

Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Zoologia  
Programa de Pós-graduação em Entomologia

Efeitos genotóxicos e biológicos em *Chironomus sancticaroli* (Strixino & Strixino, 1981) causados pela exposição ao fenantreno

Curitiba

2014

Gisele dos Santos Morais

Efeitos genotóxicos e biológicos em *Chironomus sancticaroli* (Strixino & Strixino, 1981) causados pela exposição ao fenantreno

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas Área de Concentração Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Entomologia.

Orientador:  
Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

Co-Orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Margarete Cestari

Curitiba  
2014

GISELE DOS SANTOS MORAIS

"Efeitos genotóxicos e biológicos em *Chironomus sancticaroli* (Strixino & Strixino, 1981) causados pela exposição ao fenantreno"

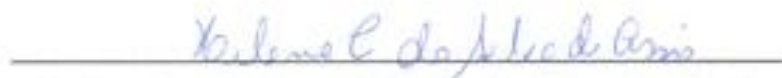
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Mestre em Ciências Biológicas", no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva (Orientador)  
(UFPR)



Profa. Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf  
(UTFPR)



Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis  
(UFPR)

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva, pela orientação, apoio, conselhos, disponibilização do laboratório e principalmente por acreditar na realização do projeto.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Margarete Cestari (Departamento de Genética) pela co-orientação e disponibilização do laboratório.

A doutoranda Emanuelli Pesenti (Genética) pelo grande auxílio com os ensaios de genotoxicidade.

Ao doutorando Mário Pessoa Guedes (Entomologia) pelo auxílio na estatística do trabalho.

A Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação Entomologia e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), e professores pela formação e a concessão da bolsa.

Aos colegas do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) Ana, Betina, Débora, Maiara, Mário, Oscar, Thalita, Vinícius, pela compreensão, ensinamentos, discussões e auxílio no trabalho.

Aos colegas de Pós Graduação, pela amizade e companheirismo.

Aos Amigos, Betina, Maria Fernanda, Camila e Mário, pela amizade, conselhos e por estarem sempre presentes.

Aos meus pais Benedito e Elide, irmãs Michele e Gracyelle, cunhados e cunhadas, Antônio Márcio, Márcio, Aline, Franciele e Heloísa, meu sobrinho João e aos meus sogros Maria e Joaquim, pela alegria, conforto, força, conselhos e por estarem sempre presente.

Ao meu amor, Cristiano e meu querido filho, Pedro, por serem meus pilares e estarem sempre presente me dando alegria.

## RESUMO

O fenantreno está entre os 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, considerados prioritários para o monitoramento ambiental. Contudo, os danos ao DNA, sobre os organismos bentônicos, são pouco conhecidos. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos, em exposição aguda (96 horas) e crônica (oito dias), e na biologia de *Chironomus sancticaroli* em exposição crônica, ao fenantreno. Primeiramente, bioensaios agudos foram feitos para determinar as concentrações letais, obtendo-se  $CL_2 = 0,83 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $CL_{10} = 1,06$ ,  $CL_{30} = 1,34 \text{ mg.l}^{-1}$  e  $CL_{50} = 1,6 \text{ mg.l}^{-1}$ . O fenantreno demonstrou ser genotóxico às larvas de *C. sancticaroli* em exposição aguda, nas concentrações  $0,16 \text{ mg.l}^{-1}$  (CENO- concentração de efeito não observado)  $0,83 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $1,06 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $1,34 \text{ mg.l}^{-1}$  e  $1,6 \text{ mg.l}^{-1}$  e em exposição crônica nas concentrações  $0,83 \text{ mg.l}^{-1}$  e  $1,06 \text{ mg.l}^{-1}$ . Os parâmetros biológicos foram avaliados em exposição crônica nas concentrações  $0,83 \text{ mg.l}^{-1}$  e  $1,06 \text{ mg.l}^{-1}$ . O fenantreno provocou redução do tamanho da cápsula cefálica e atrasos no desenvolvimento larval para ambas as concentrações analisadas. Atrasos na emergência dos adultos e dos machos e redução no número de indivíduos adultos foram observados em todas as concentrações avaliadas. A fecundidade potencial não sofreu alteração em exposição ao fenantreno. Os resultados sugerem que o fenantreno é genotóxico as larvas de *C. sancticaroli* e provoca alterações em nível populacional.

**Palavra chave:** HPAs, Ensaio Cometa, Desenvolvimento, Emergência

## ABSTRACT

The phenanthrene is among the 16 PAHs considered relevant for environment monitoring. Therefore, DNA damage on benthic organisms are few studied. The objective of this study was to evaluate the genotoxic effects on acute (96 hours) and chronic (eight days) and in biology of *Chironomus sancticaroli* in chronic exposure to phenanthrene. First, acute bioassay for calibration of lethal concentration was carried out, obtaining  $LC_2 = 0,83 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $LC_{10} = 1,06$ ,  $LC_{30} = 1,34 \text{ mg.l}^{-1}$  and  $LC_{50} = 1,6 \text{ mg.l}^{-1}$ . The phenanthrene demonstrated to be genotoxic for *C. sancticaroli* larvae in acute exposure at  $0,16 \text{ mg.l}^{-1}$  (NOEC - No Observed Effect Concentrations),  $0,83 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $1,06 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $1,34 \text{ mg.l}^{-1}$  and  $1,6 \text{ mg.l}^{-1}$  concentrations and in chronic exposure at  $0,83 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $1,06 \text{ mg.l}^{-1}$  concentrations. Biologics parameters were evaluate in chronic exposure at  $0,83 \text{ mg.l}^{-1}$  and  $1,06 \text{ mg.l}^{-1}$  concentrations. The phenanthrene caused reduction on the size of the head capsule and delay of larvae development in two concentrations evaluated. Delay in adults emergence, males emergence and reduction of adults number, were observed in all concentrations evaluated. The potential fecundity wasn't modified by phenanthrene exposure. The resulted indicated that the phenanthrene is genotoxic for *C. sancticaroli* larvae and cause effects in population level.

**Keywords:** PHAs, comet assay, development, emergency

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura química do fenantreno, representando os três anéis aromáticos (C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> ).....	15
FIGURA 2. Aquário (25 cm x 15 cm x 25 cm) com capacidade de 10 litros utilizados para manutenção da colônia matriz de <i>C. sancticaroli</i> , em sala de criação sob condições controladas de temperatura e luminosidade.....	25
FIGURA 3. Representação do método utilizado para o teste de sensibilidade ao KCl sob as concentrações de 1,5; 2,25; 3,5; 5,0 e 7,5 g.L <sup>-1</sup> , representando as etapas de criação e exposição das larvas. C1= Primeira concentração avaliada. CN= diferentes concentrações avaliadas.....	27
FIGURA 4. Método utilizado para a preparação do ensaio de toxicidade aguda (96 horas), com as etapas de criação e exposição das larvas. C1= primeira concentração avaliada; CN= diferentes concentrações avaliadas.....	31
FIGURA 5. Índice de mortalidade observado nos testes crônicos prévios por concentração de fenantreno.....	32
FIGURA 6. Método utilizado para a preparação do ensaio de toxicidade crônica (8 dias), representando as etapas de criação e exposição das larvas. Os copos permaneceram tampados, sendo representados na figura sem tampa. CN= diferentes concentrações avaliadas.....	33
FIGURA 7. Padrão de danos ao DNA em larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> . (A) dano 0; (B) dano 1; (C) dano 2; (D) dano 3; (E) dano 4.....	36
FIGURA 8. Cápsula cefálica de <i>Chironomus sancticaroli</i> indicando o procedimento utilizado para determinar do comprimento da estrutura.....	37
FIGURA 9. Asa direita de fêmea indicando o procedimento utilizado para determinar o tamanho da estrutura.....	39
FIGURA 10. Concentração letal 50% (CL <sub>50</sub> ) por teste de sensibilidade, incluindo limite inferior, limite superior e a média.....	41
FIGURA 11. Porcentagem de células encontrados para cada nível de dano (0,1,2,3,4) nos grupos controle (H <sub>2</sub> O e solvente) e grupos expostos por 96 horas	45
FIGURA 12. Mensuração dos danos ao DNA em larvas de <i>C. sancticaroli</i> demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos por 96 horas (aguda) ao fenantreno, indicando a mediana e valor mínimo e máximo. Diferentes letras indicam diferença significativa com p≤0,05 (Teste de Kruskal-Wallis).....	46
FIGURA 13. Porcentagem de células encontrados para cada classe de dano	

(0,1,2,3,4) nos grupos controle (H <sub>2</sub> O e solvente) e grupos expostos por oito dias.	47
FIGURA 14. Mensuração dos danos ao DNA em larvas de <i>C. sancticaroli</i> demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos por 8 dias (crônica) ao fenantreno, indicando a mediana e valor mínimo e máximo. Diferentes letras indicam diferença significativa com $p \leq 0,05$ (Teste de Kruskal-Wallis).....	48
FIGURA 15: Tamanho da cápsula cefálica das larvas de <i>C. sancticaroli</i> demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos ao fenantreno durante oito dias, indicando a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativa $p \leq 0,05$ (ANOVA-one way com teste <i>a posteriori</i> de Tukey).....	49
FIGURA 16. Porcentagem de larvas encontradas em cada instar para cada grupo controle (H <sub>2</sub> O e solvente) e grupos expostos por 8 dias ao fenantreno.....	51
FIGURA 17. Emergência dos adultos de <i>C. sancticaroli</i> demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos ao fenantreno durante oito dias, indicando a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativa $p \leq 0,05$ (ANOVA-one way com teste <i>a posteriori</i> de Tukey).....	52
FIGURA 18. Emergência dos machos de <i>C. sancticaroli</i> demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos ao fenantreno durante oito dias, indicando a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativa $p \leq 0,05$ (ANOVA-one way com teste <i>a posteriori</i> de Tukey).....	53
FIGURA 19. Emergência das fêmeas de <i>C. sancticaroli</i> demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos ao fenantreno durante oito dias, indicando a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativa $p \leq 0,05$ (ANOVA-one way com teste <i>a posteriori</i> de Tukey).....	53
FIGURA 20. Total dos adultos de <i>C. sancticaroli</i> demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos ao fenantreno durante oito dias, indicando a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas $p \leq 0,05$ (ANOVA-one way com teste <i>a posteriori</i> de Tukey).....	54
FIGURA 21. Fecundidade potencial das fêmeas de <i>C. sancticaroli</i> demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos ao fenantreno durante oito dias, indicando a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas $p \leq 0,05$ (ANOVA-one way com teste <i>a posteriori</i> de Tukey).....	55

## LISTA DE TABELAS

TABELA I. Propriedades físico-químicas dos HPAs. Número de anéis aromáticos; <i>PM</i> , peso molecular (g.mol <sup>-1</sup> ); <i>S</i> , solubilidade (mg.L <sup>-1</sup> ); <i>PV</i> , pressão de vapor (Pa – Pascal); <i>H</i> , constante de Henry (Pa m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> ); <i>Log K<sub>oa</sub></i> , coeficiente de partição (octanol/água).....	13
TABELA II. Reagentes utilizados na preparação da solução estoque I e solução estoque II, utilizadas no preparo da água reconstituída.....	28
TABELA III. Valores totais de amostras avaliadas através do ensaio cometa em exposição aguda (96 horas) e crônica (8 dias).....	36
TABELA IV. Medidas do tamanho da cápsula cefálica utilizadas para a definição dos instares propostos por Richardi <i>et al.</i> (2013) e as utilizadas no presente trabalho em milímetros (mm). – Não definido.....	38
TABELA V. Valores da concentração letal de 50% (CL <sub>50</sub> ) em g.l <sup>-1</sup> , obtidos no teste de sensibilidade indicando nível de confiança (NC), intervalo de confiança, média (X), desvio padrão (S), variância (S <sup>2</sup> ) e coeficiente de variação (CV) em porcentagem.....	40
TABELA VI. Resultados obtidos para os parâmetros da água reconstituída, demonstrando o valor médio e o desvio padrão.....	42
TABELA VII. Concentrações letais (CL) de fenantreno pela exposição aguda de <i>Chironomus sancticaroli</i> , expressas em mg.l <sup>-1</sup> , com nível de confiança (NC %) e intervalo de confiança (IC).....	43
TABELA VIII. Escores das lâminas obtido para os grupos controle (H <sub>2</sub> O, solvente) e grupos expostos ao fenantreno por 96 horas. (-) Indica lâminas com ausência de dados.....	44
TABELA IX. Escores das lâminas obtido para os grupos controle (H <sub>2</sub> O, solvente) e grupos expostos ao fenantreno por 8 dias (crônica). (-) Indica lâminas com ausência de dados.....	47
TABELA X. Número de larvas por instar nos grupos controle (água e solvente) e grupos expostos (0,16 mg.l <sup>-1</sup> ; 0,83 mg.l <sup>-1</sup> ), demonstrando tamanho mínimo e máximo observado para cada instar, média, desvio padrão e intervalo de confiança.....	50
TABELA XI. Comprimento da cápsula cefálica obtido para cada larva (n=70) nos grupos controle (H <sub>2</sub> O e solvente) e grupos expostos por oito dias ao fenantreno indicando o valor médio.....	70

TABELA XII. Tamanho das asas (M (mm)) e fecundidade potencial (F.) de 30 fêmeas para os grupos controle (H<sub>2</sub>O, solvente) e grupos expostos por oito dias ao fenantreno indicando o valor médio..... **72**

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ATSDR</b>	<i>Agency for Toxic Substance and Diseases Registry</i>
<b>CENO</b>	Concentração de efeito não observado
<b>CETESB</b>	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
<b>CL</b>	Concentração letal
<b>CL<sub>2</sub></b>	Concentração letal a 2% dos organismos
<b>CL<sub>5</sub></b>	Concentração letal a 5% dos organismos
<b>CL<sub>8</sub></b>	Concentração letal a 8% dos organismos
<b>CL<sub>10</sub></b>	Concentração letal a 10% dos organismos
<b>CL<sub>30</sub></b>	Concentração letal a 30% dos organismos
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentração letal que mata 50% dos organismos
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional do Meio Ambiente
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribunucleico
<b>HPAs</b>	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
<b>OECD</b>	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
<b>PHE</b>	Fenantreno
<b>PPM</b>	Parte por milhão ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>USEPA</b>	<i>United States Agency Ambiental</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

## LISTA DE SIGLAS

<b>CaCO<sub>3</sub></b>	Carbonato de cálcio
<b>g</b>	Gramas
<b>mg CaCO<sub>3</sub>.l<sup>-1</sup></b>	Miligramas de carbonato de cálcio por litro
<b>mg.Kg<sup>-1</sup></b>	Miligramas por quilo
<b>mg.l<sup>-1</sup></b>	Miligramas por litro
<b>mg.ml<sup>-1</sup></b>	Miligramas por mililitro
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mA</b>	Miliamperes
<b>M</b>	Mol
<b>mM</b>	Milimol
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>®</b>	Registrado
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>µl</b>	Micro litro
<b>µg.ml<sup>-1</sup></b>	Microgramas por mililitro
<b>≤</b>	Menor ou igual

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
2.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	13
2.1.1 Fenantreno.....	15
2.2 Bioindicadores ambientais.....	16
2.2.3 Família Chironomidae.....	17
2.2.4 <i>Chironomus sancticaroli</i> (Strixino & strixino 1981).....	18
2.3 Ecotoxicologia.....	18
2.3.1 Bioensaios de toxicidade.....	19
2.3.2 Respostas biológicas.....	19
2.4 Genotoxicidade.....	20
2.4.1 Ensaio Cometa.....	21
2.5 Parâmetros biológicos.....	21
2.5.1 Tamanho da cápsula cefálica.....	21
2.5.2 Emergência dos adultos.....	22
2.5.3 Fecundidade.....	22
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>23</b>
3.1 Objetivos específicos.....	23
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1 Material biológico.....	24
4.2 Manutenção da colônia matriz de <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	24
4.3 Avaliação da colônia matriz de <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	25
4.4 Condições dos bioensaios de toxicidade .....	26
4.4.1 Substrato artificial .....	26
4.4.2 Água reconstituída .....	28
4.5 Análise físico-química da água reconstituída.....	28
4.6 Limpeza dos materiais .....	28
4.7 Bioensaios de toxicidade aguda .....	29
4.7.1 Criação das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	29
4.7.2 Exposição aguda das larvas de <i>C. sancticaroli</i> ao fenantreno .....	29

4.8	Determinação das concentrações letais (CL) do fenantreno .....	30
4.9	Bioensaios de toxicidade crônica .....	30
4.9.1	Criação das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	30
4.9.2	Exposição crônica das larvas de <i>C. sancticaroli</i> ao fenantreno.....	30
4.10	Ensaio cometa alcalino.....	34
4.10.1	Montagem das lâminas.....	34
4.10.2	Contabilização dos danos.....	35
4.11	Parâmetros biológicos .....	37
4.11.1	Tamanho da cápsula cefálica.....	37
4.11.2	Emergência dos adultos.....	38
4.11.3	Fecundidade potencial das fêmeas .....	38
4.12	Análise dos dados.....	39
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
5.1	Avaliação da colônia matriz de <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	40
5.2	Análise físico-química da água reconstituída.....	42
5.3	Calibração das concentrações letais (CL).....	42
5.4	Ensaio cometa alcalino.....	43
5.4.1	Bioensaio de toxicidade aguda .....	43
5.4.2	Bioensaio de toxicidade crônica .....	46
5.5	Parâmetros biológicos.....	49
5.5.1	Tamanho da cápsula cefálica.....	49
5.5.2	Emergência dos adultos .....	51
5.5.3	Fecundidade potencial das fêmeas.....	54
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>63</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>70</b>

## INTRODUÇÃO

O constante aumento da produção industrial e agrícola, aliada ao aumento populacional, tem produzido uma grande quantidade de resíduos químicos excedentes. Por falta de tratamento adequado, muitas vezes esses compostos atingem o ecossistema aquático, o qual é utilizado em algumas situações como um grande depósito de efluentes. Isto causa como consequência, alterações na composição química e física do ambiente provocando redução na biodiversidade, alterações na estrutura e dinâmica das comunidades, assim como representa um risco à saúde humana (Jha 2008; Sanseverino & Nessimian 2008).

Existe a necessidade de se conhecer a toxicidade dos compostos químicos sobre os organismos e o impacto causado no ambiente, de modo a se estipular regras para o uso e descarte e cuidado no manuseio para reduzir os riscos acidentes com compostos químicos o meio aquático (Callisto *et al.* 2001; Freire *et al.* 2008).

Dentre as substâncias que chegam no meio aquático os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são considerados relevantes para o monitoramento ambiental (USEPA 1986). Entre os 16 HPAs com efeitos ambientais considerados importantes pela *United States Environmental Agency* (1986), está o fenantreno. Este permanece em grande parte adsorvido ao substrato podendo causar efeitos tóxicos aos organismos bentônicos em curto e longo prazo. Embora este composto seja considerado genotóxico, provocando mutações, e neurotóxico, atuando na expressão enzimática, ainda não são conhecidos os danos ao DNA causados sobre os quironomídeos, que se destacam entre os invertebrados bentônicos como bioindicadores ambientais. Possuem também, grande importância na cadeia alimentar, servindo como alimento a diversas espécies de peixes (USEPA 1986; Han *et al.* 2004; Martyniuk *et al.* 2009).

Neste contexto, este trabalho visa determinar os efeitos do fenantreno sobre *Chironomus sancticaroli* em diferentes níveis de organização biológica, molecular e populacional, o que pode auxiliar na compreensão dos efeitos tóxicos causados aos organismos e o risco ambiental ocasionado pela presença do fenantreno no sedimento.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos são compostos químicos considerados prioritários no estudo de contaminação ambiental (Meire *et al.* 2007). Isto é decorrente da ampla distribuição nos ambientes aquático e terrestre, dos efeitos tóxicos causados aos organismos e, principalmente, por alguns HPAs atuarem potencialmente como agentes mutagênicos e cancerígenos (WHO 1998; Netto *et al.* 2000; Jacques 2007). Dentre as mais de 100 formas existentes 16 são listados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA 1986) como importantes na avaliação da qualidade ambiental (Tab. I).

Tabela I. Propriedades físico-químicas dos HPAs. Número de anéis aromáticos; *PM*, peso molecular (g.mol<sup>-1</sup>); *S*, solubilidade (mg.L<sup>-1</sup>); *PV*, pressão de vapor (Pa – Pascal); *H*, constante de Henry (Pa m<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>); *Log K<sub>oa</sub>*, coeficiente de partição (octanol/água).

HPAs	Nº. de Anéis	PM (g.mol <sup>-1</sup> )	S Mg.L <sup>-1</sup>	PV (Pa)	H (Pa m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )	Log K <sub>oa</sub>
Naftaleno	2	128	31	10,4	43,01	3,37
Acenaftileno	3	150	16,1	0,9	8,4	4,00
Acenafteno	3	154	3,8	0,3	12,17	3,92
Fluoreno	3	166	1,9	0,09	7,87	4,18
Fenantreno	3	178	1,1	0,02	3,24	4,57
Antraceno	3	178	0,045	0,001	3,96	4,54
Fluoranteno	4	202	0,26	0,00123	1,037	5,22
Pireno	4	202	0,132	0,0006	0,92	5,18
Benz[a]antraceno	4	228	0,011	2,80.10 <sup>-5</sup>	0,581	5,91
Criseno	4	228	nd	5,70.10 <sup>-7</sup>	0,065	5,86
Benz[b]fluoranteno	5	252	0,0015	nd	nd	5,80
Benz [k]fluoranteno	5	252	0,0008	5,20.10 <sup>-8</sup>	0,016	6,00
Benzo[a]pireno	5	252	0,0038	7,00.10 <sup>-7</sup>	0,046	6,04
Indeno[1,2,3-d]pireno	6	278	nd	nd	0,003	nd
Dibenzo[a,h]antraceno	5	278	0,0006	3,70.10 <sup>-10</sup>	nd	6,75
Benzo[g,h,i]perileno	6	268	0,00026	nd	0,075	6,50

(Fonte: Meire *et al.* 2007)

Os HPAs são compostos químicos formados exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio organizados em formas de anéis (USEPA 2008). Em temperatura de 25°C apresentam-se em fase sólida incolores ou amarelados, possuem alto ponto de fusão (80 a 262°C) e ebulição (218 a 496°C), baixa pressão de vapor e caráter lipofílico (apolares), tornando-se, em geral, mais insolúvel com o

aumento da massa molecular (WHO 2003). Podem ser encontrados isolados ou associados a outros compostos presentes no ambiente formando misturas complexas.

Chegam ao ambiente de forma natural ou como consequência da atividade antrópica, que representam a principal fonte emissora. Naturalmente são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, constituindo compostos que tem a função de proteger contra a herbivoria. A extração, refinamento, uso e derramamento acidental de derivados do petróleo, assim como o despejo inadequado de efluentes industriais, representam atividades antrópica que tem ocasionado aumento significativo nas concentrações de HPAs no ambiente (Netto *et al.* 2000; Meire *et al.* 2007).

No ambiente aquático, terrestre esses compostos permanecem por muito tempo, principalmente pela falta de microorganismos capazes de promover a sua degradação (Jacques *et al.* 2007 ). Na atmosfera podem estar na forma gasosa ou associado a partículas em suspensão (Cavalcanti 2010). No ambiente terrestre são adsorvidos a materiais presentes no solo, ficando retidos à camada mais externa (Netto *et al.* 2000). Em rios, lagos e oceanos a baixa solubilidade dos hidrocarbonetos favorece a associação à matéria orgânica e a deposição no sedimento, que compreende um importante local para estudos da toxicidade destas substâncias (Queiroz *et al.* 2004).

Os HPAs possuem maior afinidade a partículas sedimentares mais finas, ou seja, apresentam maior afinidade à solos com grande concentração de argila, entre eles estão, benzo(a)fenantreno, benzo(a)pireno e fenantreno. Isso proporciona uma maior área de contato do composto com o sedimento, tendo como consequência aumento da concentração e uma maior biodisponibilidade do agente químico aos organismos bentônicos (Cavalcanti 2010). Segundo Broddin (1977), cerca de 90% dos HPAs se associam facilmente a partículas de 3µm. Estas partículas são consideradas respiráveis, ou seja, possuem tamanho menor que o alvéolo pulmonar tornando possível a entrada do composto químico, juntamente com a partícula sedimentar, no organismo humano pela via respiratória (Broddin 1977).

A biodisponibilidade dos HPAs também depende de diversos fatores como temperatura, salinidade e pH. Os HPAs se tornam mais solúveis em condições de

temperatura entre 5°C e 30°C, salinidade entre 0% e 36% e pH entre 5 e 8 (Shin 2003; Jacques 2007).

Os HPAs entram nos organismos principalmente por ingestão ou absorção da pele. Apesar de serem rapidamente absorvidos pelos tecidos não apresentam potencial mutagênico direto, necessitando de transformação metabólica ou biotransformação. Esse processo ocorre associado à via de desintoxicação do organismo, por ação das enzimas mono-oxigenases do complexo citocromo P-450. Na primeira fase do processo, chamada de funcionalização, são formados metabólitos eletrofílicos que podem interagir com o DNA causando danos. Na fase II (conjugação), os eletrólitos se ligam a grupamentos hidrofílicos facilitando a sua excreção (Netto *et al.* 2000; WHO 2003).

O efeito dos HPAs vem sendo amplamente estudados em uma grande diversidade de organismos, como insetos, anelídeos, moluscos, peixes, plantas e seres humanos. Em quironomídeos, os HPAs afetam primeiramente a sobrevivência, causando alterações no ciclo de vida e inibição da produção de proteínas (Park & Choi 2009; Hannam *et al.* 2010; Nair & Choi 2011).

### 2.1.1 Fenantreno

O fenantreno (PHE) está entre os 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos indicados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos como prioritários para estudos de contaminação ambiental (USEPA 1986). Este composto é formado por três anéis aromáticos (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>) (Fig. 1), apresenta meia vida de dois dias no sedimento e baixa solubilidade em água (1,1 mg.l<sup>-1</sup>). Em temperatura de 25°C o fenantreno é geralmente incolor, podendo ter tons de amarelo (ATSDR 2008). Possui grande afinidade à partículas sedimentares de baixa granulometria, estando presente em elevadas concentrações em solos argilosos (Broddin 1976; Young 2000).

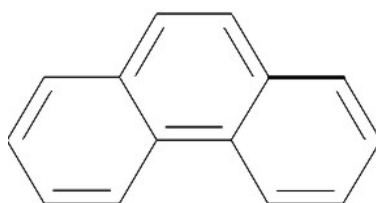


FIGURA 1. Estrutura química do fenantreno, representando os três anéis aromáticos (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>).

O pH também representa um fator importante na biodisponibilidade do fenantreno. Na presença de biosurfactantes, que são compostos gerados por microrganismos com capacidade de reduzir a tensão superficial e com alta capacidade emulsificante, a solubilidade do fenantreno é elevada em pH entre 4,5 e 5,5. Em condições com ausência de surfactantes a solubilidade também pode ser elevada em pH entre 5,5 e 7, aumentando a disponibilidade do composto também na coluna de água (Shin 2003).

O fenantreno pode ser produzido pela combustão incompleta da matéria orgânica decorrente da produção de óleo, gás e carvão. É usado na indústria para a produção de plásticos, pesticidas e corantes, sendo utilizado também na produção de explosivos e remédios (ATSDR 2008).

O PHE é considerado um HPA potencialmente genotóxico e neurotóxico (Netto *et al.* 2000; Martyniuk *et al.* 2009). Os efeitos do fenantreno foram estudados em anelídeos, moluscos, insetos e peixes e dentre os efeitos encontrados, estão a supressão do sistema imune, alteração na biologia populacional e redução da expressão da gonodotrofina e neurotransmissores. Para quironomídeos, estudos demonstram que o fenantreno provoca leve atraso no ciclo de vida, inibição na emergência dos adultos, atraso na emergência dos machos, atuando principalmente sobre a sobrevivência dos organismos (Paumen *et al.* 2007; Martyniuk *et al.* 2009; Brown 2010; Hannam *et al.* 2010; Marinkovic *et al.* 2011). Contudo, danos ao DNA em células de *Chironomus sancticaroli* ainda não são relatados na literatura.

## 2.2 Bioindicadores ambientais

Bioindicadores são organismos, espécies ou comunidades que respondem a situações adversas do ambiente sofrendo alterações em funções vitais ou acumulando toxinas, sendo escolhidos devido à sensibilidade ou tolerância a diversos parâmetros, dentre eles a presença de poluentes (Franco *et al.* 2000). No meio aquático os bioindicadores podem ser, por exemplo, organismos do plâncton, insetos, moluscos, anfíbios, peixes, plantas, bactérias (Zhou *et al.* 2008).

Os macroinvertebrados bentônicos são amplamente utilizados como bioindicadores apresentando características essenciais, como grande densidade

populacional, distribuição cosmopolita, sedentarismo, ciclo de vida relativamente longo e respondem rapidamente às alterações do ambiente que resultam em modificações no comportamento, morfologia ou fisiologia. Dentre os macroinvertebrados destaca-se a família Chironomidae (Diptera) (Callisto & Esteves 1998; Buss *et al.* 2008; Magalhães & Filho 2008).

### 2.2.3 Família Chironomidae

A família Chironomidae (Diptera) possui 20.000 espécies, distribuídas em 11 subfamílias, sendo 354 espécies encontradas no Brasil. A subfamília Chironominae compreende três tribos, Chironomini (69 gêneros), Tanytarsini (16 gêneros) e Pseudochironomini (cinco gêneros). Possui distribuição cosmopolita, não ocorrendo apenas na Antártida (Demin 2011). No Brasil, para Chironominae são descritas 230 espécies, sendo que a maior diversidade é encontrada na região norte com 180 espécies (Strixino 2011).

Os quironomídeos são insetos holometábolos. Os ovos são depositados na água reunidos em uma massa mucilaginosa (Corbi & Strixino 2006). Os imaturos vivem em ambientes dulcícolas, onde, geralmente representam os macroinvertebrados mais abundantes (Silva 2005).

As larvas vivem associadas ao fundo ou a vegetação costeira, alimentando-se no primeiro instar de bactérias e nos estágios subsequentes de matéria orgânica (Bonani 2010). Desempenham relevante papel na cadeia alimentar, servindo como alimento a diversas espécies de peixes (Hahn *et al.* 2004). Deste modo, se o sedimento se encontra contaminado com algum composto químico, será diretamente transferido para os outros animais da cadeia trófica, mesmo que estes não estejam em contato direto com o sedimento (Silva 2005).

A ampla distribuição geográfica e a densidade populacional elevada estão relacionadas, principalmente, às adaptações no sistema respiratório. As larvas possuem hemoglobina, na hemolinfa, como pigmento respiratório o que facilita a retirada do oxigênio dissolvido na água permitindo que os quironomídeos sobrevivam em ambientes com baixa taxa de oxigênio (Arne *et al.* 1981; Cranston 1995). Esses insetos também podem ser encontrados em locais inóspitos, com

elevada concentração de matéria orgânica, alterações de pH, salinidade, extremos de temperatura, profundidade e correnteza (Callisto & Esteves 1998).

Os quironomídeos são organismos sensíveis a qualquer alteração que ocorrente no ambiente em que vivem, relacionado não apenas ao substrato, mas também com a massa de água que os envolve. Isso torna esses insetos um importante bioindicador ambiental (Sanseverino & Nessimian 2008).

#### 2.2.4 *Chironomus sancticaroli* (Strixino & Strixino, 1981).

*Chironomus sancticaroli* foi descrita por Strixino & Strixino em 1981 a partir de exemplares coletados em São Carlos, São Paulo, Brasil. Foi considerada por muito tempo sinonímia de *Chironomus xanthus*, sendo está sinonímia considerada inválida por Strixino (2011).

Apresenta 16 a 18 gerações ao ano, sendo esta diferença ocasionada pelas variações decorrentes na temperatura ambiental. Em temperaturas de 25°C o ciclo de vida tem duração entre 12 a 14 dias (Strixino & Strixino 1982; Strixino & Strixino 1985).

As fêmeas de *C. sancticaroli* ovipositam cerca de 500 a 1045 ovos envoltos por mucilagem formando uma massa ovígera tubular recurvada. A eclosão ocorre com cerca de 12 horas em temperatura entre 19°C e 26°C. O primeiro instar com duração de quatro dias; o segundo de dois dias e o terceiro também com dois, enquanto que o quarto instar tem duração de seis dias. Durante o estágio de larva, constroem tubos de detritos onde permanecem como forma de proteção (Strixino & Strixino 1982).

### 2.3 Ecotoxicologia

A ecotoxicologia tem como objetivo estudar a atuação dos contaminantes ambientais nos vários níveis de organização biológica, buscando entender a causa e o efeito da exposição dos organismos à xenobióticos (Choi 2005). Compreende, basicamente, os processos de emissões de contaminantes, destino e comportamento dos compostos químicos e os efeitos sobre a biosfera, representados por organismos, populações, comunidades e ecossistemas. Essas

informações são relevantes para a compreensão dos níveis de contaminação ambiental, avaliar o grau de toxicidade dos compostos químicos e seus metabólitos sobre os organismos, determinar normas para uso e despejos de efluentes químicos, assim como, diagnosticar o risco ecológico iminente (Costa & Olivi 2008).

### 2.3.1 Bioensaios de toxicidade

Os ensaios de toxicidade visam determinar os efeitos tóxicos ocasionados pela exposição de organismos a contaminantes ambientais. Esses representam uma importante ferramenta da ecotoxicologia, sendo amplamente utilizada no monitoramento ambiental. Auxiliam na obtenção de respostas mais completas sobre o risco de contaminação ambiental, em relação a utilização única de análises químicas e físicas, visto que somente os sistemas biológicos podem detectar os efeitos tóxicos das substâncias (Costa & Olivi 2008).

Os ensaios de toxicidade aguda são experimentos de curta duração, 24 a 96 horas, que avaliam os efeitos letais dos contaminantes ambientais sobre os organismos expostos. Tem como principal objetivo determinar a taxa de mortalidade de 50% dos organismos, servindo como base para estudos mais aprofundados sobre os riscos de contaminação ambiental (Lombardi 2004; CONAMA 2004). Podem ser utilizados também para avaliar a sensibilidade dos organismos em exposição a concentrações subletais (Magalhães & Filho 2008).

Os bioensaios de toxicidade crônica são experimentos de longa duração, no qual os organismos são expostos por mais de um terço do ciclo de vida. Possui o objetivo de avaliar respostas relacionadas ao crescimento, comportamento e reprodução, em exposição a concentrações subletais (CONAMA 2005; Magalhães & Filho 2008).

### 2.3.2 Respostas biológicas

Respostas biológicas são amplamente utilizadas no monitoramento ambiental e também na avaliação da toxicidade de compostos químicos através de bioensaios. Em baixos níveis de organização biológica, como bioquímico, molecular, celular e fisiológico, são mais específicas e ocorrem precocemente,

sendo conhecidos como biomarcadores ou marcadores biológicos. Dessa forma, podem auxiliar a identificar e detectar substâncias químicas, em estágio inicial, de contaminação ambiental. Os biomarcadores, também podem indicar precocemente alterações em nível populacional, facilitando na compreensão da causa e efeito gerado pela exposição de organismos a contaminantes ambientais (Choi 2005; Freire *et al.* 2008). Em quironomídeos, os biomarcadores mais utilizados são proteínas (hemoglobinas), enzimas (acetilcolinesterase, complexo P-450), cromossomos politénicos e fragmentação do DNA (Michailova *et al.* 2003; Choi 2004; Zhao & Jones 2012).

Em níveis mais elevados de organização biológica, as respostas são, geralmente, denominadas de *endpoints* e representam respostas populacionais e de comunidade. Em quironomídeos são representadas por desenvolvimento larval, emergência dos adultos e reprodução (Lee & Choi 2006; Paúmen 2007; Marinkovic 2011).

Segundo Choi (2004) a avaliação de respostas em diferentes níveis de organização biológica pode auxiliar na compreensão das consequências da contaminação ambiental.

## 2.4 Genotoxicidade

A genotoxicidade abrange duas principais áreas de estudos, a genética e a toxicologia, por isso também é conhecida com genética toxicológica. Tem como objetivo avaliar a ação de agentes genotóxicos, que são capazes de interagir com o material genético alterando a estrutura e função do DNA. Essas alterações, ao longo do tempo, podem ser fixar na população, o que caracteriza mutações (Heerinqes *et al.* 2003).

Os compostos genotóxicos podem ser encontrados na água, solo e ar, podendo chegar aos altos níveis tróficos provocando danos genéticos nos indivíduos ou população exposta. Dessa forma, a genotoxicidade visa reconhecer as substâncias genotóxicas e determinar o risco mutagênico de forma a estabelecer limites aceitáveis de exposição, principalmente dos seres humanos (Gay 2003).

### 2.4.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa ou *Single Gell Cell Assay* é uma ferramenta amplamente aplicada na genotoxicidade. Esse método apresenta grande sensibilidade, precisão, simplicidade e custo baixo. Outra vantagem é ser um teste inespecífico, o que possibilita a utilização de qualquer tecido, necessita reduzido número de células e proporciona a mensuração de danos em células individuais (Collins 2002).

O ensaio do cometa tem como princípio que fragmentos menores de DNA tendem a se distanciar durante a corrida em gel de eletroforese, gerando uma imagem semelhante a um cometa. As condições alcalinas permitem rápida desnaturação do DNA facilitando a avaliação dos danos (Singh *et al.* 1988). Estes danos são representados por sítios de purina/pirimidina (AP-sítios, ou base de açúcar), chamados de sítios alcalilábeis, quebra de fita simples e quebra de fita dupla, relacionados, principalmente a ação de xenobióticos (Jha 2008). Tem sido aplicado em espécies que servem como bioindicadores de diferentes ordens, como anelídeos, moluscos, insetos, plantas e mamíferos, sendo sensível a agentes químicos na forma pura e complexa (Collins 2002).

Em quironomídeos o ensaio cometa é amplamente aplicado para detectar a toxicidade para diferentes substâncias (Lee & Choi 2006; Park & Choi (2007, 2009), Nair *et al.* 2011; Al-Shami *et al.* 2012).

## 2.5 Parâmetros biológicos

### 2.5.1 Tamanho da cápsula cefálica

Em quironomídeos o tamanho dos organismos representa um relevante *end point*, sendo avaliado através comprimento das larvas ou apenas da cápsula cefálica (Strixino & Strixino 1982; Marinkovic *et al.* 2011). A mensuração da cápsula cefálica permite a obtenção de dados mais precisos, devido que a estrutura apresenta maior nível de esclerotinização das larvas, enquanto que o corpo, considerado mole, pode sofrer alterações de tamanho dependendo da quantidade de alimento e água ingerida (Bonani 2010). Segundo Strixino & Strixino (1982), o crescimento das larvas de quironomídeos é praticamente constante entre os

instares, os quais podem ser determinados pelo tamanho da cápsula cefálica. Dessa forma a avaliação do tamanho da cápsula cefálica possibilita determinar atrasos no desenvolvimento larval, o que pode gerar como consequência atrasos no ciclo de vida dos organismos (Sibley *et al.* 1996).

### 2.5.2 Emergência dos adultos

A avaliação da emergência dos adultos representa um importante *end point*, já sendo utilizada em diversos estudos com quironomídeos (Lee & Choi 2006; Paúmen *et al.* 2007; Nair *et al.* 2011). Através desse parâmetro podem-se determinar atrasos no ciclo de vida e alterações na razão sexual e densidade populacional dos organismos.

### 2.5.3 Fecundidade

Modificações decorrentes no ambiente podem afetar a sobrevivência e a reprodução de quironomídeos alterando a taxa de mortalidade e natalidade da população. A taxa de natalidade é diretamente relacionado a fecundidade e sobrevivência dos organismos, pois a partir destas pode-se definir o potencial reprodutivo da população (Strixino 1980).

A fecundidade é número de indivíduos gerado pela fêmea (Carvalho *et al.* 1998). Segundo Strixino (1980) para quironomídeos a fecundidade pode ser definida como:

-**Fecundidade Inerente**: Maior número de ovos possíveis de ser produzido pelas fêmeas sem a ação ambiental.

- **Fecundidade Potencial**: Número máximo de ovos possíveis de serem produzidos pelas fêmeas.

- **Fecundidade Realizada**: Número de ovos presente na massa ovígera.

### 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos genotóxicos, em exposição aguda e crônica, e na biologia de *Chironomus sancticaroli* causados pela exposição crônica ao fenantreno.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a ocorrência de danos ao DNA das larvas de *Chironomus sancticaroli* provocada após exposição aguda (96 horas) e crônica (oito dias) ao fenantreno.
- Determinar alterações no tamanho da cápsula cefálica das larvas de *Chironomus sancticaroli* pela exposição crônica (oito dias) ao fenantreno.
- Analisar o período de início de emergência e o número de indivíduos adultos de *Chironomus sancticaroli* após exposição crônica (oito dias) ao fenantreno.
- Determinar a fecundidade potencial das fêmeas de *Chironomus sancticaroli* após exposição crônica (oito dias) ao fenantreno.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material biológico

A experimentação foi realizada com espécimes de *Chironomus sancticaroli* obtidos a partir de uma colônia matriz, mantida em sala de criação no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil, desde 2008. Exemplares da espécie foram depositados na coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure (DZUP) no Departamento de Zoologia da UFPR.

### 4.2 Manutenção da colônia matriz de *Chironomus sancticaroli*

A colônia matriz foi cultivada segundo a metodologia de Maier & Kosalwat (1990), com modificação na temperatura de criação de 20°C para 25°C ± 2. Os insetos foram mantidos em quatro aquários (25 cm x 15 cm x 25 cm) com capacidade de 10 litros, contendo uma camada de 5 cm de areia de rio peneirada, e sete litros de água desclorada (Fig 2). Esses permaneceram recobertos por tecido voal, com elástico costurado nas bordas para ficarem aderidos a parede dos recipientes, de modo a evitar fuga dos espécimes alados. Na parte superior o tecido apresenta um zíper para facilitar a manipulação.

A colônia foi mantida sob condições controladas de temperatura a 25°C ± 2, fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, umidade de 80% ± 10%, com aeração constante. A alimentação da colônia foi ministrada, uma vez por semana com 2,5g de ração canina macerada da marca Dog Chow® para sete litros de água desclorada. A limpeza dos aquários foi realizada uma vez por mês. A cada limpeza foi substituído, aproximadamente 75% da água, tomando os cuidados necessários para evitar a fuga dos indivíduos adultos ou eliminação de imaturos nos estágios iniciais de desenvolvimento.

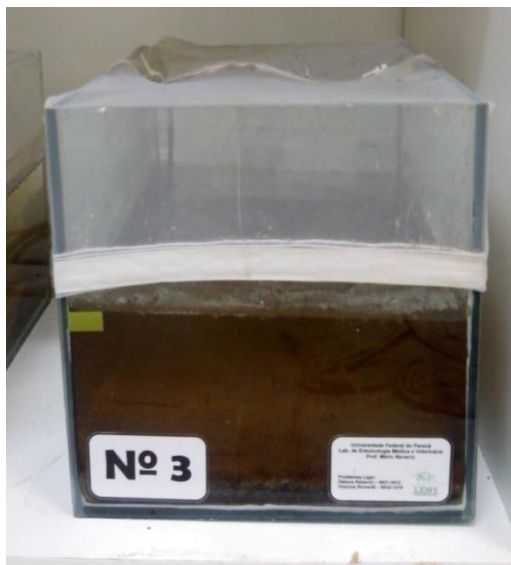


FIGURA 2. Aquário (25 cm x 15 cm x 25 cm) com capacidade de 10 litros utilizados para manutenção da colônia matriz de *C. sancticaroli*, em sala de criação sob condições controladas de temperatura e luminosidade.

#### 4. 3 Avaliação da colônia matriz de *Chironomus sancticaroli*

O teste de sensibilidade consiste em determinar a qualidade de organismos modelo pela exposição a uma substância de referência. Foi aplicado regularmente com intuito de determinar se os organismos utilizados nos testes de toxicidade estavam em condições ideais para responder de forma adequada a exposição a contaminantes ambientais. Além do acompanhamento regular, o teste de sensibilidade também é essencial quando novos organismos são adicionados a cultura estoque ou quando a cultura sofre grandes modificações (OECD 2004). Para *Chironomus sp.* vários compostos são utilizados como substância de referência como pentaclofenol, cloreto de cádmio e cloreto de potássio (OECD 2004).

Foram realizados 10 testes de sensibilidade da colônia matriz de *Chironomus sancticaroli*, com intervalo de 30 dias, utilizando cloreto de potássio (KCl) como substância de referência, seguindo o protocolo descrito por Dornfeld (2006).

Larvas de 3º instar final/4º instar inicial foram expostas as concentrações de 1,5; 2,25; 3,5; 5,0 e 7,5 g.L<sup>-1</sup> de KCl. Em cada concentração foram expostas 18 larvas divididas em três réplicas. A exposição ocorreu em recipientes de 300ml com 200ml de água desclorada, sem sedimento, com adição de uma pequena

quantidade de ração, apenas no primeiro dia de experimento. As réplicas foram mantidas sob condições controladas de temperatura à  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ , fotoperíodo de 12:12 horas claro e escuro, em período de 96 horas (Fig. 3).

Os dados foram analisados através do programa Trimmed Spearman-Kärber obtendo-se a concentração letal de 50% ( $CL_{50}$ ) para o cloreto de potássio. A faixa de sensibilidade foi determinada através do desvio padrão (S) da média (X) obtendo-se o limite superior ( $X + 2S$ ) e limite inferior ( $X - 2S$ ), sendo calculado também, o coeficiente de variação (CV) (USEPA 2000). Dessa forma os valores da  $CL_{50}$  compreendidos entre esta faixa são utilizados enquanto os outros são descartados.

#### 4.4 Condições dos bioensaios de toxicidade

Os ensaios de toxicidade foram realizados seguindo a metodologia da OECD (*Guidelines for the Testing of Chemicals 219*) (2004) com modificações. A OECD indica a utilização de larvas de primeiro instar sendo utilizada no presente trabalho larvas de segundo instar. Isto foi necessário, devido que as larvas de primeiro instar são muito pequenas e frágeis dificultando a manipulação dos organismos. Também foi alterado o fotoperíodo de 16:16 horas para 12:12 horas de claro e escuro, por ser protocolo já estabelecido em laboratório.

Os bioensaios foram conduzidos em copos de vidro de 300ml com 95g de substrato artificial e 120ml de água reconstituída. Estes foram mantidos sob condições controladas de temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  e fotoperíodo de 12:12 horas de claro e escuro (Strixino & Strixino 1982).

##### 4.4.1 Substrato artificial

O substrato artificial foi preparado utilizando 75 % de areia fina, 20% de argila branca, 5% de terra vegetal e 0,01% carbonato de cálcio. A adição do carbonato de cálcio foi necessária para o ajuste de pH  $7,0 \pm 0,5$  (OECD 2004).

Após ser pesada a areia foi lavada várias vezes em água corrente, até que a água ficasse transparente, aproximadamente 10 vezes. Posteriormente, a areia foi mantida em estufa à  $100^{\circ}\text{C}$  durante 6 horas. À areia seca foi adicionada a argila,

terra vegetal, carbonato de cálcio e água destilada sendo misturado até se tornar homogênea.

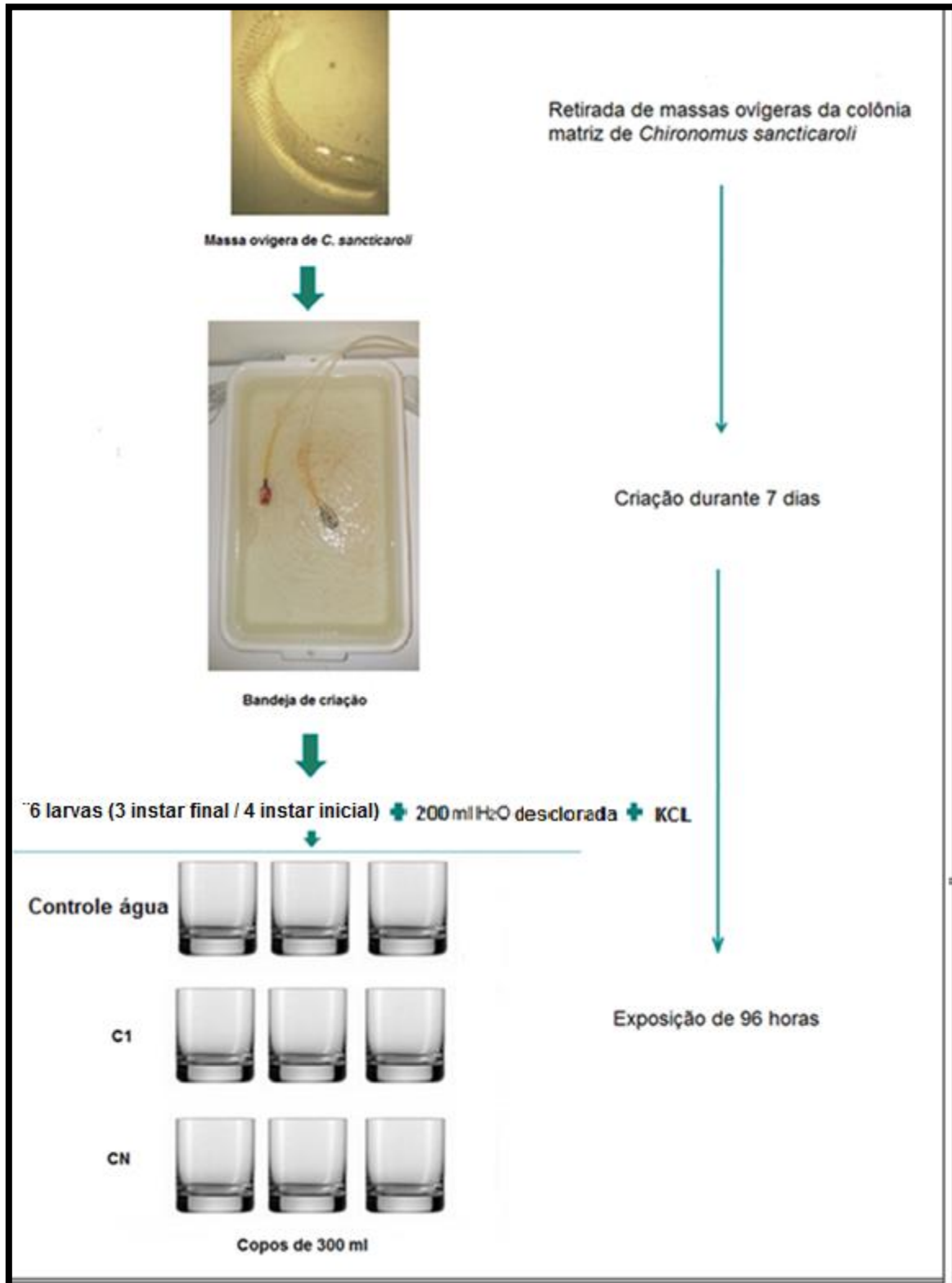


FIGURA 3. Representação do método utilizado para o teste de sensibilidade ao KCl sob as concentrações de 1,5; 2,25; 3,5; 5,0 e 7,5 g.L<sup>-1</sup>, representando as etapas de criação e exposição das larvas. C1 = Primeira concentração avaliada. CN= diferentes concentrações avaliadas.

#### 4.4.2 Água reconstituída

Segundo OECD (2004) a água utilizada em teste de toxicidade com Chironomidae deve apresentar condições de sobrevivência e não causar estresse para os organismos expostos, apresentando pH entre seis e nove e dureza inferior a  $450 \text{ mg.l}^{-1} \text{ CaCO}_3$ . Dessa forma os bioensaios foram realizados com água reconstituída, a qual foi preparada nas proporções de 100ml de água destilada, 8ml de solução de sulfato de cálcio (estoque I) e 4ml da solução de cloreto de potássio e carbonato de sódio (estoque II) (Tab. II). Essa solução foi mantida sob aeração constante durante 24 horas antes da utilização (OECD 2004).

TABELA II. Reagentes utilizados na preparação da solução estoque I e solução estoque II, utilizadas no preparo da água reconstituída.

Solução estoque I	-sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) -1000 ml água destilada
Solução estoque II	-Cloreto de potássio (KCl) -Carbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) -1000 ml água destilada

#### 4.5 Análise físico-química da água reconstituída

A análise físico-química da água reconstituída foi realizada quanto aos parâmetros de temperatura e pH, (pHmetro), condutividade (condutímetro Exstik® II) e salinidade (condutímetro Exstik® II), e dureza (por titulação com EDTA (ácido acético metiletileno)) .

#### 4.6 Limpeza dos materiais

Os utensílios de vidro utilizados nos ensaios, como copos, bastões, funis, entre outros, após a utilização foram lavados com sabão neutro e água corrente, deixando-se secar a temperatura ambiente. Após secos foram colocados em

solução de ácido nítrico à 5%, na qual permaneceriam submersos, em recipiente fechado durante um período de 24 horas. Posteriormente foram retirados e lavados em água corrente por cinco vezes deixando-os secar em estufa à 50°C.

#### 4.7 Bioensaios de toxicidade aguda

Os bioensaios de toxicidade aguda tiveram como objetivo a determinação das concentrações letais (CL) do hidrocarboneto fenantreno à 97,0% (Fluka- Sigma Aldrich®) sobre a espécie de *Chironomus sancticaroli*, assim como avaliar alterações no material genético causado pela exposição das larvas de *C. sancticaroli* ao fenantreno através do ensaio cometa alcalino.

##### 4.7.1 Criação das larvas de *Chironomus sancticaroli*

Massas ovígeras foram retiradas dos aquários da colônia matriz de *C. sancticaroli* e cultivadas em bandejas (40cm x 24cm) com quatro litros de água reconstituída sendo mantida em sala de criação sob condições de temperatura à 25°C ± 2, fotoperíodo de 12:12 de claro e escuro, umidade de 80% ± 10% e aeração constante.

A alimentação foi ministrada a cada dois dias com 0,32g de ração de peixe triturada Tetramin®. As bandejas foram mantidas durante sete dias, período que as larvas atingem o estágio de 3° instar final/ 4° instar inicial, no qual foram expostas ao fenantreno (Fig. 4).

##### 4.7.2 Exposição aguda das larvas de *C. sancticaroli* ao fenantreno

Os bioensaios foram conduzidos como descrito no item 4.4, durante 96 horas (CETESB 1992; OECD 2004).

As larvas de 3° instar final/4° instar foram expostas a diferentes concentrações de fenantreno e um grupo controle apenas com solução de solvente (água reconstituída e 160µl etanol 100% (P.A.)) com 10 organismos por réplica (Fig. 4).

Após o período de exposição o conteúdo do recipiente foi despejado em uma bandeja de plástico contabilizando-se o número de larvas vivas e larvas mortas,

estas sendo caracterizadas por se apresentarem esticadas, incolor e sem movimentação. Durante à exposição às larvas não foram alimentadas e não houve aeração das réplicas.

#### 4.8 Determinação das concentrações letais (CL) do fenantreno

A calibração das concentrações letais (CL) entre 2% e 99%, foram determinadas pelos dados de mortalidade de três bioensaios agudo (96 horas). Nestes, larvas de *C. sancticaroli* foram expostas as concentrações de 1,4 mg.l<sup>-1</sup>, 1,5 mg.l<sup>-1</sup>, 1,6 mg.l<sup>-1</sup>, 1,7 mg.l<sup>-1</sup>, 1,8 mg.l<sup>-1</sup> de fenantreno, com quatro réplicas cada, totalizando 120 larvas por concentração, sendo essas concentrações definidas a partir da concentração letal CL<sub>50</sub> igual 1,2 mg.l<sup>-1</sup> obtida por Morais (2011).

#### 4.9 Bioensaios de toxicidade crônica

O objetivo dos bioensaios de toxicidade crônica foi avaliar alterações no material genético e nos parâmetros biológicos do tamanho da cápsula cefálica larval, período de início da emergência dos adultos e fecundidade potencial das fêmeas de *Chironomus sancticaroli*.

##### 4.9.1 Criação das larvas de *Chironomus sancticaroli*

Massas ovígeras foram retiradas da colônia matriz de *C. sancticaroli* e cultivadas separadamente em recipientes de vidro de 300ml com 30ml de água reconstituída mantidas em sala de criação em condições controladas de 25°C ± 2, umidade a 80% ± 10 % e fotoperíodo de 12:12 horas de claro e escuro durante 4 dias (Fig. 6).

##### 4.9.2 Exposição crônica das larvas de *C. sancticaroli* ao fenantreno

As concentrações testadas foram definidas a partir dos dados de mortalidade obtidos em bioensaios crônicos realizados previamente com as concentrações letais

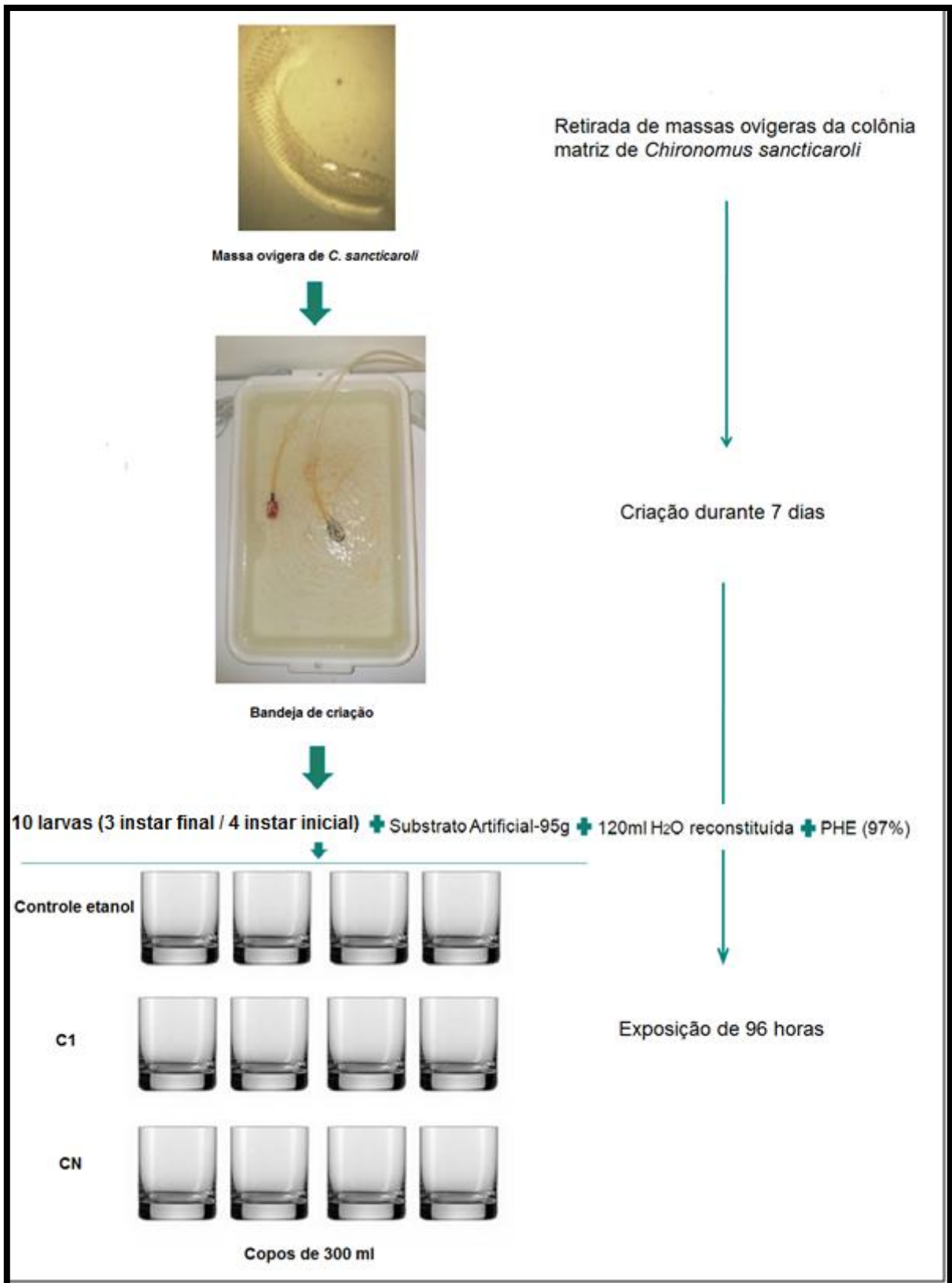


FIGURA 4. Método utilizado para a preparação do ensaio de toxicidade aguda (96 horas), com as etapas de criação e exposição das larvas. C1= primeira concentração avaliada; CN= diferentes concentrações avaliadas.

de 96 horas (Tab. VI). As larvas de segundo instar apresentaram maior sensibilidade a exposição ao fenantreno sendo observados elevados índices de mortalidade na  $CL_5$  ( $0,94 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $CL_8$  ( $1,01 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $CL_{10}$  ( $1,05 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $CL_{20}$  ( $1,21 \text{ mg.l}^{-1}$ ) com 96%, 99%, 100% e 100%, respectivamente. Dessa forma para exposição crônica foram avaliadas apenas as concentrações letais  $CNO$  ( $0,16 \text{ mg.l}^{-1}$ ) e  $CL_2$  ( $0,83 \text{ mg.l}^{-1}$ ) que apresentaram baixos índices de mortalidade (Fig.5).

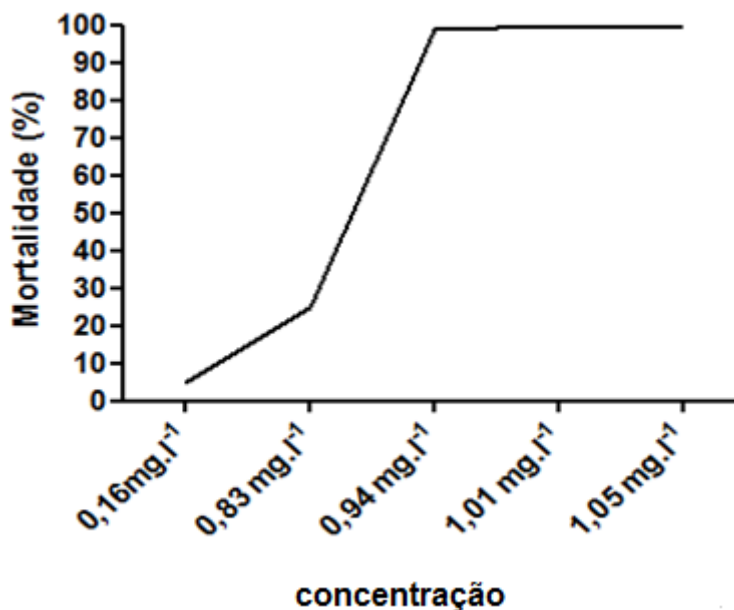


FIGURA 5. Índice de mortalidade observado nos testes crônicos prévios por concentração de fenantreno.

Os bioensaios foram conduzidos como descrito no item 4.4, com tempo de duração de oito dias, com exceção da avaliação do início da emergência dos adultos e da fecundidade potencial que teve duração até o final da emergência, cerca de 25 dias.

Larvas de primeiro instar foram separadas sob microscópio estereoscópico (Zeiss Stemi SV6) em aumento de 40x e expostas ao fenantreno. Nestes ensaios foram utilizados dois grupos controles, um com solução de solvente (água reconstituída e 160µl etanol 100% (P.A.)) e um grupo controle apenas com água reconstituída. A cada réplica foram adicionadas 20 larvas sendo que o frasco permaneceu recoberto com recipiente de plástico de 500ml invertido encaixado como uma tampa. Este continha um orifício na região lateral superior para passar a

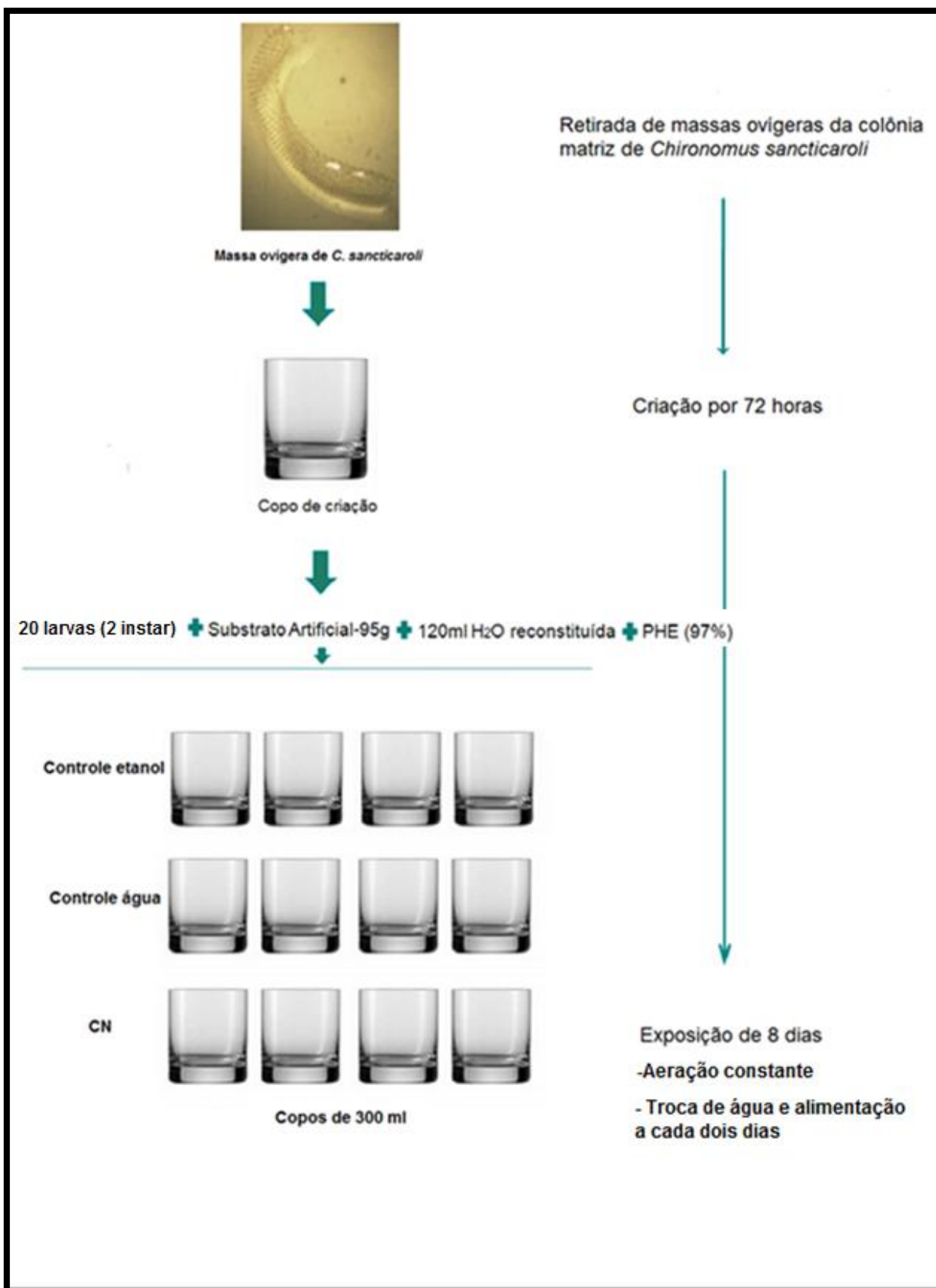


FIGURA 6. Método utilizado para a preparação do ensaio de toxicidade crônica (oito dias), representando as etapas de criação e exposição das larvas. Os copos permaneceram tampados, sendo representados na figura sem tampa. CN= diferentes concentrações avaliadas.

mangueira de silicone provinda de um compressor de ar, que mantinha constante aeração.

Foi realizada a troca de água, adicionando-se solução de fenantreno e 4,8 mg.ml<sup>-1</sup> de ração de peixe macerada da marca Tetramin® a cada dois dias, devido a meia vida do fenantreno no sedimento de igual período (Netto *et al.* 2000; Dornfeld 2006). A troca de água foi feita com uma mangueira fina com uma das pontas recobertas por voal para evitar que larvas pequenas fossem descartadas, sendo retirada aproximadamente 70% do total da água de cada recipiente.

#### 4.10 Ensaio cometa alcalino

##### 4.10.1 Montagem das lâminas

A avaliação dos danos ao DNA foi realizada através do ensaio cometa alcalino. Foram avaliadas as concentrações subletais de 0,16 mg.l<sup>-1</sup> (CENO), 0,83 mg.l<sup>-1</sup> (CL<sub>2</sub>), 1,06 mg.l<sup>-1</sup> (CL<sub>10</sub>), 1,34 mg.l<sup>-1</sup> (CL<sub>30</sub>), 1,6 mg.l<sup>-1</sup> (CL<sub>50</sub>) por exposição aguda (96 horas) e as concentrações 0,16 mg.l<sup>-1</sup> e 0,83 mg.l<sup>-1</sup> sob exposição crônica (oito dias).

A metodologia seguiu o protocolo de Lee & Choi (2006) com algumas modificações, de 1ml de PBS para 250 µl de soro bovino, adição da etapa de centrifugação à 1000 rpm por 5 minutos e o número de amostras foi alterado de 3 para 15 lâminas, demonstrando-se ser mais eficaz para *Chironomus sancticaroli*. Com o método proposto por Lee & Choi (2006) não foram obtidos resultados satisfatórios sendo necessária a adaptação do protocolo.

As lâminas utilizadas foram previamente limpas com etanol e recobertas por agarose normal a 1,5 % (1,5g; 100ml de PBS (tampão fosfato salino)).

Dez larvas vivas provindas dos bioensaios foram acondicionadas em eppendorfs contendo 250µl de soro bovino, homogeneizadas mecanicamente e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e as células resuspensas em vórtex.

Em seguida, 60µl da suspensão foi misturada com 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 0,5% (0,1g; 20ml de PBS). Essa solução foi imediatamente colocada sobre lâmina e recoberta por lamínula, mantidas sob

refrigeração de 10 a 20 minutos. Posteriormente as lâminulas foram retiradas cuidadosamente e as lâminas foram colocadas em solução de lise (solução estoque (água destilada; cloreto de sódio (NaCl); ); etilondiaminotetracético (EDTA), 10mM Tris; 100mM ácido acético etilondiaminotetracético (EDTA), hidróxido de sódio (NaOH)); Triton X-100; dimetilsulfóxido (DMSO) 10%) por 24 horas, para retirar todo o material que não correspondesse ao material genético, como a membrana celular.

Após serem retiradas da solução de lise as lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese horizontal, ajustando-as lado a lado de modo a evitar que ficassem espaço livres, sendo colocadas lâminas limpas quando necessário. Sobre as lâminas foi adicionado tampão alcalino (300mM hidróxido de sódio (NaOH); 1M (ácido acético dimetiletileno) EDTA) com pH>13 até cobrir. Essas permaneceram no tampão alcalino por 30 minutos, período necessário para a desnaturação do material genético. Em seguida foram submetidas à eletroforese com a cuba inserida em um recipiente com gelo a temperatura de 4°C condicionada a uma corrente elétrica de 25 volts e 300mA por 20 minutos.

Ao término da corrida, as lâminas foram retiradas e neutralizadas com tampão de neutralização (0,4 M Tris; pH 7,5) por 15 minutos. Em seguida foram fixadas com etanol absoluto por 5 minutos. Após secas as lâminas foram coradas com 15µl de Brometo de Etídio (20 µg.ml<sup>-1</sup>) com análise sob microscopia de epifluorescência (LEICA) em aumento de 400x.

Para cada concentração analisada foram preparadas 15 lâminas totalizando 1050 larvas utilizadas na avaliação aguda e 600 larvas utilizadas para a avaliação crônica (Tab.III).

#### 4.10.2 Contabilização dos danos

Em cada lâmina analisada foram contabilizados 50 células definindo-se para cada um o nível de dano correspondente que variaram de 0 (sem dano aparente) (Fig. 7 A), 1 dano pequeno (Fig. 7 B), 2 dano médio (Fig. 7 C), 3 dano extenso (Fig. 7 D) e 4 dano máximo (Fig. 7 E) (Kobayashi *et al.* 1995). A partir desses dados foram determinados os níveis de danos por lâmina que variaram entre 0 (50 x 0) e 200 (50 x 4) (Kobayashi *et al.* 1995), seguindo a fórmula:

$$\text{Escore da lâmina} = \sum (nn * cd)$$

Onde:

$nn$  = número de células de cada dano

$cd$  = classe de danos correspondente

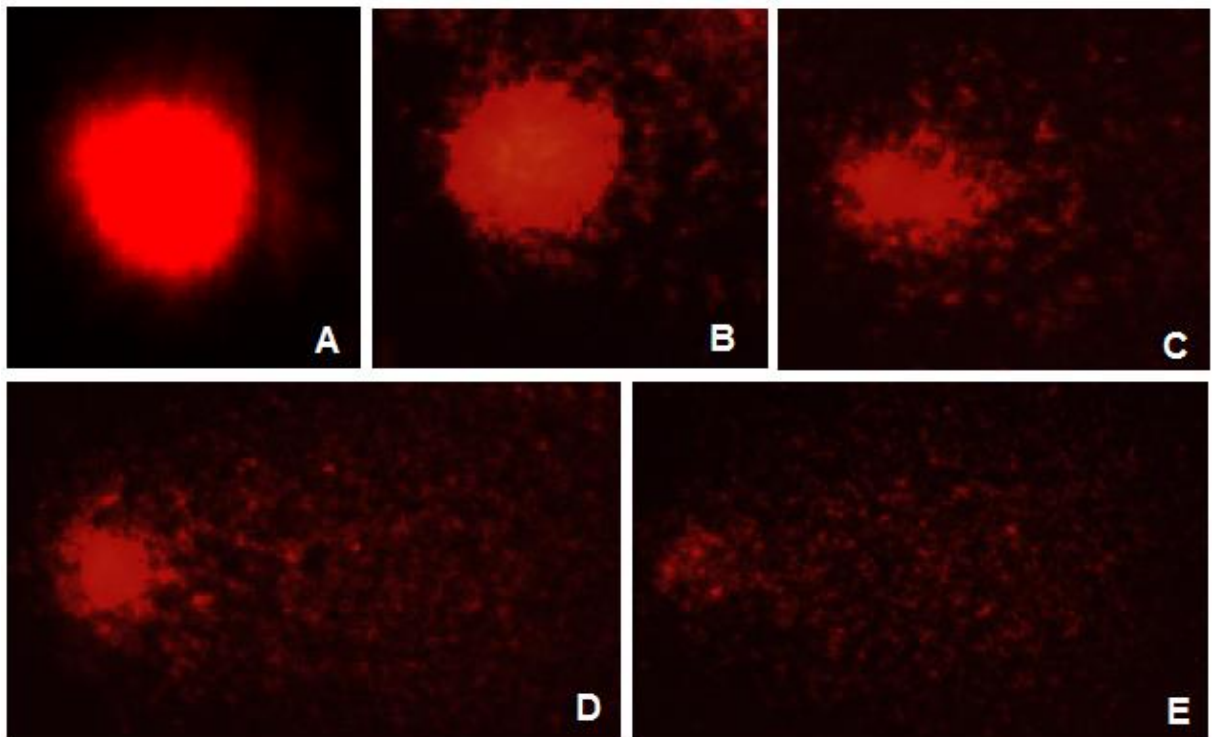


FIGURA 7. Padrão de danos ao DNA em larvas de *Chironomus sancticarloi*. (A) dano 0; (B) dano 1; (C) dano 2; (D) dano 3; (E) dano 4.

TABELA III. Valores totais de amostras avaliadas através do ensaio cometa em exposição aguda (96 horas) e crônica (8 dias).

	Exposição	
	Aguda (96 horas)	Crônica (oito dias)
Número de Grupos	7	4
Número de lâminas por grupo	15	15
Número de larvas por lâmina	10	10
Total de larvas por grupo	150	150
Total de larvas	1050	600
Número Células por Lâmina	50	50

#### 4. 11 Parâmetros biológicos

##### 4.11.1 Tamanho da cápsula cefálica

A avaliação do tamanho da cápsula cefálica teve como objetivo determinar alterações no tamanho das larvas.

Após a exposição crônica de oito dias, as larvas vivas foram armazenadas em álcool 80%. Estas larvas foram diafanizadas em solução de Hidróxido de potássio (KOH) a 10% durante 24 horas. Em seguida, os organismos foram montados em lâminas em meio de verniz de vitral incolor (Acrilex) com a região ventral da cápsula cefálica voltada para cima. As lâminas foram observadas em microscópio estereoscópico (Zeiss SteREO Discovery. V20 com câmera acoplada AxioCam ERc5s) sob aumento de 150x, sendo mensurados o comprimento da cápsula cefálica (Fig. 8) de 70 larvas de cada grupo controle e grupo exposto através do programa ZEN 2011 “*blue edition*”. A partir dessas medidas, também foram determinados os instares larvais de acordo com o proposto por Richardi *et al.* (2013) para *C. sancticaroli* mantida a 25°C (Tab. IV). Como critério para a definição de cada instar foi utilizado o apenas o limite mínimo, sendo as medidas demonstradas na tabela IV.

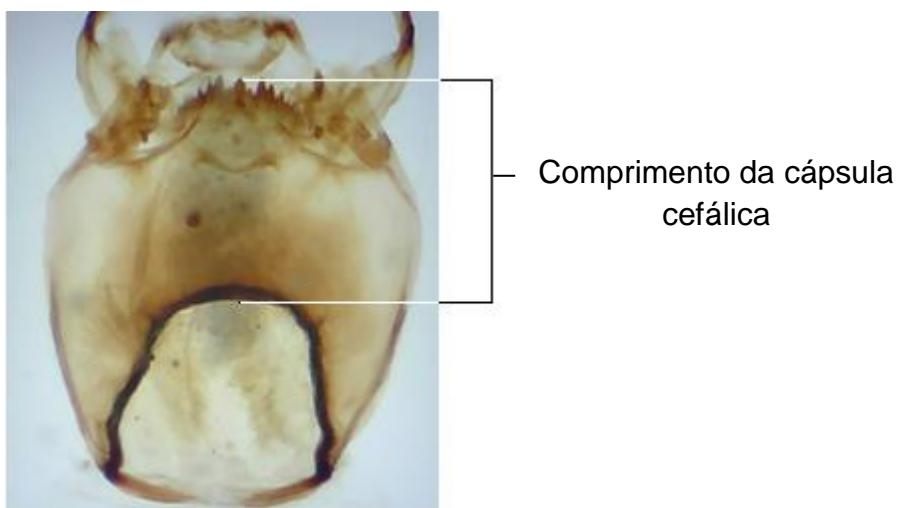


FIGURA 8. Cápsula cefálica de *Chironomus sancticaroli* indicando o procedimento utilizado para determinar do comprimento da estrutura.

TABELA IV. Medidas do tamanho da cápsula cefálica utilizadas para a definição dos instares propostos por Richardi *et al.* (2013) e as utilizadas no presente trabalho em milímetros (mm). (–) Não definido

Instar	Richardi <i>et al.</i> (2013)		Medidas utilizadas	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
1°	0,061mm	0,066mm	0,061mm	0,089mm
2°	0,090mm	0,112mm	0,090mm	0,158mm
3°	0,159mm	0,192mm	0,159mm	0,259mm
4°	0,260mm	0,340mm	0,260mm	-

#### 4.11.2 Emergência dos adultos

Atraso na emergência dos adultos foi avaliado através de três bioensaios de toxicidade crônica (oito dias), totalizando 240 larvas expostas por grupo analisado. Esse teve duração até o fim da emergência dos adultos, aproximadamente 25 dias. As réplicas foram observadas diariamente para a observação do dia de início da emergência dos adultos sendo contabilizado o número total de adultos. Estes foram identificados em machos, com antenas plumosas e fêmeas com antenas sem plumosidade, as quais foram armazenadas em álcool 80% para a avaliação da fecundidade potencial.

#### 4.11.3 Fecundidade potencial das fêmeas

A avaliação da fecundidade potencial foi obtida através do método descrito por Strixino (1980). Os indivíduos de *Chironomus sancticaroli* foram mantidos sob exposição crônica (oito dias) até a emergência dos adultos. As fêmeas foram retiradas com auxílio de um sugador e armazenadas em álcool 80%.

A asa direita, definida como padrão, foi removida de 30 fêmeas de cada grupo analisado (controle e exposto). Posteriormente foram fotografadas em microscópio estereoscópio (Zeiss SteREO Discovery. V20 com câmera acoplada AxioCam ERc5s) em aumento de 32x e medidas através do programa Zen 2011 “*blue edition*” da região do arculus até o ápice, sendo desprezada a base verdadeira uma vez que pode ser facilmente danificada ao ser removida do corpo da fêmea (Fig. 9).

A fecundidade potencial foi calculada utilizando a expressão proposta por Strixino (1980):

$$F = M + K.L$$

Onde:

$F$  = número de ovos

$M$  = constante (-707,71)

$K$  = constante (471,64)

$L$  = comprimento da asa



FIGURA 9. Asa direita de fêmea indicando o procedimento utilizado para determinar o tamanho da estrutura.

#### 4.12 Análise dos dados

A determinação das concentrações letais (CL) ocorreu através do programa GW-Basic Probit versão 5.0. Os danos ao DNA foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ) através do programa BioEStat versão 5.0. Os parâmetros biológicos foram analisados pelo teste ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) através do programa PAST versão 1.95. Os gráficos foram produzidos no programa GraphPad Prism versão 5.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da colônia matriz de *Chironomus sancticaroli*

As CL<sub>50</sub> obtidas na avaliação da colônia são demonstradas na tabela V.

TABELA V. Valores da concentração letal de 50% (CL<sub>50</sub>) em g.l<sup>-1</sup>, obtidos no teste de sensibilidade indicando nível de confiança (NC), intervalo de confiança, média (X), desvio padrão (S), variância (S<sup>2</sup>) e coeficiente de variação (CV) em porcentagem.

Teste	CL <sub>50</sub>	NC	IC
1	3,64	95	3,33-3,95
2	4,21	95	3,90-4,51
3	3,33	95	3,03-3,63
4	4,73	95	4,43-5,03
5	4,10	95	3,79-4,40
6	4,54	95	4,24-4,84
7	4,07	95	3,77-4,37
8	4,40	95	4,10-4,70
9	5,04	95	4,74-5,34
10	4,04	95	4,04-4,34
Média (X)	4,08 g.l <sup>-1</sup>		
Desvio Padrão (S)	0,48		
Variância (S <sup>2</sup> )	0,25		
Coeficiente de Variação	11,80%		

Os valores da concentração letal de 50% (CL<sub>50</sub>) apresentaram média de 4,08 g.l<sup>-1</sup>, limite superior de 5,04 g.l<sup>-1</sup> e limite inferior de 3,12 g.l<sup>-1</sup> com coeficiente de variação de 11,8% (Fig. 10). Todos os testes apresentaram CL<sub>50</sub> dentro da faixa de sensibilidade estabelecida.

Esses dados quando comparados, permaneceram próximos aos obtidos por Dornfeld (2006) para *Chironomus xanthus*, que apresentou limite inferior de 5,58 g.l<sup>-1</sup> e limite superior de 5,36 g.l<sup>-1</sup> com coeficiente de variação igual a 16%.

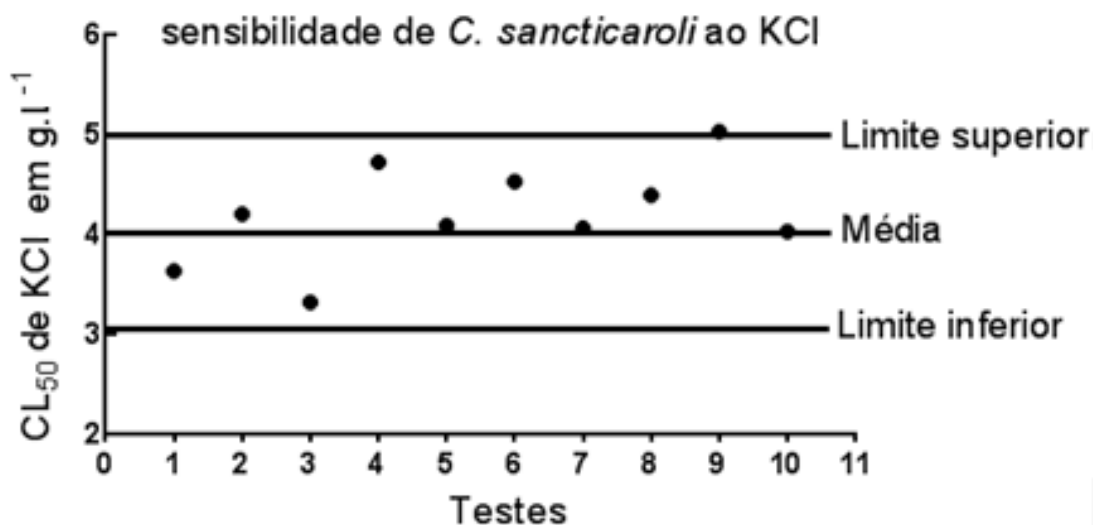


FIGURA 10. Concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>) por teste de sensibilidade, incluindo limite inferior, limite superior e a média.

A precisão dos testes é indicada pelo coeficiente de variação em porcentagem dado pela razão entre o desvio padrão e a média (fórmula abaixo). Este índice indica a padronização da metodologia, a confiança dos resultados obtidos e valida a utilização da espécie ou dos organismos a serem utilizados nos testes de toxicidade (Pereira 2010). A *Environmental Canada* (1995) estabelece que o coeficiente de variação ideal deve ser  $\leq 30\%$ . Neste estudo foi obtido coeficiente de variação igual a 11,8%, indicando que a colônia matriz de *C. sancticaroli* foi mantida de forma homogênea o que possibilita a utilização dos organismos em teste de toxicidade.

$$CV = S \cdot \frac{100}{x}$$

Onde:

*CV* = coeficiente variação

*S* = desvio padrão

*x* = média

## 5.2 Análise Físico-Química da Água Reconstituída

Os valores para os parâmetros da água reconstituída de temperatura, salinidade, condutividade, pH e dureza estão representados na tabela VI. Os bioensaio apresentaram condições ideais para a sobrevivência das larvas de *C. sancticaroli*.

TABELA VI. Resultados obtidos para os parâmetros da água reconstituída, demonstrando o valor médio para os ensaios agudos e crônicos.

Parâmetros	Valores
Temperatura (°C)	21,5 ± 3
pH	7,5 ± 5
Condutividade (µS/cm)	96,8 ±10
Salinidade (µg/l)	46,2 ± 2
Dureza (mg/l CaCO <sub>3</sub> )	19,5± 4

## 5.3 Determinação das concentrações letais

Na tabela VII estão representados os valores das concentrações letais (CL) do fenantreno sobre a espécie de *Chironomus sancticaroli*, com o nível de confiança e intervalo de confiança. O grupo controle apresentou mortalidade natural de 3,4%, mantendo-se na faixa aceitável de mortalidade menor ou igual a 30% (OECD 2004). O valor do  $\chi^2$  (Chi-quadrado), também se manteve na faixa aceitável de menor ou igual a 10 com valor de 3,07 (USEPA 2000).

A partir das concentrações letais definidas (CL) foi possível determinar as concentrações subletais que foram utilizadas nos experimentos agudos, CL<sub>2</sub> (0,83 mg.l<sup>-1</sup>), CL<sub>10</sub> (1,06 mg.l<sup>-1</sup>), CL<sub>30</sub> (1,34 mg.l<sup>-1</sup>), CL<sub>50</sub> (1,6 mg.l<sup>-1</sup>), assim como calcular a concentração CENO (Concentração de efeito não observado calculada pela  $CL_{50}/10 = 0,16$  mg.l<sup>-1</sup> (CETESB 1992).

TABELA VII. Concentrações letais (CL) de fenantreno pela exposição aguda de *Chironomus sancticaroli*, expressas em mg.l<sup>-1</sup>, com nível de confiança (NC %) e intervalo de confiança (IC).

CL	Concentração (mg.l <sup>-1</sup> )	NC%	IC
2	0,83	95	0,421– 1,033
5	0,94	95	0,548 – 1,122
10	1,06	95	0,694 – 1,201
30	1,34	95	1,128 – 1,419
50	1,60	95	1,510 – 1,655
90	2,34	95	2,022 – 3,683
95	2,60	95	2,178 – 4,659
98	2,96	95	2,368 – 6,072
99	3,2	95	2,503 – 7,244

#### 5.4 Ensaio cometa alcalino

##### 5.4.1 Bioensaios de toxicidade aguda

Para esta análise foi determinado o nível de dano de 50 células por lâmina, não sendo utilizados dados de lâminas sem material para a análise (Tab VIII).

Nos grupos controles ocorram maior porcentagem de células sem dano (classe 0) e da classe 1, obtendo-se 0,3% de células com classe 3 três e 0,1% de danos da classe quatro no grupo controle água e 1% de danos da classe três e 0,3% de danos da classe quatro no grupo controle solvente (etanol P.A.) (Fig. 11).

Nos grupos expostos foram observados danos de todas as classes. Pode-se observar que com o aumento da concentração foram observados danos mais severos (classe 3 e classe 4) tendo elevação percentual a partir da concentração 0,16mg.l<sup>-1</sup> (Fig. 11). Isto indica uma tendência de elevação do nível de dano ao DNA com o aumento da concentração.

Lâminas com menores escores foram obtidas nos grupos controles com variação de 10 a 31 no controle água e 11-41 no controle solvente. Nos grupos expostos ao fenantreno a faixa de danos encontrados apresentou grande variação sendo o escore máximo (200) encontrado apenas na maior concentração (Tab. VIII).

TABELA VIII. Escores das lâminas obtido para os grupos controle (H<sub>2</sub>O e solvente) e grupos expostos ao fenantreno por 96 horas. (-) Indica lâminas com ausência de dados.

N° da lâmina	H <sub>2</sub> O	Solvente	0,16mg.l <sup>-1</sup>	0,83 mg.l <sup>-1</sup>	1,06 mg.l <sup>-1</sup>	1,34 mg.l <sup>-1</sup>	1,60 mg.l <sup>-1</sup>
1	10	15	63	54	69	154	76
2	13	21	70	90	112	58	200
3	22	27	31	86	185	74	105
4	18	18	118	71	169	102	106
5	15	32	96	148	91	106	65
6	24	41	64	113	76	99	98
7	21	25	43	97	79	60	103
8	26	13	61	88	100	91	100
9	31	18	60	88	134	131	200
10	28	11	32	59	129	76	116
11	17	17	88	107	-	120	37
12	14	27	-	33	-	-	56
13	12	24	-	76	-	-	49
14	23	29	-	-	-	-	-
15	19	-	-	-	-	-	-
Mediana	19	22,5	63	88	106	99	100

Os escores das lâminas analisados pelo teste Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,005$ ) (5%) demonstrou que não houve diferença significativa entre o controle água e o controle solvente ( $p=0,960$ ), indicando que o solvente (etanol P.A.) não causa danos relevantes ao DNA. Deste modo apenas o grupo água foi utilizado como padrão de comparação.

Ao analisar as concentrações de fenantreno testadas em relação ao controle água todas apresentaram diferença significativa com  $p < 0,001$ . Porém, quando realizada a comparação entre os grupos expostos foi constatada diferença significativa apenas entre os tratamentos 0,16 mg.l<sup>-1</sup> e 1,06mg.l<sup>-1</sup> com  $p = 0,042$  (Fig 12). O aumento da concentração não provocou elevação no nível de danos ao DNA, não sendo observado resposta concentração-dependente. Isto sugere que o fenantreno é genotóxico as larvas de *C. sancticaroli* em curta exposição atingindo o interior celular ocasionando quebras no DNA.

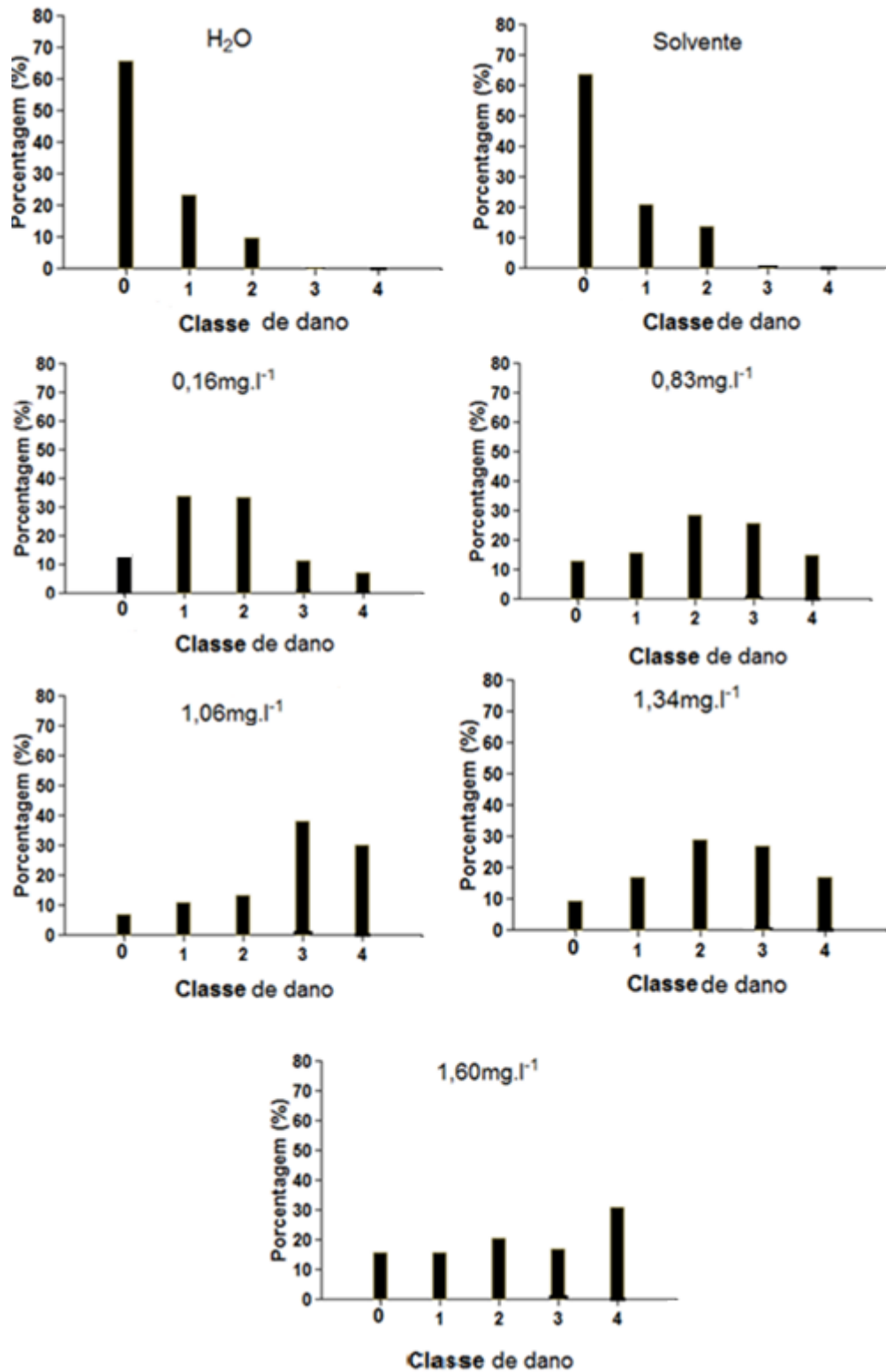


FIGURA 11. Porcentagem de células encontrados para cada classe de dano (0,1,2,3,4) nos grupos controle (H<sub>2</sub>O e solvente) e grupos expostos por 96 horas.

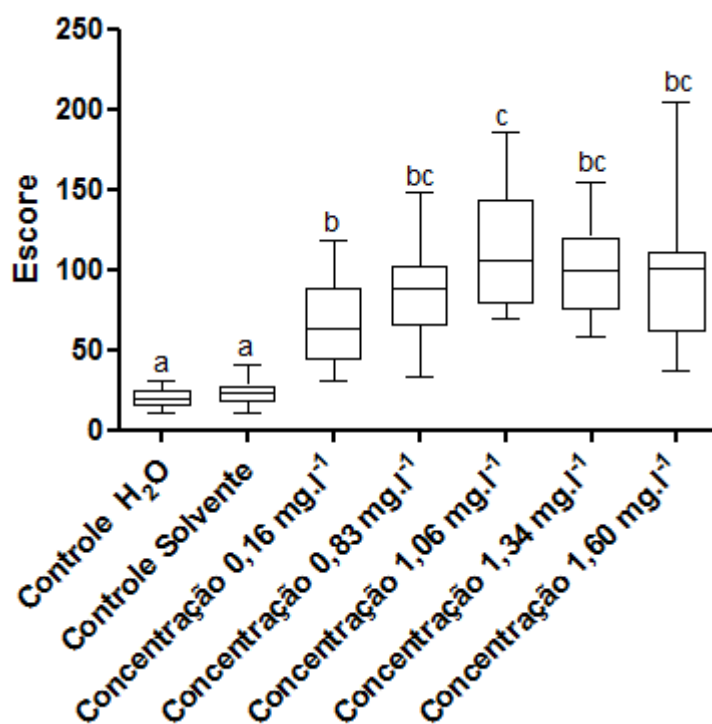


FIGURA 12. Mensuração dos danos ao DNA em larvas de *C. sancticaroli* demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos por 96 horas (aguda) ao fenantreno, indicando a mediana e valor mínimo e máximo. Diferentes letras indicam diferença significativa com  $p \leq 0,05$  (Teste de Kruskal-Wallis).

#### 5.4.2 Bioensaios de toxicidade crônica

A avaliação da genotoxicidade crônica do fenantreno foi realizada a partir dos dados obtidos pela análise dos danos de 50 células por lâmina. Não sendo utilizados dados de lâminas sem material de análise (Tab. IX).

Nos grupos controle foi observada maior porcentagem de células das classes zero e um de danos, com percentual reduzido de danos da classe três e quatro. Nos grupos expostos ao fenantreno, a menor concentração apresentou danos da classe um e dois em maior porcentagem, ocorrendo com o aumento da concentração elevação de dano das classes três e quatro (Fig.13). Podendo-se verificar uma tendência no aumento de dano com a elevação da concentração de fenantreno.

Para os grupos controle foram observadas lâminas com baixo escore de 10-29 no grupo controle água e 10-36 no grupo controle solvente. Nos grupos expostos as lâminas apresentaram escores mais elevados que os grupos controle, não sendo observado dano máximo (200) (Tab. IX).

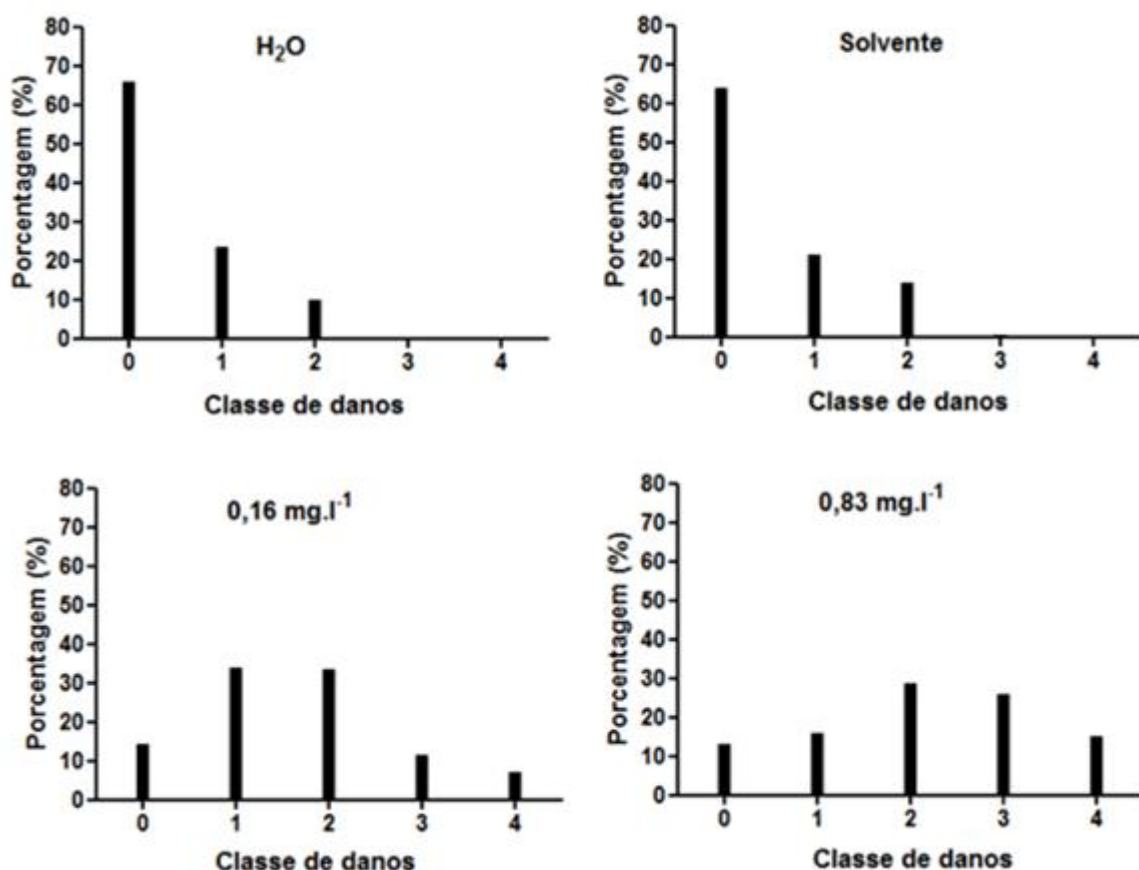


FIGURA 13. Porcentagem de células encontrados para cada classe de dano (0,1,2,3,4) nos grupos controle (H<sub>2</sub>O e solvente) e grupos expostos ao fenantreno por oito dias.

TABELA IX. Escore das lâminas obtido para os grupos controle (H<sub>2</sub>O e solvente) e grupos expostos ao fenantreno 8 dias (crônico). (-) indica lâminas com ausência de dados.

Nº da lâmina	H <sub>2</sub> O	Solvente	0,16mg.l <sup>-1</sup>	0,83 mg.l <sup>-1</sup>
1	10	11	26	42
2	10	12	52	53
3	12	14	53	64
4	13	14	54	67
5	17	16	65	72
6	18	19	68	81
7	19	20	69	87
8	21	21	76	94
9	24	22	90	98
10	24	23	93	103
11	25	32	100	106
12	26	36	108	107
13	29	-	-	109
14	-	-	-	136
15	-	-	-	-
Mediana	19	19,5	68,5	94

Não foi detectada diferença significativa, pelo teste Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ), entre os grupos controle água e solvente com  $p=0,700$ . No ensaio crônico, da mesma forma que em exposição aguda o solvente não ocasionou danos relevantes ao DNA, sendo utilizado apenas o controle água como padrão de comparação (Fig. 14).

Nas duas concentrações analisadas ( $0,83 \text{ mg.l}^{-1}$ ;  $0,16 \text{ mg.l}^{-1}$ ) obteve-se danos significativos ao DNA com  $p < 0,0001$ . De outro modo, a elevação da concentração não ocasionou aumento significativo no nível de dano ao DNA ( $p=0,421$ ), não ocorrendo resposta concentração-dependente (Fig.14). Dessa forma, o fenantreno é genotóxico as larvas de *C. sancticaroli*, atingindo o interior celular e ocasionando quebras no material genético.

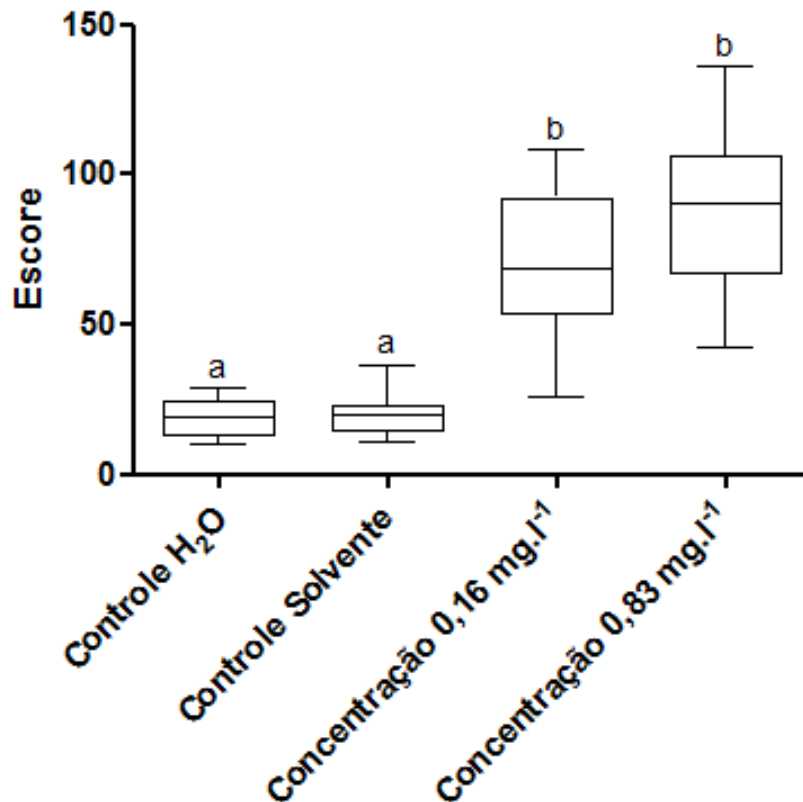


FIGURA 14. Mensuração dos danos ao DNA em larvas de *C. sancticaroli* demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos por 8 dias (crônica) ao fenantreno, indicando a mediana e valor mínimo e máximo. Diferentes letras indicam diferença significativa com  $p \leq 0,05$  (Teste de Kruskal-Wallis).

## 5.5 Parâmetros biológicos

### 5.5.1 Tamanho da cápsula cefálica

O tamanho da cápsula cefálica foi avaliado, após o ensaio crônico, a partir da mensuração do comprimento de 70 cápsulas cefálicas de cada grupo controle (água e solvente) e grupos expostos ao fenantreno ( $0,16\text{mg.l}^{-1}$  e  $0,83\text{mg.l}^{-1}$ ) ( Tab. XI - Anexo 1).

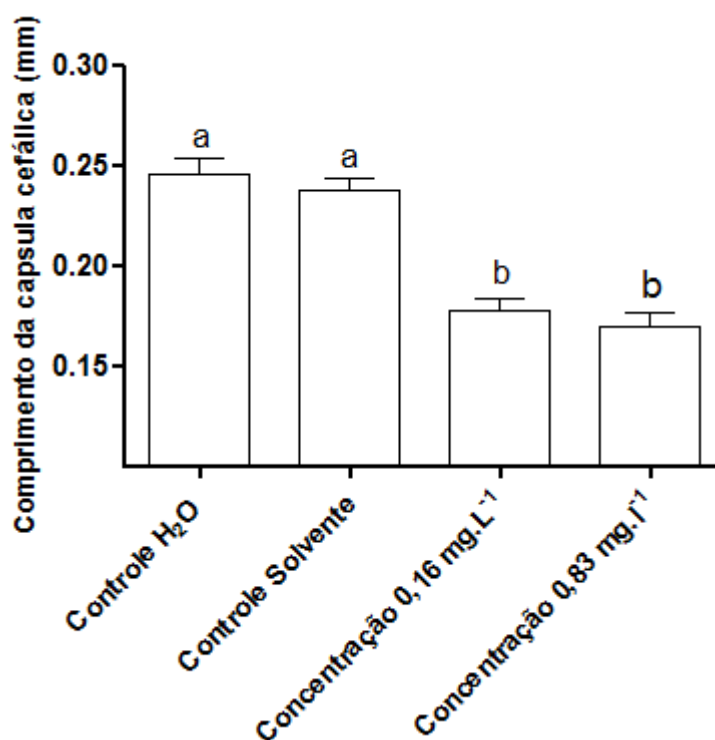


FIGURA 15: Tamanho da cápsula cefálica das larvas de *C. sancticaroli* demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos ao fenantreno durante oito dias, indicando a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas  $p \leq 0,05$  (ANOVA-one way com teste *a posteriori* de Tukey).

A análise dos dados pelo teste ANOVA para  $p \leq 0,05$  (5%) demonstrou não haver diferença significativa entre os grupos controles. Assim apenas o grupo controle de água reconstituída foi utilizado como padrão de comparação (Fig. 15).

Em ambas as concentrações analisadas foram observadas diferenças significativas com  $p=1,913$  para  $0,83\text{mg.l}^{-1}$  e  $p=4,281$  para  $0,16\text{mg.l}^{-1}$ . Entre as duas concentrações de fenantreno testadas, não houve diferença significativa ( $p=0,369$ ). O teste de Tukey para  $p \leq 0,05$  (5%) realizado *a posteriori* confirmou os dados, não obtendo-se diferença significativa para ambas as concentrações com  $p=7,72$  para

0,16 mg.l<sup>-1</sup> e p= 7,72 para 0,83 mg.l<sup>-1</sup> em relação ao controle. Entre os tratamentos não houve diferença significativa com p=0,84. Estes dados indicam que o fenantreno provoca redução da cápsula cefálica de *Chironomus sancticaroli*, embora o efeito não seja intensificado com o aumento da concentração, caracterizando uma resposta concentração-não-dependente (Fig. 15).

Os tamanhos das cápsulas cefálica dos grupos expostos ao fenantreno, apresentaram tamanho em média de 1,5 vezes menor que a cápsula cefálica dos grupos controle. A determinação dos instares larvais indicou que, em média, todos os grupos analisados estavam no terceiro instar.

Ao final do período de observação, o fenantreno provocou redução no número larvas de quarto instar e aumento das larvas de primeiro e segundo instar em relação ao controle (Tab. X), sendo encontrada apenas, aproximadamente, 11% de larvas de quarto instar nos tratamentos (Fig.16). Isto indica que nos tratamentos, com fenantreno, algumas larvas apresentaram atrasos no desenvolvimento. Os resultados demonstram que o fenantreno provoca redução no tamanho da cápsula das larvas de *C. sancticaroli* indicando que composto é potencialmente tóxico em nível populacional.

TABELA X. Número de larvas por instar nos grupos controle (água e solvente) e grupos expostos (0,16 mg.l<sup>-1</sup>; 0,83 mg.l<sup>-1</sup>), demonstrando tamanho mínimo e máximo observado para cada instar, média, desvio padrão e intervalo de confiança.

	Instar	N° larvas	Mínimo(mm)	Máximo (mm)	Média	SD	IC
Água	I	0	-	-	-	-	-
	II	4	0,136	0,153	0,144	0,008	0,1261-0,1518
	III	32	0,161	0,259	0,191	0,021	0,1836-0,1983
	IV	34	0,270	0,340	0,307	0,017	0,3023-0,3127
Solvente	I	0	-	-	-	-	-
	II	5	0,140	0,157	0,148	0,008	0,1407-0,1552
	III	27	0,164	0,256	0,186	0,026	0,1765-0,1964
	IV	38	0,258	0,326	0,284	0,015	0,2797-0,2896
0,16 mg.l <sup>-1</sup>	I	1	0,087	0,087	-	-	-
	II	21	0,093	0,156	0,139	0,017	0,1316-0,1463
	III	40	0,159	0,259	0,181	0,024	0,1733-0,1886
	IV	8	0,272	0,294	0,281	0,007	0,2754-0,2865
0,83 m.l <sup>-1</sup>	I	5	0,083	0,086	0,084	0,001	0,0830-0,0849
	II	26	0,090	0,158	0,129	0,024	0,1076-0,1503
	III	31	0,160	0,260	0,188	0,031	0,1774-0,1985
	IV	8	0,260	0,294	0,279	0,011	0,2713-0,2866

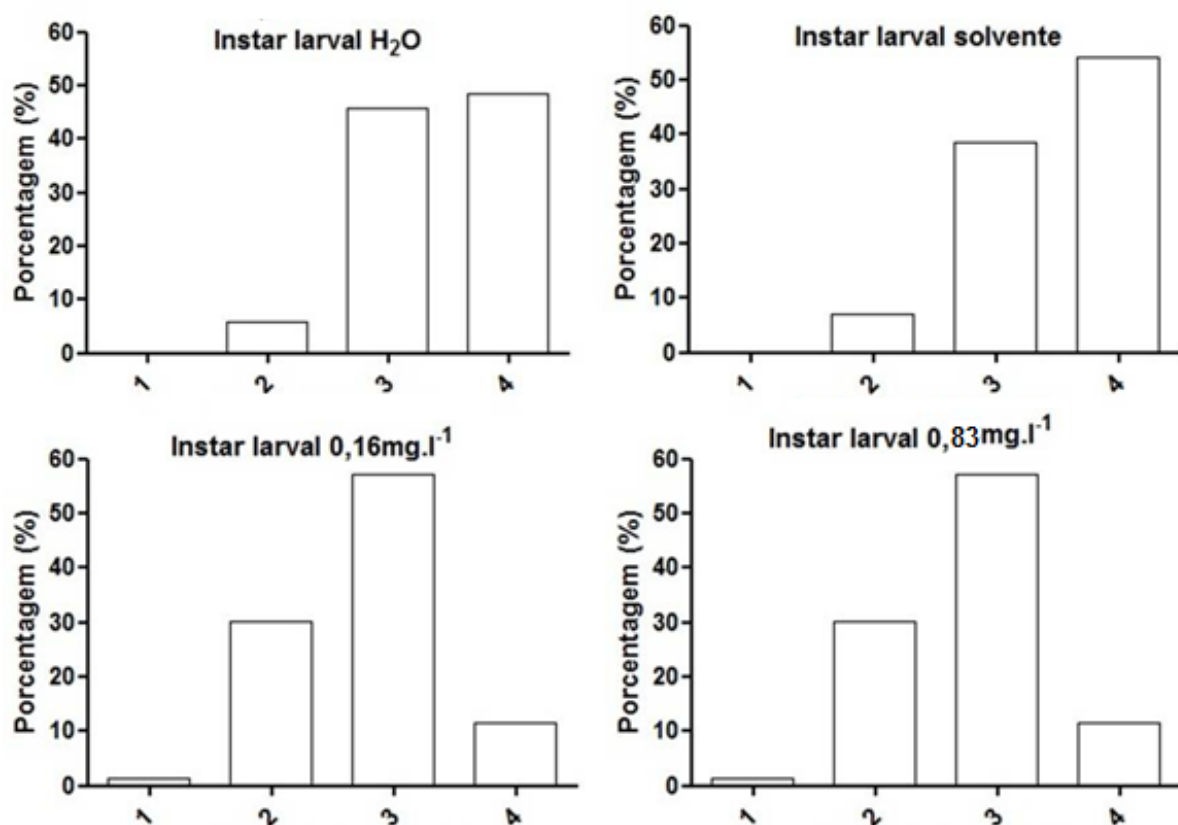


FIGURA 16. Porcentagem de larvas encontradas em cada instar para cada grupo controle (H<sub>2</sub>O e solvente) e grupos expostos por 8 dias ao fenantreno.

### 5.5.2 Emergência dos adultos

O início da emergência dos adultos foi avaliada a partir de dados de três bioensaios de toxicidade crônica, aproximadamente 25 dias, totalizando 240 larvas expostas nos grupos analisados.

Os grupos controle apresentaram em média emergência no 12º dia, enquanto que nos tratamentos o início se deu em média no 14º dia, não sendo detectada diferença significativa entre os grupos controle ( $p \leq 0,05$ ). Comparando-se os tratamentos com fenantreno, ao padrão ambos apresentaram diferença significativa com  $p=0,013$  para  $0,16 \text{ mg.l}^{-1}$  e  $0,035$  para  $0,83 \text{ mg.l}^{-1}$ . O aumento da concentração do fenantreno não provocou atraso significativo na emergência dos adultos com  $p=0,677$ , obtendo-se resposta concentração-não-dependente (Fig. 17). Estes dados foram confirmados utilizando o teste de Tukey *a posteriori* ( $p \leq 0,05$ ) obtendo-se  $p=0,013$  e  $0,03$ , para  $0,16 \text{ mg.l}^{-1}$  e  $0,83 \text{ mg.l}^{-1}$ , respectivamente.

Atrasos no início da emergência de machos foram significativos para ambos os tratamentos em relação ao grupo controle com  $p=0,013$  para  $0,16\text{mg.l}^{-1}$  e  $p=0,004$  para  $0,83\text{ mg.l}^{-1}$  porém, o aumento da concentração não representou atrasos significativos ( $p=0,333$ ), obtendo-se resposta concentração-não-dependente (Fig. 18). No teste de Tukey ( $p\leq 0,05$ ) *aposteriori* foram obtidos  $p=0,01$  para ambas as concentrações. Esses dados demonstraram que o fenantreno afeta a emergência dos machos provocando atrasos.

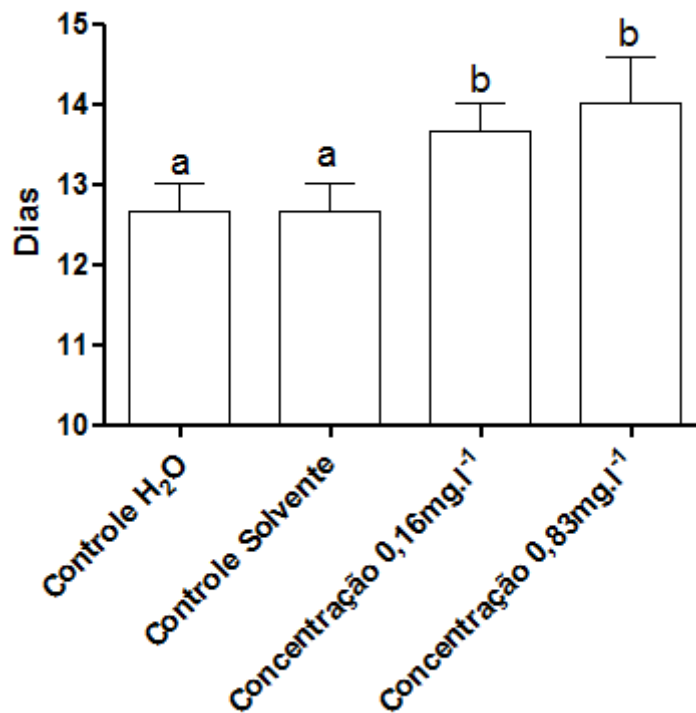


FIGURA 17. Emergência dos adultos de *C. sancticaroli* demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos ao fenantreno durante oito dias, indicando a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa para  $p\leq 0,05$  (ANOVA-one way com teste *aposteriori* de Tukey).

O início da emergência das fêmeas ocorreu sem atrasos significativos com  $p=1$  para  $0,16\text{ mg.l}^{-1}$ , e  $p=0,116$  para  $0,83\text{ mg.l}^{-1}$  (Fig. 19). Esses dados foram confirmados pelo teste de Tukey ( $p\leq 0,05$ ) obtendo-se  $p= 1$  para  $0,16\text{ mg.l}^{-1}$  e  $p=0,11$  para  $0,83\text{ mg.l}^{-1}$ . Isto sugere que a presença do fenantreno não altera o tempo de emergência das fêmeas de *C. sancticaroli*.

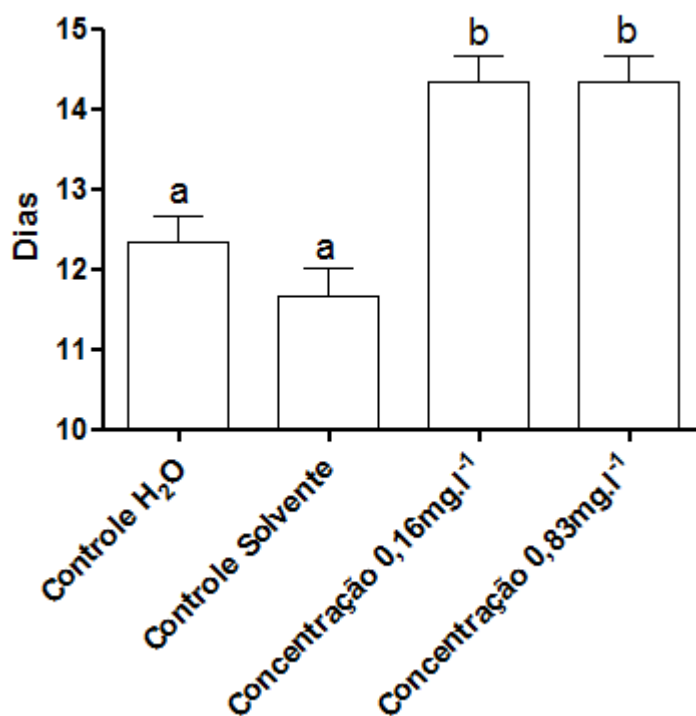


FIGURA 18. Emergência dos machos de *C. sancticaroli* demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos ao fenantreno durante oito dias, indicando a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa para  $p < 0,05$  (ANOVA-one way com teste *aposteriori* de Tukey).

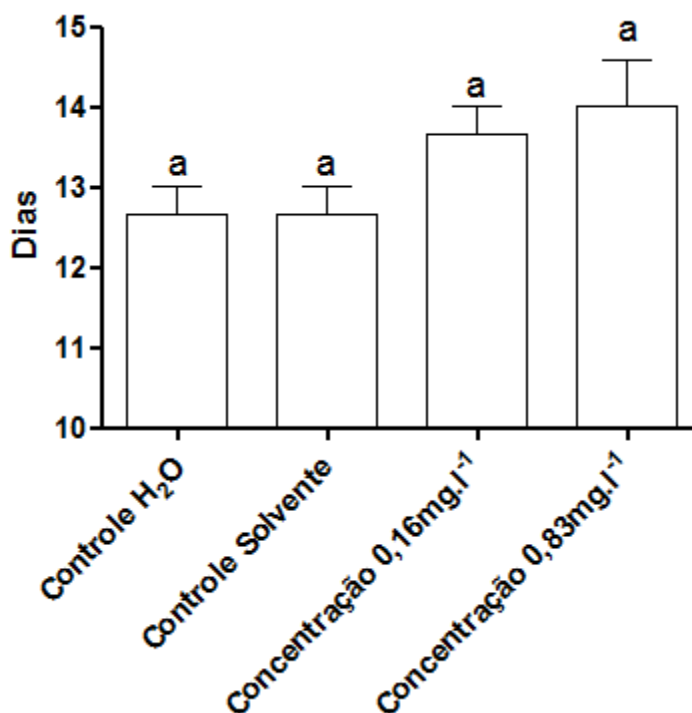


FIGURA 19. Emergência das fêmeas de *C. sancticaroli* demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos ao fenantreno durante oito dias, indicando a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa para  $p < 0,05$  (ANOVA-one way com teste *aposteriori* de Tukey).

Para o número de adultos que emergiram foi observada um queda significativa com o aumento da concentração, sendo em média de 76 indivíduos no grupo controle água, 75 no grupo controle solvente, 30 no tratamento de 0,16 mg.l<sup>-1</sup> e apenas 22 no tratamento 0,83 mg.l<sup>-1</sup>, com p= 2,48 para 0,16mg.l<sup>-1</sup> e p=1,31 para 0,83 mg.l<sup>-1</sup> (p<0,05). Neste caso, a resposta representou concentração-dependente (Fig. 20). Estes resultados foram corroborados pelo teste de Tukey (p≤0,05) *aposteriori*, obtendo-se p<0.000 para 0,16 mg.l<sup>-1</sup> e p<0,000 para 0,83 mg.l<sup>-1</sup>. Isto indica que a exposição ao fenantreno provoca redução do número de adultos de *Chironomus sancticaroli*.

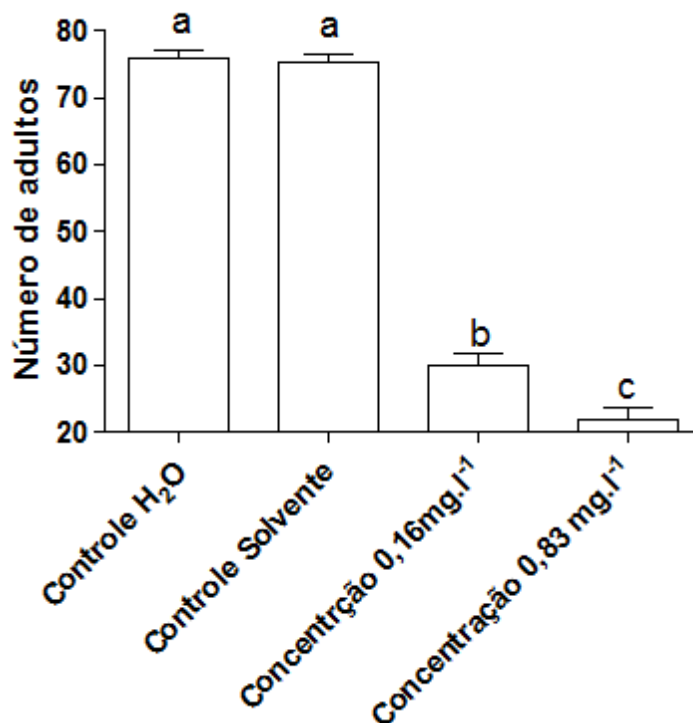


FIGURA 20. Total dos adultos de *C. sancticaroli* demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos ao fenantreno durante oito dias, indicando a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa para p<0,05 (ANOVA-one way com teste *aposteriori* de Tukey).

### 5.5.3 Fecundidade potencial das fêmeas

A avaliação da fecundidade potencial das fêmeas de *Chironomus sancticaroli* sugeriu que o fenantreno não afeta o número de ovos possíveis de ser produzidos pelas fêmeas, não ocorrendo diferença significativa entre os grupos controles (p= 0,924) e entre os tratamentos com fenantreno e controle água com p

=0,167 para 0,16 mg.l<sup>-1</sup> e 0,295 para 0,83 mg.l<sup>-1</sup> pelo teste ANOVA com  $p \leq 0,05$ . O mesmo ocorreu entre os tratamentos com  $p = 0,620$  (Fig. 21). Esses dados foram corroborados pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) *a posteriori* com  $p=0,561$  para 0,16 mg.l<sup>-1</sup> e 0,561 para 0,83 mg.l<sup>-1</sup>.

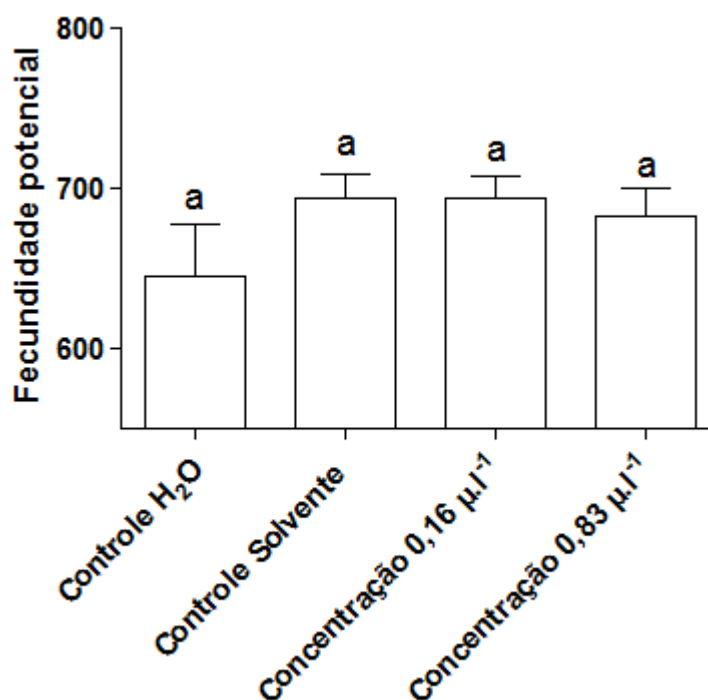


FIGURA 21. Fecundidade potencial das fêmeas de *C. sancticaroli* demonstrando os grupos controle (água e solvente) e grupos expostos ao fenantreno durante oito dias, indicando a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa para  $p \leq 0,05$  (ANOVA-one way com teste *a posteriori* de Tukey).

## 6. DISCUSSÃO

A avaliação conjunta de respostas em diferentes níveis de organização biológica auxilia na compreensão da toxicidade sobre os organismos, ajudando a determinar o impacto ambiental provocado pela presença dos compostos químicos (Ross *et al.* 2002; Lee & Choi 2006).

Neste estudo foram avaliados os efeitos do fenantreno sobre *C. sancticaroli* em níveis molecular e populacional. Em ambos, a espécie demonstrou ser sensível a exposição ao fenantreno sendo observado danos ao DNA, em nível molecular, e

redução no tamanho da cápsula cefálica, atrasos na emergência dos adultos e dos machos e diminuição do número de indivíduos alados, em nível populacional.

A calibração das concentrações do fenantreno sobre *C. sancticaroli* indicou que as larvas de 3º instar final/ 4º instar inicial não sobrevivem em concentrações acima de 3,2 mg.l<sup>-1</sup>, que representa 99% de mortalidade, enquanto que 50% dos organismos são capazes de sobreviver em 1,6 mg.l<sup>-1</sup>. Para *C. riparus* a concentração letal para a emergência de 50% dos organismos, em 28 dias de exposição ao fenantreno, foi determinada em 0,124 mg.l<sup>-1</sup>, por Paumen *et al.* (2007). Este aumento da CL<sub>50</sub> em 13 vezes para *C. sancticaroli*, pode estar relacionada principalmente aos diferentes estágios de vida que permaneceram expostos ao fenantreno. Os organismos de *C. riparus* foram expostos no estágio de larva de 3º instar/4º instar, passando pelo estágio de pupa até a emergência dos adultos, enquanto que para *C. sancticaroli* somente foram expostos indivíduos no estágio de larva. Dessa forma, o estágio larval pode representar o estágio de vida dos quironomídeos com maior resistência a exposição ao fenantreno.

A concentração letal a 50% do fenantreno também foi determinada para diversos organismos. Para anelídeos (*Eisenia fetida*), um importante bioindicador de solo, obteve-se CL<sub>50</sub> igual a 40,67 mg.Kg<sup>-1</sup> (Wu *et al.* 2011). Em peixe, a CL<sub>50</sub> para 96 horas foi determinada em 0,94 mg.l<sup>-1</sup> para *Colossoma macropomus*, 1,03 mg.l<sup>-1</sup> para Curimbata (*Prochilodus lineatus*) e 1,17 mg.l<sup>-1</sup> para Zebrafish (Veintemilla 2006; Zhao 2011; Martins 2012). Para camarão foi obtida CL<sub>50</sub> igual a 360 µg.l<sup>-1</sup> para 96 horas de exposição (Unger 2009). Em collembola (*Folsomia candida*), insetos de solo, a CL<sub>50</sub> para 96 horas foi determinada em 171 µmol.Kg<sup>-1</sup> (Paumen 2009). Comparando-se com esses organismos, *Chironomus sancticaroli* apresentou CL<sub>50</sub> com maior proximidade a CL<sub>50</sub> determinada para as diferentes espécies de peixes, o que pode estar relacionado a ambos habitarem o meio aquático. No entanto, *C. sancticaroli* demonstrou maior resistência a exposição ao fenantreno, em relação, a todos os organismos, com exceção apenas dos anelídeos. Segundo Fent *et al.* (2004) a diferença de sensibilidade dos organismos podem estar relacionado a fatores como biodisponibilidade, metabolização e hábito de vida dos organismos.

A partir da CL<sub>50</sub> foi estimada a concentração de efeito não observado (CENO igual a CL<sub>50</sub>/10) em 0,16 mg.l<sup>-1</sup>. Essa concentração é determinada pela USEPA (2000) como a maior concentração em que os compostos químicos não afetam os

organismos expostos, sendo estatisticamente igual ao controle. Neste estudo o fenantreno provocou efeitos genotóxicos e populacionais até mesmo na concentração CENO, o que indica uma alta toxicidade do composto. Dessa forma, novos estudos são necessários para se determinar o limite mínimo da concentração de fenantreno que não causa efeitos sobre os organismos.

A realização de bioensaios agudo e crônico demonstrou que os estágios iniciais de desenvolvimento dos imaturos foram afetados, indicando que as larvas de segundo instar são mais sensíveis que as larvas de terceiro instar final/ quarto instar inicial, as quais tiveram menor índice de mortalidade.

Os danos ao DNA causado pelo fenantreno foram avaliados através do ensaio cometa alcalino. Nestes, juntamente com o controle negativo (H<sub>2</sub>O), foram avaliados os danos ao DNA ocasionados pelo solvente (etanol P.A.), que poderia estar influenciando nos resultados e assim seria obtida uma resposta falso-positiva. Contudo não houve diferença entre os dois grupos, indicando que, as concentrações de solvente (etanol 100%) utilizadas não ocasionou danos significativos ao DNA das larvas de *C. sancticaroli*. Este dado se assemelha ao proposto por Phillips & Jenkinson (2001) de que o etanol não é genotóxico.

Em exposição aguda esperava-se um significativo aumento dos danos ao DNA com a elevação da concentração, já que foram utilizadas concentrações que representam uma faixa crescente de mortalidade dos organismos, CENO, CL<sub>2</sub>, CL<sub>10</sub>, CL<sub>30</sub> e CL<sub>50</sub>. Neste caso, o aumento relativo da concentração de fenantreno poderia ocasionar maiores danos ao DNA das larvas de *C. sancticaroli*. Entretanto, foi observada diferença significativa apenas entre as concentrações de 0,16 mg.l<sup>-1</sup> e 1,06 mg.l<sup>-1</sup>.

A observação de danos mais severos (classes três e quatro) e maiores escores das lâminas nas maiores concentrações de fenantreno também sugerem, aumento de danos ao DNA com a elevação da concentração de fenantreno. Contudo, o aumento da concentração em 10x não ocasionou resposta significativa em relação ao controle, sendo obtida uma resposta concentração-não-dependente.

Esses resultados indicam que o fenantreno é genotóxico a *C. sancticaroli* causando quebras no material genético em baixas concentrações em curto período de exposição. Considerando que os efeitos moleculares são primários, a avaliação

dos danos ao DNA através do ensaio cometa alcalino, poderia auxiliar na identificação do fenantreno em estágios iniciais de contaminação ambiental.

O mesmo padrão de danos ao material genético foi encontrado em exposição crônica. Ambas as concentrações analisadas se diferenciaram do controle, embora o aumento da concentração em aproximadamente 5x não ocasionou intensificação da quebra do material genético. Considerando que danos da classe três e classe quatro e lâminas de maior escore foram observadas na maior concentração (0,83 mg.l<sup>-1</sup>), há um indício de que o aumento da concentração de fenantreno poderia ocasionar aumento nos danos ao DNA em longo período de exposição.

Contudo, a obtenção de resposta concentração-não-dependente pode representar que mesmo com o aumento relativo da concentração o potencial genotóxico do fenantreno não se intensifica, e neste caso, a permanência do composto no ambiente também não elevaria os danos ao DNA.

A obtenção de resposta concentração-não-dependente para os danos ao DNA pode ser decorrente do mecanismo presente nos organismos que neutralizam a ação do fenantreno sobre o material genético. Segundo Marinković *et al.* (2011) o fenantreno provoca ativação da enzima de reparo de DNA, o que poderia estar reduzindo a intensificação dos danos ao material genético.

A avaliação conjunta da exposição crônica e aguda demonstrou que o fenantreno é potencialmente genotóxico a *C. sanctiarii* causando danos ao DNA. Segundo Jha (2008) os danos podem representar, em curto prazo, efeitos subletais e a longo prazo pode ocasionar mutações, perdas e aberrações cromossômicas assim como pode ocasionar alteração na estrutura gênica da espécie. Dessa forma, o estudo dos danos ao DNA ocasionados pelo fenantreno torna-se de grande relevância para o monitoramento ambiental.

Os efeitos populacionais em quironomídeos ocasionados pela exposição a xenobióticos são amplamente estudados, representando importantes *endpoints* (Lee & Choi 2006; Paumen *et al.* 2007; Marinkovic *et al.* 2011; Nair *et al.* 2011). Segundo Strixino (1982) a medida da cápsula cefálica pode ser utilizada para determinar o instar larval e, conseqüentemente, avaliar o desenvolvimento dos organismos. Os instares larvais para *C. sanctiarii* já foram definidos pela medida da cápsula cefálica por Strixino & Strixino (1982) e Richardi *et al.* (2013).

A cápsula cefálica das larvas expostas sofreram redução de 1,5 vezes em relação ao grupo controle. Utilizando as medidas de Richardi *et al.* (2013) as larvas analisadas estavam em média no terceiro instar, sugerindo uma sincronização no ciclo de vida. Entretanto, ocorreu aumento na porcentagem de larvas no segundo instar e redução nas larvas de quarto instar em ambas as concentrações, testadas no bioensaio crônico, indicando atraso no desenvolvimento larval. Esses dados não corroboram com Marinković *et al.* (2011) que não observaram alterações no tamanho das larvas expostas ao fenantreno.

A redução do tamanho da cápsula cefálica pode ter sido ocasionado pela inibição do processo de muda ou alterações em funções essenciais como a alimentação.

Segundo Marinkovic *et al.* (2012), em *C. riparus*, o fenantreno não alterou a expressão do hormônio juvenil (ácido-metil-transferase), que é o principal regulador da muda. Isto indica que o processo de muda não é inibido pelo fenantreno através do metabolismo hormonal.

Ao estudar a histologia das larvas de *C. sancticaroli* expostas ao fenantreno Richardi (2013) observou alteração em células do intestino responsáveis pela absorção de nutrientes o que poderia reduzir a capacidade nutricional das larvas. Neste caso, a alteração no tamanho da cápsula cefálica poderia estar ocorrendo devido a redução de nutrição das larvas.

Atrasos no desenvolvimento larval de quironomídeos por restrição alimentar já foram descritos na literatura. Libber *et al.* (1996) observaram que a redução da quantidade de alimento oferecido as larvas ocasiona um retardo no desenvolvimento dos organismos resultando em atrasos na emergência dos adultos de *C. tentans*. O mesmo foi determinado por Ristola *et al.* (1999) em estudo com *C. riparus*. Isto reforça o indicativo de que o fenantreno esteja atuando sobre a nutrição das larvas de *C. sancticaroli*.

Avaliando-se o início da emergência foram observados atrasos para os adultos nas duas concentrações analisadas, indicando atrasos no ciclo de vida da espécie, embora não tenha ocorrido resposta concentração-dependente. Atrasos na emergência de diferentes espécies de quironomídeos foram observados em exposição a Nitrato de Prata, metais pesados e HPAs (Sibley 1996, Ristola 1999, Nair *et al.* 2011).

Considerando que as larvas apresentaram redução do tamanho sob exposição ao fenantreno pode-se determinar que isto está relacionado aos atrasos decorrente na emergência dos adultos, o que sugere que o fenantreno cause atrasos no desenvolvimento das larvas e, conseqüentemente, no ciclo de vida da espécie.

Diferença na sensibilidade de machos e fêmeas em condições adversas, como a exposição a compostos químicos, já foi amplamente relatado na literatura (Sanchez *et al.* 2005; Libber *et al.* 2006; Ristola *et al.* 2009; Marinkovic *et al.* 2011). Neste estudo, machos apresentaram significativos atrasos no início da emergência, para as duas concentrações analisadas, nos bioensaios crônicos, enquanto que as fêmeas não apresentaram retardo no início da emergência. Isto demonstra a diferença de sensibilidade relacionada ao sexo em exposição ao fenantreno. Esses resultados foram obtidos também por Paumen *et al.* (2007) e Marinkovic *et al.* (2011) em estudos com *C. riparus*.

O número de adultos que emergiram sofreu uma significativa redução com aumento da concentração obtendo-se apenas 37% na concentração 0,16 mg.l<sup>-1</sup> e 28% em 0,83 mg.l<sup>-1</sup>. Isto indica redução do número de organismos adultos com o aumento da concentração, podendo-se, ao longo do tempo provocar redução na densidade de *C. sancticaroli*. Esses dados são similares aos obtidos por Paumen *et al.* (2007) que observou redução da emergência dos adultos com o aumento da concentração de fenantreno.

A redução da quantidade de organismos adultos está relacionada, principalmente, ao alto índice de mortalidade das larvas de segundo instar expostas ao fenantreno, sugerindo que o fenantreno afeta primeiramente a sobrevivência dos organismos. Decréscimo no número de adultos também foi observado em *C. riparus* expostas ao Nitrato de Prata e *C. tentans* em exposição à piretróide (Maul *et al.* 2009; Nair *et al.* 2011).

A fecundidade potencial das fêmeas de *C. sancticaroli*, diferentemente dos outros fatores populacionais analisados não sofreu alteração pela exposição ao fenantreno. Entretanto, não foi possível determinar os efeitos do fenantreno sobre o número efetivo de ovos produzidos pelas fêmeas, visto que a fecundidade realizada, ou seja, o número de ovos presente na massa ovígera, segundo Strixino (1980), depende não apenas do número de óvulos maduros, mas de fatores ambientais

como vento, luz e temperatura que determinam os eventos de encontro de parceiros, acasalamento e oviposição. O que indica a necessidade de pesquisas futuras.

A avaliação conjunta da toxicidade do fenantreno sobre *C. sancticaroli* em diferentes níveis de organização biológica, molecular e populacional, demonstrou que a espécie pode representar um potencial bioindicador ambiental. Da mesma forma pode-se observar que o fenantreno possui potencial genotóxico, causando danos ao DNA e afetando também níveis populacionais, provocando alteração no desenvolvimento dos imaturos e retardo no ciclo de vida. Considerando que os danos ao DNA provocados por exposição ao fenantreno, ainda não haviam sido abordados na literatura para Chironomidade, sendo este o primeiro trabalho, é de grande importância a realização de novos estudos, como, efeitos enzimáticos (etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e glutathiona-s-transferase (GST)), visando a entender os efeitos desse composto sobre os organismos.

## 7. CONCLUSÕES

O fenantreno é tóxico às larvas de *C. sancticaroli* sendo obtida faixa de tolerância de 0,83 mg.l<sup>-1</sup> a 3,2 mg.l<sup>-1</sup> com sobrevivência de 50% dos organismos em concentração de 0,16 mg.l<sup>-1</sup> de fenantreno.

A avaliação dos danos ao DNA pelo ensaio cometa alcalino, demonstrou que o fenantreno é genotóxico as larvas de *C. sancticaroli* em exposição de 96 horas (aguda) nas concentrações 0,16 mg.l<sup>-1</sup>, 0,83mg.l<sup>-1</sup>, 1,06mg.l<sup>-1</sup>, 1,34mg.l<sup>-1</sup> e 1,60mg.l<sup>-1</sup>, e oito dias (crônica) nas concentrações 0,16 mg.l<sup>-1</sup>, 0,83mg.l<sup>-1</sup>.

O fenantreno causa redução do tamanho da cápsula cefálica e atrasos na emergência dos adultos e dos machos de *Chironomus sancticaroli* em exposição crônica ao fenantreno sob as concentrações 0,16 mg.l<sup>-1</sup>, 0,83mg.l<sup>-1</sup>.

A exposição ao fenantreno reduziu o número de indivíduos adultos de *Chironomus sancticaroli* por exposição crônica nas concentrações 0,16 mg.l<sup>-1</sup>, 0,83mg.l<sup>-1</sup>.

A fecundidade potencial das fêmeas de *Chironomus sancticaroli* não foi afetada em exposição crônica (oito dias) nas concentrações 0,16 mg.l<sup>-1</sup>, 0,83mg.l<sup>-1</sup> de fenantreno.

## REFERÊNCIAS

- Al- Shami, S. A.; C.S. Rawi, S.A. Nor, A.H. Ahimad & N.A. Ishadi. 2012. Genotoxicity in *Chironomus kiiensis* (Chironomidae: Diptera) after exposure to polluted sediments from rivers of north peninsular Malaysia: Implication for ecotoxicological monitoring. **River Research and Applications**.
- Bonani, F. 2010. Avaliação de Deformidades Morfológicas em Larvas de Chironomus (Diptera, Chironomidae) na Bacia do Rio Piracicaba e sua Aplicação no Biomonitoramento. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais – Ecologia- Universidade Federal de São Carlos), São Carlos, São Paulo.
- Broddin, G.; L. V. Vaeck & V. Cauwenberghe. 1977. On the size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon containing particles from a coke oven emission source. **Atmospheric Environment** **11**: 1061 - 1064.
- Brown, S. A.; J.R. Mckelvie & A. J. Simpson. 2010. HNMR metabolomics of earthworm exposure to sub-lethal concentrations of phenanthrene in soil. **Environmental Pollution (158)**: 2117-2123.
- Buss, D. F.; R. B. Renata & D. F. Baptista. Monitoramento biológica de ecossistemas aquáticos continentais. 2008. **Oecologia Brasilienses** **12** (3): 339 - 345.
- Callisto, M. Moretti & M. Goulart. 2001. Macroinvertebrado Bentônico como Ferramenta para Avaliar a Saúde de Riachos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos** **1** (6): 71-82.
- Callisto, M. & F. A. Esteves. 1998. Biomonitoramento da macrofauna bentônica de Chironomidae (Diptera) em dois Igarapés amazônicos sob influência das atividades de uma mineração de bauxita. **Oecologia Brasilienses (5)**: 299-309.
- Carvalho, J. A. M. D. O. Sawyer, R. N. Rodrigues.1998. **Introdução a alguns conceitos básicos e medidas em demográfias**.
- Cavalcanti, R. M.; N. S. M. Filho; R. B. Viana; I. R. N. Oliveira & R. F. Nascimento. 2007. Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em matrizes aquosas ambientais. **Química Nova (30) 3**: 560 - 564
- Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CESTEB). 1992. **Relatório de águas interiores do Estado de São Paulo**. 1992.Associação de Estudos Brasileira de Estudos Populacionais.
- Choi, J. 2004. Ecological Issues in a Changing World. In S.-K, p. 203 - 215. Hong *et al.* (ED.) Status, **Response and Strategy** .
- Choi, J. 2005. Ecotoxicological biomonitoring as different levels of biological organization and its application in *Chironomus riparus* spp. **Journal Environmental Toxicology** **20** (1):1 - 11.
- Collins A. R. 2002. **Methodos in Molecular Biology**. V.V. Didenko (Ed.). Totowa.

CONAMA. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução 357 (53)**: 58-63.

Costa, C. R. & P. Olivi. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova** 31 (7): 1820 -1830.

Cotelle, S. & Ferard. 1999. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. **Environmental and Molecular Mutagenesi** (34): 246-255.

Corbi, J. J.; S. T. Strixino. 2006. Ciclo de Vida de Duas Espécies de *Goeldichironomus* (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 50 (1): 72-75.

Cranston, P. 1995. The Cironomidae: The biology and ecology of non-biting midges. In: Armitage, P., P. S. Cranston & L. C. V. Pinder (Ed.). **The Cironomidae: The biology and ecology of non-biting midges**. London: Chapman & Hall.

Demin, A. G.; N. V. Polukonova & N. S. Muge. 2011. Molecular Phylogeny and The Time of the Minges (Chironomidae, Nematocera, Diptera) Inferred from a Partial Nucleotide Sequence of the Cytochrome Oxidase I Gene COI. **Russian Journal of Genetics** (10) 47: 1168 -1180.

Dornfeld, C.B. Utilização de *Chironomus sp* (Diptera, Chiromidae) para a Avaliação da Qualidade de Sedimentos e Contaminação por Metais. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental – Universidade Federal de São Carlos), São Carlos, São Paulo, 2006.

Enrici, M. H. L.; A. Dondeyne & E. Thybaud. 2003. Influence of the organic matter on the biovality of phenanthrene for benthic organisms. **Aquatic Ecosystem Health & Management** 6 (4): 391 - 396.

Environmental Canada. 1995. **Guidance Document on measurement of toxicity test presicion using control sediments spiked with a referent toxicant. E. P. S. 1 /RM/ 30, 56 pp.**

Fent, K. 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology** 205: 223 - 240.

Franco, R. M.; E. A. Raimundi; F. C. Antonelo; M. G. Bocchese; V. L. Hammerschmitt & G. M. S. Franco. 2000. Análise da Qualidade da Água Através do Uso de Macroinvertebrados Bentônicos em Riacho da Fazenda Tamanduá Vargem Bonita (SC), Brasil. **Oecologia Brasilienses** (6): 70-18.

Freire, M. M.; V.G. Santos; I.S.F. Ginuinol & A. R. Linde. 2008. Biomarcadores na Avaliação da Saúde Ambiental. In **Oecologia Brasilienses** 12(3): 347-354.

Gay, M. N. R. 2003. **Genética Toxicológica: Bases e Metas**. Instituto Butantan. São Paulo, SP, Brasil.

Hannam, M.; S. D. Bamber; T. S. Galloway; A.J. Moody & M. B. Jones. 2010. Effects of the model PAH phenanthrene on immature function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pectens maximus*. **Chemosphere**: 779-784.

Hahn, N. S. ; R. Fugui & Andrian. 2004. Alimentação de peixes em reservatório brasileiro: alterações e consequências nos estágios iniciais do repesamento. **Oecologia Brasilienses** 11 (4): 469-480.

Heerinques, P. J. A.;B. Erdtmann & J. Silva.2003. **Genética Toxicológica**. Ed. Alcançe 1° edição, Rio Grande do Sul, 26-27.

Jacques, R. J.; F.M. Bento & Z. I. Antonioli. 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural** 4: 1192-1201.

Jha, A. N. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis** 23 (3):207-221.

Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., & Sofuni, T. 1995 A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **Mammalian Mutagenicity Study Group Communications** 3:, 103–115.

Lee, S. B.; & J. Choi. 2006. Multilevel evaluation of Nonylphenol Toxicity in fourth-instar larval of *Chironomus riparus* (Diptera, Chironomidae). **Environmental Toxicology and Chemistry** 11: 3006-3014.

Liber, K. ; D. J. Call; T. D. Dawson; F. W. Whiteman & T. M. Dillon.1996. Effects of *Chironomus tentans* larval growth retardation on adult emergence and oviposition success: implication for interpreting freshwater sediment bioassays. **Hydrobiologia** 323 (3): 155-167.

Lombardi, J. V. 2004. Fundamentos de toxicologia aquática. In: M. J. T. Ranzani-Paiva; R. M. Takemota & M.A. P. Lizama (Eds.) **Saúde de Organismos Aquáticos**. 261 - 270.

Maier, K. J. & P. Kosalwat. 1990. Culture of *Chironomus decorus* (Diptera: Chironomidae) and Effect of Temperature on its Life History. **Environmental Entomology** 19: 1681-1888.

Magalhães, D. P. & A. S. F. Filho. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasilienses** 12 (3): 355 - 381.

Marinkovic, M.; W.C. Leeuw; W.A. Ensink; M. Jonk; T. M. Breit & W. Admiral. 2012. Gene Expression Patterns and Life Cycle Responses of Toxicant Exposed Chironomids. **Environmental Science & Technology** 46: 1267-1286.

Marinkovic, M.; R.A. Verwey; G. A. Numerador; M.J. Jonter & Kraak, M. H. 2011. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparus* to compounds with different modes of action. **Environmental Science & Technology** **45**: 1645-1651.

Martins, L. P. A. 2012. Toxicidade e alterações, morfofuncionais, bioquímicas e genéticas em Curimatás, *Prochilodus Lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) expostos ao fenantreno. Tese (Universidade Federal de São Carlos) São Paulo.

Martyniuk, C. J.; B. C. Sanchez; N. J. Szabo & N. D. Denslow. 2009. Aquatic contaminants alter genes involved in neurotransmitter synthesis and gonadotrophin release in largemouth bass. **Aquatic Toxicology** **95**: 1-9.

Maul, J.D.; A. A. Drennam; A. D. Harwood; M. J. Lydy. 2009. Effect of sediment-associated pyrethroids, fipronil and metabolites on *Chironomus tentans* growth rate, body mass, condition index, immobilization and survival. **Environmental Toxicology and Chemistry**.

Meire, R. O. & A. Azeredo. 2007. Aspectos Ecotoxicológicos de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. **Oecologia Brasilienses** **1**: 188-201.

Meniconi, M. F. G. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos no meio ambiente: diferenciação de fontes em sedimentos e metabólitos de peixes. Tese de doutorado (Programa de Pós Graduação em Química- UFRN) Natal.

Michailova, P.; J. Ilkova & K. White. 2003. Functional and structural rearrangements of salivary gland polytene chromosomes of *Chironomus riparus* Mg. (Diptera, Chironomidae) in response to freshly neutralized aluminium. **Environmental Pollution** **123**: 193-207.

Morais, G. 2011. Efeito do fenantreno na biologia de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino 1981 (Diptera: Chironomidae). Monografia (Universidade Federal do Paraná) em Ciências Biológicas.

Nair, P. M.; S.Y. Park & S. W. Lee. 2011. Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposure *Chironomus riparus*. **Aquatic Toxicology** **101**: 31-37.

Netto, A. D. P.; J.C. Moreira, A. E. X. O. Dias; G. Arbilla; L. F. V. Ferreira; A. S. Oliveira & J. Barek. Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e seus derivados nitratos (NHPAS): Uma revisão metodológica. **Nova Química** **23**: 765-773.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. 2004. Sediment Water Chironomid Toxicity Test Using Spiker Water. **Guidelines for Testing of Chemicals** **219**

Park, S. Y. & J. Choi. 2007. Cytotoxicity genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environmental International** **33**: 817-822.

Park, S. Y., & Choi, J. 2009. Genotoxic effects of Nonylphenol and Bisphenol A Exposure in Aquatic Biomonitoring Species: Freshwater Crustacean, *Daphnia magna* and Aquatic Midge, *Chironomus riparus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** **83**: 463-468.

Paumen, M. L.; M. H. Kraak & C.A. Gestel. 2007. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparus* to polycyclic aromatic compound exposure. **Environmental Pollution** **152**: 225-232.

Paumen, M. L.; E. Steembergen; M. H. S. kraak; N. M. V. Stanlen & C.A. M. V. Gestel. 2009. Multigeneration exposure of the springtail *Folsomia candida* to phenanthrene: from dose-response-relationship to threshold concentrations. **American Chemical Society**.

Pereira, S. A.; I. A. Nascimento; M. B. N. L. Leite; A. C. Cruz; D. A. Barros; V. Q. Araújo; L. M. A. Sampaio & N. C. Nascimento. 2010. Sensibilidade de quatro organismos-teste (*Skeletonema costatum*, *Tetraselmis chuii*, *Crassostrea rhizophorea* e *Echiometra lucunter*) ao dodecil sulfato de sódio: elaboração das cartas-controle. **Dialógos e Ciências** **24**.

Phillips, J. P. & Petter Jenkinson. 2001. Is ethanol genotoxic? A review of the published data. **Mutagenesis** (2) **16**: 91 - 2001.

Platt, K. L.; S. Aderhold & K. Kulpe. 2007. Unexpected DNA damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons under standard laboratory conditions. **Mutation Research** **650**: 96-103.

Queiroz, A. F. S.; J. S. Celino; I. G. Veiga & J. A. Triguis. 2004. Contaminação por Hidrocarboneto Policíclico Aromático (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos superficiais de manguezais da Baía de Todos os Santos, Bahia. **Copyright, Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás**.

Richardi, V. S.; D. Rebecchi; J. M. R. Aranha; M. A. N. Silva. 2013. Determination of larval instar in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) using a novel head capsule structures. **Revista Brasileira de Zoologia** **30 (2)**: 211-216.

Richardi, V. S. 2013. Descrição histológica de imaturos de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) e efeitos histopatológicos e biológicos após a exposição ao fenantreno. Dissertação de mestrado (Universidade Federal do Paraná) Curitiba, PR.

Ristola, T.; J. Pellien; M. Ruokalainen. A. Kostano. J. V. F. Kukkonen. 1999. Effect of sediment type, feeding level, and larval density on growth and development of a midge (*Chironomus riparus*). **Environmental Toxicology and Chemistry** **18 (4)**: 756 - 764.

Ross, K.; C. Naomi; J. R. Joseph; J. Elder. 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. **Marine Pollution Bulletin** (44): 671-679.

Sanseverino, A. M.; J.L. Nessimian. 2008. Assimetria Flutuante em Organismos Aquáticos e sua Aplicação para Avaliação de Impactos Ambientais. **Oecologia Brasilienses** 12(3): 382-405.

Sanchez, P.; A. C. Fernandez; C. Veja; M. M. Garcia; M.P. J. V. Tarazona. 2005. Evaluation of a multi-species test system for assessing acute and chronic toxicity of sediments and water to aquatic invertebrates. Effects of pentachlorophenol on *Daphnia magna* and *Chironomus prasinus*. **Journal of Soils and Sediments** (5): 53-58.

Shin, K. H.; K. W. Kim & E. A. Seagren. 2004. Combined effects of pH and biosurfactant addition on solubilization and biodegradation of phenanthrene. **Applied Microbial and Cell Physiology** 65: 336 - 343.

Silva, A. M. 2005. Avaliação ecotoxicológica do agrotóxico permetrina através de ensaios de toxicidade com invertebrados aquáticos. Dissertação (Mestrado em Ciências – Tecnologia Nuclear- Autarquia associada a Universidade de São Paulo), São Paulo, 2005.

Singh, N. P.; M. T. McCoy; R. R. Tice & E. L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research** 175: 184-191.

Sibley, P. K.; G. T. Ankley; A. M. Cotter & E. N. Leonard. 1996. Predicting chronic toxicity of sediments spiked with zinc: an evaluation of the acid volatile sulfide model using a life cycle test with the midge *Chironomus tentans*. **Environmental Toxicology and Chemistry** 15: 2102 - 2112.

Strixino, T. S. 1980. Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sabcarlensis* sp. n. (Diptera: Chironomidae). Tese de doutorado (Universidade Federal de São Carlos), São Paulo.

Strixino, T. S. 2011. Chironomidae (Insecta, Diptera, Nematocera) do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. **Biota Neotropical** 11.

Strixino, G. &. 1985. A temperatura e o Desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae.). **Revista Brasileira de Zoologia** 3: 177-180.

Strixino, T. & G. Strixino. 1982. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 26 (2): 183-189.

Tao, Y.; C. Haingang; C. Wen-gui; Q. J. Fang & X. Ping. 2011. Acute and chronic toxicity effects of phenanthrene in seawater on crimson snapper (*Lutyanus erythroptereus*). **Journal of Fisheries of China** 2011- 2012.

Unger, M.; M. C. Newman & G. G. Vados. 2009. Predicting survival of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) during ethylenaphthalene, dimethylnaphthalene and phenanthrene exposures differing in concentration and duration. **Environmental Toxicology and Chemistry** (26): 528-534.

USEPA.1986. **Quality criteria for water**. EPA 440/5-86-001. Washington, DC.20460. United States Environmental Agency.

USEPA. 2000. **Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates**. EPA 600/R-99/064. Washington, DC. 212p. Environmental Protection Agency.

USEPA. Environment Protection Agency. 2008. **Quality criteria for water**. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Veintemilla, C. A. C. 2006. Impactos do Fenantreno sobre o Tambiqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818: CL<sub>50</sub>, Crescimento e Hematologia. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais – Concentração em Ecologia- Universidade Federal do Amazonas), Manaus.

Zhao, X. 2011. Joint acute toxicity of phenanthrene and sodium perchlorate to adult Zebrafish. **Biomedical Engineering** 1-4.

Zhao, L.& W. Jones. 2012. Expression of heat shock protein genes in insects stress responses. **IJS** (9): 93-101.

Zhou, Q.; Z. Jianbin; J. Fu.; J. Shi & G. Jiang. 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta** 135-150.

WHO. 2003. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water . **Guidelines for Drink Water Quality**. World Health Organization.

WHO. World Health Human. 1998. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water. In **Guidelines for Drinking-Water**. Geneva, World Health Organization, 495-505p.

Wu, S.; E. Wu; L. Qiu; W. Zhong & J. Chuan. 2010. Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. **Chemosphere** 83: 429 – 434.

Yung, S. W.; S. H. Wei & B. V. Chang. 2000. Biodegradation of polycyclic hydrocarbons by a mixed culture. **Chemosphere** 41: 1463 – 1468.

## ANEXO 1

TABELA XI. Comprimento da cápsula cefálica obtido para cada larva (n=70) nos grupos controle (H<sub>2</sub>O, solvente) e grupos expostos por oito dias ao fenantreno indicando o valor médio.

Número da Larva	H <sub>2</sub> O	Solvente	0,16 mg.l <sup>-1</sup>	0,83 mg.l <sup>-1</sup>
1	0,29	0,302	0,185	0,251
2	0,321	0,292	0,162	0,163
3	0,294	0,326	0,294	0,171
4	0,304	0,316	0,272	0,167
5	0,311	0,271	0,167	0,168
6	0,334	0,286	0,093	0,219
7	0,301	0,294	0,251	0,286
8	0,332	0,258	0,274	0,258
9	0,271	0,141	0,176	0,26
10	0,294	0,289	0,123	0,288
11	0,293	0,28	0,176	0,23
12	0,34	0,268	0,166	0,269
13	0,32	0,279	0,195	0,171
14	0,324	0,225	0,156	0,279
15	0,306	0,157	0,179	0,26
16	0,283	0,289	0,188	0,215
17	0,322	0,256	0,174	0,283
18	0,327	0,284	0,206	0,149
19	0,33	0,291	0,276	0,125
20	0,202	0,278	0,208	0,158
21	0,191	0,185	0,259	0,186
22	0,189	0,3	0,211	0,178
23	0,203	0,14	0,151	0,163
24	0,202	0,169	0,173	0,275
25	0,301	0,164	0,28	0,174
26	0,189	0,27	0,24	0,085
27	0,31	0,266	0,16	0,164
28	0,191	0,169	0,146	0,152
29	0,198	0,289	0,166	0,176
30	0,202	0,157	0,168	0,141
31	0,2	0,18	0,172	0,247
32	0,195	0,277	0,143	0,155
33	0,182	0,297	0,132	0,172
34	0,185	0,171	0,172	0,15
35	0,176	0,185	0,148	0,166
36	0,17	0,262	0,166	0,182
37	0,181	0,177	0,177	0,294
38	0,27	0,264	0,172	0,142
39	0,149	0,288	0,14	0,18
40	0,259	0,174	0,151	0,091

41	0,174	0,268	0,152	0,176
42	0,179	0,165	0,096	0,174
43	0,25	0,245	0,234	0,103
44	0,172	0,277	0,132	0,178
45	0,161	0,274	0,159	0,178
46	0,182	0,181	0,288	0,174
47	0,167	0,256	0,156	0,09
48	0,322	0,183	0,176	0,103
49	0,161	0,169	0,177	0,146
50	0,185	0,309	0,174	0,091
51	0,182	0,179	0,278	0,142
52	0,139	0,178	0,143	0,144
53	0,193	0,188	0,087	0,102
54	0,153	0,265	0,172	0,12
55	0,136	0,178	0,146	0,156
56	0,309	0,178	0,164	0,148
57	0,298	0,183	0,175	0,084
58	0,207	0,179	0,163	0,135
59	0,209	0,183	0,166	0,187
60	0,308	0,296	0,175	0,152
61	0,202	0,286	0,178	0,145
62	0,299	0,311	0,177	0,145
63	0,297	0,164	0,168	0,16
64	0,324	0,282	0,163	0,19
65	0,308	0,291	0,148	0,176
66	0,299	0,172	0,139	0,09
67	0,297	0,285	0,149	0,086
68	0,324	0,149	0,144	0,085
69	0,202	0,291	0,15	0,083
70	0,308	0,269	0,163	0,102
<b>Média</b>	<b>0,245557</b>	<b>0,237143</b>	<b>0,1777143</b>	<b>0,16982857</b>

## ANEXO 2

TABELA XII. Tamanho das asas (M (mm)) e fecundidade potencial (F.) de 30 fêmeas para os grupos controle (H<sub>2</sub>O, solvente) e grupos expostos por oito dias ao fenantreno indicando o valor médio.

Asa	H <sub>2</sub> O		Solvente		0,16 mg.l <sup>-1</sup>		0,83 mg.l <sup>-1</sup>	
	M. (mm)	F.	M. (mm)	F.	M.	F.	M. (mm)	F.
1	3,22	808,61	3,17	785,50	2,956	686,46	3,126	767,35
2	3,11	280,375	3,10	752,49	2,085	275,66	3,023	718,77
3	2,60	518,08	3,02	718,53	2,404	426,11	2,845	634,82
4	2,91	662,40	3,21	804,37	2,172	316,69	3,043	728,20
5	3,14	770,88	2,97	690,70	2,036	252,55	3,232	817,34
6	2,86	641,65	3,16	782,67	2,305	379,42	3,034	723,96
7	3,06	734,09	2,85	634,58	2,193	326,60	2,645	540,49
8	2,68	557,70	3,05	731,26	2,197	328,48	2,985	700,85
9	3,11	758,62	2,90	657,69	2,312	382,72	3,11	759,80
10	2,92	669,48	3,05	731,26	2,369	409,61	3,1	755,08
11	2,98	696,36	2,81	619,48	2,15	306,32	2,665	549,92
12	3,06	735,98	3,14	773,24	2,393	420,92	2,790	608,88
13	3,10	752,02	3,21	805,78	2,153	307,73	2,827	626,33
14	3,02	718,53	3,35	872,28	3,114	760,98	2,882	652,27
15	2,98	699,19	3,03	721,36	3,097	752,96	2,541	491,44
16	3,03	722,77	3,16	780,31	2,998	706,27	3,167	786,68
17	3,10	752,49	3,13	768,52	2,971	693,53	2,91	665,47
18	2,76	595,90	2,88	652,50	2,712	571,38	3,2	802,25
19	3,13	767,11	3,00	708,15	2,675	553,93	2,965	691,41
20	3,02	718,53	2,84	631,75	2,915	667,12	3,083	747,07
21	2,97	693,53	2,84	631,75	2,640	537,42	3,081	746,12
22	3,20	802,01	3,15	777,01	3,143	774,65	2,882	652,27
23	2,76	594,49	2,69	562,89	2,980	697,78	3,115	762,16
24	2,85	636,46	2,95	684,10	2,994	704,38	2,827	626,33
25	3,06	735,98	2,89	652,97	2,502	472,33	2,750	590,01
26	2,94	679,38	2,73	580,34	2,733	581,28	3,2	802,25
27	2,72	574,68	2,82	624,20	2,785	605,81	3,265	832,90
28	3,12	764,75	2,82	622,31	2,368	409,13	2,623	530,11
29	2,91	666,65	2,70	564,30	2,86	641,18	2,747	588,60
30	2,98	697,78	2,68	556,29	3,021	717,11	2,953	685,75
<b>Média</b>	<b>2,98</b>	<b>694,00</b>	<b>2,98</b>	<b>695,95</b>	<b>2440,00</b>	<b>522,2171</b>	<b>2,437</b>	<b>686,1617</b>