxicidade para juvenis de *T. carolinus* no escuro ou na ausência de RUVB.
- O antraceno é genotóxico para *T. carolinus* e os danos causados ao DNA são dose-dependente.
- A radiação ultravioleta B artificial é letal para juvenis de pampos. Exposições com intensidade de $35\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ocasionaram a mortalidade total de peixes pré-expostos ou não ao antraceno. Nesta intensidade, a mortalidade é constatada logo após a exposição.
- Há indicação de que pampos pré-contaminados com antraceno têm capacidade de depurar e de reparar danos causados ao DNA pela exposição à RUVB.
- Dependendo da intensidade da radiação ultravioleta B artificial e do tempo de exposição, há indicação da fototoxicidade do antraceno em pampos.
- O ensaio cometa mostrou ser uma ferramenta eficiente de avaliação do efeito genotóxico do antraceno e a redução no dano ao DNA.

- O pampo mostrou ser sensível aos efeitos do antraceno e da radiação ultravioleta B artificial podendo ser usado como um bom bioindicador para estudar estes efeitos no monitoramento ambiental.
- Resultados obtidos neste trabalho demonstram que mais pesquisas são necessárias utilizando a radiação ultravioleta B artificial para avaliar a fototoxicidade do antraceno em pampos.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, S. M.; SHUGART, L. R.; SOUTHWORTH, G. R.; HILTON, D. E. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MACCARHY, J. F.; SHUGART L. R. (Eds.). **Biomarkers of environmental contamination**. Lewis Publishers, Boca Raton, p. 333-353, 1990.
- ALLRED, P. M.; GIESY, J. P. Solar radiation-induced toxicity of anthracene to *Daphnia pulex*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 4, p. 219-226, 1985.
- ALMEIDA, V. M. F.; DUNCAN, A. L. Crude Oil effects on fish of the amazon: current status. In: **Tropical Fish: News and Reviews**, International Congress on The Biology of Fish. University of British Columbia, Vancouver, Canada, p. 49-60, 2002.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutat. Res.**, v. 343, p. 121-135, 1995.
- ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutat. Res.**, v. 56, p. 57-67, 2004a.
- ANDRADE, V. M.; SILVA, J.; SILVA, F. R.; HEUSER, V. D.; DIAS, J. F.; YONEAMA, M. L.; FREITAS, T. R. O. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. **Environ. Mol. Mutag.**, v. 44(5), p. 459-468, 2004b.
- ANKLEY, G. T.; RUSSELL, J. E.; BARBARA, R. S.; PATRICIA, A. K.; VINCENT, R. M.; JULIE, S. C. Evaluation of models for predicting the phototoxic potency of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Aquat. Toxicol.**, v. 37, p. 37-50, 1997.
- ARFSTEN, D. P.; SCHAEFFER, D. J.; MULVENY, D. C. The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic Hydrocarbons in animals and plants: A Review. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 33, p. 1-24, 1996.
- ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY **Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**. Report of the U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1995.
- AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. R. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutat. Res.**, v. 674, p. 101-108, 2009.
- BEDDING, N. D.; MCINTYRE, A. E.; PERRY, R.; LESTER, J. N. Organic contaminants in aquatic environment. II. Behavior and fate in hydrological cycle. **Sci. Total Environ.**, v. 26, p. 255-312, 1983.
- BELLINGER, J. W.; AVAULT, J. W. Food habits of juvenile pompano (*Trachinotus carolinus*) in Louisiana. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v. 100(3), p. 486-494, 1971.

- BETOWSKI, L. D.; ENLOW, M.; RIDDICK, L. The phototoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons: a theoretical study of excited states and correlation to experiment. **Comput. Chem.**, v. 26, p. 371-377, 2002.
- BORNMAN, J. F.; TERAMURA, A. H. Effects of ultraviolet-B radiation on terrestrial plants. In: YOUNG A. R.; BJÖRN, L. O.; MOAN, J.; NULTSCH, W. (Eds.). **Environmental UV-Photobiology**. Plenum, New York,. p. 427-471, 1993.
- BOWLING, J. W.; LEVERSEE, G. J.; LANDRUM, P. F.; GIESY, J. P. Acute mortality of anthracene-contaminated fish exposed to sunlight. **Aquat. Toxicol.**, v. 3, p. 79-90, 1983.
- BROWN, A. C.; MCLACHLAN, A. **Ecology of sandy shores**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990.
- BUMA, A. G. J.; DE BOER, M. K.; BOLEN, P. Depth distribution of DNA damage in Antarctic marine phyto- and bacterioplankton exposed to summertime UV radiation. **J. Phycol.**, v. 37, p. 200-208, 2001.
- CARTER, R. W. G. **Coastal environments: An introduction to the physical, ecological and cultural systems of coastlines**. Academic Press, London, 1988.
- CHOI, J.; ORIS, J. T. Assessment of the toxicity of anthracene photo-modification products using the topminnow (*Poeciliopsis lucida*) hepatoma cell line (PLHC-1). **Aquat. Toxicol.**, v. 65, p. 243-251, 2003.
- CULLEN, J. J.; NEALE, P. J.; LESSER, M. P. Biological weighting function for the inhibition of phytoplankton photosynthesis by ultraviolet radiation. **Science**, v. 258, p. 646-650, 1992.
- DU PREEZ, H. H.; MCLACHLAN, A.; MARAIS, J. F.; COCKCROFT, A. C. Bioenergetics of fishes in a high-energy surf-zone. **Mar. Biol.**, v. 106, p. 1-12, 1990.
- FARMAN, J. C.; GARDINER, B. G.; SHANKLIN, J. D. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. **Nature**, v. 315, p. 207-210, 1985.
- FELIX, F. C.; SPACH, H. L.; MORO, P. S.; JUNIOR, R. S.; SANTOS, C.; HACKRADT, C. W.; HOSTIM-SILVA, M. Utilization patterns of surf zone inhabiting fish from beaches in Southern Brazil. **Pananjas**, v. 1, p. 27-39, 2007.
- FOOTE, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochem. Photobiol.**, v. 54, p. 659, 1991.
- FRENZILLI, G.; NIGRO, A.; LYONS, B. P. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutat. Res.**, v. 681, p. 80-92, 2009.
- GARCÍA, O.; MANDINA, T.; LAMADRID, A. I.; DIAZ, A.; REMIGIO, A.; GONZALEZ, Y.; PILOTO, J.; GONZALEZ, J. E.; ALVAREZ, A. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an interlaboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutat. Res.**, v. 556, p. 25-34, 2004.
- GOMES, V.; PASSOS, M. J. A. C. R.; LEME, N. M. P.; SANTOS, T. C. A.; D. Y.

- F. CAMPOS; F. M. HASUE; PHAN, V. N. Photo-induced toxicity of anthracene in the Antarctic shallow water amphipod *Gondogeneia antarctica*. **Polar Biol.**, v. 32, p. 1009-1021, 2009.
- GOMES, V.; PASSOS, M. J. A. C. R.; SANTOS, T. C. A.; CAMPOS D. Y. F.; USSAMI, K. A.; HASUE, F. M.; PHAN, N. V. DNA strand breaks in caged Antarctic coastal fish (*Trematomus newnesi*), following exposure to the waters in front of the Brazilian Antarctic Research Station "Comandante Ferraz". (aceito para publicação na Revista Pesquisa Antártica Brasileira), 2010.
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.). **Mutagênese ambiental**. Editora Ulbra, Canoas (RS), p. 247-279, 2003.
- GROFF, A. A.; SILVA, J.; NUNESB, E. A.; IANISTICKI, M.; GUECHEVA, T. N.; OLIVEIRA, A. M.; OLIVEIRA, C. P. F.; VAL, A. L.; HENRIQUES, J. A. P. UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Colossoma macropomum* and *Arapaima gigas* **Amaz. Fish J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v. 99, p. 93-99, 2010.
- HÄDER, D.-P.; SINHA, R. P. Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. **Mutat. Res.**, v. 571, p. 221-233, 2005.
- HÄKKINEN, J.; VEHNÄÄINEN, E.; OIKARI, A. High sensitivity of northern pike larvae to UV-B but no UV-photoinduced toxicity of retene. **Aquat. Toxicol.**, v. 66, p. 393-404, 2004.
- HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 18(1), p. 45-51, 2003.
- HARTMANN, A.; PAPPERT-HELBIG, M. S. U.; LOWE, P.; MUELLER, W. S. L. Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. **Mutagenesis**, v. 19(1), p. 51-59, 2004.
- HASEGAWA, M.; SUZUKI, A.; MATSUMURA, S.; TOSHIMA, K. Molecular design, chemical synthesis, and evaluation of novel anthracene derivatives as a new family of protein photocleavers. **Sci. Technol. Adv. Mater.**, v. 7, p. 169-174, 2006.
- HATCH, A. C.; BURTON, G. A. Photo-induced toxicity of PAHs to *Hyaella azteca* and *Chironomus tentans*: effects of mixtures and behavior. **Environ. Pollut.**, v. 106(2), p. 157-67, 1999.
- HEILMAN, M. J.; SPIELER, R. E. The daily feeding rhythm to demand feeders and the effects of time meal-feeding on the growth of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. **Aquaculture**, v. 180, p. 53-64, 1999.
- HOESE, H. D.; MOORE, R. H. **Fishes of the Gulf of Mexico**. Texas A & M University Press, College Station, 1977.
- ILNYTSKY, Y.; YAO, Y.; KOVALCHUK, I. Double-strand break repair machinery is sensitive to UV radiation. **J. Mol. Biol.**, v. 345(4), p. 707-715,

2005.

- JORY, D.; IVERSEN, E.; LEWIS, R. Culture of the fishes of the genus *Trachinotus* (Carangidae) in the Western Atlantic. **J. Wild. Maricult. Soc.**, v. 16, p. 87-94, 1985.
- KANGAN, J.; KANGAN, E. D.; KANGAN, I. A.; KANGAN, P. A.; QUIGLEY, S. The phototoxicity of non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 11/12 (14), p. 1829-1834, 1985.
- KARANJAWALA, Z. E.; MURPHY, N.; HINTON, D. R.; HSIEH, C. L.; LIEBER, M. R. Oxygen metabolism causes chromosome breaks and is associated with the neuronal apoptosis observed in DNA double-strand break repair mutants. **Curr. Biol.**, v. 12, p. 397-402, 2002.
- KAWEEWAT, K.; HOFER, R. Effect of UV-B radiation on goblet cells in the skin of different fish species. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 41, p. 222-226, 1997.
- KIENE, R. P.; CAPONE, D. G. Effects of organic pollutants on methanogenesis, sulfate reduction and carbon dioxide evolution in salt marsh sediments. **Mar. Environ. Res.**, v. 13, p. 141-160, 1984.
- KIRCHHOFF, V. W. J. H.; SCHUCH, N. J.; PINHEIRO, D. K.; HARRIS, J. M. Evidence for an Ozone Hole Perturbation at 30° South. **Atmos. Environ.**, v. 30(9), p. 1481-1488, 1996.
- KLAPER, R.; FRANKEL, S.; BERENBAUM, M. R. Anthocyanin content and UVB sensitivity in *Brassica rapa*. **Photochem. Photobiol.**, v. 63, p. 811-813, 1996.
- KORNHAUSER, A.; WAMER, W. G.; LAMBERT, L. L. Light-induced dermal toxicity: Effects on the cellular and the molecular level. In: MARZULLI, F. N.; H. I. MAIBACH (Eds.). **Dermal-toxicology**. 4th. ed. Hemisphere, New York, p. 527-569, 1991.
- LAW, R. J.; BISCAYA, J. L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) – Problems and progress in sampling, analysis and interpretation. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 29(4-5), p. 235-241, 1994.
- LAZO, J. P.; DAVIS, D. A.; ARNOLD, C. R. The effects of dietary protein level on growth, feed efficiency and survival of juvenile Florida pompano (*Trachinotus carolinus*). **Aquaculture**, v. 169, p. 225-232, 1998.
- LEE, R. F.; HOOK, S. E. Interactive effects of UV, benzo[a] pyrene, and cadmium on DNA damage and repair in embryos of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. **Mar. Environ. Res.**, v. 58, p. 735-739, 2004.
- LEE, R. F.; PAGE, D. S. Petroleum hydrocarbons and their effects in subtidal regions after major oil spills. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 34(11), p. 928-940, 1997.
- LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the singles cell electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 43-64, 2003.
- LEHMANN, J.; POLLET, D.; PEKER, S.; STEINKRAUS, V.; HOPPE, U. Kinetics of DNA strand breaks and protection by antioxidants in UVA- or UVB-irradiated HaCaT keratinocytes using the single cell gel

- electrophoresis assay. **Mutat. Res.**, v. 407, p. 97-108, 1998.
- LYONS, B. P.; PASCOEB, C. K.; MCFADZEN, I. R. B. Phototoxicity of pyrene and benzo[a]pyrene to embryo-larval stages of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Environ. Res.**, v. 54, p. 627-631, 2002.
- MACIEL, N. A. L. Estudo sobre a composição, distribuição, abundância e diversidade da ictiofauna de três enseadas na região litorânea de Ubatuba – Estado de São Paulo – Brasil. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 141 p.1995.
- MALLAKIN, A.; DIXON, D. G.; GREENBERG, B. M. Pathway of anthracene modification under simulated solar radiation. **Chemosphere**, v. 40, p. 1435-1441, 2000.
- MCELROY, A. E.; FARRINGTON, J.W.; TEAL, J. M. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: VARANASI, U. (Ed.). **Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment**. CRC Press, Boca Raton. p. 1-39, 1993.
- MCCLOSKEY, J. T. I.; ORIS, J. T. Effect of anthracene and solar ultraviolet radiation on exposure on gill ATPase and selected hematologic measurements in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). **Aquat. Toxicol.**, v. 24, p. 207-218, 1993.
- MEDEIROS, P. M.; BÍCEGO, M. C. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediment using geochemical markers. II. São Sebastião, SP-Brasil. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 49, p. 892-899, 2004.
- MEDEIROS, P. M.; BÍCEGO, M. C.; CASTELÃO, R. M.; DEL ROSSO, C.; FILMANN, G.; ZAMBONI, A. J. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediment of Patos Lagoon Estuary. **Brazil. Environ. Int.**, v. 31(1), p. 77-87, 2005.
- MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV. Teleostei (3)**. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1980.
- MERRIL, C. R. Silver staining of proteins and DNA. **Nature**, v. 343, p. 779-780, 1990.
- MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutat. Res.**, v. 399, p. 135-147, 1998.
- MUNIZ, P.; PIRES-VANIN, A. M. S.; MARTINS, C. C.; MONTONE, R. C.; BÍCEGO, M. C. Trace metals and organic compounds in the benthic environment of a subtropical embayment (Ubatuba Bay, Brazil) **Mar. Pollut. Bull.**, v. 52, p. 1098-1105, 2006.
- NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A Silver staining method for single-cell gel assay. **Histochem. Cytochem.**, v. 49, p. 1183-1186, 2001.
- NEFF, J.M. **Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment**. Applied Science, UK, 1979.
- ORIS, J. T.; GIESY Jr., J. P. The photo enhanced toxicity of anthracene to juvenile sunfish (*Lepomis spp.*). **Aquat. Toxicol.**, v. 6, p. 133-146, 1985.

- ORIS, J. T.; GIESY Jr., J. P. The photo-induced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to larvae of the Fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Chemosphere**, v. 16(7), p. 1395-1404, 1987.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 53(3), p. 331-347, 2002.
- PAKKER, H.; MARTINS, R.; BOELEN, P.; BUMA, A. G. J.; NIKAIDO, O.; BREEMAN, A. M. Effects of temperature on the photoreactivation of ultraviolet-B induced DNA damage in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). **J. Phycol.**, v. 36: p. 334-341, 2000.
- PEACHEY, R. B. J. The synergism between hydrocarbon pollutants and UV radiation: a potential link between coastal pollution and larval mortality. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 315, p. 103-114, 2005.
- PEACHEY, R. L.; CROSBY, D. G. Phototoxicity in tropical reef animals. **Mar. Environ. Res.**, v. 42(1-4), p. 359-362, 1996.
- PELLETIER, E.; SARGIAN, P.; PAYET, J.; DEMERS, S. Ecotoxicological effects of combined UVB and organic contaminants in coastal waters: A review. **Photochem. Photobiol.**, v. 82, p. 981-993, 2006.
- SANTOS, T. C. A.; PHAN, V. N.; PASSOS, M. J. A. C. R.; GOMES, V. Effects of naphthalene on metabolic rate and ammonia excretion of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 335, p. 82-90, 2006.
- SANTOS, T. C. A. **Estudos sobre efeitos do naftaleno e benzo(a)pireno em *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) utilizando biomarcadores citogenéticos, histopatológicos e bioquímicos.** Tese (Doutorado). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 2009.
- SCHIRMER K.; CHAN, A. G. J.; GREENBERG, B. M.; DIXON, D. G.; BOLS, N. C. Ability of 16 priority PAHs to be photocytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. **Toxicology**, v. 127, p. 143-155, 1998.
- SCORVO FILHO, J. D.; HORIKAWA, M. T.; BARROS, H. P.; BASTOS, A. A. Identificação e ocorrência de alevinos de *Trachinotus* na região de Ubatuba (23°32'S e 45°04'W), Estado de São Paulo, Brasil. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 14, p. 35-43, 1987.
- SINGH, N. P.; MACCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SINHA, R. P.; RICHTER, P.; FADDOUL, J.; BRAUN, M.; HÄDER, D. P. Effects of UV and visible light on cyanobacteria at the cellular level. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 1, p. 553-559, 2002.
- SOLOMON, S.; GARCIA, R. R.; ROWLAND, F. S.; WUIBBLES, D. J. On the depletion of Antarctic ozone. **Nature**, v. 321(19), p. 755-758, 1986.
- SOUTHERLAND, H. A.; LEWITUS, A. J. Physiological responses of estuarine phytoplankton to ultraviolet light-induced fluoranthene toxicity. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 298, p. 303– 322, 2004.

- STEEVENS, J. A.; SLATTERY, M.; SCHLENK, D.; ARYL, A.; BENSON, W. H. Effects of ultraviolet-B light and polyaromatic hydrocarbon exposure on sea urchin development and bacterial bioluminescence. **Mar. Environ. Res.**, v. 48, p. 439-457, 1999.
- TICE, R. R. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPOS, D. H.; VENITT, S. (Eds.). **Environmental mutagenesis**. BIOS Scientific Publishers, Oxford. p. 315-339, 1995.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206-221, 2000.
- TOSHIMA, K.; HASEGAWA, M.; SHIMIZU, J.; MATSUMURA, S. Molecular design, chemical synthesis and biological evaluation of anthracene-carbohydrate hybrids as novel DNA photocleaving and photoselective cytotoxic agents. **ARKIVOC**, p. 28-35, 2004.
- TOYOOKA, T.; IBUKI, Y. DNA damage induced by coexposure to PAHs and light. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 23, p. 256-263, 2007.
- ULUPINAR, M.; OKUMUS, I. Detection of mutagenic-carcinogenic pollutants in aquatic system using cytogenetic methods in fish. **Turk. J. Zool.**, v. 26, p. 141-148, 2002.
- VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutat. Res.**, v. 631, p. 36-43, 2007.
- VIEIRA, L. R.; SOUSA, A.; FRASCO, M. F.; LIMA, I.; MORGADO, F.; GUILHERMINO, L. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). **Sci. Total Environ.**, v. 395(2-3), p. 87-100, 2008.
- WEBER, R. R. A perigosa poluição das águas. **Scient. Am.**, v. 1(12), p. 46-49, 2003.
- WILLETT, K. L.; LIENESCH, L. A.; DI GIULIO, R. T. No detectable DNA excision repair in UV-exposed hepatocytes from two catfish species. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 128, p. 349-358, 2001.
- WILLIAMSON, C.; NEALE, P. J.; GRAD, G.; LANGE, H. J.; HARGREAVES, B. R. Beneficial and detrimental effects of UV on aquatic organisms: implications of spectral variation. **Ecol. Appl.**, v. 1(6), p. 1843-1857, 2001.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 3rd. ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, 1996 .

Figura 1. Sistema utilizado para manutenção dos peixes durante as exposições à lâmpada fluorescente e à radiação ultravioleta (1: tampo superior do sistema; 2: barra com rosca sem fim para regulagem de altura das lâmpadas; 3: sistema de troca de água).

Figura 2. Classe de danos: CLASSE 0: Sem dano – cabeça grande e intacta e cometa sem cauda; CLASSE 1: Leve dano – cabeça grande e um pouco afetada; cauda pequena com tamanho igual ou menor que o diâmetro da cabeça; largura da cauda é menor que o diâmetro da cabeça; CLASSE 2: Dano médio – cabeça grande e um pouco afetada; cauda pequena com tamanho entre uma ou duas vezes o diâmetro da cabeça; largura da cauda é menor que o diâmetro da cabeça; CLASSE 3: Dano elevado – cabeça reduzida; cauda longa e larga; tamanho da cauda entre duas ou três vezes o diâmetro da cabeça; largura da cauda é duas ou três vezes o diâmetro da cabeça; CLASSE 4: Dano extremo – cabeça bem reduzida; cauda longa e larga cujo contorno é difícil de se determinar devido à dispersão de pequenos fragmentos de DNA.

Figura 3. Média do índice de dano de grupos de peixes pré-expostos às concentrações de antraceno de 8, 16 e 32µg/L e subsequente submetidos a um período cumulativo de 10 horas (5hs/dia) de exposição à luz de lâmpadas fluorescentes. (Ctrl H₂O): Controle em água limpa; (Ctrl ETOH): Controle em água com solvente etanol 0,01%; (8, 16 e 32µg/L): Grupos expostos às diferentes concentrações de antraceno. Barras indicam desvio padrão.

Figura 4. Média do índice de dano de grupos de peixes pré-expostos às concentrações de antraceno de 8, 16 e 32µg/L e subsequente submetidos a um período cumulativo de 20 horas (5hs/dia) de exposição à luz de lâmpadas fluorescentes. (Ctrl H₂O): Controle em água limpa; (Ctrl ETOH): Controle em água com solvente etanol 0,01%; (8, 16 e 32µg/L): Grupos expostos às diferentes concentrações de antraceno. Barras indicam desvio padrão.

Figura 5. Média do índice de dano de grupos de peixes pré-expostos às concentrações de antraceno de 8, 16 e 32µg/L e subsequentemente submetidos a um período cumulativo de 30 horas (5hs/dia) de exposição à luz de lâmpadas fluorescentes. (Ctrl H₂O): Controle em água limpa; (Ctrl ETOH): Controle em água com solvente etanol 0,01%; (8, 16 e 32µg/L): Grupos expostos às diferentes concentrações de antraceno. Barras indicam desvio padrão.

Figura 6. Média do índice de dano dos grupos de peixes mantidos em água limpa por 24 horas no escuro e posteriormente expostos à luz de lâmpadas fluorescentes por períodos cumulativos de 10, 20 e 30hs (5hs/dia), em água limpa. Barras indicam desvio padrão.

Figura 7. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos à solução de etanol 0,01% por 24 horas no escuro e posteriormente expostos à luz de lâmpadas fluorescentes por períodos cumulativos de 10, 20 e 30hs (5hs/dia), em água limpa. Barras indicam desvio padrão.

Figura 8. Média do índice de dano dos grupos de peixes mantidos em água limpa e na ausência de luz por 48, 96 e 144hs, correspondentes aos períodos cumulativos de 10, 20 e 30hs, respectivamente. Barras indicam desvio padrão.

Figura 9. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos por 24hs no escuro à solução de antraceno de $8\mu\text{g/L}$ e posteriormente submetidos à luz de lâmpadas fluorescentes por períodos cumulativos de 10, 20 e 30hs (5hs/dia), em água limpa. Barras indicam desvio padrão.

Figura 10. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos por 24hs no escuro à solução de antraceno de $16\mu\text{g/L}$ e posteriormente submetidos à luz fluorescente sem radiação ultravioleta por períodos cumulativos de 10, 20 e 30hs (5hs/dia), em água limpa. Barras indicam desvio padrão.

Figura 11. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos por 24hs no escuro à solução de antraceno de 32 $\mu\text{g/L}$ e posteriormente submetidos à luz fluorescente sem radiação ultravioleta, por períodos cumulativos de 10, 20 e 30hs (5hs/dia), em água limpa. Barras indicam desvio padrão.

Figura 12. Média do índice de dano dos grupos de peixes submetidos a um período de 2 horas de exposição à radiação ultravioleta B (35 $\mu\text{W/cm}^2$). (Ctrl H₂O): Controle na água limpa; (Ctrl ETOH): Controle em água com solvente etanol 0,01%; (8, 16 e 32 $\mu\text{g/L}$): Grupos expostos a diferentes concentrações de antraceno. Barras indicam desvio padrão.

Exposição 4hs (2hs/dia) RUVB

Figura 13. Média do índice de dano dos grupos de peixes submetidos a um período de 4 horas (2 horas/dia) de exposição à radiação ultravioleta B ($35\mu\text{W}/\text{cm}^2$). (Ctrl H₂O): Controle na água limpa; (Ctrl ETOH): Controle em água com solvente etanol 0,01%; (8, 16 e 32µg/L): Grupos expostos a diferentes concentrações de antraceno. Barras indicam desvio padrão.

Exposição 5hs RUVB

Figura 14. Média do índice de dano dos grupos de peixes submetidos a um período de 5 horas de exposição à radiação ultravioleta B ($35\mu\text{W}/\text{cm}^2$). (Ctrl H₂O): Controle na água limpa; (Ctrl ETOH): Controle em água com solvente etanol 0,01%; (8, 16 e 32µg/L): Grupos expostos a diferentes concentrações de antraceno. Barras indicam desvio padrão.

Figura 15. Média do índice de dano dos grupos de peixes mantidos em água limpa por 24 horas no escuro e posteriormente submetidos à radiação de ultravioleta B ($35\mu\text{W}/\text{cm}^2$) por períodos não cumulativos de 2 e 5hs e por um período cumulativo de 4hs* (2hs/dia), em água limpa. Barras indicam desvio padrão.

Figura 16. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos por 24hs no escuro em solução de etanol 0,01% e posteriormente submetidos à radiação ultravioleta B ($35\mu\text{W}/\text{cm}^2$) por períodos não cumulativos de 2 e 5hs e por um período cumulativo de 4hs* (2hs/dia), em água limpa. Barras indicam desvio padrão.

Figura 17. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos por 24hs no escuro à solução de antraceno na concentração de $8\mu\text{g/L}$ e posteriormente submetidos à radiação ultravioleta B ($35\mu\text{W/cm}^2$) por períodos não cumulativos de 2 e 5hs e um período cumulativo de 4hs* (2hs/dia), em água limpa. Barras indicam desvio padrão.

Figura 18. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos por 24hs no escuro à solução de antraceno na concentração de $16\mu\text{g/L}$ e posteriormente submetidos à radiação ultravioleta B ($35\mu\text{W/cm}^2$) por períodos não cumulativos de 2 e 5hs e um período cumulativo de 4hs* (2hs/dia), em água limpa. Barras indicam desvio padrão.

Figura 19. Média do índice de dano dos grupos de peixes pré-expostos por 24hs no escuro à solução de antraceno na concentração de 32 μ g/L e posteriormente submetidos à radiação ultravioleta B (35 μ W/cm²) por períodos não cumulativos de 2 e 5hs e um período cumulativo de 4hs* (2hs/dia), em água limpa. Barras indicam desvio padrão.

Figura 20. Mortalidade cumulativa dos peixes pré-expostos à água limpa (Ctrl H₂O) e à solução de etanol 0,01% (Ctrl ETOH), por 24 horas no escuro e posteriormente expostos à radiação ultravioleta B (RUVB - 35μW/cm²) por um período de 5hs/dia, durante dois dias em água limpa. (A contagem dos indivíduos mortos ao longo de cada dia de exposição foi realizada em três intervalos, cada um de 5hs, após o desligamento de lâmpada; (A), (B) e (C): peixes destinados a serem expostos à radiação ultravioleta B (RUVB) por períodos cumulativos de 10, 20 e 30hs - 5hs/dia).

Figura 21. Mortalidade cumulativa dos peixes pré-expostos às soluções de antraceno de 8 e 16 µg/L, por 24 horas no escuro e posteriormente expostos à radiação ultravioleta B (RUVB - 35 µW/cm²) por um período de 3hs/dia durante dois dias em água limpa. (A contagem dos indivíduos mortos ao longo de cada dia de exposição foi realizada em três intervalos de 5 horas cada após o desligamento da lâmpada).

Figura 22. Média e Desvio Padrão do Índice de Dano (ID) de cinco peixes cada, pré-expostos em soluções de antraceno nas concentrações de 8 e 16 µg/L por 24 horas no escuro e posteriormente expostos à radiação ultravioleta B (35 µW/cm²) em água limpa por um período de 3hs.

Figura 23. Mortalidade cumulativa dos peixes pré-expostos às soluções de antraceno nas concentrações de 8, 16 e 32 µg/L, por 24 horas no escuro e posteriormente expostos à radiação ultravioleta B (RUVB - 35µW/cm²) por um período de 2hs/dia, durante dois dias, em água limpa. (A contagem dos indivíduos mortos ao longo de cada dia de exposição foi realizada em três intervalos de 5 horas cada após o desligamento da lâmpada).

Figura 24. Média e Desvio Padrão do Índice de Dano (ID) de cinco peixes cada, pré-expostos em água limpa (Ctrl H₂O) e solução de etanol 0,01% (Ctrl ETOH), por 24 horas no escuro e posteriormente expostos à radiação ultravioleta B (35µW/cm²) em água limpa por um período de 4hs (2horas/dia).

Figura 25. Mortalidade cumulativa dos peixes pré-expostos em água limpa (Ctrl H₂O), solução de etanol 0,01% (Ctrl ETOH), soluções de antraceno nas concentrações de 8, 16 e 32µg/L, por 24 horas no escuro e posteriormente expostos à radiação ultravioleta B (RUVB - 35µW/cm²) por um período de 2hs/dia, durante três dias, em água limpa (A contagem dos indivíduos mortos ao longo de cada dia de exposição foi realizada em três a quatro intervalos de 5hs após o desligamento de lâmpada, até a mortalidade total).

Figura 26. *Trachinotus carolinus* apresentando alterações no padrão de coloração das regiões indicadas (setas).

Tabela 1. Intensidade da radiação ultravioleta ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) obtida variando a altura das lâmpadas em relação à superfície da água e/ou o número de lâmpadas instaladas.

Número de lâmpadas	Altura lâmpada (cm)	Média da Intensidade UV ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)
12	60	137
12	38	249
9	60	111
9	38	122
9	68	100
6	68	58
3	68	39
3	68	29

Tabela 2. Mortalidade de peixes mantidos em água limpa (Ctrl H₂O) e solução de etanol 0,01% (Ctrl ETOH), durante 24hs no escuro, e posteriormente expostos, em água limpa, a diferentes intensidades de radiação ultravioleta durante os períodos cumulativos de 10, 20 e 30 horas (5hs/dia).

Tratamento durante pré-exposição	Duração cumulativa de exposição (horas)	Altura da lâmpada (cm)	Nº de lâmpadas	Intensidade da RUV ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)	Nº de mortos
Ctrl H ₂ O	10	38	9 ^a	241	10
Ctrl ETOH	10	38	9	241	10
Ctrl H ₂ O	20	38	9	241	10
Ctrl ETOH	20	38	9	241	10
Ctrl H ₂ O	30	38	9	241	10
Ctrl ETOH	30	38	9	241	10
Ctrl H ₂ O	30	68	12 ^b	135	10
Ctrl H ₂ O	10	68	3 ^c	35	10
Ctrl ETOH	10	68	3	35	10
Ctrl H ₂ O	20	68	3	35	10
Ctrl ETOH	20	68	3	35	10
Ctrl H ₂ O	30	68	3	35	10
Ctrl ETOH	30	68	3	35	10
Ctrl H ₂ O	10	68	3	24*	10

a: 3 lâmpadas para cada dois aquários;

b: 4 lâmpadas para cada dois aquários;

c: uma lâmpada para cada dois aquários. As lâmpadas foram instaladas de forma eqüidistante em relação aos aquários;

* lâmpada envolta com três camadas de filme plástico.

Tabela 3. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 3.

10 horas	Ctrl H ₂ O	Ctrl ETOH	Ctrl Escuro	8µg/L	16µg/L	32µg/L
Ctrl H ₂ O		0.707646	0.826499	0.000126	0.000161	0.000138
Ctrl ETOH	0.707646		0.834841	0.000161	0.000129	0.000126
Ctrl Escuro	0.826499	0.834841		0.000129	0.000152	0.000161
8µg/L	0.000126	0.000161	0.000129		0.208183	0.612587
16µg/L	0.000161	0.000129	0.000152	0.208183		0.188797
32µg/L	0.000138	0.000126	0.000161	0.612587	0.188797	

Tabela 4 Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 4.

20 horas	Ctrl H ₂ O	Ctrl ETOH	Ctrl Escuro	8µg/L	16µg/L	32µg/L
Ctrl H ₂ O		0.826499	0.216897	0.518205	0.000251	0.000129
Ctrl ETOH	0.826499		0.313258	0.384186	0.000206	0.000164
Ctrl Escuro	0.216897	0.313258		0.109627	0.000133	0.000141
8µg/L	0.518205	0.384186	0.109627		0.000415	0.000133
16µg/L	0.000251	0.000206	0.000133	0.000415		0.000151
32µg/L	0.000129	0.000164	0.000141	0.000133	0.000151	

Tabela 5. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 5.

30 horas	Ctrl H ₂ O	Ctrl ETOH	Ctrl Escuro	8µg/L	16µg/L	32µg/L
Ctrl H ₂ O		0.814825	0.331350	0.626493	0.000133	0.000164
Ctrl ETOH	0.814825		0.395585	0.906324	0.000129	0.000141
Ctrl Escuro	0.331350	0.395585		0.315934	0.000150	0.000133
8µg/L	0.626493	0.906324	0.315934		0.000164	0.000129
16µg/L	0.000133	0.000129	0.000150	0.000164		0.200350
32µg/L	0.000164	0.000141	0.000133	0.000129	0.200350	

Tabela 6. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 6.

Ctrl H₂O	10 horas	20 horas	30 horas
10 horas		0.027817	0.054530
20 horas	0.027817		0.402256
30 horas	0.054530	0.402256	

Tabela 7. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 7.

Ctrl ETOH	10 horas	20 horas	30 horas
10 horas		0.040506	0.025488
20 horas	0.040506		0.817647
30 horas	0.025488	0.817647	

Tabela 8. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 8.

Ctrl escuro	10 horas	20 horas	30 horas
10 horas		0.656766	0.039297
20 horas	0.656766		0.036853
30 horas	0.039297	0.036853	

Tabela 9. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 9.

8 µg/L	10 horas	20 horas	30 horas
10 horas		0.000172	0.000190
20 horas	0.000172		0.238182
30 horas	0.000190	0.238182	

Tabela 10. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 10.

16 µg/L	10 horas	20 horas	30 horas
10 horas		0.009177	0.908570
20 horas	0.009177		0.018550
30 horas	0.908570	0.018550	

Tabela 11. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 11.

32 µg/L	10 horas	20 horas	30 horas
10 horas		0.155103	0.985280
20 horas	0.155103		0.309398
30 horas	0.985280	0.309398	

Tabela 12. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 12.

2 horas	Ctrl H ₂ O	Ctrl ETOH	8µg/L	16µg/L	32µg/L
Ctrl H ₂ O		0.867024	0.132148	0.000986	0.393194
Ctrl ETOH	0.867024		0.158962	0.001023	0.559473
8µg/L	0.132148	0.158962		0.017020	0.263077
16µg/L	0.000986	0.001023	0.017020		0.003486
32µg/L	0.393194	0.559473	0.263077	0.003486	

Tabela 13. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 14.

5 horas	Ctrl H ₂ O	Ctrl ETOH	8µg/L	16µg/L	32µg/L
Ctrl H ₂ O		0.322326	0.958139	0.874660	0.001473
Ctrl ETOH	0.322326		0.169979	0.381207	0.007521
8µg/L	0.958139	0.169979		0.975332	0.000911
16µg/L	0.874660	0.381207	0.975332		0.001584
32µg/L	0.001473	0.007521	0.000911	0.001584	

Tabela 14. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 17.

8 µg/L	Exp 2hs	Exp 4hs*	Exp 5hs
Exp 2hs		0.081585	0.016988
Exp 4hs*	0.081585		0.194422
Exp 5hs	0,016988	0.194422	

Tabela 15. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 18.

16 µg/L	Exp 2hs	Exp 4hs*	Exp 5hs
Exp 2hs		0,036811	0,017804
Exp 4hs*	0,036811		0,386084
Exp 5 hs	0,017804	0,386084	

Tabela 16. Resultado do teste Newman-Keuls referente aos dados apresentados na Figura 19.

32 µg/L	Exp 2hs	Exp 4hs*	Exp 5hs
Exp 2hs		0,000889	0,001617
Exp 4hs*	0,000889		0,858133
Exp 5 hs	0,001617	0,858133	