



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE

# BRUNA CRISTINA FERREIRA VASCONCELOS

# ANÁLISES MULTICRITERIAIS DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ÓLEO CRU EM ORGANISMOS RECIFAIS

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Braga Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Ralf Tarciso Silva Cordeiro

## BRUNA CRISTINA FERREIRA VASCONCELOS

# ANÁLISES MULTICRITERIAIS DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ÓLEO CRU EM ORGANISMOS RECIFAIS

Trabalho de dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGBio -UFRPE) como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Braga Gomes Coorientador: Prof. Dr. Ralf Tarciso Silva Cordeiro Dados Internacionais de Catalogação na Publicação Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE Bibliotecário(a): Ana Catarina Macêdo – CRB-4 1781

V331a	Vasconcelos, Bruna Cristina Ferreira.
	Análises multicriteriais dos efeitos da exposição
	ao óleo cru em organismos recifais / Bruna Cristina
	Ferreira Vasconcelos Recife, 2024.
	133 f.; il.

Orientador(a): Paula Braga Gomes. Co-orientador(a): Ralf Tarciso Silva Cordeiro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Recife, BR-PE, 2024.

Inclui referências.

1. *Cnidaria*. 2. Invertebrados. 3. Petróleo. 4. Toxicologia ambiental I. Gomes, Paula Braga, orient. II. Cordeiro, Ralf Tarciso Silva, coorient. III. Título

CDD 333.95

# **BRUNA CRISTINA FERREIRA VASCONCELOS**

# ANÁLISES MULTICRITERIAIS DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ÓLEO CRU EM ORGANISMOS RECIFAIS

Dissertação defendida e aprovada em 31 de maio de 2024.

# BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Braga Gomes (UFRPE) - Presidente

Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas (UFPE) - Titular

Prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica Lúcia Botter Carvalho (UFRPE) - Titular

Dr. Felipe Ferreira Campos (UFPE) - Suplente

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e bolsa concedida e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGBio - UFRPE) pelo apoio estrutural.

Meus sinceros agradecimentos dedico a todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Sem este suporte minha jornada não teria sido possível.

Agradeço à minha orientadora, Paula Gomes, e meu coorientador, Ralf Cordeiro, pela orientação, apoio e incentivo ao longo do mestrado, que foram fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação. Agradeço também aos membros da banca examinadora, Cristiano Chagas e Mônica Botter, por dedicarem seu tempo e conhecimento na análise deste trabalho e por suas considerações e sugestões.

À minha família e amigos, sou profundamente grata pelo amor, apoio e compreensão durante todos os momentos desafiadores desta caminhada. Suas palavras de incentivo foram essenciais para manter minha motivação e determinação.

Agradeço aos amigos que tive o privilégio de conhecer durante o mestrado que me acompanharam e apoiaram ao longo desta jornada acadêmica, aos docentes responsáveis pelos laboratórios parceiros e a todos os professores que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho, compartilhando generosamente seus conhecimentos e experiências.

Expresso minha profunda gratidão a todas as pessoas que tornaram possível a conclusão desta dissertação. Muito obrigada!

### LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### **PRIMEIRO MANUSCRITO**

Figura 1. Diagrama de cada etapa realizada na pesquisa bibliográfica usando a diretriz Tabela 1. Lista do número de artigos publicados por ano (2013-2023) relacionados aos Figura 2. Distribuição mundial de artigos que abordam os efeitos agudos do óleo cru em Cnidaria, entre os anos de 2013 e 2023...... 38 Figura 3. Relação entre as distribuições temporal e mundial de artigos que abordam os Figura 4. Número de artigos que analisaram os efeitos agudos do óleo cru nos diferentes estágios de vida de Cnidaria (mais de um estágio de vida pode ter sido avaliado em um Tabela 2. Classificação taxonômica básica dos grupos investigados nos artigos que abordam os efeitos agudos do óleo cru em Cnidaria, entre 2013 e 2023 (mais de uma espécie pode ter Figura 5. Número de artigos publicados em cada categoria de abordagem em estudos sobre os efeitos agudos do óleo cru em indivíduos adultos e estágios iniciais do desenvolvimento de Tabela 3. Principais procedimentos metodológicos aplicados em ensaios experimentais sobre 
 Tabela 4. Efeitos significativos da exposição aguda ao óleo cru em Cnidaria
 49
**SEGUNDO MANUSCRITO** Tabela 1. Concentrações individuais e totais dos 16 HPAs prioritários na amostra de borra de óleo em µg/g, Palythoa variabilis e sedimento em ng/g de peso seco das praias de Muro Alto

Figura 2. Somatório das concentrações dos 16 HPAs prioritários nas três amostras de
sedimentos (a) e Palythoa variabilis (b) de MUR e SER (ng/g peso seco) em relação às
concentrações dos HPAs na borra de óleo (µg/g) 82
Figura 3. Matriz de correlação entre os HPAs totais e as origens e locais
Tabela 2. Concentrações individuais (µg/g peso seco), média e desvio padrão de elementos
nos sedimentos e Palythoa variabilis das praias de Muro Alto e Serrambi (PE, Brasil) após o
derramamento de óleo em intervalos aproximados de 6 meses (Campanha I), 1 ano
(Campanha II) e 1,5 ano (Campanha III)
Figura 4. Boxplot da ocorrência de cada elemento presente em ambas as origens em relação
ao local (Serrambi ou Muro Alto - PE, Brasil)
Figura 5. Boxplot da ocorrência de cada elemento em relação a origem (organismo ou
sedimento)
Figura 6. Boxplot da concentração total dos elementos presentes em cada origem
(organismos ou sedimentos) em relação ao local (Serrambi ou Muro Alto) 89
Tabela 3. Resultados da ANOVA de 2 fatores: local (Serrambi e Muro Alto) e origem
(sedimento e organismo) sobre a concentração dos elementos. ***p<0,001
Figura 7. Análise de componentes principais (PCA) dos elementos bioacumulados pelos
organismos da espécie Palythoa variabilis de Serrambi e Muro Alto
Figura 8. Análise de componentes principais (PCA) dos elementos e HPAs totais nos
sedimentos de Serrambi e Muro Alto
Tabela 4. Regressão por componentes principais (PCR) para peroxidação lipídica (a),
oxidação de proteínas (b) e grupos sulfidrilas (c) em relação aos HPAs totais nos organismos
e nos sedimento e aos componentes principais identificados na PCA dos elementos nos
organismos (co1 e co2) e no sedimento (cs1)
Tabela 5. Regressão por componentes principais (PCR) para índice de dano genético em
relação aos HPAs totais nos organismos e nos sedimentos e aos componentes principais
identificados na PCA dos elementos nos organismos (co1 e co2) e sedimento (cs1)
Tabela S1. Correlação entre os componentes da PCA para os organismos (a) e para os
sedimentos (b) e cada elemento 103
TERCEIRO MANUSCRITO

Figura 3. Lente ocular milimetrada para medir as camadas teciduais (a) e faringe (b) dos Tabela 2. Concentrações dos HPAs (ng L-1) nas amostras de controle, 12,5%WAF, 25%WAF e 100%WAF ...... 117 Tabela 3. Medidas morfológicas dos pólipos de Palythoa variabilis (em mm) expostos ao Figura 4. Níveis de biomarcadores do estresse oxidativo (a, b, c) em µg/mg proteína e sistema antioxidante enzimático (d, e, f) em U/mg proteína de Palythoa variabilis expostos de forma aguda à 12,5%WAF, 25%WAF e grupo controle. a) níveis de malondialdeído (MDA); b) níveis de carbonilas; c) níveis de sulfidrilas; d) níveis de superóxido dismutase (SOD); e) níveis de catalase (CAT); f) níveis de glutationa-S-transferase (GST). Resultados expressos em média e erro padrão da média, sendo utilizado o teste Anova One-Way seguido Figura 5. a) Índice de dano genético (ID) (0-400) b) frequência de dano genético (FD) (0-100%) de Palythoa variabilis expostos de forma aguda à 12,5%WAF, 25%WAF e grupo 

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	
1.1 Serviços ecossistêmicos dos ambientes recifais	13
1.2 O petróleo no ambiente marinho	
1.3 Efeitos da exposição ao petróleo	
2 OBJETIVOS	
2.1 Objetivo geral	
2.2 Objetivos específicos	
3 REFERÊNCIAS	
PRIMEIRO MANUSCRITO: Toxicidade do óleo cru: uma revisão sistemática o	los efeitos
agudos em Cnidaria	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	
2 MATERIAIS E MÉTODOS	
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1 Distribuição dos artigos por ano e local de publicação	
3.2 Estágio de vida	40
3.3 Grupos de Cnidaria encontrados nos artigos selecionados	
3.4 Abordagens observadas nos artigos	42
3.5 Efeitos agudos	
4 CONCLUSÃO	59
5 REFERÊNCIAS	
SEGUNDO MANUSCRITO: Efeitos tóxicos da exposição in situ a HPAs e el	ementos em
Palythoa variabilis (Duerden, 1898) (Cnidaria, Zoantharia) e sua relaç	ão com o
derramamento de óleo de 2019 na costa brasileira	
RESUMO	69
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	
2 MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1 Área de estudo	
2.2 Análises dos HPAs	

# SUMÁRIO

2.3 Determinação das concentrações dos elementos traço	
2.4 Análises de estresse oxidativo	
2.5 Análises de genotoxicidade - Ensaio cometa alcalino	
2.6 Análises dos dados	
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1 Análises dos HPAs	
3.2 Determinação das concentrações dos elementos	85
3.3 Análises multivariadas dos dados	
4 CONCLUSÃO	
5 REFERÊNCIAS	
MATERIAL SUPLEMENTAR	103
TERCEIRO MANUSCRITO: Toxicidade experimental aguda de h	idrocarbonetos
policíclicos aromáticos (HPAs) do óleo cru ao zoantídeo Palythoa variad	bilis (Duerden,
1898)	104
RESUMO	105
ABSTRACT	106
1 INTRODUÇÃO	107
2 MATERIAIS E MÉTODOS	108
2.1 Coleta e manutenção dos organismos	108
2.2 Preparação e análise da WAF	110
2.3 Desenho Experimental e condições de teste	111
2.4 Análises morfológicas e comportamentais	112
2.5 Análises de estresse oxidativo	112
2.5.1 Homogeneização das amostras, extração e dosagem de proteínas	112
2.5.2 Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo	113
2.5.3 Avaliação do sistema antioxidante enzimático	113
2.6 Análises de genotoxicidade - Ensaio cometa alcalino	114
2.6 Análises dos dados	115
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1 Análises dos parâmetros de qualidade da água	116
3.2 Análises das WAFs	116
3.3 Análises morfológicas e comportamentais	118
3.4 Análises de estresse oxidativo	120
3.5 Análises de genotoxicidade	124

4 CONCLUSÃO	127
5 REFERÊNCIAS	127
CONSIDERAÇÕES FINAIS	133

#### **RESUMO**

Os recifes são habitats ricos em biodiversidade, mas vulneráveis a poluentes como o óleo cru, que causam danos morfológicos, comportamentais, fisiológicos e genéticos aos organismos, devido à bioacumulação de hidrocarbonetos e metais. O objetivo deste trabalho consiste em avaliar, in situ e ex situ, os efeitos tóxicos da exposição ao óleo sobre o zoantídeo Palythoa variabilis, um cnidário comum em recifes brasileiros. Inicialmente, foi realizada uma revisão sistemática da literatura a fim de reunir dados atuais dispersos sobre efeitos agudos do óleo cru em Cnidaria. A busca abrangeu artigos publicados entre 2013 e 2023 utilizando os termos: "crude oil" AND acute AND (Cnidaria OR coral) e as classes que compõem o filo. Foram recuperados 28 artigos, evidenciando limitação do número de estudos, sendo 2022 o ano mais produtivo. Os artigos concentram-se em avaliar respostas pelos maiores grupos de cnidários adultos (Classe Anthozoa, Ordem Scleractinia) e são experimentais, porém, apresentam metodologias variadas, necessitando de uniformização. As abordagens são empregadas de forma independente, tornando essencial análises das relações entre bioacumulação e efeitos sobre a saúde, comportamento, fisiologia e genética. Há déficits de análises de efeitos fisiológicos e genéticos e de diferentes táxons, assim, estudos no tema precisam preencher estas lacunas. Posteriormente, foi avaliado o efeito do óleo in situ, sendo analisada a relação entre HPAs e elementos dos sedimentos e bioacumulados por P. variabilis de duas praias de Pernambuco (Muro Alto - diretamente impactada pelo derramamento de óleo de 2019 e Serrambi - indiretamente impactada), e da borra de óleo que atingiu a costa brasileira. Também foi avaliada a relação deles com a geração de estresse oxidativo e danos genéticos nos animais. Há correlação entre a composição de HPAs nos sedimentos de ambas as praias e na borra de óleo. Os elementos Ba, Cd, Cu, Pb, As e V bioacumulados são correlacionados aos danos oxidativos e genéticos. Nos sedimentos, Al, Cu, Ni e Co correlacionam-se com danos oxidativos. Os principais HPAs responsáveis por induzir as respostas biológicas foram o fluoreno bioacumulado e o fenantreno nos sedimentos. Finalmente, foram realizadas análises ex situ do efeito de HPAs do óleo cru em P. variabilis. Pólipos coletados em Serrambi (PE) e aclimatados foram expostos à WAF por 96 h (25%WAF, 12,5%WAF e grupo controle). A exposição aguda induz alterações comportamentais, estresse oxidativo e danos genéticos. Estes resultados têm potencial de uso em estratégias de mitigação de danos de derramamentos de óleo ao fornecerem mecanismos de respostas subletais dos animais, fortalecendo esforços de conservação de recifes.

Palavras-chave: Cnidaria. Invertebrados. Petróleo. Toxicologia.

#### ABSTRACT

Reefs are habitats rich in biodiversity but vulnerable to pollutants such as crude oil, which cause morphological, behavioral, physiological and genetic damage to organisms due to the bioaccumulation of hydrocarbons and metals. The objective of this study is to evaluate, both in situ and ex situ, the toxic effects of oil exposure on Palythoa variabilis, a common cnidarian in Brazilian reefs. Initially, a systematic literature review was conducted to gather current data on the acute effects of crude oil on Cnidaria. The search covered articles published between 2013 and 2023 using the terms: "crude oil" AND acute AND (Cnidaria OR coral) and the classes that compose the phylum. Twenty-eight articles were retrieved, highlighting the limited number of studies, with 2022 being the most productive year. The articles focus on evaluating responses from the major groups of adult cnidarians (Class Anthozoa, Order Scleractinia) and are experimental, but they present varied methodologies, indicating a need for standardization. The approaches are employed independently, making it essential to analyze the relationships between bioaccumulation and effects on health, behavior, physiology, genetics and different taxa, so studies on the topic need to fill these gaps. Subsequently, the in situ effect of oil was evaluated, analyzing the relationship between PAHs and elements in the sediments and bioaccumulated by P. variabilis from two beaches in Pernambuco (Muro Alto - directly impacted by the 2019 oil spill and Serrambi - indirectly impacted) and the oil sludge that reached the Brazilian coast, assessing the generation of oxidative stress and genetic damage in the animals. There is a correlation between the composition of PAHs in the sediments of both beaches and in the oil sludge. The elements Ba, Cd, Cu, Pb, As, and V bioaccumulated are correlated with oxidative and genetic damage. In the sediments, Al, Cu, Ni, and Co are correlated with oxidative damage. The main PAHs responsible for inducing biological responses were bioaccumulated fluorene and phenanthrene in the sediments. Finally, ex situ analyses of the effect of PAHs from crude oil on P. variabilis were conducted. Polyps collected in Serrambi (PE) and acclimated were exposed to WAF for 96 hours (25% WAF, 12.5% WAF and control group). Acute exposure induces behavioral alterations, oxidative stress, and sublethal genetic damage. These results have potential for use in oil spill damage mitigation strategies by providing the mechanisms of sublethal responses of the animals, strengthening efforts to conserve reef ecosystems.

Keywords: Cnidaria. Invertebrates. Petroleum. Toxicology.

## 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 1.1 Serviços ecossistêmicos dos ambientes recifais

Os recifes tropicais são ecossistemas de alta diversidade e produtividade (MOBERG e FOLKE, 1999; SOARES e RABELO, 2014; HICKMAN *et al.*, 2016) ecologicamente importantes, pois abrigam uma elevada taxa de diversidade de vida marinha e oferecem locais de refúgio, desova, criação, alimentação e reprodução para muitas espécies (MOBERG e FOLKE, 1999). Os ambientes recifais são habitats estruturalmente complexos que estendem-se por quilômetros e a composição de sua comunidade depende de fatores globais, regionais e locais, que interagem para produzir a grande variedade de recifes do planeta (PANDOLFI, 2002; HUGHES *et al.*, 2005; BARBIER *et al.*, 2011).

As espécies e grupos que interagem com os recifes são essenciais para a manutenção da resiliência desses ecossistemas ao desempenhar suas funções no ambiente (ROBERTS, 1995). Devido à redundância funcional, a alta diversidade de espécies que vivem nos recifes permite a execução de um mesmo papel por espécies diferentes no ecossistema, impossibilitando a alteração da funcionalidade desse ambiente, potencializando a capacidade de resposta e de adaptação aos impactos antropogênicos e assegurando sua diversidade funcional (HOOPER *et al.*, 2005). Ademais, muitas espécies que não desempenham funções-chave podem assumir tais funções em momentos em que populações de espécies-chave de um grupo funcional são extintas (MOBERG e FOLKE, 1999).

Os recifes oferecem uma ampla gama de serviços ecossistêmicos (SPURGEON, 1992). De forma direta, os recifes fornecem matérias-primas, serviços e proteção costeira (MOBERG e FOLKE, 1999); e apoiam a manutenção da pesca, a nutrição, o turismo, a recreação, a educação e a pesquisa (BARBIER *et al.*, 2011). Os recifes, ao longo do tempo geológico, tornaram-se ambientes que apoiam outros ecossistemas. Portanto, indiretamente, os recifes realizam o suporte biológico e biogeoquímico aos ecossistemas com eles interconectados (MOBERG e FOLKE, 1999). Além disso, para os seres humanos, esses ambientes englobam valores de lazer e existência; valores de opção de uso futuro; e benefícios esotéricos, incluindo: valores espirituais, estéticos, culturais e patrimoniais, os quais beneficiam comunidades tradicionais e seus costumes que evoluíram em associação com recifes (SPURGEON, 1992).

Os recifes sustentam a alimentação da biota pelágica com o fluxo de excedentes da produção de matéria orgânica, fator que aumenta a produtividade das comunidades de

plâncton e peixes (MOBERG e FOLKE, 1999). Portanto, no âmbito do uso extrativo direto, os recifes apresentam valor comercial por serem fontes de alimentos e recursos econômicos essenciais para a sobrevivência de populações humanas costeiras, através da pesca (SMITH, 1978) e da coleta de outros animais associados, visto que uma em cada quatro espécies marinhas vive nos recifes, incluindo 65% dos peixes (MMA, 2018), permitindo a comunidades humanas a obtenção de renda através de serviços ecossistêmicos fornecidos por esses ambientes (HICKMAN *et al.*, 2016). Além disso, peixes recifais, moluscos e corais são utilizados em aquarismo, em que podem atingir valores elevados (SPURGEON, 1992).

Os recifes são fontes de produtos de potencial biotecnológico, visto que muitas algas e invertebrados marinhos, como corais (por exemplo da ordem Alcyonacea), gorgônias (ordem Gorgonacea), anêmonas e esponjas, sintetizam compostos químicos complexos com propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e anticoagulantes (CARTÉ, 1996) que detêm importância econômica substancial como fontes de produtos químicos usados em uma variedade de itens farmacêuticos, cosméticos, suplementos nutricionais e pigmentos (BLACKBURN *et al.*, 2014). Adicionalmente, esqueletos de corais têm sido importantes aliados em procedimentos de enxertos ósseos (SPURGEON, 1992).

Em relação aos usos diretos não extrativos, os ambientes recifais detêm valor turístico significativo através do mergulho, snorkeling, pesca recreativa e passeios de barco (MOBERG e FOLKE, 1999), sendo o turismo o uso de maior benefício financeiro direto, quando comparado com todos os demais usos de recifes, visto que, os valores de alojamento, alimentação e custos de viagem, também são atribuíveis ao turismo e às atividades realizadas nos recifes. Assim como o turismo, a educação e os resultados de pesquisas científicas geram receitas significativas, dado que pesquisas podem ser usadas no monitoramento ambiental e de mudanças climáticas (SPURGEON, 1992).

De forma complementar, os recifes oferecem serviços de estrutura física, pois atuam na proteção costeira (MOBERG e FOLKE, 1999) ao formar uma barreira regeneradora que dissipa e atenua a energia das ondas, beneficiando propriedades e atividades econômicas ao reduzir a erosão (BARBIER *et al.*, 2011). Além disso, os recifes acumulam e produzem sedimentos e material de praia a partir de forças físicas e da atividade da biota associada (MOBERG e FOLKE, 1999), podendo formar praias, extensões de terra e ilhas inteiras. Assim, são criados ambientes biologicamente produtivos e de baixa energia, que detêm valor econômico da pesca, da navegação (SPURGEON, 1992) e do turismo (RICHMOND, 1993). Como resultado, os recifes projetam este cenário para outros ecossistemas costeiros, que desempenham seus próprios serviços ecossistêmicos (BARBIER *et al.*, 2011).

Ecossistemas de recifes também desempenham serviços na ciclagem de nutrientes orgânicos e inorgânicos. Apesar de abrigar uma grande quantidade de carbono inorgânico, um recife atua como fonte líquida de dióxido de carbono (CO2) atmosférico (KAWAHATA *et al.*, 1997). Além disso, os recifes contribuem para o carbonato de cálcio (CaCO3) global (GATTUSO *et al.*, 1998) e transferem o excesso de produção de nitrogênio das cianobactérias e microrganismos bentônicos que vivem associados aos recifes para o ambiente pelágico (MOBERG e FOLKE, 1999; BARBIER *et al.*, 2011).

Os invertebrados marinhos desempenham tarefas estruturais e funcionais nos recifes, atuando na sustentação e manutenção da biodiversidade (BLACKBURN *et al.*, 2014). Os organismos recifais, em particular, muitos cnidários são responsáveis por criar habitats complexos que sustentam outros animais (MATHER, 2013) e por formar o núcleo das cadeias alimentares, pois são fontes de alimento e presas para espécies, sendo assim, a importância dos invertebrados recifais reside em seu uso indireto (BLACKBURN *et al.*, 2014). Especificamente, os zoantídeos (Anthozoa: Hexacorallia: Zoantharia) são cnidários bentônicos marinhos que apresentam distribuição cosmopolita (RABELO *et al.*, 2015) e podem abrigar zooxantelas, desempenhando um papel essencial na estrutura e funções de recifes (SANTOS *et al.*, 2016). Esses animais apresentam alta abundância, plasticidade, capacidade de adaptação e resiliência a estressores, fatores que lhes conferem relevância científica para a avaliação do efeito de estressores antropogênicos (ROCHA *et al.*, 2020).

Como descrito, vários são os serviços ecossistêmicos fornecidos pelos recifes e sua comunidade associada (CESAR, 1996), contudo, cerca de 75% dos ambientes recifais mundiais estão ameaçados por atividades antrópicas (BURKE *et al.*, 2011) que impactam a ecologia funcional dos recifes (SPALDING e BROWN, 2015). Os principais estressores locais são: superexploração; pesca destrutiva; turismo descontrolado e poluição (MOBERG e FOLKE, 1999), os quais interagem com estressores globais como as mudanças climáticas e exposição a poluentes, a exemplo do petróleo.

O aumento da temperatura e acidificação dos oceanos, induzidos pelo aquecimento global, afetam os recifes e organismos associados através de impactos sobre a reprodução, suscetibilidade à doenças e calcificação. Especificamente, impactos projetados em corais incluem redução do crescimento, enfraquecimento de esqueletos, bioerosão e dissolução de substratos de carbonato (PANDOLFI et al., 2011). Em consequência, ocorre a perda da biodiversidade, resiliência e renovação, que afetam as funções e a continuidade da geração de serviços ecossistêmicos pelos recifes, visto que são dependentes de interações entre redes de espécies dentro e entre os ecossistemas (MOBERG e FOLKE, 1999). Assim, os recifes estão

sujeitos a uma miríade de poluentes locais e globais que interagem para potencializar os impactos a esses ecossistemas (FERRANDO *et al.*, 2015; SPALDING e BROWN).

#### 1.2 O petróleo no ambiente marinho

O petróleo tem origem biológica, a partir da matéria orgânica enterrada e submetida a altas pressão e temperatura por milhões de anos. Portanto, sua composição depende da fonte da matéria orgânica que o originou (CARLS e MEADOR, 2009), sendo uma mistura complexa de compostos de hidrocarbonetos e não hidrocarbonetos, incluindo metais pesados (EGBE, 2010; CHINEDU e CHUKWUEMEKA, 2018), enxofre e nitrogênio (GHULAM *et al.*, 2013), com uma ampla gama de toxicidades (SUCHANEK, 1993).

De acordo com Suchanek (1993), o petróleo no ambiente marinho se divide em três componentes: volátil, flutuante e de afundamento. O componente volátil evapora rapidamente na atmosfera, entre dias a semanas, e se dissolve na coluna d'água, afetando principalmente organismos planctônicos. O componente flutuante é a fração que afeta aves, mamíferos e a comunidade costeira. A ação das ondas transforma o componente flutuante em uma pasta aerada chamada "mousse", que afunda e é capaz de sufocar invertebrados. A mistura da água salina com o petróleo forma a fração de óleo acomodada em água (WAF - *Water Accommodated Fraction*), fase aquosa que contém gotas de óleo. Também é possível ser formada a fração de óleo solúvel em água (WSF - *Water Soluble Fraction*), a qual é um subconjunto de WAF que contém apenas compostos solúveis (LIU e KUJAWINSKI, 2015).

O petróleo é constituído por hidrocarbonetos (TONINI *et al.*, 2010) aromáticos e alifáticos; componentes organometálicos (VAN HAMME *et al.*, 2003); e compostos orgânicos voláteis (COVs) (PENA *et al.*, 2020). Os principais grupos de hidrocarbonetos presentes no petróleo cru são: hidrocarbonetos saturados (alcanos e cicloalcanos), aromáticos, resinas e asfaltenos (compostos policíclicos que contêm nitrogênio, enxofre e oxigênio) (DISNER e TORRES, 2020). Assim, o petróleo é composto por uma mistura complexa de hidrocarbonetos de peso molecular de baixo (de C1) a alto (mais de C38) (GALVAN, 2016) e é principalmente parafínico, naftênico e aromático, e compostos de enxofre como tióis, sulfetos e tiofenos também estão presentes (GHULAM *et al.*, 2013).

Hidrocarbonetos aromáticos possuem dois grupos ecotoxicologicamente relevantes: BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que tornam-se biodisponíveis e são rapidamente bioacumulados e biomagnificados na cadeia trófica (GALVAN, 2016). Tolueno e xileno são os compostos aromáticos derivados do benzeno mais comuns no petróleo, outros derivados do benzeno incluem compostos fundidos diaromáticos (naftaleno) e triaromáticos (fenantreno e antraceno) (GHULAM *et al.*, 2013), além dos hidrocarbonetos leves de baixa solubilidade, principalmente n-alcanos com menos de 15 átomos de carbono (CARLS e MEADOR, 2009).

Os HPAs são compostos de alto peso molecular que estão presentes na fração de óleo associada a água (WAF), formados por dois ou mais anéis de benzeno fundidos (DISNER e TORRES, 2020). Os HPAs em ambiente natural, são poluentes orgânicos que causam efeitos nocivos aos organismos (HONDA e SUZUKI, 2000) e são compostos críticos em termos de impactos ambientais, assim, a toxicidade relativa do óleo é diretamente relacionada à proporção de hidrocarbonetos aromáticos presentes (SUCHANEK, 1993). Os compostos aromáticos raramente atingem mais de 15% dos óleos crus e estão concentrados em frações pesadas como gasóleo e óleos lubrificantes (GHULAM *et al.*, 2013).

O petróleo também é constituído por metais pesados, que apresentam densidade pelo menos cinco vezes maior que a densidade da água. Esses elementos detêm vários efeitos tóxicos e sua toxicidade está relacionada com seu peso (SARDAR *et al.*, 2013). Cádmio e Chumbo estão entre os metais pesados mais abundantes e são particularmente tóxicos, causando a contaminação do ambiente marinho, fator que representa uma ameaça significativa (MUSTAFA *et al.*, 2015). Uma vez liberados no ambiente, os metais podem ser introduzidos nos organismos por ingestão, gerando rápido acúmulo pelos tecidos (SARDAR *et al.*, 2013). Assim, incidentes de derramamento de petróleo aumentam a disponibilidade de metais pesados como contaminantes no ambiente natural (MUSTAFA *et al.*, 2015).

Além do óleo cru, contaminantes de derivados do petróleo atingem o ambiente marinho nas formas de gasolina (GALVAN, 2016), diesel, óleos isolantes minerais (IMO) e lubrificantes, os quais, comparativamente ao óleo cru, apresentam menores concentrações de compostos contaminantes. A gasolina e o diesel são produtos refinados leves de petróleo e são constituídos principalmente por hidrocarbonetos de cadeia curta (DAL PONT, 2018).

Na tentativa de limpeza de manchas de óleo no ambiente marinho, são utilizados dispersantes, os quais interagem de forma sinérgica negativa com o óleo, gerando impactos cada vez maiores na biodiversidade marinha (SUCHANEK, 1993), visto que o petróleo disperso provoca maior toxicidade para organismos do que o petróleo ou os dispersantes sozinhos (BOBRA *et al.*, 1989; SINGER *et al.*, 2000). Desse modo, a toxicidade aguda do óleo é provocada por uma série de interações entre fatores químicos, físicos e fisiológicos, e é altamente dependente das condições específicas de exposição (SINGER *et al.*, 2000).

#### 1.3 Efeitos da exposição ao petróleo

O óleo em ambiente marinho se dispersa desde a superfície, passando pela coluna d'água, até os sedimentos, e afeta comunidades em diferentes habitats (BLACKBURN *et al.*, 2014). Em relação aos três componentes do petróleo no ambiente marinho, descritos por Suchanek (1993), as comunidades entre-marés são vulneráveis ao "mousse" devido à natureza flutuante dessa fração, aliada à mobilidade limitada da maioria dos invertebrados, assim, os organismos são cobertos pelo óleo. Geralmente, os ambientes recifais são os mais impactados por derramamentos, visto que o petróleo é sedimentado devido a sua densidade, misturando-se com areia e outros materiais (KEESING *et al.*, 2018). A poluição por óleo interfere nos processos dos organismos, causando a mortalidade de seres vivos, acompanhado por um aumento de espécies tolerantes à poluição, o que indica um estado anormal da biodiversidade marinha (BLUMER *et al.*, 1971).

Os impactos de derramamentos de óleo variam de acordo com o estágio de vida dos invertebrados marinhos, habitat, sensibilidade, modo de alimentação e capacidade de evitar e de processar contaminantes (BLACKBURN *et al.*, 2014). Além disso, os fatores que determinam a extensão das consequências biológicas incluem: tipo e dosagem do óleo, fatores ambientais, natureza da biota, presença de outros poluentes (LOYA e RINKEVICH, 1980), intensidade e duração da exposição. O principal efeito agudo de um derramamento de óleo em ambientes recifais é a mortalidade em massa de invertebrados bentônicos por asfixia física pelo óleo, durante e após algumas horas da exposição (NADEAU e BERGQUIST, 1977) devido à obstrução de estruturas, impedindo a respiração (HONDA e SUZUKI, 2000).

Os impactos subletais agudos do efeito toxicológico do óleo em organismos recifais podem ser agrupados em efeitos fisiológicos e efeitos genéticos (BLACKBURN *et al.*, 2014; CERQUEIRA *et al.*, 2020), que afetam a probabilidade de sobrevivência desses animais (KEESING *et al.*, 2018). As funções mais comumente alteradas pelo petróleo são: reprodução, crescimento, respiração, excreção, alimentação, movimento, resposta ao estímulo e suscetibilidade à doença (SUCHANEK, 1993; BLACKBURN *et al.*, 2014). Além disso, são alterados a quimiorrecepção e o comportamento quimicamente mediado, bloqueando receptores gustativos ou imitando estímulos naturais, induzindo falsas respostas (BLUMER *et al.*, 1971). Os efeitos crônicos decorrentes da poluição por óleo geralmente imitam os efeitos da exposição aguda (SUCHANEK, 1993).

Respostas subletais ao óleo pelos invertebrados marinhos recifais provocam mudanças significativas a nível populacional, visto que, a exposição a hidrocarbonetos pode

resultar em deficiência reprodutiva, desenvolvimento de doenças e perda de diversidade genética (KEESING *et al.*, 2018). Os impactos na população incluem mudanças em sua estrutura; efeitos sobre abundância, idade e variabilidade; modificações das interações entre competidores, predador/presa e simbiontes; perturbação do habitat e da teia alimentar (BLACKBURN *et al.*, 2014; SUCHANEK, 1993). Além disso, derramamentos de óleo no ambiente marinho causam mortalidade do zooplâncton, resultando em reduções de biomassa e gerando implicações no recrutamento de juvenis (BLACKBURN *et al.*, 2014). No ecossistema recifal, o óleo gera impactos sobre organismos associados (SHIGENAKA, 2010), assim, a eliminação de espécies que contribuem para estruturar e manter interações apresenta um impacto severo sobre a comunidade como um todo (SUCHANEK, 1993).

Mudanças a nível de comunidade e ecossistema dependem de interações entre as espécies e são impulsionadas por impactos a nível individual (SUCHANEK, 1993). Após derramamentos ocorre o crescimento acelerado de macroalgas, ao ponto de impossibilitar a remoção por herbívoros, alterando a estrutura da comunidade (SUCHANEK, 1994). Além disso, espécies oportunistas invadem o habitat e se proliferam. Um efeito indireto da presença de manchas de óleo na superfície do mar é a redução das taxas de luz, afetando a eficiência de predadores visuais e reduzindo taxas fotossintéticas (SUCHANEK, 1993). Outros efeitos acontecem sobre mamíferos, em que, consequentemente, sua influência sobre invertebrados também é modificada, permitindo a proliferação de populações e reduzindo leitos de algas e a sedimentação e aumentando a erosão dos substratos bentônicos, desenvolvendo um substrato mais duro, modificando a comunidade como um todo (SUCHANEK, 1994).

Além dos riscos diretos de sufocamento dos animais, o risco de solubilização de compostos tóxicos na água não pode ser descartado, pois mesmo em baixas concentrações, podem ser danosos aos organismos (GALVAN *et al.*, 2016; DISNER e TORRES, 2020), fornecendo risco resultante de reexposição ao petróleo (KEESING *et al.*, 2018). Além disso, o óleo aderido a sedimentos suspensos migra para regiões distantes e profundas, resultando em contaminação secundária de locais distantes da origem do derramamento. Mudanças na fisiologia, comportamento e reprodução influenciam na capacidade de um organismo de se alimentar, perceber o ambiente e competir por recursos, o que pode levar a mudanças na aptidão. Assim, embora a maioria dos impactos documentados a nível de população e comunidade foquem na mortalidade como principal impacto, é necessário expandir as análises para impactos subletais (SUCHANEK, 1993).

Através da predação o óleo atinge níveis tróficos superiores, uma vez que não é degradável, e organismos de valor alimentar para humanos são contaminados com

hidrocarbonetos de petróleo prejudiciais à saúde (CERQUEIRA *et al.*, 2020). Os riscos da ingestão de contaminantes do óleo por seres humanos são graves, visto que compostos aromáticos podem levar à morte por envenenamento (PENA *et al.*, 2020). A toxicidade mais preocupante dos HPAs é a carcinogenicidade (KUO *et al.*, 1998), seguida da genotoxicidade, imunotoxicidade, geração de estresse oxidativo (BEKKI *et al.*, 2009) e alteração de funções reprodutivas. Compostos voláteis estão associados a câncer, toxicidade hematológica, renal, hepática, hormonal e respiratória. Por fim, metais pesados induzem lesões renais, são neurotóxicos, carcinogênicos e imunotóxicos (PENA *et al.*, 2020).

Como grupo, organismos recifais são sensíveis à poluição por óleo e sofrem alta mortalidade quando atingidos (SUCHANEK, 1993), devido ao sufocamento por deposição ou pelo consumo direto de presas e detritos (SHIGENAKA *et al.*, 2010; LOYA e RINKEVICH, 1980). Quando não ocorre mortalidade, são induzidas respostas subletais pelos organismos (SUCHANEK, 1993; BLACKBURN *et al.*, 2014). Devido ao hábito alimentar, os invertebrados suspensívoros concentram resíduos de óleo na faringe e bioacumulam hidrocarbonetos derivados do petróleo (COHEN *et al.*, 1977), podendo ocorrer a absorção de frações tóxicas por zooxantelas, as quais são expelidas (SHIGENAKA, 2010), induzindo o desenvolvimento de manchas, doenças e branqueamento em organismos que estabelecem esta relação simbiótica (BLACKBURN *et al.*, 2014).

Além disso, são induzidas mudanças na condição fisiológica celular de cnidários e alterações nas proporções de proteínas e lipídios, fator que sugere a interrupção no sistema de síntese de lipídios após a exposição aguda ao óleo, decorrente da interação com HPAs (BENSON e MUSCATINE, 1974). A ruptura no sistema de síntese de lipídios tem potencial de cascata para organismos que dependem desses animais (KEESING *et al.*, 2018). Adicionalmente, experimentos de laboratório realizados por Rinkevich e Loya (1979) indicam danos ao sistema reprodutivo de corais decorrentes da exposição ao óleo (RINKEVICH e LOYA, 1977). Segundo Loya e Rinkevich (1980), corais expostos ao óleo demonstram diminuição de ovócitos, redução de tecido gamético feminino por pólipo, degeneração dos ovócitos e ausência de tecido gamético.

Uma das reações comportamentais observadas em cnidários expostos ao óleo cru é a produção excessiva de muco, que é uma resposta ao estresse (REIMER, 1975). A produção de muco ajuda na limpeza de substâncias tóxicas, fornecendo aos animais um nível de resiliência. No entanto, o excesso da produção de muco induz efeitos nocivos indiretos, como crescimento bacteriano e degradação tecidual, além de ser energeticamente custoso (LOYA e RINKEVICH, 1980), o que pode comprometer ainda mais a saúde do organismo. Além disso,

o muco serve como fonte de alimento para outros organismos recifais (ROTJAN e LEWIS, 2008), e no caso de exposição ao óleo, pode servir como via de contaminação na cadeia trófica (SHIGENAKA, 2001; KEESING *et al.*, 2018).

Produtos petrolíferos interferem na taxa de crescimento de animais coloniais (BIRKELAND *et al.*, 1976) e no comportamento quimicamente mediado (BLUMER *et al.*, 1971). Segundo Suchanek (1993), para várias concentrações de frações solúveis de petróleo em água (WSF), cnidários apresentam alterações na função quimiossensorial e nas taxas de ingestão. Normalmente, as contrações da boca estão associadas com a alimentação, a partir de reação aos aminoácidos prolina e glutationa tripeptídica (MARISCAL e LENHOFF, 1968). A adição de um grupo -OH (formando hidroxiprolina) ou de um grupo glicil (prolilglicina) anula a atividade da prolina, assim, as reações de alimentação e ingestão são alteradas pelo petróleo. Alguns cnidários respondem à poluição por petróleo através da abertura da boca ou por abertura reduzida, que geram danos aos mecanismos de alimentação, tornando-se anormais (LOYA e RINKEVICH, 1979; REIMER, 1975).

Outras alterações comportamentais em cnidários incluem: respostas táteis alteradas ocorrendo dobramento descoordenado e disperso de tentáculos (LOYA e RINKEVICH, 1980; COHEN *et al.*, 1977), além de sinais de estresse, como redução do número de tentáculos expandidos e desenvolvimento de rupturas nos discos orais, através dos quais são extrudados os filamentos septais (LEWIS, 1971). Outras formas que o petróleo e HPAs afetam organismos recifais consistem em alterações na expressão gênica, atividade enzimática, sucesso reprodutivo e alimentação (TARRANT *et al.*, 2014; CERQUEIRA *et al.*, 2020).

Contaminantes presentes no petróleo podem levar à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (TARRANT *et al.*, 2014), que podem danificar o DNA celular, lipídios, proteínas e atividade enzimática (LESSER, 2006). Quando ROS se acumulam, há uma sobrecarga da capacidade defensiva da célula, gerando estresse oxidativo e dano celular (TARRANT *et al.*, 2014).

A reação de ROS com lipídios é um dos mecanismos mais prevalentes de lesão celular (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990). A peroxidação lipídica é citotóxica, com múltiplos efeitos na atividade enzimática, na produção de ATP e na iniciação de apoptose. O ataque oxidativo às proteínas resulta em modificações de aminoácidos, fragmentação da cadeia peptídica, agregação de produtos de reação reticulados, carga elétrica alterada e maior suscetibilidade à remoção e degradação, e o acúmulo de proteínas nas células faz parte do processo de envelhecimento. Já a geração de ROS em lesões no DNA causam deleções, mutações, quebra de fita simples e reticulação de proteínas (LESSER, 2006).

Os invertebrados marinhos mais bem compreendidos no que diz respeito ao estresse oxidativo são os cnidários que estabelecem relações simbióticas com zooxantelas, visto que as ROS têm como alvos celulares o fotossistema II e a enzima carboxilase primária, Rubisco, em zooxantelas (LESSER, 2006). Assim, altos fluxos de ROS em corais, zoantídeos ou em zooxantelas podem sobrecarregar a resposta enzimática protetora e resultar na produção do radical hidroxila (FRANKLIN *et al.*, 2004).

Por serem animais que habitam ambientes rasos, os invertebrados recifais são expostos a combinações de estressores que interagem entre si, como a fotoativação de HPAs pela radiação UV, fator que pode levar a uma maior produção de ROS e maior toxicidade (FU *et al.*, 2012). Metais e contaminantes químicos também podem causar estresse oxidativo diretamente ou por meio de processos metabólicos. Especificamente, a toxicidade aguda de HPAs ocorre principalmente através da exposição a altas concentrações, mas a exposição crônica também pode levar à genotoxicidade e efeitos subletais (TARRANT *et al.*, 2014).

Adicionalmente, é possível notar impactos genéticos como quebras de fitas de DNA em animais expostos ao óleo (JHA, 2008). O ensaio cometa alcalino é uma técnica relevante que permite identificar quebras de fitas simples do DNA, sítios de reparo por excisão, sítios álcali-lábeis e reticulação, com a abordagem de célula única (KUMARAVEL e JHA, 2006; KUMARAVEL *et al.*, 2007). A alta ocorrência de quebras de fitas de DNA pode estar relacionada à HPAs que causam efeitos tóxicos a organismos aquáticos (ALBERS, 2003).

A indução de quebras de fitas de DNA pode estar diretamente relacionada com a capacidade de eliminação de oxirradicais das células e, consequentemente, com o estresse oxidativo. Assim, uma menor integridade genética se correlaciona com uma redução na eficiência de neutralização de espécies celulares oxidantes (ROS) (JHA, 2008). Portanto, a adoção de um sistema integrado de abordagem, pode fornecer uma indicação do risco potencial associado às condições ambientais (FRENZILLI *et al.*, 2001). De acordo com Jha (2008), metais pesados, como o cádmio e o cromo mostram mecanismos distintos envolvendo danos oxidativos, além de prejudicar a capacidade de reparos de DNA.

Entre os cnidários recifais, os corais (Ordem Scleractinia) e os octocorais (Subclasse Octocorallia) são os mais estudados quanto aos efeitos da exposição ao óleo (ex. FROMETA *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2023; NORDBORG *et al.*, 2018, 2021, 2022; RENEGAR e TURNER, 2021; RENEGAR *et al.*, 2017). No entanto, os recifes brasileiros de águas rasas (até 7m) tem características bem distintas de outros recifes tropicais, com baixa cobertura coralínea, elevado endemismo e sendo os zoantídeos (Ordem Zoantharia) os invertebrados bentônicos com os maiores valores de cobertura (AUED *et al.*, 2018). Essa ordem de

cnidários é majoritariamente colonial, formando extensas colônias que chegam a cobrir cerca de 10% do recifes em algumas áreas (BARRADAS *et al.*, 2010; FRANCINI-FILHO *et al.*, 2013). No Brasil, as espécies mais abundantes são *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860), *Zoanthus sociatus* (Ellis, 1768) e *Palythoa variabilis* (Duerden, 1898). Assim como os corais, os zoantídeos têm papel fundamental na dinâmica energética dos recifes, na estruturação da comunidade bentônica devido a seu rápido crescimento e estratégias competitivas, além de participarem de várias associações com outros organismos (SILVA *et al.*, 2015; SANTANA *et al.*, 2015). Apesar da enorme importância do grupo, que inclusive já substituiu os corais como grupo dominante após processo de mudança de fase em recifes brasileiros (CRUZ *et al.*, 2015), não há estudos sobre o impacto da exposição ao óleo em zoantídeos.

Diante do exposto, hipotetiza-se que: (i) a literatura sobre os efeitos agudos da exposição ao óleo cru em Cnidaria é escassa e tem metodologias e objetivos variados; (ii) a exposição *in situ* ao óleo gera estresse oxidativo e quebras de fitas de DNA em *Palythoa variabilis* (Duerden, 1898); (iii) a exposição *ex situ* aguda ao óleo cru induz respostas morfológicas, estresse oxidativo e quebras de fitas de DNA em *Palythoa variabilis* (Duerden, 1898).

#### **2 OBJETIVOS**

#### 2.1 Objetivo geral

Avaliar, *in situ* e *ex situ*, os efeitos tóxicos da exposição ao óleo sobre *Palythoa variabilis* (Duerden, 1898).

### 2.2 Objetivos específicos

a) Produzir uma revisão sistemática da literatura a fim de reunir e integrar os dados atuais sobre os efeitos agudos do óleo cru em Cnidaria;

b) Avaliar os efeitos químicos e toxicológicos (geração de estresse oxidativo e genotoxicidade) da exposição *in situ* ao óleo no zoantídeo *Palythoa variabilis*;

c) Avaliar o efeito agudo da exposição *ex situ* ao óleo cru sobre a sobrevivência, comportamento, morfologia, geração de estresse oxidativo e genotoxicidade em *P. variabilis*.

# **3 REFERÊNCIAS**

ALBERS, P. H. et al. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. **Handbook of ecotoxicology**, v. 2, p. 341-471, 2003, ISBN: 9780429137464.

AUED, A. W. et al. Large-scale patterns of benthic marine communities in the Brazilian Province. **PloS one**, v. 13, n. 6, e0198452, 2018. doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone. 0198452.

BARRADAS J. I. et al. Spatial distribution of benthic macroorganisms on reef flats at Porto de Galinhas Beach (northeastern Brazil), with special focus on corals and calcified hydroids. **Biotemas**, v. 23, p. 61–67, 2010. doi: https://doi.org/10.5007/2175-7925.2010v23n2p61.

BARBIER, E. B. et al. The value of estuarine and coastal ecosystem services. **Ecological monographs**, v. 81, n. 2, p. 169-193, 2011. doi: https://doi.org/10.1890/10-1510.1.

BEKKI, K. et al. Evaluation of toxic activities of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives using in vitro bioassays. **Journal of Health Science**, v. 55, n. 4, p. 601-610, 2009. doi: https://doi.org/ 10.1248/jhs.55.601.

BENSON, A. A.; MUSCATINE, L. Wax in coral mucus: energy transfer from corals to reef fishes 1. **Limnology and Oceanography**, v. 19, n. 5, p. 810-814, 1974; doi: https://doi.org/ 10.4319/lo.1974.

19.5.0810.

BIRKELAND, C. et al. Survey of marine communities in Panama and experiments with oil. **US Environmental Protection Agency**, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, 1976.

BLACKBURN, M. et al. Oil in our oceans: a review of the impacts of oil spills on marine invertebrates. **Portland, OR: The Xerces Society for Invertebrate Conservation**, v. 152, 2014.

BLUMER, M. et al. An ocean of oil: a small oil spill. **Environment: Science and Policy for Sustainable Development**, v. 13, n. 2, p. 2-12, 1971; doi: https://doi.org/10.1080/00139157 .1971. 9930568.

BOBRA, A. M. et al. Acute toxicity of dispersed fresh and weathered crude oil and dispersants to Daphnia magna. **Chemosphere**, v. 19, n. 8-9, p. 1199-1222, 1989. doi: https://doi.org/10.1016/0045-6535(89)90068-4.

BURKE, L. et al. Reefs at risk revisited. Washington, DC: **World Resources Institute,** 2011. CARLS, M. G.; MEADOR, J. P. A perspective on the toxicity of petrogenic PAHs to

developing fish embryos related to environmental chemistry. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 15, n. 6, p. 1084-1098, 2009. doi: https://doi.org/10.1080/1080703090 3304708.

CARTE, B. K. Biomedical potential of marine natural products. **Bioscience**, v. 46, n. 4, p. 271-286, 1996. doi: https://doi.org/10.2307/1312834.

CERQUEIRA, W. R. P. et al. Registro de petróleo em poríferos e cnidários durante o impacto agudo de derramamento no Nordeste brasileiro em 2019. **Scientia Plena**, v. 16, n. 8, 2020; doi: https://doi.org/10.14808/sci.plena.2020.088001.

CESAR, H. Economic analysis of indonesian coral reefs. 108 pp. 1996.

CHINEDU, E.; CHUKWUEMEKA, C. K. Oil spillage and heavy metals toxicity risk in the Niger Delta, Nigeria. **Journal of Health and Pollution**, v. 8, n. 19, 2018. doi: https://doi.org/10.5696/2156-9614-8.19.180905.

COHEN, Y.; NISSENBAUM, A.; EISLER, R. Effects of Iranian crude oil on the Red Sea octocoral Heteroxenia fuscescens. **Environmental Pollution (1970)**, v. 12, n. 3, p. 173-186, 1977. doi: https:// doi.org/10.1016/0013- 9327(77)90051-9.

CRUZ, I. C. S. et al. Evidence of a phase shift to *Epizoanthus gabrieli* Carlgreen, 1951 (Order Zoanthidea) and loss of coral cover on reefs in the Southwest Atlantic. **Marine Ecology**, v. 36, n. 3, p. 318-325, 2015. doi: https://doi.org/10.1111/maec.12141.

DAL PONT, G. Effects of petroleum hydrocarbons to tropical and temperate fish species: a toxicity and multibiomarker approach for the assessment of environmental contamination. Universidade Federal do Paraná, Curitiba/Brasil, v. 224, 2018. (Thesis). DISNER, G. R.; TORRES, M. The environmental impacts of 2019 oil spill on the Brazilian coast: Overview. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 7, n. 15, p. 241-256, 2020; doi: 10.21438/rbgas(2020)071518.

EGBE, R. E.; THOMPSON, D. Environmental challenges of oil spillage for families in oil producing communities of the Niger Delta region. **Journal of Home Economics Research**, v. 13, p. 24-34, 2010. doi: 10.1.1.1064.9980.

FERRANDO, A. et al. Oil spill effects on macrofaunal communities and bioturbation of pristine marine sediments (Caleta Valdés, Patagonia, Argentina): experimental evidence of low resistance capacities of benthic systems without history of pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 20, p. 15294-15306, 2015; doi:

https://doi.org/10.1007/s11356-015-4167-6.

FRANCINI-FILHO R. B.et al. Dynamics of coral reef benthic assemblages of the Abrolhos Bank, Eastern Brazil: inferences on natural and anthropogenic drivers. **PLoS ONE** v. 8, e54260, 2013. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054260.

FRANKLIN, D. J. et al. Cell death and degeneration in the symbiotic dinoflagellates of the coral Stylophora pistillata during bleaching. **Marine Ecology Progress Series**, v. 272, p. 117-130, 2004. doi: 10.3354/meps272117.

FRENZILLI, G. et al. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, Mytilus galloprovincialis: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. **Aquatic Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 19-32, 2001. doi: https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00159-4.

FROMETA, J. et al. Toxicity of oil and dispersant on the deep water gorgonian octocoral *Swiftia exserta*, with implications for the effects of the Deepwater Horizon oil spill. **Marine pollution bulletin**, 122(1-2), p. 91-99, 2017. doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017. 06.009.

FU, P. P. et al. Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)—light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 30, n. 1, p. 1-41, 2012. doi: https://doi.org/10.1080/ 10590501.2012.653887.

GALVAN, G. L. Efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo e gasolina: integrando relevantes organismos e biomarcadores. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2015. (Thesis). Disponível em: http://hdl.handle.net/1884/40362. Acesso em: 01/08/2022.

GATTUSO, J.P.; FRANKIGNOULLE, M.; WOLLAST, R. Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 405-434, 1998. doi: https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.405.

GHULAM, Y. et al. Quality and chemistry of crude oils. Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels, v. 4, n. 3, p. 53-63, 2013. doi: 10.5897/JPTAF12.025.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in biochemical sciences**, v. 15, n. 4, p. 129-135, 1990. doi: https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90206-Q.

HICKMAN, C. P. J. *et al.* Princípios Integrados de Zoologia. 16<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1405 p., 2016; ISBN: 978-0-07-352421-4.

HONDA, M.; SUZUKI, N. Toxicities of polycyclic aromatic hydrocarbons for aquatic animals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 4, p. 1363, 2020. doi:10.3390/ijerph 17041363.

HOOPER, D. U. et al. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. **Ecological monographs**, v. 75, n. 1, p. 3-35, 2005; doi: https://doi.org/10.1890/04-0922.

HUGHES, T. P. et al. New paradigms for supporting the resilience of marine ecosystems. **Trends in ecology & evolution**, v. 20, n. 7, p. 380-386, 2005. doi: https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.03.022.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207-221, 2008. doi: https://doi.org/10.1093/mutage/gen014.

KAWAHATA, H.; SUZUKI, A.; GOTO, K. Coral reef ecosystems as a source of atmospheric CO2: Evidence from pCO2 measurements of surface waters. **Coral Reefs**, v. 16, p. 261-266, 1997. doi: https://doi.org/10.1007/s003380050082.

KEESING, J. K. et al. Impacts and environmental risks of oil spills on marine invertebrates, algae and seagrass: A global review from an Australian perspective. p. 61, 2018. ISBN: 9780429454455, 9781138318625.

KUMARAVEL, T. S. et al. Comet assay measurements: a perspective. **Cell biology and toxicology**, v. 25, n. 1, p. 53-64, 2009. doi: https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9. KUMARAVEL, T. S.; JHA, Awadhesh N. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, n. 1-2, p. 7-16, 2006. doi:

https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.03.002.

KUO, C.Y. et al. Correlation between the amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagenicity of airborne particulate samples from Taichung City, Taiwan. **Environmental research**, v. 78, n. 1, p. 43-49, 1998. doi: https://doi.org/10.1006/enrs.1998.3838.

LESSER, M. P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. **Annual Review of Physiology**, v. 68, p. 253-278, 2006. doi: 10.1146/annurev .physiol.68.040104.110001.

LEWIS, J. B. Effect of crude oil and an oil-spill dispersant on reef corals. **Marine pollution bulletin**, v. 2, n. 4, p. 59-62, 1971. doi: https://doi.org/10.1016/0025-326X(71)90211-6. LIU, Y.; KUJAWINSKI, E. B. Chemical composition and potential environmental impacts of water-soluble polar crude oil components inferred from ESI FT-ICR MS. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0136376, 2015. doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136376.

LIU, Z. et al. The scleractinian coral *Pocillopora damicornis* relies on neuroendocrine regulation to cope with polycyclic aromatic hydrocarbons under heat stress. **Environmental Pollution**, 316: 120565, 2023. doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120565.

LOYA, Y.; RINKEVICH, B. Abortion effect in corals induced by oil pollution. Marine **Ecology Progress Series**, v. 1, n. 1, p. 77-80, 1979.

LOYA, Y.; RINKEVICH, B. Effects of oil pollution on coral reef communities. Marine **Ecology Progress Series**, v. 3, n. 16, p. 180, 1980.

MARISCAL, R. N.; LENHOFF, H. M. The chemical control of feeding behaviour in Cyphastrea ocellina and in some other Hawaiian corals. **Journal of Experimental Biology**, v. 49, n. 3, p. 689-699, 1968.

MATHER, J. Marine invertebrates: communities at risk. **Biology**, v. 2, n. 2, p. 832-840, 2013; doi: https://doi.org/10.3390/biology2020832.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. Gerência de Biodiversidade Aquática e Recursos Pesqueiros. **Recifes de Coral.** Brasília: MMA/SBF/GBA, 2018. Disponível em: https://antigo.mma. gov.br/ processo-eletronico/item/ 397-recifes-de-corais.html. Acesso em: 19/06/2022. MOBERG, F.; FOLKE, C. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. **Ecological economics**, v. 29, n. 2, p. 215-233, 1999. doi: https://doi.org/10.1016/S0921-8009(99)00009-9.

MUSTAFA, A. D. et al. Oil spill related heavy metal: a review. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1348-1360, 2015. ISSN: 1394 - 2506.

NADEAU R. J.; BERGQUIST E. T. (1977). Effects of the march 18, 1973 oil spill near Cabo Rojo, Puerto Rico on tropical marine communities. **Int Oil Spill Conference**, Proceed. 1977 March; (1): 535 - 538; doi: https://doi.org/10.7901/2169-3358-1977-1-535.

NORDBORG, F. M. et al. Comparative sensitivity of the early life stages of a coral to heavy fuel oil and UV radiation. **Science of the Total Environment**, 781: 146676, 2021. doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146676.

NORDBORG, F. M. et al. Coral recruits are highly sensitive to heavy fuel oil exposure both in the presence and absence of UV light. **Environmental Pollution**, 309, 119799, 2022. doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119799.

NORDBORG, F. M. et al. Phototoxic effects of two common marine fuels on the settlement success of the coral *Acropora tenuis*. **Scientific Reports**, 8(1), 8635, 2018. doi: https://doi.org/10.1038/s41598-018-26972-7.

PANDOLFI, J. M. Coral community dynamics at multiple scales. **Coral reefs**, v. 21, n. 1, p. 13-24, 2002. doi: 10.1007/s00338-001-0204-7.

PANDOLFI, J. M. et al. Projecting coral reef futures under global warming and ocean acidification. **Science**, v. 333, n. 6041, p. 418-422, 2011. doi: 10.1126/science.1204794. PENA, P. G. L. et al. The crude oil spill on the Brazilian coast in 2019: the question of public

health emergency. **Cadernos de Saúde Pública,** v. 36, p. e00231019, 2020; doi: https://doi.org/10.1590/ 0102-311X00231019.

RABELO, E. F. et al. Distribution pattern of zoanthids (Cnidaria: Zoantharia) on a tropical reef. **Marine Biology Research**, v. 11, n. 6, p. 584-592, 2015. doi: https://doi.org/10.1080/17451000.2014.962542.

REIMER, A. A. Effects of crude oil on the feeding behaviour of the zoanthid Palythoa variabilis. **Environmental physiology & biochemistry**, v. 5, n. 4, p. 258-266, 1975; PMID: 240674.

RENEGAR, D. A. et al. Acute and subacute toxicity of the polycyclic aromatic hydrocarbon 1-methylnaphthalene to the shallow-water coral *Porites divaricata*: Application of a novel exposure protocol. **Environmental toxicology and chemistry**, *36*(1), 212-219, 2017. doi: https://doi.org/10.1002/etc.3530.

RENEGAR, D. A.; TURNER, N. R. Species sensitivity assessment of five Atlantic scleractinian coral species to 1-methylnaphthalene. **Scientific reports**, 11(1): 529, 2021. doi: https://doi.org/10.1038/s41598-020-80055-0.

RICHMOND, R. H. Coral reefs: present problems and future concerns resulting from anthropogenic disturbance. **American Zoologist**, v. 33, n. 6, p. 524-536, 1993. doi: https://doi.org/10.1093/icb/33. 6.524.

RINKEVICH, B.; LOYA, Y. Harmful Effects of Chronic Oil Pollution on a Red Sea Scleractinian Coral Population. **Proc. 3rd Int. Coral Reef Symp**, 1977. p. 585-591. ROBERTS, C. M. Effects of fishing on the ecosystem structure of coral reefs. **Conservation biology**, v. 9, n. 5, p. 988-995, 1995. doi: https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1995.9051332. x-i1.

ROCHA, R. J. M. et al. Do microplastics affect the zoanthid Zoanthus sociatus?. **Science of The Total Environment**, v. 713, p. 136659, 2020. doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv. 2020.136659.

ROTJAN, R. D.; LEWIS, S. M. Impact of coral predators on tropical reefs. **Marine ecology progress series**, v. 367, p. 73-91, 2008; doi: https://doi.org/10.3354/meps07531.

SANTANA, E. F. C. et al. Trophic ecology of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) on tropical reefs. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 95, n. 2, p. 301-309, 2015. doi: https://doi.org/10.1017/S0025315414001726. SANTOS, M. E. A. et al. Overview of the order Zoantharia (Cnidaria: anthozoa) in Brazil. **Marine Biodiversity**, v. 46, p. 547-559, 2016. doi: https://doi.org/10.1007/s12526-015-0396-7.

SARDAR, K. et al. Heavy metals contamination and what are the impacts on living organisms. **Greener Journal of Environmental management and public safety**, v. 2, n. 4, p. 172-179, 2013.

SHIGENAKA, G. Oil Spills in Coral Reefs: Planning and response considerations. National Oceanic and Atmospheric Administration, National Ocean Service (Washington DC), 84 pp. 2010.

SHIGENAKA, G. Toxicity of oil to reef-building corals: A spill response perspective. 2001. Corporate Authors: United States, National Ocean Service., Office of Response and

Restoration; United States, National Oceanic and Atmospheric Administration,;Coral Reef Conservation Program (U.S.); Series : **NOAA technical memorandum NOS-OR&R** ; URL : https://repository.library.noaa. gov/view/noaa/452. Acesso em: 01/08/2022.

SILVA, J. F. et al. Growth of the tropical zoanthid *Palvthoa caribaeorum* (Cnidaria:

Anthozoa) on reefs in northeastern Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.

87, p. 985-996, 2015. doi: https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140475.

SINGER, M. M. et al. Standardization of the preparation and quantitation of

water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 11, p. 1007-1016, 2000; doi: https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00045-X.

SMITH P. A. C. Coral-reef area and the contributions of reefs to processes and resources of the world's oceans. **Nature**, v. 273, p. 18, 1978.

SOARES, M. O.; RABELO, E. F. Primeiro registro de branqueamento de corais no litoral do Ceará (NE, Brasil): indicador das mudanças climáticas?. **Geociências** (São Paulo), v. 33, n. 1, p. 1-10, 2014.

SPALDING, M. D.; BROWN, B. E. Warm-water coral reefs and climate change. Science, v. 350, n. 6262, p. 769-771, 2015. doi: 10.1126/science.aad0349.

SPURGEON, J. P.G. The economic valuation of coral reefs. **Marine pollution bulletin**, v. 24, n. 11, p. 529-536, 1992.

SUCHANEK, T. H. Oil impacts on marine invertebrate populations and communities. **American Zoologist**, v. 33, n. 6, p. 510-523, 1993; doi: https://doi.org/10.1093/icb/33.6.510. SUCHANEK, T. H. Temperate coastal marine communities: biodiversity and threats.

**American zoologist**, v. 34, n. 1, p. 100-114, 1994. doi: https://doi.org/10.1093/icb/34.1.100. TARRANT, A. M. et al. Activation of the cnidarian oxidative stress response by ultraviolet radiation, polycyclic aromatic hydrocarbons and crude oil. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 9, p. 1444-1453, 2014; doi: https://doi.org/10.1242/jeb.093690.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 4, p. 1025-1035, 2010. doi: 10.4257/oeco.2010.1404.11.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003. doi: https://doi.org/10. 1128/MMBR.67.4.503-549.2003.

### **PRIMEIRO MANUSCRITO**

Toxicidade do óleo cru: uma revisão sistemática dos efeitos agudos em Cnidaria Bruna Cristina Ferreira Vasconcelosª; Ralf Tarciso Silva Cordeiroª,<sup>b</sup>; Paula Braga Gomes<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;

<sup>b</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Artigo a ser submetido na revista Environmental Reviews (<u>https://cdnsciencepub.com/authors-and-reviewers/author-guidelines</u>). Fator de impacto: 5,7.

#### **RESUMO**

Cnidários são animais criadores de habitats e formam a base de cadeias alimentares, todavia, estão ameaçados por impactos antrópicos, como derramamentos de óleo, que induzem mortalidade e danos subletais agudos a esses animais. A literatura sobre esse tema é limitada e dispersa, com objetivos e metodologias variados, dificultando a identificação de padrões e lacunas. Portanto, o objetivo do presente artigo consiste em produzir uma revisão sistemática da literatura atual sobre efeitos agudos do óleo cru em representantes do filo Cnidaria, a fim de integrar os dados. A pesquisa foi realizada de acordo com as diretrizes PRISMA 2020, através dos bancos de dados Google Acadêmico, Scopus, Science Direct, Periódicos CAPES e SpringerLink, utilizando os termos de busca: "crude oil" AND acute AND (Cnidaria OR coral), complementados com cada classe de Cnidaria e limitada a artigos publicados em inglês de 2013 a 2023. O número de registros recuperados foi baixo, visto que foram identificados 28 artigos resultantes de 20 estudos, sendo 2022 o ano com maior número de publicações e os Estados Unidos o país melhor representado. A Classe Anthozoa e, principalmente, os corais (Ordem Scleractinia) foram mais estudados. Houve estudos dos efeitos sobre gametas, embriões, larvas, juvenis e adultos, sendo este último majoritário. A maioria dos estudos utilizou Water Accommodated Fractions (42,3%), o sistema de fluxo contínuo (23%) e o tempo de exposição mais comumente (34,6%) usado foi 96 h (variando desde 18 h até alguns dias). Houve grande variação nas estratégias metodológicas evidenciando a necessidade de padronização dos métodos. O efeito do óleo sobre adultos foi mais estudado, especialmente avaliando a saúde e morfologia, a letalidade, alterações genéticas e eficiência dos simbiontes. Por outro lado, nos estágios iniciais de vida a letalidade, metamorfose e assentamento larval foram mais avaliados. Os resultados são avaliados de forma conjunta e mostram respostas que variam, principalmente, com o tempo de exposição e a concentração utilizada, provocando principalmente danos subletais em diferentes níveis. A complementação de estudos com mais espécies, novas abordagens e, considerando os efeitos sinérgicos da elevação de temperatura e radiação UV são importantes para entender melhor o impacto do óleo em cnidários.

**Palavras-chave:** Anthozoa. Coral. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). Impactos imediatos. Petróleo.

#### ABSTRACT

Cnidarians are habitat-creating animals that form the basis of food chains; however, they are threatened by anthropogenic impacts, such as oil spills, which induce acute mortality and sublethal damage to these animals. The literature on this topic is limited and dispersed, with varying objectives and methodologies, making it difficult to identify patterns and gaps. Therefore, the aim of the present article is to produce a systematic review of the current literature on the acute effects of crude oil on representatives of the phylum Cnidaria, in order to integrate the data. The research was conducted according to the PRISMA 2020 guidelines, through the databases Google Scholar, Scopus, Science Direct, CAPES Journals, and SpringerLink, using the search terms: "crude oil" AND acute AND (Cnidaria OR coral), complemented with each class of Cnidaria and limited to articles published in English from 2013 to 2023. The number of records retrieved was low, with 28 articles resulting from 20 studies identified, with 2022 being the year with the highest number of publications and the United States being the best-represented country. The class Anthozoa, particularly corals (Order Scleractinia), was the most studied. There were studies on the effects on gametes, embryos, larvae, juveniles, and adults, with the latter being the majority. Most studies used Water Accommodated Fractions (42.3%), the continuous flow system (23%), and the most commonly used exposure time (34.6%) was 96 hours (ranging from 18 hours to some days). There was a wide variation in methodological strategies, highlighting the need for the standardization of methods. The effect of oil on adults was more studied, especially evaluating health and morphology, lethality, genetic alterations, and the efficiency of symbionts. On the other hand, in the early life stages, lethality, metamorphosis, and larval settlement were more evaluated. The results are evaluated together and show responses that vary mainly with the exposure time and concentration used, causing primarily sublethal damage at different levels. The complementing of studies with more species, new approaches, and considering the synergistic effects of temperature rise and UV radiation are important to better understand the impact of oil on cnidarians.

**Keywords:** Anthozoa. Coral. Immediate impacts. Petroleum. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).

## 1 INTRODUÇÃO

Cnidários desempenham importantes papéis estruturais e funcionais no ambiente marinho, atuando na sustentação e manutenção da biodiversidade (Blackburn et al., 2014) ao fornecer habitat para uma vasta gama de organismos e formar a base de cadeias alimentares (Mather, 2013). Impactos como a poluição por petróleo, que resulta de atividades de extração, refino, transporte e armazenamento de óleo cru (Chinedu e Chukwuemeka, 2018) degradam ecossistemas, como os recifes de coral, e sua biota associada (Spalding e Brown, 2015). O petróleo é constituído por hidrocarbonetos, classificados como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e hidrocarbonetos alifáticos (Nordborg et al., 2018), componentes organometálicos (Pena et al., 2020) e metais (Sardar et al., 2013), sendo os HPAs os poluentes orgânicos mais críticos (Disner e Torres, 2020). A exposição aguda de cnidários ao óleo cru provoca mortalidade por asfixia (Honda e Suzuki, 2000; Guzman et al., 2020). Quando não ocorre mortalidade, são induzidos danos subletais agudos à morfologia, comportamento, fisiologia e genética de cnidários (Tarrant et al., 2014) ao concentrar resíduos e bioacumular hidrocarbonetos (Cohen et al., 1977). Esses danos variam com o estágio de vida, habitat, sensibilidade, capacidade de evitar contaminantes (Blackburn et al., 2014) e com a interação com pressões ambientais (Nordborg et al., 2021), podendo gerar impactos nas populações (Keesing et al., 2018).

Os cnidários representam importantes modelos para estudos ecotoxicológicos pela variedade de habitats (pelágico e bentônico), existência de representantes sésseis ou sedentários, expostos ao acúmulo de contaminantes no fundo marinho, e ainda pela grande representação em ambientes costeiros como os recifes de corais, comuns em áreas de grande risco de exposição ao óleo (Negri *et al.*, 2016). Nesse contexto, alguns estudos tentaram avaliar impactos do óleo cru sobre os cnidários e seu papel funcional nos ecossistemas, no entanto, a realização desta análise é uma tarefa desafiadora. Por um lado, estudos de campo

fornecem informações mais realistas (Ballou *et al.*, 1989), entretanto há dificuldades em adquirir permissões para experimentos *in situ* (Wade *et al.*, 2017). Além disso, cada derramamento de óleo é um evento único e os efeitos tóxicos dependem de uma combinação de fatores (Haapkylä *et al.*, 2007; Redman e Parkerton, 2015). Por outro lado, estudos experimentais em aquários (*in vitro*) conseguem isolar os fatores cujos efeitos se desejam avaliar, mas dificilmente reproduzem as mesmas condições de campo, como concentrações, condições físico-químicas e interações entre espécies (Aurand e Coelho, 2005; Lee *et al.*, 2013).

O método e o tempo de exposição, e as variáveis respostas utilizadas diferem entre os estudos, tornando os resultados dispersos e dificultando o entendimento integrado dos efeitos do óleo sobre a biota (Adams *et al.*, 2017; Hodson *et al.*, 2019). Assim, revisões sistemáticas da literatura permitem agrupar e analisar conjuntamente informações sobre o tema, possibilitando a identificação de tendências, padrões e lacunas no conhecimento. Além disso, estudos desta natureza têm foco em respostas de indivíduos e espécies, o que pode contribuir no entendimento de mecanismos evolutivos adaptativos ou de resposta a impactos. Considerando a importância dos representantes do filo Cnidaria em ecossistemas comumente afetados por derramamentos, como os recifes de corais, e a necessidade de reunir e analisar informações dispersas, o objetivo desse estudo foi promover uma revisão sistemática da literatura sobre os efeitos agudos do óleo cru em cnidários. A revisão abrangeu os efeitos agudos, com foco em experimentos laboratoriais, para evitar a variabilidade existente em estudos *in situ* e/ou de maior duração. Conforme nossa compreensão, esta é a primeira revisão com esta abordagem, que poderá fornecer subsídios no direcionamento de esforços futuros para melhor entender os efeitos do derramamentos de óleo em cnidários.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para reunir o conhecimento atual sobre os efeitos agudos do petróleo cru em Cnidaria, uma revisão sistemática da literatura foi realizada utilizando as seguintes plataformas de busca: *Google* Acadêmico, *Scopus*, *Science Direct*, Periódicos CAPES e *SpringerLink*, utilizando as plataformas *Rayyan* e *Mendeley* para triar e gerenciar as referências. Foram utilizadas as palavras-chave e operadores booleanos: "*crude oil*" *AND acute AND (Cnidaria OR coral)*. Para abranger o maior número de artigos, foi incluída a palavra-chave "coral" além da palavra "Cnidaria", pois muitos estudos utilizam corais como organismos de pesquisa, mas não citam o filo Cnidaria no texto. A revisão avaliou publicações em Inglês e suas respectivas referências para possíveis citações adicionais.

A busca foi limitada a artigos científicos publicados entre 2013 e 2023. Essa restrição foi necessária devido à ampla variedade de métodos de exposição, especialmente no tipo e concentração da solução ou do óleo (Adams *et al.*, 2017). Esta falta de padronização impossibilita entender os reais efeitos do óleo cru sobre os organismos e pode mascarar ou levar a erros de interpretação dos resultados. Mais recentemente, diversas tentativas foram feitas buscando padronização metodológica na análise de toxicidade do óleo cru. Uma das iniciativas mais importantes foi o *Chemical Response to Oil Spills: Ecological Effects Research Forum (CROSERF)*, protocolos desenvolvidos através de consenso entre cientistas, governo e indústrias (Aurand e Coelho, 2005). Ao longo do tempo, muitos estudos passaram a seguir o *CROSERF* e, dessa forma, a busca por artigos publicados nos últimos dez anos permite maior padronização em relação aos métodos e confiança na interpretação dos resultados de forma conjunta.

Durante a triagem, a lista inicial de publicações foi obtida a partir da leitura do título do artigo e foi complementada usando cada classe de Cnidaria como palavra-chave, substituindo a palavra "coral", assim novas buscas foram realizadas com "Hydrozoa", "Scyphozoa", "Cubozoa" e "Anthozoa" como palavras-chave.

Foram seguidas as diretrizes do PRISMA 2020 (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) a fim de detalhar e diagramar cada etapa realizada na pesquisa bibliográfica (Figura 1). Assim, a plataforma *Rayyan* foi utilizada para facilitar a exclusão de artigos através da leitura do resumo. O critério de exclusão foi a remoção de: (i) registros duplicados; (ii) artigos de revisão (estritamente metodológicos e/ou fora do escopo desta revisão); (iii) citações; (iv) artigos que não são de periódicos (capítulos de livros, avaliações de risco, dissertações e teses); (v) idiomas diferentes do inglês; e (vi) artigos que não responderam às palavras-chave. Prosseguindo a seleção, foi realizada uma análise de conteúdo dos artigos a serem discutidos nesta revisão.

Em adição à primeira pesquisa, um artigo foi inserido a esta revisão com o uso da palavra-chave "Scyphozoa". As outras classes usadas como palavras-chave não forneceram artigos extras a serem incorporados à revisão. As buscas de identificação nas bases de dados resultaram 1.202 registros (*records*), dos quais 67 foram duplicados. Outros 1.013 registros foram removidos por não atenderem às palavras-chave e aos critérios de inclusão (artigos de pesquisa científica publicados em inglês entre 2013 a 2023).

Após a identificação, foi realizada a triagem em 122 registros, em que foi realizada a leitura dos resumos e exclusão dos registros não publicados em artigos científicos (n = 9) e registros considerados inelegíveis após a leitura do resumo (n = 79) por não contemplarem os critérios de inclusão. Os 34 artigos remanescentes foram lidos e foram excluídos cinco artigos de revisão que não haviam sido reconhecidos durante a etapa de identificação, além de um artigo publicado em outro idioma, que não o inglês. Durante a triagem nenhum artigo foi recuperado. Após a triagem, 28 artigos de periódicos, oriundos de 20 estudos diferentes, permaneceram no conjunto de dados (dados diagramados na figura 1). Alguns estudos
(experimentos ou ensaios) resultaram em mais de um artigo publicado. Da mesma forma, mais de uma espécie pode ter sido utilizada em um mesmo estudo.



Figura 1. Diagrama de cada etapa realizada na pesquisa bibliográfica usando a diretriz PRISMA 2020.

De cada registro foram extraídos os seguintes dados: (1) ano e local de publicação; (2) estágio de vida dos organismos; (3) classe e espécie estudada; (4) abordagens metodológicas utilizadas. Para abordagem foram consideradas as categorias de efeitos/respostas avaliadas, classificadas em "Letalidade", "Bioacumulação", "Saúde e morfologia", "Comportamento", "Fisiologia", "Genética", "Eficiência dos simbiontes", "Fototoxicidade", "Fertilização", "Metamorfose" e "Assentamento larval". "Saúde e morfologia" encontram-se juntos na mesma abordagem pois os autores avaliam alterações morfológicas como critérios para determinar o estado de saúde dos animais, como por exemplo: fragmentação (p. ex. De Leo *et* 

*al.*, 2016), retração dos pólipos (p. ex. Frometa *et al.*, 2017) e outros danos morfológicos. Além dessas informações, também foram avaliadas as metodologias de exposição utilizadas e os principais resultados obtidos, os quais foram analisados de forma integrada.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 3.1 Distribuição dos artigos por ano e local de publicação

Os artigos selecionados foram agrupados levando em consideração os anos de publicação (Tabela 1). Com base nessa análise, foram identificadas publicações que relatam os efeitos toxicológicos agudos do petróleo cru em Cnidaria em todos os anos entre 2013 e 2023, sem demonstrar padrão específico de aumento ou decréscimo do número de publicações com o passar do tempo.

Tabela	1. Lista	ı do	número	de a	irtigos	publicad	los po	r ano	(2013-2023	<ol> <li>relacion</li> </ol>	ados a	los efeitos	agudos	do óle	эс
cru em	Cnidaria	a.													

Year	Number of published articles	Percentage (%)
2013	2	7.15
2014	1	3.57
2015	2	3.57
2016	2	14.29
2017	2	3.57
2018	3	10.71
2019	1	3.57
2020	3	10.71
2021	5	17.86
2022	6	21.43
2023	1	3.57
Total	28	100.0

No ano de 2022, o número de artigos publicados é o maior (n = 6), principalmente devido à necessidade de corrigir lacunas de dados sobre a sensibilidade de corais à exposição aguda ao óleo (Ashok *et al.*, 2022; Nordborg *et al.*, 2022); à intensificação do desenvolvimento costeiro e do tráfego marítimo (Hulver *et al.*, 2022); e derramamentos de óleo (Miranda *et al.*, 2022) que atingiram a costa dos países estudados por estes artigos.

Foram identificadas publicações que relatam os efeitos agudos do óleo cru em Cnidaria em seis países diferentes (Figura 2). Os Estados Unidos foi o país com o maior número de publicações sobre o tema, com 14 artigos (50%), seguido da Austrália com 8 artigos (28,6%); da China e da Noruega com 2 artigos cada (7,1%); e Brasil e Arábia Saudita com apenas 1 artigo por país (3,6%).

**Figura 2.** Distribuição mundial de artigos que abordam os efeitos agudos do óleo cru em Cnidaria, entre os anos de 2013 e 2023.



Historicamente, um dos maiores derramamento de petróleo em ambiente marinho é representado pela explosão da plataforma de perfuração *Deepwater Horizon* em 2011, que descarregou mais de 4 milhões de barris de petróleo bruto no Golfo do México (GOM) em um período de três meses, causando diversos impactos ecológicos no ambiente marinho (De Leo *et al.*, 2016; Echols *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016). A ocorrência desse grande

derramamento de óleo, explica o fato de a metade dos artigos terem sido publicados nos Estados Unidos em quase todos os anos (Figura 3), país atingido pelo derramamento.

Além da ocorrência do "*Deepwater Horizon oil spill*", o GOM representa uma importante fonte de petróleo para grande parte do Ocidente, com mais de 1,5 milhões de barris de petróleo extraídos diariamente de plataformas petrolíferas na região, fator que explica outro grande derramamento de óleo: o do navio petroleiro Exxon Valdez (Goodbody-Gringley *et al.*, 2013). Uma vez que atividades de exploração, produção de petróleo e expansão portuária têm o potencial de prejudicar ecossistemas de recifes (Turner *et al.*, 2021), oito dos artigos que avaliam os efeitos agudos do petróleo em Cnidaria publicados pelos EUA realizaram coletas de animais ou óleo em regiões localizadas no GOM.



Figura 3. Relação entre as distribuições temporal e mundial de artigos que abordam os efeitos agudos do óleo cru em Cnidaria.

SAU = Arábia Saudita; BRA = Brasil; NOR = Noruega; CHN = China; AUS = Austrália; USA = Estados Unidos da América.

Na Austrália, além da grande importância de seus recifes, o interesse renovado nos efeitos dos derramamentos de petróleo em ecossistemas marinhos foi estimulado, principalmente, pelo incidente da plataforma de perfuração de Montara (Negri *et al.*, 2016). Entre os anos 1970 e 2017 ocorreram 51 derramamentos de óleo em águas australianas, com impactos aos cnidários que vivem na Grande Barreira de Corais e em outros recifes (Keesing

*et al.*, 2018). Portanto, derramamentos de petróleo de plataformas nos trópicos e subtrópicos enfatizaram a necessidade de compreender melhor os riscos para os organismos marinhos tropicais (Brinkman *et al.*, 2023).

Na China, a concentração e distribuição de hidrocarbonetos de petróleo têm crescido próximo às águas costeiras, evidenciando uma situação preocupante (Xiao *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2023). Já na Noruega, a indústria petrolífera está se deslocando em direção ao norte e muitas áreas de perfuração coincidem com habitats raros ou em declínio, incluindo recifes de corais de águas frias (Letnes *et al.*, 2019). Na Arábia Saudita, o aumento do desenvolvimento urbano ao longo da costa do Mar Vermelho, além do intenso tráfego marítimo, aumenta o potencial de impactos decorrentes da poluição por petróleo (Hulver *et al.*, 2022), todos estes fatores explicam a produção científica sobre o tema por estes países nos anos mais recentes.

Na costa brasileira, no ano de 2019, uma mancha de petróleo bruto de pelo menos 5.000 toneladas foi encontrada ao longo de mais de 3.000 km de costa em 11 estados, configurando o pior desastre ambiental registrado no Oceano Atlântico Sul (Miranda *et al.*, 2022). Apesar disso, há apenas uma publicação sobre o tema no ano de 2022 (Figura 3), o que demonstra uma lacuna de estudos desenvolvidos no país sobre o efeito agudo da exposição ao óleo cru em cnidários, especialmente se for considerada a grande extensão costeira do país e a magnitude do derramamento de óleo que ocorreu no ano de 2019.

### 3.2 Estágio de vida

Dos 28 artigos analisados, 64,3% investigaram as respostas agudas por indivíduos adultos, 28,6% avaliaram as respostas larvais e 10,7%, respostas por juvenis ou recrutas (alguns artigos avaliaram mais de um estágio). Além disso, também foram avaliados os efeitos em embriões (7,1%) e gametas (3,5%) (Figura 4).



**Figura 4.** Número de artigos que analisaram os efeitos agudos do óleo cru nos diferentes estágios de vida de Cnidaria (mais de um estágio de vida pode ter sido avaliado em um mesmo artigo).

#### 3.3 Grupos de Cnidaria encontrados nos artigos selecionados

As classes investigadas nos artigos foram: 7,1% (n = 2) Scyphozoa (subclasse Discomedusae) e 85,7% (n = 24) Anthozoa (incluindo as subclasses Hexacorallia e Octocorallia). Hexacorallia mostrou ser a subclasse de antozoários mais investigada, em um total de 20 artigos (71,4%). Nesta subclasse, Actinaria (n = 2), Antipatharia (n = 2) e Scleractinia (n = 16) foram as ordens avaliadas. A subclasse Octocorallia foi investigada em cinco artigos (17,8% do total de artigos examinados), representada por sete espécies diferentes, pertencentes às ordens Malacalcyonacea e Scleralcyonacea (Tabela 2).

Considerando os artigos que classificaram os grupos estudados até o nível de espécie, no total, 26 espécies diferentes de Cnidaria foram avaliadas nas publicações (Tabela 2). Uma vez que Scleractinia foi o grupo estudado pelo maior número de artigos relacionados aos efeitos agudos do óleo cru (16 artigos), a variedade de espécies foi a maior entre os grupos de Cnidaria. As espécies mais estudadas foram *Acropora millepora*, analisada em seis artigos, seguida de *Acropora tenuis*, *Desmophyllum pertusum* (citada como *Lophelia pertusa*) e *Porites astreoides*, analisadas em três artigos. A razão pela qual *A. millepora* é a espécie de Cnidaria mais investigada a respeito da exposição aguda ao óleo reside em sua importância como um coral construtor de recifes, comum no Indo-Pacífico (Ashok *et al.*, 2022) e suas larvas mostram sensibilidade em resposta a HPAs (Nordborg *et al.*, 2021). Em relação à importância das demais espécies mais estudadas, *A. tenuis* é um coral comum no Oceano Pacífico (Negri *et al.*, 2016; Overmans *et al.*, 2018); *D. pertusum* é um coral de águas frias formador de recifes, que suporta diversos serviços ecossistêmicos e está ameaçado por impactos antrópicos no mar profundo (Weinning *et al.*, 2020); finalmente, *P. astreoides* é comum em águas rasas e apresenta ampla distribuição e adequação à experimentação (Turner *et al.*, 2021).

**Tabela 2.** Classificação taxonômica básica dos grupos investigados nos artigos que abordam os efeitos agudos do óleo cru em Cnidaria, entre 2013 e 2023 (mais de uma espécie pode ter sido avaliada em um mesmo artigo).

Phylum	Class	Subclass	Order	Family	Genus	Species
	Caushasaa	Discourse durance	Compositores	Ulmaridae	Aurelia	Aurelia aurita
	Scyphozoa	Discomedusae	Semaeostomeae	Pelagiidae	Pelagia	Pelagia noctiluca
					Bebryce	Bebryce spp.
				Diovauridae	Hypnogorgia	Hypnogorgia pendula
			Malacalcyonacea	riexauliuae	Swiftia	Swiftia exserta
		Octocorallia			Thesea	Thesea nivea
				Paramuriceidae	Paramuricea	Paramuricea sp.
			Scloralevonacea	Priminoidae	Callogorgia	Callogorgia delta
			Scieralcyonacea	Ellisellidae	Ellisella	Ellisella barbadensis
		Hexacorallia	Actinaria	Edwardsiidae	Nematostella	Nematostella vectensis
	Anthozoa		Antipatharia	Antipathidae	Antipathes	Antipathes atlantica
				Leiopathidae	Leiopathes	Leiopathes glaberrima
Coldoria						Acropora cervicornis
Chidana				Acroporidae	Acropora	Acropora hyacinthus
						Acropora millepora
						Acropora muricata
						Acropora tenuis
				Caryophyliidae	Desmophyllum	Desmophyllum pertusum
			Coloractinia	Montastraeidae	Montastraea	Montastraea faveolata
			Scieracuma	Sidorastroidao	Sidorastroa	Siderastrea siderea
				Siderastreidae	Siderastrea	Siderastrea stellata
				Scleractinia inc. sed.	Solenastrea	Solenastrea bournoni
				Astrocoeniidae	Stephanocoenia	Stephanocoenia intersepta
				Pocilloporidae	Pocillopora	Pocillopora damicornis
				Poritidae	Porites	Porites astreoides
					r onteo	Porites divaricata

inc. sed.: Incertae sedis (de classificação incerta).

### 3.4 Abordagens observadas nos artigos

A figura 5 sintetiza as abordagens observadas nos artigos que avaliaram as respostas à exposição aguda ao petróleo por cnidários. Dos dez artigos que analisaram as respostas

agudas pelos estágios iniciais de vida de cnidários, seis abordaram a "Letalidade" de indivíduos juvenis e quatro avaliaram a "Metamorfose larval". Sucesso do "assentamento larval", "Comportamento" e "Morfologia" foram analisados por três artigos. Finalmente, "Fisiologia", "Genética" e sucesso da "Fertilização" foram analisados em apenas um artigo (Figura 5). Assim, foram avaliadas desde alterações sobre o sucesso da fertilização e desenvolvimento embrionário (Nordborg *et al.*, 2021), passando pelo comportamento de natação da larva (Goodbody-Gringley *et al.*, 2013), seu assentamento no substrato e sua metamorfose, até transformar-se em um pólipo juvenil (Negri *et al.*, 2016; Nordborg *et al.*, 2018; Overmans *et al.*, 2018).

**Figura 5.** Número de artigos publicados em cada categoria de abordagem em estudos sobre os efeitos agudos do óleo cru em indivíduos adultos e estágios iniciais do desenvolvimento de Cnidaria (2013 - 2023) (mais de uma abordagem pode ter sido avaliada em um mesmo artigo).



Todos os demais artigos combinaram mais de uma abordagem de análise de indivíduos adultos: "Saúde e morfologia" foram avaliadas na maioria das publicações (77,7%), seguido de "Letalidade" (66,6%), "Genética" (50%), "Eficiência dos simbiontes" (44,4%), "Fototoxicidade" (27,7%), "Fisiologia" (22,2%) e "Comportamento" (16,6%) (Figura 5).

Os artigos que abordaram o tema "Saúde e morfologia" analisaram, principalmente, alterações nos filamentos (Weinning *et al.*, 2020), exposição do esqueleto, alterações na

coloração, inchaço e integridade tecidual (De Leo *et al.*, 2016; May *et al.*, 2020; Renegar e Turner, 2021; Turner *et al.*, 2021). Paralelamente, poucos artigos observaram o desenvolvimento de processos patológicos (Silva *et al.*, 2016) e a taxa de crescimento do animal (Brinkman *et al.*, 2023).

As análises realizadas em artigos que abordaram alterações genéticas incluem análises transcriptômicas e da expressão gênica. De forma específica, foram aplicadas as seguintes metodologias: sequenciamento do RNA (De Leo *et al.*, 2021), desenvolvimento de biblioteca de cDNA (DNA complementar) (Overmans *et al.*, 2018), sequenciamento de *DGE* (*Digital Gene Expression*), identificação e análise de marcadores (Tarrant *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2018), além de análises funcionais por *KEGG* (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto), interpretação utilizando o sistema de classificação *Gene Ontology* (GO) (Xiao *et al.*, 2018; De Leo *et al.*, 2021) e PCR quantitativa em tempo real (qPCR) (Overmans *et al.*, 2018).

Para analisar a eficiência fotossintética dos simbiontes de cnidários expostos de forma aguda ao petróleo, foram realizadas determinações da densidade de simbiontes (células/cm<sup>-2</sup>) e do conteúdo de clorofila (Liu *et al.*, 2023). Adicionalmente, a eficiência quântica foi analisada de diferentes formas, como pela máxima eficiência quântica adaptada ao escuro ou ao claro (Fv/Fm) (May *et al.*, 2020; Nordborg*et al.*, 2022), a eficiência quântica média (Renegar *et al.*, 2016) e a efetiva ( $\Delta$ F/Fm') (Brinkman *et al.*, 2023).

Em relação à abordagem fisiológica, foram analisados o conteúdo de proteínas totais e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), marcador do estresse oxidativo (Tarrant *et al.*, 2014; Overmans *et al.*, 2018). Nas análises comportamentais foram avaliados o movimento e a expansão dos tentáculos, a liberação de muco (Weinning *et al.*, 2020) e extensão e retração dos pólipos (De Leo *et al.*, 2016). Ao abordar a bioacumulação foram mensuradas as concentrações totais de hidrocarbonetos de petróleo absorvidos pelos organismos (Almeda *et al.*, 2013; Ashok *et al.*, 2022). Quanto à metodologia de estudo dos artigos, apenas 7,1% (n = 2) dos artigos realizaram análises *in situ* (Silva *et al.*, 2016; Miranda *et al.*, 2022). Silva *et al.* (2016) analisaram processos patológicos em octocorais e antipatários após o *"Deepwater Horizon oil spill"*, no Golfo do México, e os efeitos mais comuns foram a formação de biofilme sobre os animais, a exposição dos esqueletos e a quebra de ramificações. Já Miranda *et al.* (2022) avaliaram interações a curto prazo entre o petróleo e corais da área marinha costeira protegida no Brasil (Área de Proteção Ambiental da Costa dos Corais), através da identificação de manchas de óleo e avaliação dos efeitos na vitalidade dos corais. Os principais resultados demonstram a ocorrência de manchas de óleo em fendas, poças de maré e em contato direto com corais, influenciando negativamente na cobertura da espécie *Siderastrea stellata*.

A grande maioria dos estudos analisados realizaram ensaios experimentais 92,9% (n = 26). Em relação à fração de óleo utilizada nos experimentos, 42,3% (n = 11) dos artigos seguiram o procedimento metodológico da utilização de WAF (*Water Accommodated Fractions*), em que o óleo é agitado em água do mar até ser obtida a fração de óleo acomodada em água (p. ex. Nordborg *et al.*, 2022; Frometa *et al.*, 2017; Renegar *et al.*, 2016). No ambiente natural, quando o óleo cru atinge os oceanos, sua mistura com água salina forma a WAF, fase aquosa que contém gotas de óleo, e também é formada a fração de óleo solúvel em água (WSF), que contém apenas compostos solúveis (Liu e Kujawinski, 2015). Um dos artigos (3,8%) utilizou HEWAF (*High-Energy WAF*), na qual a mistura de óleo e água do mar é agitada mecanicamente com alta intensidade (May *et al.*, 2020) e um artigo (3,8%) utilizou "*Low Energy WAF*", em que não é formado vórtice durante a agitação (Negri *et al.* 2021) (Tabela 3).

Também foi possível identificar a utilização de HPAs isolados em nove experimentos (34,6%) (p. ex. Letnes *et al.*, 2019; Overmans *et al.*, 2018; Turner *et al.*, 2021; Renegar e Turner, 2021), além da combinação de WAF e dispersantes (CEWAF - *Chemically-Enhanced* 

*WAF*) em quatro artigos (15,3%) (Goodbody-Gringley *et al.*, 2013; Echols *et al.*, 2015; Weinning *et al.*, 2020; Bytingsvik *et al.*, 2020). Os dispersantes são compostos químicos utilizados na tentativa de remoção de manchas de óleo formadas em grandes derramamentos, contudo, interagem com o petróleo (Suchanek, 1993), causando maior toxicidade aos organismos, quando comparado com o petróleo ou dispersantes isolados (Singer *et al.*, 2000). Por fim, dois artigos (7,6%) utilizaram o petróleo cru diretamente em seus experimentos, através do uso de telhas embebidas em óleo (Hulver *et al.*, 2022) ou emulsões de óleo e água do mar (Almeda *et al.*, 2013) (Tabela 3).

As exposições agudas variaram de 18 a 96 h e se relacionaram com o estágio de vida dos organismos. Exposições por 96 h foram analisadas em 34,6% dos experimentos (n = 9), sendo sete deles sobre respostas em adultos (p. ex. Negri *et al.*, 2021; Frometa *et al.*, 2017). Sete artigos (26,9%) realizaram exposições por 48 h, dos quais três avaliaram respostas de estágios iniciais de vida (p. ex. Nordborg *et al.*, 2018; Renegar e Turner, 2021). Exposições por 24 h sobre estágios iniciais de vida foram avaliadas em quatro artigos, enquanto um avaliou respostas por adultos em 24 h (p. ex. Tarrant *et al.*, 2014; Goodbody-Gringley *et al.*, 2013). Também foram observadas exposições mais curtas, por 18 h (3,8%) (Berger *et al.*, 2022) e exposições além de 96 h em seis artigos (23%), que variaram entre cinco e 21 dias (p. ex. Almeda *et al.*, 2013; Nordborg *et al.*, 2022; Ashok *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023).

Dos 26 artigos experimentais, três (11,5%) realizaram exposições constantes, sem renovação da solução de teste, em que a mesma solução inicial é utilizada durante toda a exposição, com possível declínio da concentração de contaminantes (Tarrant *et al.*, 2014; Negri *et al.*, 2016; Frometa *et al.*, 2017). Três (11,5%) artigos realizaram renovação estática, em que a solução de teste é renovada em determinados intervalos de tempo, a fim de manter a concentração dos contaminantes (Almeda *et al.*, 2013; Echols *et al.*, 2015; Nordborg *et al.*, 2022). Seis artigos (23%) realizaram ensaios de fluxo contínuo (p. ex. Letnes *et al.*, 2019;

Turner *et al.*, 2021), um artigo (3,8%) realizou metodologia denominada "*spiked flow-through*" que refere-se à exposição em concentrações decrescentes (Goodbody-Gringley *et al.*, 2013) e um artigo (3,8%) utilizou a metodologia "*pulse chase*", com exposições seguidas de um período de recuperação (May *et al.*, 2020). Os demais 12 artigos experimentais não citam o tipo de exposição.

Os autores utilizaram métodos de exposição variados (Tabela 3), consequentemente os artigos demonstram grande variação nas concentrações de óleo/água utilizadas nos experimentos com cnidários. As concentrações dos ensaios experimentais variaram de 0,00925 mg/L (Overmans *et al.*, 2018) até 25 g/L (Frometa *et al.*, 2017).

**Tabela 3.** Principais procedimentos metodológicos aplicados em ensaios experimentais sobre os efeitos agudos da exposição ao óleo cru em Cnidaria.

Treatment	Time of	Exposure method	Main references
solution	exposure		
		Static, test solution not renewed	Frometa et al., 2017
	96 h	Test solution renewed every 48 h	Echols <i>et al.</i> , 2015
		-	De Leo <i>et al.</i> , 2016; 2021
WAF	48 h	Continuous flow recirculating system	Renegar et al., 2016
		-	Nordborg et al., 2018
	24 h	Static	Negri <i>et al.</i> 2016
HEWAF		"Pulse chase": pulse of oil treatment	May et al., 2020
		every 12 h	
Low-energy	96 h	No vortex	Negri et al. 2021
WAF			

		Flow through system	Goodbody-Gringley <i>et al.</i> , 2013
CEWAF		-	Bytingsvik et al., 2020
	96 h	Test solution renewed every 48 h	Echols et al., 2015
	48 h	Recirculating units	Weinning et al., 2020
	96 h	Flow through system	Letnes et al., 2019
PAHs	48 h	-	Overmans et al., 2018
		Continuous flow recirculating system	Renegar and Turner, 2021; Turner <i>et al.</i> , 2021
		Continuous exposure without test	Tarrant <i>et al.</i> , 2014
	24 h	solution renewal	
		-	Xiao <i>et al.</i> , 2018
Crude oil	3 w	Tiles soaked in light fresh crude oil	Hulver <i>et al.</i> , 2022
directly	1 - 6 d	Oil-seawater emulsions	Almeda et al., 2013

- : exposure method not mentioned in the article; h: hours; d: days; w: weeks.

# 3.5 Efeitos agudos

A poluição por óleo representa um risco potencial e gera impactos agudos nos ambientes marinhos, incluindo efeitos de danos físicos (contaminação e sufocamento) e toxicidade de seus compostos químicos (Almeda *et al.*, 2013; Nordborg *et al.*, 2021). A Tabela 4 sintetiza os efeitos significativos da exposição aguda ao óleo cru em Cnidaria encontrados nos artigos analisados.

Ordem	Espécie	Estágio de vida	Abordagem	Principais Efeitos	Referência
Semaeostomeae	Aurelia aurita	Larvas	Saúde e morfologia	Descoloração, desidratação, redução do tamanho, deformação, perda da integridade tecidual e contrações musculares irregulares;	Echols <i>et al.</i> , 2015
	Pelagia noctiluca	Adultos	Bioacumulação	Bioacumulação seletiva de HPAs (criseno, fenantreno e pireno);	Almeda <i>et al.</i> , 2013
			Letalidade	Maior mortalidade em tratamentos com misturas de óleo e dispersantes;	Frometa <i>et al.</i> , 2017
	Swiftia exserta		<i>ta</i> Retração severa do pólipo, alimentação e ingestão reduzidas, acúmulo de HPAs nos tecidos, rendimento quântico adaptado à luz reduzido;		May <i>et al.</i> , 2020
	Thesea nivea		Saúde e morfologia		Silva <i>et al.</i> , 2016
Malacalcyonacea	Bebryce spp.	Adultos		Desenvolvimento de processos patológicos; exposição e fragmen- tação do esqueleto:	
	Hypnogorgia pendula				
	Paramuricea type B3			Declínio na saúde em misturas de óleo e dispersantes:	De Leo et al.,
	Leiopathes glaberrima			Decimio na saude em misturas de orco e dispersantes,	2016

Tabela 4. Efeitos significativos da exposição aguda ao óleo cru em Cnidaria.

	Paramuricea type B3		Conótion	Metabolismo energético alterado, estresse oxidativo,	De Leo <i>et al.</i> ,
Scleralcyonacea	Callogorgia delta		Genetica	danos celulares;	2021
Actinaria	Nematostella	A dultos	Conótico	Expressão de proteínas de atividade antioxidante aumentada;	Tarrant <i>et al.</i> , 2014
Actiliaria	vectensis	Aduitos	Genetica	Processos de comunicação celular e transdução de sinal regulados negativamente, respostas ao estresse celular;	Berger et al., 2022
Antipatharia	Antipathes atlantica	Adultos	Saúde e morfologia	Desenvolvimento de patologias em consequência da exposição dos esqueletos e quebra de ramificações;	Silva <i>et al.</i> , 2016
	Acropora hyacinthus	Embriões	Genética	Aumento da expressão de genes de resposta ao estresse, fosforilação oxidativa e vias de desintoxicação, inibição da cadeia respiratória, distúrbio de funções biológicas;	Xiao <i>et al.</i> , 2018
			Genética, fisiologia e metamorfose	Redução do sucesso da metamorfose larval, transcrição e expressão de genes antioxidantes aumentadas, superexpressão de proteínas de choque térmico e aumento da atividade da SOD;	Overmans <i>et</i> <i>al.</i> , 2018
Scleractinia	Acropora tenuis	Larvas	Comportamento	Fragmentação e redução da mobilidade;	Negri <i>et al.</i> , 2016
			Metamorfose, assen- tamento e fisiologia	Desenvolvimento lento, metamorfose parcial, formação incompleta de septos mesentéricos e incapacidade de assentamento larval;	Nordborg <i>et al.</i> , 2018
	Acropora		Metamorfose	Larvas se desenvolvem lentamente e sofrem metamorfose parcial;	Negri <i>et al.</i> , 2021

millepora

		Gametas, embriões e larvas	Morfologia, comportamento, assentamento e metamorfose	Desenvolvimento larval lento, metamorfose parcial, incapacidade de assentamento, fragmentação e baixa mobilidade;	Nordborg <i>et al.</i> , 2021
		Recrutas	Fisiologia	Redução do crescimento e absorção de frações tóxicas por simbiontes;	Nordborg <i>et al.</i> , 2022
		Adultos Larvas	Bioacumulação	Maior acúmulo de HPAs através da dieta;	Ashok <i>et al.</i> , 2022
			Letalidade	Mortalidades significativas ocorrem a partir de 24 h;	Brinkman <i>et</i> <i>al.</i> , 2023
	Montastraea faveolata			Mortalidade de larvas cresce com o aumento das	Goodbody-Gri-
	Porites astreoides			concentrações de contaminantes;	<i>et al.</i> , 2013
	Desmophyllum pertusum	Adultos		Mortalidade significativa a partir de 24 h de exposição;	Bytingsvik et al., 2020
	Porites divaricata		Saúde e morfologia / Comportamento	Atrofia dos mucócitos, inchaço da gastroderme, necrose, distensão e extensão progressiva de pólipos, elevada produção de muco e atraso qualitativo na resposta tátil;	Renegar <i>et al.</i> , 2016
	Acropora cervicornis			/ Retração de pólipos, exposição do esqueleto, afinamento, necrose e mortalidade tecidual; interrupção do comportamento normal;	Turner et al.,
	Porites astreoides				2021; Renegar e Turner 2021
	Siderastrea	1			- <i></i>

siderea			
Stephanocoenia intersepta			
Solenastrea bournoni			
Pocillopora damicornis	Genética	Ativação do sistema de regulação neuroendócrina, apoptose celular em resposta às ROS, elevação da atividade antioxidante, metabolismo de toxinas;	Liu <i>et al.</i> , 2023

Mortalidades significativas de cnidários adultos em resposta à exposição aguda ao petróleo ocorrem a partir de 24 h de contato com contaminantes em altas concentrações, como por exemplo, os HPAs tolueno, naftaleno, 1-metilnaftaleno (Brinkman *et al.*, 2023) e 2-metilnaftaleno (Bytingsvik *et al.*, 2020). O HPA fenantreno induz taxa de mortalidade inferior e efeitos subletais limitados quando comparado com os HPAs citados (Turner *et al.*, 2021). O contato agudo com concentrações elevadas de petróleo são menos letais do que exposições a misturas de óleo e dispersantes (De Leo *et al.*, 2016), em contrapartida, não há mortalidade significativa em exposições a concentrações mais baixas (Turner *et al.*, 2021).

O óleo cru induz efeitos sobre a saúde e morfologia de corais em resposta ao estresse que dependem do estágio de vida do animal (De Leo *et al.*, 2016), tempo e dosagem da exposição (Brinkman *et al.*, 2023). Portanto, exposições agudas de durações mais curtas induzem a retração dos pólipos, que progride para o afinamento tecidual, exposição do esqueleto até a necrose e mortalidade tecidual em corais adultos (Silva *et al.*, 2016; Renegar e Turner, 2021). Cnidários são gravemente impactados após 24 h de exposição, demonstrando efeitos máximos e mortalidade em 48 h (Turner *et al.*, 2021), quando a estrutura epidérmica é comprometida, com atrofia dos mucócitos, inchaço da gastroderme e necrose, resultando em aumento do número de amebócitos granulares na epiderme, que desempenham papel na resposta à lesão tecidual (Renegar *et al.*, 2016).

Em contrapartida, alguns dos artigos analisados defendem que a saúde de cnidários não é significativamente alterada em exposições ao óleo cru por 24 h (Weinning *et al.*, 2020), demonstrando efeitos tóxicos agudos mínimos sobre a vitalidade dos animais (Miranda *et al.*, 2022). A curto prazo (até 24 h), a integridade e a coloração dos tecidos não são impactadas (May *et al.*, 2020), resultado que pode relacionar-se com a ausência de efeitos significativos na eficiência fotossintética dos simbiontes, visto que os HPAs podem ser bioacumulados, mas não induzirem efeitos tóxicos às zooxantelas (Ashok *et al.*, 2022).

Em exposições agudas mais longas, foram observados o clareamento parcial do coral após 35 h e a perda de tecido após 65 h, intensificados com o passar do tempo, além de inibição da regeneração; portanto, exposições por 96 h resultam em alterações mais significativas na saúde e morfologia dos animais (May *et al.*, 2020). Além disso, a maioria dos cnidários expostos a baixas concentrações de hidrocarbonetos de petróleo permaneceram vivos e com pouca ou nenhuma alteração tecidual, já as altas concentrações promoveram a secreção excessiva de muco e a degradação dos tecidos, que causaram redução da taxa de crescimento do animal (Silva *et al.*, 2016; Turner *et al.*, 2021).

Adicionalmente, foi documentada a interrupção imediata do comportamento normal dos cnidários expostos de forma aguda ao óleo cru (Turner *et al.*, 2021), evidenciada pela retração severa do pólipo e atividades de alimentação e ingestão de nutrientes reduzidas, resultantes do acúmulo de HPAs nos tecidos dos animais (May *et al.*, 2020). Também foram observadas alterações comportamentais representadas por distensão e extensão progressiva de pólipos, elevada produção de muco e atraso qualitativo na resposta tátil em exposições por 48 h, respostas consistentes com uma ação tóxica (Renegar *et al.*, 2016).

De acordo com a maioria dos autores, a capacidade fotossintética (quantificada por Fv/Fm), o fotossistema II das zooxantelas e a coloração do animal adulto (analisada morfologicamente) não são afetadas pela exposição aguda ao óleo cru, sugerindo maior sensibilidade do animal, quando comparado com suas algas simbiontes (Renegar *et al.*, 2016; Nordborg *et al.*, 2022; Brinkman *et al.*, 2023). Assim, a eficiência fotossintética dos simbiontes não é reduzida até que impactos sobre o coral sejam maiores (Turner *et al.*, 2021).

Apesar de a maioria dos autores defenderem que a exposição aguda ao óleo cru não induz branqueamento e toxicidade à eficiência fotossintética dos simbiontes de cnidários, alguns autores argumentam que, em exposições por 96 h, o rendimento quântico efetivo adaptado à luz é reduzido a partir de 20 h de exposição (May *et al.*, 2020). Tratamentos

combinados de exposição aguda a HPAs e calor causam efeitos aos simbiontes ao elevarem a atividade antioxidante e suprimirem a fotossíntese (Liu *et al.*, 2023). Danos à eficiência fotossintética dos simbiontes são capazes de induzir impactos na nutrição, crescimento e processos fisiológicos de cnidários adultos (May *et al.*, 2020). Apesar disso, o declínio na eficiência fotossintética de simbiontes durante testes de toxicidade demonstra ser reversível após o término dos experimentos (Turner *et al.*, 2021).

Fisiologicamente, cnidários respondem à exposição aguda ao óleo cru através da redução da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), responsável por reduzir danos gerados pelos ROS (Overmans *et al.*, 2018). A partir de 24 h, o sistema de regulação neuroendócrina do animal é ativado, induzindo a apoptose em resposta às ROS, indicando elevação da atividade oxidante. Adicionalmente, a exposição à HPAs induz processos de metabolismo de toxinas (Liu *et al.*, 2023), alterações no metabolismo energético e respostas ao estresse (De Leo *et al.*, 2021). A exposição direta ao óleo cru causa maior estresse oxidativo, já a exposição a contaminantes dissolvidos impacta o desenvolvimento de tecidos, respostas imunológicas, respostas a danos celulares e reparo do DNA (De Leo *et al.*, 2021).

Exposições agudas ao petróleo induzem a expressão elevada de proteínas dos ribossomos, que regulam o metabolismo de invertebrados em períodos de estresse, e de genes associados à biodegradação xenobiótica e reparo de lesões, além de respostas inflamatórias. Ao mesmo tempo, ocorre a inibição de moléculas estruturais que conferem integridade aos tecidos. Assim, a resposta inicial de defesa é representada pela citotoxicidade aguda e dano celular, que reduzem recursos energéticos alocados para manter a cicatrização, o reparo e a integridade tecidual (De Leo *et al.*, 2021).

Análises transcriptômicas indicam ativação da regulação neuroendócrina, com estímulo da expressão de genes relacionados ao sistema monoaminérgico e acetilcolinérgico, o que inibe a meiose (Liu *et al.*, 2023). No entanto, os níveis mais altos de expressão gênica

55

diferencial foram encontrados em tratamentos que continham dispersantes, demonstrando estresse imune e oxidativo e metabolismo energético alterado (De Leo *et al.*, 2021).

Também foi examinado o potencial de bioacumulação de HPAs do petróleo em Cnidaria (Almeda *et al.*, 2013; Ashok *et al.*, 2022). Ashok *et al.* (2022) demonstram que corais da espécie *Acropora millepora* (Ehrenberg, 1834) bioacumulam de forma significativa o HPA fenantreno, com concentrações teciduais mais altas em exposições agudas em que o HPA foi dissolvido diretamente na água do mar, com maior retenção de poluentes adquiridos através da alimentação de diferentes presas. Almeda *et al.* (2013) registraram bioacumulação seletiva de HPAs como criseno, fenantreno e pireno, os quais podem ser transferidos pela cadeia alimentar e, potencialmente, contaminar predadores de topo.

Todos os estágios iniciais de vida de cnidários são impactados pela exposição aguda ao óleo cru, mas exibem sensibilidades distintas. A fertilização é impactada principalmente pela baixa densidade de espermatozóides, intensificada pela co-exposição à luz, ao contrário do que acontece com os ovócitos, os quais contêm micosporinas, aminoácidos protetores contra a radiação (Nordborg *et al.*, 2021). A exposição de larvas resulta em mortalidade nas primeiras 24 h, crescendo com o aumento das concentrações (Goodbody-Gringley *et al.*, 2013) e com a co-exposição à radiação UV, induzindo letalidade completa (Nordborg *et al.*, 2018; 2021; Overmans *et al.*, 2018) e causando fotólise dos HPAs, o que aumenta consideravelmente sua toxicidade (fotoativação) pela formação de ROS (Negri *et al.*, 2016). No entanto, a sobrevivência em curto prazo de adultos não é substancialmente afetada, devido ao tecido espesso e pigmentado, maturação dos mecanismos de defesa e reservas energéticas (Tarrant *et al.*, 2014).

Larvas de cnidários expostas se desenvolvem lentamente e sofrem metamorfose parcial (Nordborg *et al.*, 2018; 2021; Negri *et al.*, 2021), diminuindo o sucesso da metamorfose com o aumento da concentração de HPAs (Overmans *et al.*, 2018). A

56

metamorfose parcial causa formação incompleta de septos mesentéricos e diminui a capacidade do assentamento larval ao substrato (Nordborg *et al.*, 2018; 2021). Essas respostas por larvas também são amplificadas com a co-exposição à radiação UV, porém, o grau de resposta varia com a espécie (Goodbody-Gringley *et al.*, 2013).

Em baixas concentrações de HPAs, a capacidade de natação larval é mantida, no entanto, larvas se tornam fragmentadas e menos móveis à medida que as concentrações aumentam (Negri *et al.*, 2016; Nordborg *et al.*, 2021), assim como a frequência e gravidade de anormalidades morfológicas em larvas e juvenis também se intensificam (Nordborg *et al.*, 2018). Os efeitos teratogênicos da exposição aguda a altas concentrações de petróleo podem incluir descoloração, desidratação, redução do tamanho, deformação, perda da integridade tecidual e contrações musculares irregulares em cnidários (Echols *et al.*, 2015). Adicionalmente, são observadas larvas de tamanho reduzido ao final de 48 h de exposição, as quais são geradas através da fragmentação de larvas saudáveis que desenvolveram anormalidades (Nordborg *et al.*, 2021).

Estágios iniciais de vida têm a expressão de proteínas de atividade antioxidante aumentada pela co-exposição à radiação UV e HPAs por 96 h (Tarrant *et al.*, 2014). O contato agudo com HPAs também demonstra efeitos na transcrição e expressão de genes com atividade antioxidante e envolvidos na homeostase de proteínas por larvas de corais, além de superexpressão de proteínas de choque térmico e aumento da atividade da SOD em resposta a níveis elevados de ROS (Overmans *et al.*, 2018), responsáveis pela adaptação às tensões ambientais. Além disso, em embriões ocorrem alterações na expressão de genes relacionados às respostas ao estresse, fosforilação oxidativa e vias de desintoxicação, assim, a cadeia respiratória oxidativa pode ser inibida, alterando o conteúdo de enzimas e diminuindo a quantidade de ATP, induzindo distúrbio de funções biológicas (Xiao *et al.*, 2018).

A radiação solar potencializa os efeitos tóxicos do óleo cru em 10% para cnidários, fator observado no crescimento do animal, absorção de frações tóxicas por simbiontes (Nordborg *et al.*, 2022), sobrevivência e metamorfose larval (Overmans *et al.*, 2018; Negri *et al.*, 2016), uma vez que, a exposição aos raios solares pode aumentar a reatividade de HPAs (Tarrant *et al.*, 2014) e induzir a formação de ROS e danos às membranas e ao DNA (Renegar *et al.*, 2016). No entanto, os padrões de expressão e resposta variam com a intensidade e duração da exposição (Tarrant *et al.*, 2014) e os danos por estressores combinados são muito maiores do que os impactos separadamente (Berger *et al.*, 2022).

Logo, na presente revisão bibliográfica foi possível observar que o número de estudos sobre os efeitos tóxicos agudos do óleo cru em Cnidaria ainda é limitado. Nos últimos dez anos, nota-se relativa carência de publicações de artigos, especialmente por países que apresentam longa extensão costeira, com exceção dos EUA. Assim, muitos desses países publicaram poucos ou nenhum registro sobre o tema, ainda levando em consideração a ocorrência de grandes derramamentos de óleo, como é o caso do Brasil, que sofreu as consequências de um derramamento no ano de 2019.

A maior parte dos estudos avaliou os efeitos do petróleo nos maiores grupos de cnidários e em corais adultos, dado que são animais formadores de recifes e que estão mais sujeitos aos impactos antrópicos, tornando necessário voltar esforços para outros grupos e estágios de vida, a fim de identificar diferentes respostas que geram alterações distintas nas funções dos organismos no ambiente. Os procedimentos metodológicos aplicados foram bastante variados, evidenciando a necessidade de maior padronização desses procedimentos, a fim de possibilitar a comparação entre as respostas e resultados obtidos. Em relação às abordagens dos estudos, é essencial o preenchimento de lacunas a respeito das relações entre os dados de bioacumulação e de efeitos morfológicos, comportamentais, fisiológicos e

genéticos, a fim de confirmar com assertividade que os efeitos ocorrem em resposta direta à contaminação aguda pelo petróleo.

## 4 CONCLUSÃO

Derramamentos de óleo em ecossistemas recifais são particularmente nocivos aos organismos que vivem em associação aos recifes, incluindo cnidários, colocando esses ambientes em maior risco. Diante do exposto, conclui-se que existem áreas de pesquisa sobre os efeitos tóxicos agudos do óleo cru em Cnidaria que já foram relativamente bem investigadas, como, por exemplo, letalidade, saúde e morfologia. Entretanto, existem tópicos que necessitam de mais análises, a exemplo de efeitos fisiológicos, genéticos e efeitos aliados a estressores que potencializam a toxicidade do óleo, tal como estresse térmico. Além disso, nota-se a necessidade de padronizar as metodologias utilizadas em ensaios experimentais, a fim de garantir a reprodutibilidade do método e, principalmente, a comparabilidade entre os resultados obtidos, para, posteriormente, serem aplicadas políticas eficientes.

Assim, torna-se possível alcançar uma maior compreensão dos fatores que interagem sinergicamente em um ambiente natural, analisando diferentes grupos e estágios de vida de Cnidaria, visto que alguns deles são negligenciados, necessitando de maior atenção de pesquisa para entender como táxons diferentes respondem a esse contaminante. Portanto, experimentações e estudos adicionais utilizando diferentes hidrocarbonetos, espécies, abordagens e análises correlacionadas podem vir a garantir uma maior contribuição para a formação de uma imagem mais completa dos danos induzidos pela exposição aguda ao óleo cru em Cnidaria. Logo, ao ampliar o conhecimento e as informações sobre o assunto, é possível traçar estratégias de mitigação de danos em derramamentos de óleo e angariar esforços de conservação de ecossistemas complexos como os recifes.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Esta pesquisa teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), código 001 e apoio estrutural do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGBio - UFRPE). Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco - FACEPE (APQ 0685-2.05/19).

## **5 REFERÊNCIAS**

Adams, J., Charbonneau, K., Tuori, D., Brown, R.S. and Hodson, P.V. 2017. Review of methods for measuring the toxicity to aquatic organisms of the water accommodated fraction (WAF) and chemically-enhanced water accommodated fraction (CEWAF) of petroleum. Research Document 2017/064. Department of Fisheries and Oceans, Ottawa, Ontario, Canada. Available from: <a href="http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/Publications/ResDocs-Doc">http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/Publications/ResDocs-Doc</a> Rech/2017/2017\_064-eng.html>.

Almeda, R., Wambaugh, Z., Wang, Z., Hyatt C., Liu, Z., and Buskey E.J. 2013. Interactions between zooplankton and crude oil: toxic effects and bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons. PloS one, **8**: e67212. doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067212.

Ashok, A., Høj, L., Brinkman, D.L., Negri, A.P., and Agusti, S. 2022. Food-chain length

determines the level of phenanthrene bioaccumulation in corals. Environmental Pollution,

**297**: 118789. doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118789.

Aurand, D., and Coelho, G. 2005. Cooperative aquatic toxicity testing of dispersed oil and the chemical response to oil spills: Ecological Effects Research Forum (CROSERF), **125**. *Inc. Lusby, MD. Tech. Report*, 07-03.

Ballou, T. G., Hess, S. C., Dodge, R. E., Knap, A. H., and Sleeter, T. D. 1989. Effects of untreated and chemically dispersed oil on tropical marine communities: a long-term field

experiment. In International Oil Spill Conference, American Petroleum Institute, 1989 (1): 447-454. doi: https://doi.org/10.7901/2169-3358-1989-1-447.

Berger, C.A., Ward, C.P., Karchner, S.I., Nelson, R.K., Reddy, C.M., Hahn, M.E., et al. 2022. *Nematostella vectensis* exhibits an enhanced molecular stress response upon co-exposure to highly weathered oil and surface UV radiation. Marine Environmental Research, **175**: 105569. doi: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105569.

Blackburn, M., Mazzacano, C.A., Fallon, C., and Black, S.H. 2014. A review of the impacts of oil spills on marine invertebrates. The Xerces Society for Invertebrate Conservation, Portland, OR, **152**.

Brinkman, D.L., Flores, F., Luter, H.M., Nordborg, F.M., Brooks, M., Parkerton, et al. 2023. Sensitivity of the Indo-Pacific coral *Acropora millepora* to aromatic hydrocarbons.

Environmental Pollution, 121963. doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121963.

Bytingsvik, J., Parkerton, T.F., Guyomarch, J., Tassara, L., LeFloch, S., Arnold, W.R., et al. 2020. The sensitivity of the deepsea species northern shrimp (*Pandalus borealis*) and the cold-water coral (*Lophelia pertusa*) to oil-associated aromatic compounds, dispersant, and Alaskan North Slope crude oil. Marine Pollution Bulletin, **156**: 111202. doi:

https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111202.

Chinedu, E., and Chukwuemeka, C. K. 2018. Oil spillage and heavy metals toxicity risk in the Niger Delta, Nigeria. Journal of Health and Pollution, **8**(19), 180905. doi: https://doi.org/10.5696/2156-9614-8.19.180905.

Coher V. Nissenhour A. and Eisler D. 1077. Effects of Iron

Cohen, Y., Nissenbaum, A., and Eisler, R. 1977. Effects of Iranian crude oil on the Red Sea octocoral *Heteroxenia fuscescens*. Environmental Pollution (1970), **12**(3), 173-186. doi: https://doi.org/10.1016/0013-9327(77)90051-9.

DeLeo, D.M., Ruiz-Ramos, D.V., Baums, I.B., and Cordes, E.E. 2016. Response of deep-water corals to oil and chemical dispersant exposure. Deep Sea Research Part II:

Topical Studies in Oceanography, 129: 137-147. doi:

https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.02.028.

DeLeo, D.M., Glazier, A., Herrera, S., Barkman, A., and Cordes, E.E. 2021. Transcriptomic responses of deep-sea corals experimentally exposed to crude oil and dispersant. Frontiers in Marine Science, **8**: 649909. doi: https://doi.org/10.3389/fmars.2021.649909.

Disner, G.R., and Torres, M. 2020. The environmental impacts of 2019 oil spill on the Brazilian coast: Overview. Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade. doi: 10.21438/rbgas(2020)071518.

Echols, B.S., Smith, A.J., Gardinali, P.R., and Rand, G.M. 2016. The use of ephyrae of a scyphozoan jellyfish, Aurelia aurita, in the aquatic toxicological assessment of Macondo oils from the Deepwater Horizon incident. Chemosphere, **144**: 1893-1900. doi:

https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.082.

Frometa, J., DeLorenzo, M.E., Pisarski, E.C., and Etnoyer, P. J. 2017. Toxicity of oil and dispersant on the deep water gorgonian octocoral *Swiftia exserta*, with implications for the effects of the Deepwater Horizon oil spill. Marine pollution bulletin, **122**(1-2): 91-99.. doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.009.

Goodbody-Gringley, G., Wetzel, D.L., Gillon, D., Pulster, E., Miller, A., and Ritchie, K.B. 2013. Toxicity of Deepwater Horizon source oil and the chemical dispersant, Corexit® 9500, to coral larvae. PloS one, **8**(1), e45574. doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045574. Guzman, H.M., Kaiser, S., and Weil, E. 2020. Assessing the long-term effects of a catastrophic oil spill on subtidal coral reef communities off the Caribbean coast of Panama (1985–2017). Marine Biodiversity, **50**: 1-19. doi: https://doi.org/10.1007/s12526-020-01057-9

Haapkylä, J., Ramade, F., and Salvat, B. 2007. Oil pollution on coral reefs: a review of the state of knowledge and management needs. Vie et Milieu/Life & Environment, **91-107**. HAL id: hal-03234945.

Hodson, P. V., Adams, J., and Brown, R. S. 2019. Oil toxicity test methods must be improved. Environmental toxicology and chemistry, **38**(2): 302-311. doi: https://doi.org/10.1002/ etc.4303.

Honda, M., and Suzuki, N. 2020. Toxicities of polycyclic aromatic hydrocarbons for aquatic animals. International Journal of Environmental Research and Public Health, **17**(4), 1363. doi: https://doi.org/10.3390/ijerph17041363.

Hulver, A.M., Steckbauer, A., Ellis, J.I., Aylagas, E., Roth, F., Kharbatia, N., et al. 2022.
Interaction effects of crude oil and nutrient exposure on settlement of coral reef benthos.
Marine Pollution Bulletin, 185: 114352. doi:https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114352.
Keesing, J.K., Gartner, A., Westera, M., Edgar, G.J., Myers, J., Hardman-Mountford, N.J., et al. 2018. Impacts and environmental risks of oil spills on marine invertebrates, algae and seagrass: A global review from an Australian perspective. Oceanography and Marine Biology. ISBN: 9780429454455, 9781138318625.

Lee, K., Nedwed, T., Prince, R. C., and Palandro, D. 2013. Lab tests on the biodegradation of chemically dispersed oil should consider the rapid dilution that occurs at sea. Marine pollution bulletin, **73**(1): 314-318. doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.06.005. Letnes, P.A., Hansen, I.M., Aas, L.M.S., Eide, I., Pettersen, R., Tassara, L., et al. 2019. Underwater hyperspectral classification of deep sea corals exposed to 2-methylnaphthalene. PloS one, **14**(2): e0209960. doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209960. Liu, Y., and Kujawinski, E.B. 2015. Chemical composition and potential environmental impacts of water-soluble polar crude oil components inferred from ESI FT-ICR MS. PloS one, **10**(9): e0136376. doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136376.

Liu, Z., An, M., Geng, X., Wu, Z., Cai, W., Tang, J., et al. 2023. The scleractinian coral *Pocillopora damicornis* relies on neuroendocrine regulation to cope with polycyclic aromatic hydrocarbons under heat stress. Environmental Pollution, **316**: 120565. doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120565.

Mather, J. 2013. Marine invertebrates: communities at risk. Biology, **2**(2): 832-840. doi: https://doi.org/10.3390/biology2020832.

May, L.A., Burnett, A.R., Miller, C.V., Pisarski, E., Webster, L.F., Moffitt, Z.J., et al. 2020. Effect of Louisiana sweet crude oil on a Pacific coral, *Pocillopora damicornis*. Aquatic Toxicology, **222**: 105454. doi: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105454.

Miranda, R.J., Pinto, T.K., Lopes, R.V., Santos, J.W., Sampaio, C.L., Santos, R.G., et al. 2022. Oil spill disaster in Southwest Atlantic Coast: an Evaluation of Short-term effects on coral reef benthic assemblages. Anais da Academia Brasileira de Ciências, **94**: e20210401. doi: https://doi.org/10.1590/0001-3765202220210401.

Negri, A.P., Brinkman, D.L., Flores, F., Botté, E.S., Jones, R.J., and Webster, N.S. 2016.
Acute ecotoxicology of natural oil and gas condensate to coral reef larvae. Scientific reports,
6(1): 21153. doi: https://doi.org/10.1038/srep21153.

Negri, A.P., Brinkman, D.L., Flores, F., van Dam, J., Luter, H.M., Thomas, M.C., et al. 2021. Derivation of toxicity thresholds for gas condensate oils protective of tropical species using experimental and modelling approaches. Marine Pollution Bulletin, **172**: 112899. doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112899.

Nordborg, F.M., Flores, F., Brinkman, D.L., Agustí, S., and Negri, A. P. 2018. Phototoxic effects of two common marine fuels on the settlement success of the coral *Acropora tenuis*. Scientific Reports, **8**(1), 8635. doi: https://doi.org/10.1038/s41598-018-26972-7.

Nordborg, F.M., Brinkman, D.L., Ricardo, G.F., Agustí, S., and Negri, A.P. 2021.

Comparative sensitivity of the early life stages of a coral to heavy fuel oil and UV radiation.

Science of the Total Environment, 781: 146676. doi:

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146676.

Nordborg, F.M., Brinkman, D.L., and Negri, A.P. 2022. Coral recruits are highly sensitive to heavy fuel oil exposure both in the presence and absence of UV light. Environmental Pollution, **309**: 119799. doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119799.

Overmans, S., Nordborg, M., Díaz-Rúa, R., Brinkman, D.L., Negri, A.P., and Agustí, S.

2018. Phototoxic effects of PAH and UVA exposure on molecular responses and

developmental success in coral larvae. Aquatic toxicology, 198: 165-174. doi:

https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.03.008.

Pena, P.G.L., Northcross, A.L., Lima, M.A.G.D., and Rêgo, R.D.C.F. 2020. The crude oil spill on the Brazilian coast in 2019: the question of public health emergency. Cadernos de Saúde Pública, **36**: e00231019. doi: https://doi.org/10.1590/0102-311X00231019.

Redman, A. D., and Parkerton, T. F. 2015. Guidance for improving comparability and relevance of oil toxicity tests. Marine Pollution Bulletin, **98**(1-2): 156-170. doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.06.053.

Renegar, D.A., and Turner, N.R. 2021. Species sensitivity assessment of five Atlantic scleractinian coral species to 1-methylnaphthalene. Scientific reports, **11**(1): 529. doi: https://doi.org/10.1038/s41598-020-80055-0.

Renegar, D. A., Turner, N. R., Riegl, B. M., Dodge, R. E., Knap, A. H., & Schuler, P. A.

(2017). Acute and subacute toxicity of the polycyclic aromatic hydrocarbon

1-methylnaphthalene to the shallow-water coral *Porites divaricata*: Application of a novel exposure protocol. Environmental toxicology and chemistry, **36**(1): 212-219. doi:

https://doi.org/10.1002/etc.3530.

Sardar, K., Ali, S., Hameed, S., Afzal, S., Fatima, S., Shakoor, M.B., et al. 2013. Heavy metals contamination and what are the impacts on living organisms. Greener Journal of Environmental management and public safety, **2**(4): 172-179.

Silva, M., Etnoyer, P.J., and MacDonald, I.R. 2016. Coral injuries observed at mesophotic reefs after the Deepwater Horizon oil discharge. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, **129:** 96-107. doi: https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.05.013.

Singer, M.M., Aurand, D., Bragin, G.E., Clark, J.R., Coelho, G.M., Sowby, M.L., and

Tjeerdema, R.S. 2000. Standardization of the preparation and quantitation of

water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. Marine Pollution Bulletin,

**40**(11): 1007-1016. doi: https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00045-X.

Spalding, M.D., and Brown, B.E. 2015. Warm-water coral reefs and climate change. Science, **350**(6262): 769-771. doi: 10.1126/science.aad0349.

Suchanek, T.H. 1993. Oil impacts on marine invertebrate populations and communities.

American Zoologist, **33**(6): 510-523. doi: https://doi.org/10.1093/icb/33.6.510.

Tarrant, A.M., Reitzel, A.M., Kwok, C.K., and Jenny, M.J. 2014. Activation of the cnidarian oxidative stress response by ultraviolet radiation, polycyclic aromatic hydrocarbons and crude oil. Journal of Experimental Biology, **217**(9): 1444-1453. doi:

https://doi.org/10.1242/jeb.093690.

Turner, N.R., Parkerton, T.F., and Renegar, D.A. 2021. Toxicity of two representative petroleum hydrocarbons, toluene and phenanthrene, to five Atlantic coral species. Marine Pollution Bulletin, **169**: 112560.doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112560.

Wade, T. L., Morales-McDevitt, M., Bera, G., Shi, D., Sweet, S., Wang, B., Knap, A. H., et al. 2017. A method for the production of large volumes of WAF and CEWAF for dosing mesocosms to understand marine oil snow formation. Heliyon, **3**(10). doi: 10.1016/j.heliyon. 2017.e00419

Weinnig, A.M., Gómez, C.E., Hallaj, A., and Cordes, E. E. 2020. Cold-water coral *(Lophelia pertusa)* response to multiple stressors: High temperature affects recovery from short-term pollution exposure. Scientific Reports, **10**(1): 1768. doi: <u>https://doi.org/10.1038/s41598-020-58556-9</u>.

Xiao, R., Zhou, H., Chen, C.M., Cheng, H., Li, H., Xie, J., et al. 2018. Transcriptional responses of *Acropora hyacinthus* embryo under the benzo (a) pyrene stress by deep sequencing. Chemosphere, **206**: 387-397. doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018. 04.149.

### **SEGUNDO MANUSCRITO**

Efeitos tóxicos da exposição in situ a HPAs e elementos em Palythoa variabilis (Duerden,

1898) (Cnidaria, Zoantharia) e sua relação com o derramamento de óleo de 2019 na

costa brasileira

Artigo a ser submetido na revista Marine Pollution Bulletin

(https://www.sciencedirect.com/journal/marine-pollution-bulletin/publish/guide-for-authors). Fator de impacto: 5,8.

#### RESUMO

O presente estudo objetivou analisar a relação entre a composição dos HPAs e elementos bioacumulados por Palythoa variabilis de duas praias de Pernambuco (Muro Alto, diretamente atingida pelo óleo; e Serrambi, indiretamente atingida) e da borra de óleo que atingiu a costa brasileira em 2019, avaliando a geração de estresse oxidativo e danos genéticos nos animais. Foram realizadas análises dos HPAs prioritários e elementos acumulados nos organismos e sedimentos; biomarcadores do estresse oxidativo; e quebras de fitas do DNA pelo ensaio cometa. Houve abundância de HPAs de baixo peso molecular em P. variabilis, assim, observa-se assinatura diferente do óleo, indicando concentração de outra fonte. Há uma fraca correlação entre os HPAs nos sedimentos e na borra de óleo, e a sua bioacumulação pelos organismos, mas, há uma alta correlação entre os HPAs presentes nos sedimentos de ambas as praias, os quais também apresentam correlação significativa com os HPAs presentes na borra de óleo. Além disso, a maior parte dos elementos e danos biológicos associados aos organismos ocorreu nos animais coletados em Muro Alto, já em relação aos sedimentos, a maioria dos contaminantes e os níveis de MDA estão associados aos sedimentos coletados em Serrambi. Os elementos Ba, Cd, Cu, Pb, As e V bioacumulados são correlacionados aos danos oxidativos e genéticos. Nos sedimentos, Al, Cu, Ni e Co correlacionam-se com os danos oxidativos. Os principais HPAs responsáveis por induzir os danos biológicos foram o fluoreno bioacumulado e o fenantreno presente nos sedimentos. Embora a bioacumulação de HPAs nos organismos não tenha mostrado forte correlação com os sedimentos e a borra de óleo, a presença de HPAs nos sedimentos indica uma fonte constante de poluição e risco para organismos marinhos. Os danos biológicos observados enfatizam a necessidade urgente de medidas de mitigação de danos gerados como resultado de derramamentos de óleo.

Palavras-chave: Brasil. Ensaio cometa. Estresse oxidativo. Metais. Zoantídeo.

#### ABSTRACT

This study aimed to analyze the relationship between the composition of PAHs and elements bioaccumulated by Palythoa variabilis from two beaches in Pernambuco (Muro Alto, directly affected by the oil spill; and Serrambi, indirectly affected) and the oil sludge that reached the Brazilian coast in 2019, evaluating the generation of oxidative stress and genetic damage in the animals. Analyses of priority PAHs and elements accumulated in organisms and sediments, biomarkers of oxidative stress, and DNA strand breaks by the comet assay were performed. There was an abundance of low molecular weight PAHs in *P. variabilis*, thus, a different oil signature is observed, indicating concentration from another source. There is a weak correlation between PAHs in sediments and in oil sludge, and their bioaccumulation by organisms, but there is a strong correlation between PAHs in sediments from both beaches, which also show a significant correlation with PAHs present in the oil sludge. Additionally, most of the elements and biological damage associated with organisms occurred in animals collected at Muro Alto, while regarding sediments, most contaminants and MDA levels are associated with sediments collected at Serrambi. The elements Ba, Cd, Cu, Pb, As, and V bioaccumulated are correlated with oxidative and genetic damage. In sediments, Al, Cu, Ni, and Co correlate with oxidative damage. The main PAHs responsible for inducing biological damage were bioaccumulated fluorene and phenanthrene present in sediments. Although the bioaccumulation of PAHs in organisms did not show a strong correlation with the sediments and oil sludge, the presence of PAHs in the sediments indicates a constant source of pollution and risk to marine organisms. The observed biological damage emphasizes the urgent need for mitigation measures to address the harm caused by oil spills.

Keywords: Brazil. Comet assay. Oxidative stress. Metals. Zoanthid.

## 1 INTRODUÇÃO

Um derramamento de óleo foi identificado na costa brasileira em agosto de 2019 e atingiu estados do Nordeste e Sudeste (IBAMA, 2019). Toneladas de óleo cru se espalharam, atingindo mais de 1.000 localidades em 11 estados e quase 3.200 Km do litoral (ARAÚJO *et al.*, 2020; MB, 2020; PENA *et al.*, 2020). Esse óleo exibiu frações de densidade próxima da água do mar, podendo afundar e misturar-se com areia e outros materiais (DISNER e TORRES, 2020), produzindo manchas de altas viscosidade e densidade e baixas concentrações de compostos voláteis, além de ter sido submetido a processos de degradação e intemperismo, ou seja, passou por processos químicos, físicos e biológicos (CARLS e MEADOR, 2009).

Inédito por sua quantidade, duração e extensão geográfica, foi considerado o maior e mais grave incidente com petróleo da história do Brasil (MIRANDA *et al.*, 2022), desencadeando uma crise ambiental (PENA *et al.*, 2020) e inestimáveis prejuízos à biodiversidade marinha, com efeitos sobre habitats e comunidades locais (DISNER e TORRES, 2020), além de prejuízos socioeconômicos e à saúde da população (CERQUEIRA *et al.*, 2020). Com o derramamento, seres vivos e serviços ecossistêmicos essenciais, como a pesca, são ameaçados (MMA, 2010), fator que desperta preocupação com a proteção das comunidades costeiras frente a derramamentos (BLACKBURN *et al.*, 2014).

Posteriormente, durante os anos de 2020 e 2021, a mancha de óleo reapareceu de forma intermitente após intensos eventos oceanográficos, como períodos de ventos fortes, ondas altas e grandes amplitudes de maré (REDDY *et al.*, 2022). O óleo coletado neste período apresentava características como aspecto betuminoso, alta viscosidade e densidade superior à da água do mar, sugerindo que sofreu processos de intemperismo e alteração de sua composição original (LOURENÇO *et al.*, 2020).

Posteriormente ao derramamento, toneladas de óleo foram retiradas de praias, manguezais e recifes de coral afetados (BRUM *et al.*, 2020). Estes últimos vêm sofrendo múltiplos impactos em todo o mundo (SPALDING e BROWN, 2015), incluindo exposição ao óleo, por serem encontrados comumente em áreas de grande risco (NEGRI *et al.*, 2016). Os impactos subletais do efeito toxicológico do óleo em organismos recifais podem ser agrupados em efeitos fisiológicos e efeitos genéticos (CERQUEIRA *et al.*, 2020), sendo induzidas mudanças na fisiologia celular, alterações nas proporções de proteínas e lipídios decorrentes da interação com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (BENSON e MUSCATINE, 1974). Esses contaminantes induzem a produção de espécies reativas de
oxigênio (ROS) (TARRANT *et al.*, 2014), que podem danificar o DNA, lipídios, proteínas e a atividade enzimática (LESSER, 2006). Quando ROS se acumulam, há sobrecarga da capacidade defensiva da célula, gerando estresse oxidativo (TARRANT *et al.*, 2014). Impactos genéticos incluem quebras de fitas de DNA que se correlacionam com danos oxidativos, os quais prejudicam reparos do DNA (JHA, 2008).

Nos recifes brasileiros rasos, os zoantídeos (Cnidaria, Anthozoa, Zoantharia) apresentam cobertura superior a de corais, sendo o grupo animal que predomina em recifes até sete metros de profundidade, podendo ocupar até 50% da superfície de um recife (ACOSTA e GONZALEZ, 2007; AUED *et al.*, 2018). São animais majoritariamente coloniais, com importante papel na dinâmica de ecossistemas recifais, tanto pelas transferências de matéria e energia (SANTANA *et al.*, 2015), quanto por interações competitivas (RABELO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015). Eles têm elevada capacidade de adaptação e resiliência a estressores, fatores que lhes conferem relevância científica para a avaliação dos efeitos de estressores antropogênicos (ROCHA *et al.*, 2020).

De maneira específica, zoantídeos pertencentes ao gênero *Palythoa* incorporam sedimentos na parede do corpo para sustentação (SUCHANEK e GREEN, 1981), no entanto, os sedimentos funcionam como reservatórios para metais pesados e outros contaminantes. Assim, ao incorporar sedimentos, os zoantídeos podem acumular poluentes associados e absorver frações tóxicas do óleo. Da mesma forma que os corais e outros cnidários, zoantídeos são sensíveis aos impactos mediados pelo petróleo e demonstram crescimento relativamente rápido por não apresentarem esqueleto carbonático, minimizando impactos das coletas para estudos (COSTA, 2007; SHIGENAKA, 2010).

A fim de avaliar alterações resultantes do estresse oxidativo mediado por HPAs, as análises de proteínas carboniladas e peroxidação lipídica (através da substância reativa ao ácido tiobarbitúrico - TBARS) têm sido utilizadas como biomarcadores (ALMROTH *et al.* 2005; BHAGAT *et al.*, 2017; FROUIN *et al.*, 2007; GRINTZALIS *et al.*, 2012), dado que apresentam vantagens pelas altas formação e estabilidade (KALOYIANNI *et al.*, 2009). Para avaliar a genotoxicidade, o ensaio cometa alcalino, ou eletroforese em gel de célula única, é amplamente utilizado em análises de quebras de fita de DNA resultantes da interação com poluentes em ecossistemas marinhos (AKCHA *et al.*, 2003), por ser uma técnica rápida e de alta sensibilidade (LEE *et al.*, 2011; WOO *et al.*, 2006).

As respostas dos organismos à exposição ao óleo dependem do tipo do óleo, forma e tempo de exposição e variam de acordo com a espécie atingida (LOYA e RINKEVICH, 1980). Muitos estudos *in situ* e ensaios experimentais têm avaliado respostas de

espécies-chave de corais em ecossistemas atingidos ou que possam ser potencialmente impactados pelo petróleo, no entanto, não há, até o presente, estudos que avaliem a resposta de zoantídeos, grupo fundamental na manutenção da dinâmica dos recifes costeiros do Brasil.

O presente estudo objetivou determinar e comparar a composição dos 16 HPAs prioritários e elementos dos sedimentos e bioacumulados pelo zoantídeo *Palythoa variabilis* (Duerden, 1898) de duas praias de Pernambuco (Muro Alto e Serrambi), e da borra de óleo que atingiu a costa brasileira em 2019, e avaliar a geração de estresse oxidativo e danos genéticos nos animais após seis meses, um ano e um ano e meio do derramamento de óleo.

# 2 MATERIAIS E MÉTODOS

# 2.1 Área de estudo

Durante o derramamento de óleo no ano de 2019, uma amostra da borra de óleo foi coletada na Praia do Francês, no estado de Alagoas e amostras de sedimentos e de indivíduos de *Palythoa variabilis* foram coletadas em duas áreas recifais: Serrambi (SER) e Muro Alto (MUR), localizadas no município de Ipojuca, no estado de Pernambuco. A praia de Muro Alto (8°25'30"S 34°58'36"W) encontra-se a cerca de 54 km ao sul da cidade do Recife, capital do estado. A praia de Serrambi (8°33'21"S e 35°00'21"W) dista 70 km ao sul de Recife (Figura 1). Essas praias possuem ambientes recifais fundamentais para a economia local através do turismo e do uso dos seus serviços ecossistêmicos (MARTINS, 2020).



Figura 1. Localização das áreas de estudo, Muro Alto e Serrambi, Ipojuca - PE.

Fonte: Google Earth (2023).

Essas praias foram selecionadas devido ao fato de Muro Alto ser uma região em que foi observado impacto direto do derramamento de óleo, com registro de acúmulo sobre os recifes e no sedimento adjacente. Já os recifes de Serrambi não foram diretamente atingidos pelo óleo, permitindo uma análise comparativa das duas localidades. As coletas foram realizadas seis meses (campanha I - 10 e 12 de fevereiro de 2020), um ano (campanha II - 16 e 17 de setembro de 2020), e um ano e meio (campanha III - 26 de fevereiro/01 de março de 2021) após o desastre.

Em cada campanha foi coletada uma amostra de sedimento e amostras de 25 pólipos de *Palythoa variabilis*, pertencentes a cinco fragmentos de colônias diferentes em cada praia, com o auxílio de pás, espátulas e pinças de metal. Os pólipos e sedimentos foram acondicionados em frascos de vidro com água do mar e transportados em caixas térmicas ao laboratório (cerca de 1,5 h de deslocamento), onde foram pesados e encaminhados para análise. Para as análises de bioacumulação de HPAs e metais pesados, uma amostra de sedimento e *pools* de organismos foram congelados a -80°C em recipientes de vidro e enviados por transporte aéreo aos Laboratório de Geoquímica Orgânica da UFF e ao Centro de Biociências e Biotecnologia da UENF, em caixas térmicas refrigeradas. Amostras de *pool* de organismos foram congeladas a -20°C até o processamento para as análises dos biomarcadores do estresse oxidativo e as amostras de 31 pólipos (de quatro a seis pólipos por campanha) para o ensaio cometa foram processadas vivas, logo após a chegada do campo no Centro Acadêmico de Vitória, UFPE.

#### 2.2 Análises dos HPAs

Para as análises dos HPAs, as amostras coletadas foram liofilizadas e peneiradas em malha de 2 mm, descartando a fração retida e homogeneizando manualmente a fração coletada. Em torno de 8 g de sedimento, 1 g de amostras de organismos (por campanha) e 0.5 g de óleo foram imersos em diclorometano (DCM) e extraídos por 15 min em cuba ultrassônica e centrifugados a 2000 rpm por 5 min. Esse processo foi repetido por três ciclos e o sobrenadante foi concentrado em evaporador rotativo. Ao extrato foram adicionados 40 mL de DCM ao qual foi adicionado cobre ativado para remover o enxofre elementar. Em seguida, o extrato foi seco em fluxo de nitrogênio, reeluído em 2 mL de n-hexano e enviado para a etapa de fracionamento em cromatografia líquida em coluna aberta com sílica ativada como fase estacionária adaptada em pipeta Pasteur. Padrões substitutos de n-tetracosano-d50 e p-terfenil-d14 foram adicionados ao extrato antes do fracionamento (adição de 50 µl de

solução a 50  $\mu$ g/mL). A fração de compostos aromáticos foi eluída com 3 mL de n-hexano/DCM 1:1%v/v. Os extratos secos da fração aromática foram eluídos com 100  $\mu$ l de uma solução padrão interna dos HPAs deuterados naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10 e criseno-d10 a 500 ng/mL.

As análises foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (*Agilent* 7890A/5973C). A quantia de 2  $\mu$ l foi injetada sem divisão a uma temperatura de 310°C. A coluna capilar utilizada foi a HP5-MS (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25  $\mu$ m de espessura do filme) com Hélio sendo o gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1.3 mL/min. A programação da temperatura no forno começou em 80°C, mantidos por 4 min, seguida de um aumento de 20°C/min até 200°C, mantidos por 2 min, então um aumento de 5°C/min até 280°C mantidos por 6.5 min, e finalmente, um aumento de 5°C/min até 290°C, permanecendo nessa temperatura por 10 min. A temperatura da interface foi de 310°C.

Foram analisadas as composições dos 16 HPAs prioritários de acordo com a USEPA (*United States Environmental Protection Agency*), que os listou como poluentes prioritários de controle (XIANG *et al.*, 2017). A aquisição de dados pelo espectrômetro de massa foi realizada por monitoramento seletivo de íons (SIM) para os íons característicos dos 16 HPAs prioritários: naftaleno (m/z = 128), acenaftileno (m/z = 152), acenafteno (m/z = 152), fenantreno (m/z = 178), antraceno (m/z = 178), fluoranteno (m/z = 202), pireno (m/z = 202), benzo {a}antraceno (m/z = 228), criseno (m/z = 228), benzo[k]fluoranteno (m/z = 252), benzo[b]fluoranteno (m/z = 252), benzo[a]pireno (m/z = 252), perileno-d12 (m/z = 264), indeno[1.2.3.c.d]pireno (m/z = 276), dibenzo(a.b) antraceno (m/z = 136), acenafteno (m/z = 153), acenafteno-d10 (m/z = 162), fenantreno-d10 (m/z = 188), criseno-d12 (m/z = 240).

#### 2.3 Determinação das concentrações dos elementos traço

Sedimentos e indivíduos de *Palythoa variabilis* foram homogeneizados e liofilizados, a fim de determinar os elementos: Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Ti, V e Zn, utilizando ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer*; ICP-OES 720 ES, *Varian Liberty Series* II, EUA). Cada amostra (0.3 g) foi solubilizada em 10 mL de 65% HNO<sub>3</sub> e aquecida em bloco digestor. As amostras foram ressuspendidas em 5 mL de 0.5% HNO<sub>3</sub> a 60°C e filtradas, sendo obtido um volume final de 15 mL com 0.5% HNO<sub>3</sub>. Uma solução de controle analítico (brancos analíticos) foi preparada para verificar possíveis contaminações. Para testar a precisão e exatidão, um material de referência (DORM-4 proteína de peixe, *National Research Council of Canada*) foi analisado ao longo das amostras. Os coeficientes de variação entre as réplicas analíticas foram avaliadas em <15% e as concentrações dos elementos foram determinadas em μg/g de massa seca.

### 2.4 Análises de estresse oxidativo

A determinação de peroxidação lipídica seguiu a metodologia de Buege e Aust (1978), pelo ensaio de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em que o malondialdeído (MDA), formado a partir da quebra de ácidos graxos poliinsaturados, serve como índice para determinar a extensão da reação de peroxidação. Assim, o MDA é um produto da peroxidação lipídica que reage com o ácido tiobarbitúrico para criar espécies absorvidas a 535 nm (NIEHAUS e SAMUELSSON, 1968). Neste método, 1 ml de amostra biológica foi acrescentado a 2 ml de TCA-TBA-HCl (ácido tricloroacético a 15% w/v; 0,375% w/v de ácido tiobarbitúrico; ácido clorídrico a 0,25 N). A solução foi aquecida por 15 min em banho-maria fervente e, após o resfriamento, o precipitado foi removido por centrifugação durante 10 min. A absorção da amostra foi determinada a 535 nm contra um branco que contém todos os reagentes menos o lipídio. A concentração de malondialdeído das amostras foi determinada em mmol/mg de proteína.

A geração de danos oxidativos às proteínas foi determinada pela quantificação do conteúdo de proteínas carboniladas, através da metodologia de Zanatta *et al.* (2013), em que as amostras foram dissecadas, pesadas e homogeneizadas em 10 w/v de tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 140 mM de KCl. Os homogeneizados foram centrifugados por 10 min a 4°C para descartar núcleos e detritos celulares. O sobrenadante, uma suspensão de organelas, foi separado e pré-incubado a 37°C por 1 h com os metabólitos 3MCG (3-metilglutaril-coenzima A) ou 3MCA (3-metilcrotonil-coenzima A), intermediários no metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada, os controles não continham esses metabólitos (3MCG e 3MCA) no meio de incubação. Após a pré-incubação, foram retiradas as alíquotas para medir a formação de carbonila espectrofotometricamente determinada a 365 nm. Os resultados foram calculados como nmol de grupos carbonila/mg de proteína.

As concentrações de tióis totais foram obtidas utilizando-se a metodologia de Ellman (1959), em que o bis(p-nitrofenil)dissulfeto reage com compostos de tiol alifáticos em pH 8,0 para produzir 1 mol de ânion p-nitrotiofenol por mol de tiol. Como este ânion é altamente colorido, é usado para medir as concentrações de tiol. Bis(3-carboxi-4-nitrofenil)dissulfeto foi preparado e o tecido dos animais foi extraído por trituração e foram adicionados a solventes apropriados. A suspensão foi filtrada e o filtrado foi tratado com reagente dissulfeto

após ajuste do pH para 8,0. A mistura foi filtrada, a diferença na absorbância foi determinada e a concentração de tióis totais foi fornecida em mmol/mg de proteína.

#### 2.5 Análises de genotoxicidade - Ensaio cometa alcalino

As análises genotóxicas foram realizadas através da técnica da eletroforese celular em microgel, ou ensaio cometa, de acordo com o protocolo de Tice *et al.* (2000) adaptado, em que é obtida uma suspensão de células e são preparadas lâminas com células em agarose, as células são lisadas para liberar DNA e expostas a álcalis (pH > 13) para obter DNA de fita simples, subsequentemente é realizada a eletroforese sob condições alcalinas (pH > 13), a neutralização do álcali, a coloração de DNA e a visualização e pontuação dos cometas.

Foram utilizadas lâminas para microscopia onde as células de *P. variabilis* (n = 31) foram homogeneizadas com 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LM, 0,5%), previamente aquecida à 37°C em banho maria. Em seguida, 100 µL dessa mistura foram depositados em lâminas cobertas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Após a deposição do material, as lâminas foram cobertas por lamínulas e refrigeradas a 4 °C por 10 min para a solidificação do gel de agarose. Após o resfriamento, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em cubas contendo solução de lise (2.5 M cloreto de sódio [NaCl], 100 mM ácido etilenodiamino tetra-acético [EDTA], 10 mM tris(hidroximetil)aminometano [Tris], 1% Triton X-100, 10% dimetilsulfóxido [DMSO], pH 10, 4°C) por sete dias. Após o tempo de lise, as lâminas foram posicionadas horizontalmente em uma cuba de eletroforese contendo tampão alcalino (1 M NaOH e 200 mM EDTA, pH 13, 4°C), onde permaneceram em repouso por 20 min e, posteriormente, submetidas à eletroforese por 20 min (300 mA/ 32V). As lâminas tiveram o seu pH neutralizado em tampão Tris-HCl (0,4 M Tris - ácido clorídrico [HCl], pH 7,5) durante 15 min e foram fixadas em álcool absoluto por 5 min. Estas etapas foram realizadas sob iluminação de luz vermelha, a fim de evitar danos genéticos induzidos pela luz. Para a avaliação do dano genético, as lâminas foram coradas com 100 µL do corante laranja de acridina e analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com objetiva de 40x, utilizando o filtro AlexaFluor 488.

Foram analisados 100 nucleoides por amostra, levando em consideração a relação entre a quantidade de DNA presente na cauda do cometa e a quantidade de DNA presente no nucleoide. Assim, cada nucleoide foi classificado em uma das seguintes categorias: 0 (sem dano, sem qualquer migração de DNA); 1 (pouco dano aparente, poucos fragmentos de DNA formando uma pequena cauda); 2 (dano médio, formação de uma cauda de tamanho significativo); 3 (dano intenso, formação de uma cauda muito prolongada) e 4 (dano máximo,

pouco DNA presente no nucleoide e cauda muito extensa) (COLLINS *et al.*, 2008). A partir dos resultados de avaliação de cada nucleoide foi calculado o índice de dano (ID), em que os valores podem variar de 0 a 400, a depender do dano genético em cada nucleoide, utilizando a seguinte equação:  $ID = \sum (classe do nucleoide x número de nucleoides na classe).$ 

### 2.6 Análises dos dados

Inicialmente as concentrações dos 16 HPAs prioritários detectadas no sedimento e em *P. variabilis* foram analisadas de forma descritiva em cada campanha de coleta. Como não foi detectada variação linear na composição e nos valores em relação ao tempo decorrido desde o derramamento inicial (Campanhas I, II e III - 6, 12 e 18 meses após derramamento inicial), as análises comparativas com o óleo e a avaliação dos efeitos foram realizadas sem incluir o tempo/campanha como variável explicativa.

A correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a relação entre as concentrações de HPAs na borra de óleo, nos organismos e no sedimento nas duas praias, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk). A concentração de cada elemento foi apresentada através de *boxplot* considerando o local (Muro Alto e Serrambi) e a origem (sedimento e organismo), seguida de comparação da concentração total de elementos utilizando ANOVA de dois fatores com comparação par a par através do teste a posteriori de Tukey.

A regressão de componentes principais (PCR) foi utilizada para avaliar a relação de cada variável dependente (MDA, Carbonilas, Sulfidrilas e Índice de Dano) com os HPAs-totais no sedimento, HPAs-totais nos organismos e com os elementos. Devido ao elevado número de elementos e, para remover a multicolinearidade entre as variáveis, foi utilizada a análise de componentes principais (PCA) separadamente para os elementos no sedimento e para os encontrados nos organismos. Os principais eixos explicativos foram utilizados na PCR. Previamente foi utilizado o VIF (*Variance Inflation Factor*) e variáveis detectadas como redundantes foram eliminadas do modelo. Todas as análises foram realizadas no ambiente R (*R Core Team*, 2022) com nível de significância 5% (p < 0.05).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 3.1 Análises dos HPAs

A Tabela 1 apresenta as concentrações obtidas para os 16 HPAs prioritários na amostra da borra de óleo coletada na Praia do Francês (AL) e *Palythoa variabilis* e sedimentos coletados nas praias de Serrambi (SER) e Muro Alto (MUR) nas três campanhas amostrais. A análise dos 16 HPAs prioritários da amostra de borra de óleo demonstra assinatura com maiores concentrações de fenantreno, pireno, criseno e benzo[a]antraceno, além de baixas concentrações de naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fluoranteno e demais HPAs de alto peso molecular. A quantidade total de HPAs de 2 a 5 anéis aromáticos para a amostra foi de 45,80 µg/g peso seco. O fenantreno é um HPA de baixo peso molecular (triaromático), predominante na amostra de óleo (Tabela 1), sugerindo intemperismo, posto que o fenantreno domina o petróleo intemperizado após a perda do naftaleno volátil (JAFARABADI *et al.*, 2018). Portanto, processos de intemperismo abióticos, como evaporação e dissolução, foram responsáveis por remover parte do naftaleno da amostra (REDDY *et al.*, 2022).

Segundo Reddy *et al.* (2022), esse óleo se trata de uma mistura de pelo menos dois derivados de petróleo diferentes, prática comum para produzir produtos como o óleo combustível para uso em embarcações. Na ocasião do derramamento de óleo na costa brasileira foram realizadas análises que indicaram que o derramamento se originou de uma única fonte (LOURENÇO *et al.*, 2020) e a composição do óleo não possui características geoquímicas compatíveis com óleo brasileiro, além de indicar que passou por intensos processos de intemperismo e consiste em um produto de óleo pesado (BRUM *et al.*, 2020), não destilado e rico em aromáticos (REDDY *et al.*, 2022; SOARES e RABELO, 2023).

Campanha	NAF	АРТ	ACE	FLU	РНЕ	ANT	FLT	PYR	BaA	CHR	BbF	BkF	BaP	INP	DBA	BghiP	Total
P. variabilis																	
MUR - I	n.d.	n.d.	n.d.	18,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18,82
MUR - II	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,00
MUR - III	n.d.	n.d.	n.d.	18,92	0,50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	19,42
SER - I	n.d.	8,61	11,91	0,22	0,48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	21,22
SER - II	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,00
SER - III	n.d.	n.d.	n.d.	20,13	n.d.	n.d.	1,14	0,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	22,17
Sedimentos																	
MUR - I	n.d.	1,88	0,71	41,40	190,00*	25,90	3,17	28,50	n.d.	4,91	<0,032	<0,029	2,07	7,34	n.d.	11,00	291,80
MUR - II	n.d.	0,58	<0,014	<0,023	16,20	1,68	0,46	2,76	n.d.	1,85	<0,032	<0,029	1,19	n.d.	n.d.	2,31	2,48
MUR - III	n.d.	n.d.	n.d.	<0,023	122,00*	4,32	2,14	10,30	n.d.	2,39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,32
SER - I	n.d.	n.d.	n.d.	<0,023	53,60	5,73	3,00	19,10	n.d.	3,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	78,30
SER - II	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35,80	0,96	0,51	4,40	n.d.	1,46	<0,032	<0,029	1,06	6,18	n.d.	4,86	38,50
SER - III	n.d.	0,66	<0,014	13,50	104,00*	14,60	2,57	13,50	n.d.	2,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	145,20
Borra de óleo	0,84	0,47	0,32	1,44	15,30	1,91	1,25	5,90	3,44	4,84	1,41	0,50	3,01	1,31	1,75	2,07	45,80
LD	0,003	0,014	0,023	0,012	0,005	0,038	0,003	0,007	0,042	0,023	0,032	0,029	0,019	0,026	0,024	0,010	
LQ	0,001	0,004	0,007	0,003	0,001	0,011	0,001	0,002	0,013	0,007	0,010	0,009	0,006	0,008	0,007	0,003	

**Tabela 1.** Concentrações individuais e totais dos 16 HPAs prioritários na amostra de borra de óleo em  $\mu g/g$ , *Palythoa variabilis* e sedimento em ng/g de peso seco das praias de Muro Alto e Serrambi após o derramamento de óleo em intervalos aproximados de 6 meses (fev/2020), 1 ano (set/2020) e 1,5 ano (fev-mar/2021).

NAF = Naftaleno; APT = Acenaftileno; ACE = Acenafteno; FLU = Fluoreno; PHE = Fenantreno; ANT = Antraceno; FLT = Fluoranteno; PYR = Pireno; BaA = Benzo[a]antraceno; CHR = Criseno; BbF = Benzo[b]fluoranteno; BkF = Benzo[k]fluoranteno; BaP = Benzo[a]pireno; INP = Indeno[1.2.3-c.d]pireno; DBA = Dibenzo[a.b]antraceno; BghiP = Benzo[g. h.i]perileno; n.d. = não detectado.

<0,014 = valor menor que a quantificação limite do método para acenafteno (ng/g);

<0,023 = valor menor que a quantificação limite do método para fluoreno (ng/g);

<0,032 = valor menor que a quantificação limite do método para benzo[k]fluoranteno (ng/g);

<0,029 = valor menor que a quantificação limite do método para benzo[b]fluoranteno (ng/g);

\* = valor maior que o ponto mais alto da curva analítica (100 ng/g) obtido pela extrapolação da curva;

LQ = primeiro valor quantificado com extrema precisão;

LD = medida referencial acima do branco que pode ser detectada, mas não quantificada.

Nos sedimentos foram detectadas concentrações de fluoreno, antraceno, pireno, benzo(g.h.i)perileno, além de baixas concentrações de acenafteno, acenaftileno, fluoranteno, criseno, benzo(a)pireno, indeno(1.2.3-c.d)pireno e altas concentrações de fenantreno (Tabela 1; Figura 2). Nas amostras de *P. variabilis* analisadas, os HPAs detectados foram: acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fluoranteno, fenantreno e pireno. Estes são HPAs de baixo peso molecular (triaromáticos), os quais também foram detectados em amostras de corais analisadas por Han *et al.* (2020) e Jafarabadi *et al.* (2018).

A distribuição das concentrações dos HPAs ao longo das três campanhas, nos organismos e sedimentos coletados em cada uma das praias, não demonstrou um padrão linear de redução ao longo do tempo. Assim, essas concentrações foram somadas para a comparação das composições com a da borra de óleo (Figura 2). Esta falta de linearidade pode ser explicada por alguns fatores ou pela combinação deles. Um deles é a ressuspensão de sedimentos, processo que ocorre no ambiente marinho pela ação de ondas, marés, correntes, dragagem e navios, em que partículas de HPAs agregadas aos sedimentos tornam-se biodisponíveis na coluna d'água (FENG *et al.*, 2008), podendo ser bioacumulados por organismos.

Outro fator é representado pelo aparecimento de novos resíduos de petróleo na costa nordeste do Brasil em junho de 2020, como consequência de eventos oceanográficos intensos, como períodos de ventos fortes, ondas altas e grandes amplitudes de maré, apresentando perfis químicos compatíveis com a mancha de óleo que atingiu a costa brasileira no ano de 2019 (MB, 2020b), propiciando acúmulo de HPAs nos sedimentos e organismos. Além disso, a entrada de HPAs no ambiente marinho também pode advir de outras fontes que não a petrogênica, como por exemplo, fontes pirogênicas. Os HPAs pirogênicos são formados durante processos de combustão, como a atividade industrial e a queima de combustíveis fósseis e de matéria orgânica (KO *et al.*, 2014).

Em termos de distribuição, HPAs tri-aromáticos e diaromáticos acumularam-se nos sedimentos de ambas as praias, com predominância de fenantreno em altas concentrações (328,2 ng/g em Muro Alto e 193,4 ng/g em Serrambi), indicando origem petrogênica e mesma assinatura de HPAs na borra de óleo. Os fenantrenos são hidrocarbonetos aromáticos dominantes na maioria dos óleos (ZHANG *et al.*, 2016), inclusive na amostra de borra de óleo analisada no presente estudo (Figura 2a). Os

HPAs nos sedimentos das duas praias tiveram assinaturas similares entre si e com a borra de óleo. Em geral, os HPAs tendem a ser adsorvidos por matéria em suspensão e, posteriormente, depositados nos sedimentos, os quais funcionam como depósitos para os HPAs (JAFARABADI *et al.*, 2021).

De forma geral, as concentrações dos HPAs no sedimento de Muro Alto foram maiores que em Serrambi, especialmente do fenantreno. A praia de Muro Alto, além de ter recebido impacto direto do óleo (com acúmulo sobre o recife) é também muito próxima ao Complexo Industrial Portuário de Suape. É comum haver concentrações mais elevadas de HPAs próximo a portos, diminuindo acentuadamente com a distância desses locais (LATIMER e ZHENG, 2003).

**Figura 2.** Somatório das concentrações dos 16 HPAs nas três amostras de sedimentos (a) e *Palythoa variabilis* (b) de MUR e SER (ng/g peso seco) em relação às concentrações dos HPAs na borra de óleo  $(\mu g/g)$ .



MUR = Muro Alto; SER = Serrambi; PHE = Fenantreno; PYR = Pireno; CRY = Criseno; BaA = Benzo[a]antraceno; BaP = Benzo[a]pireno; BgP = Benzo[g. h.i]perileno; ANT = Antraceno; DBA = Dibenzo[a.b]antraceno; FLU = Fluoreno; BbF = Benzo[b]fluoranteno; IND = Indeno[1.2.3-c.d]pireno; FLT = Fluoranteno; NAF = Naftaleno; BkF = Benzo[k]fluoranteno; ACY = Acenaftileno; ACE = Acenafteno.

Por outro lado, o perfil dos HPAs bioacumulados pelos zoantídeos não se correlaciona com a assinatura dos HPAs nos sedimentos ou na borra de óleo. O HPA de maior predominância nos tecidos dos organismos foi o fluoreno (Figura 2b), um HPA de baixo peso molecular de origem petrogênica (KAFILZADEH *et al.*, 2011). O fluoreno esteve presente na borra do óleo e no sedimento, porém não teve o mesmo destaque. Segundo Yang *et al.* (2020), tecidos de corais demonstram capacidade de bioacumulação de HPAs mesmo com concentrações relativamente baixas de HPAs no ambiente. Além disso, segundo Sheedy *et al.* (1998), a absorção e depuração de fluoreno pelo organismo é mais rápida, quando comparada com outros HPAs.

A bioacumulação de HPAs por cnidários pode ocorrer de forma direta, através da alimentação suspensívora ou, de forma indireta, por difusão passiva, uma vez que, no ambiente marinho, HPAs podem dissolver-se e serem transportados com o fluxo de água (JAFARABADI *et al.*, 2021). Além disso, zoantídeos da espécie *P. variabilis* agregam sedimentos na parede do corpo, fator que representa outra via de bioacumulação de contaminantes (SUCHANEK e GREEN, 1981). Essa bioacumulação não ocorre rapidamente, este processo leva tempo (JAFARABADI *et al.*, 2021).

Assim, as altas concentrações de fluoreno nos tecidos dos organismos podem ter sido bioacumuladas ao longo do tempo, demonstrando maior incorporação deste HPA ou outras fontes de origem, que não o derramamento de óleo em questão. Alguns exemplos são: escoamento urbano, efluentes de águas residuais, emissões industriais, deposição atmosférica (queima de combustíveis fósseis e matéria orgânica) e vazamentos durante o transporte de combustíveis fósseis (LATIMER e ZHENG, 2003). Esse acúmulo com o passar do tempo também pode explicar a presença de concentrações de outros HPAs nos tecidos dos organismos, os quais estavam pouco representados no sedimento e na amostra de óleo como acenaftileno e acenafteno.

Os HPAs totais encontrados nos sedimentos das duas praias tiveram elevada correlação positiva entre si, bem como estiveram, ambos, correlacionados com os HPAs totais da borra do óleo (Figura 3). Por outro lado, os HPAs encontrados nos organismos não tiveram correlação significativa com o sedimento nem com o óleo em nenhuma das praias. Isto corrobora a assinatura diferente nos perfis de HPAs dos organismos, o que

pode indicar outras fontes de contaminação local (LATIMER e ZHENG, 2003). Assim, a rota de absorção deve ser considerada ao avaliar a bioacumulação (MEADOR, 2003).

A distribuição de HPAs no ambiente marinho é controlada pela sua hidrofobicidade, tornando os sedimentos um dos principais reservatórios desses contaminantes (LATIMER e ZHENG, 2003). No entanto, vários fatores podem influenciar a concentração de HPAs bioacumulados, incluindo o tamanho do organismo, taxas de alimentação e respiração, metabolismo dos compostos, sazonalidade, concentrações de contaminantes no ambiente e o tamanho dos sedimentos (MEADOR, 2003), os quais são diferentes entre as praias. A Praia de Serrambi apresenta sedimentos grossos, já a granulometria de Muro Alto é composta por sedimentos médios a finos (MALLMANN *et al.*, 2014), estes últimos provavelmente contêm maiores concentrações de contaminantes, como HPAs (MEADOR, 2003).





Além disso, a presença de hidrocarbonetos do petróleo nos sedimentos depende das características do óleo, de parâmetros ambientais, temperatura, pH, salinidade, microbioma e tipo de ambiente (CHOUERI *et al.*, 2024). Portanto, apesar de, inicialmente, a praia de Serrambi ter sido escolhida para a realização das coletas dos organismos e sedimentos por ser um local de referência, visto que não foi atingida diretamente pelo derramamento de óleo que ocorreu na costa brasileira no ano de 2019, os sedimentos coletados em Serrambi apresentaram características de HPAs totais semelhantes aos sedimentos coletados em Muro Alto, que teve seus recifes diretamente atingidos pelo derramamento, porém com valores mais elevados nesta última.

#### 3.2 Determinação das concentrações dos elementos

Em média, a maioria dos elementos analisados, incluindo Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, V e Zn, apresentaram maiores concentrações em *P. variabilis* coletados em Muro Alto, já em Serrambi, apenas dois elementos (Ti e Cu), foram observados em maiores concentrações. Em relação às concentrações de elementos nos sedimentos, em média, Co, Cu, Mn, Ni e V foram os que apresentaram maiores concentrações nos sedimentos coletados em Muro Alto (Tabela 2). Os metais têm a tendência de permanecer bem preservados nos sedimentos ao longo do tempo, representando uma ameaça, mesmo em baixas concentrações (OLIVEIRA *et al.*, 2024).

Além de terem sido diretamente atingidos pelo derramamento, os recifes de Muro Alto estão localizados adjacentes ao Complexo Industrial Portuário de Suape, fator que pode contribuir para maiores concentrações de elementos nos organismos em relação aos recifes de Serrambi, que está aproximadamente 24 km mais afastada. O Porto de Suape recebe frequentemente o tráfego de grandes embarcações e descargas de efluentes industriais e domésticos, principais fontes de contaminação de água e sedimentos (BARCELLOS e SANTOS, 2018). Os metais são os principais contaminantes em sedimentos de áreas portuárias e apresentam toxicidade e tendência de bioacumulação ao longo das teias alimentares marinhas (BARUAEM *et al.*, 2012). De acordo com Baruaem *et al.*, 2012 os elementos Cu e Ni são mais abundantes em regiões contaminadas e áreas portuárias. Portanto, esta associação está relacionada com o aumento das concentrações de metais ao longo da bacia de drenagem (OLIVEIRA *et al.*, 2020) (Tabela 2).

Origem	Campanha	Al	As	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Ti	V	Zn
	SER - I	996,17	5,77	1,77	0,06	0,15	2,55	2,05	697,67	10,25	<ld< td=""><td>1,64</td><td>1,63</td><td>7,09</td><td>22,02</td><td>1,98</td><td>10,99</td></ld<>	1,64	1,63	7,09	22,02	1,98	10,99
	SER - II	887,14	2,70	1,87	0,02	0,11	2,60	0,69	633,37	11,58	3,02	1,89	4,07	5,71	36,62	1,86	9,19
	SER - III	890,63	3,84	2,28	0,02	0,15	2,18	2,09	644,37	13,63	2,71	2,65	2,31	7,46	19,34	1,36	7,99
	Média	924,65	4,10	1,97	0,03	0,14	2,44	1,61	658,47	11,82	2,87	2,06	2,67	6,75	25,99	1,73	9,39
	DP	61,97	1,55	0,27	0,02	0,02	0,23	0,80	34,39	1,71	0,22	0,53	1,26	0,92	9,30	0,33	1,51
P. variabilis	MUR - I	2151,02	7,47	3,99	0,10	0,34	3,71	1,50	1422,62	28,25	2,57	2,35	4,08	14,15	27,15	3,58	17,99
	MUR - II	1274,21	4,49	2,25	0,13	0,24	3,12	1,04	870,90	18,63	<ld< td=""><td>2,90</td><td>5,21</td><td>9,49</td><td>23,07</td><td>2,21</td><td>19,48</td></ld<>	2,90	5,21	9,49	23,07	2,21	19,48
	MUR - III	1270,65	7,90	3,86	0,18	0,33	3,32	1,06	1031,31	21,97	3,82	2,11	5,14	12,83	21,61	2,31	18,90
	Média	1565,30	6,62	3,37	0,14	0,30	3,38	1,20	1108,28	22,95	3,19	2,45	4,81	12,16	23,94	2,70	18,79
	DP	507,26	1,86	0,97	0,04	0,05	0,30	0,26	283,80	4,88	0,88	0,40	0,63	2,40	2,87	0,76	0,75
	SER - I	1967,00	<ld< td=""><td>119,00</td><td>DI</td><td>2,20</td><td>3,20</td><td>2,90</td><td>2472,00</td><td>68,00</td><td>DI</td><td>1,50</td><td>1,80</td><td>DI</td><td>1146,00</td><td>16,80</td><td>2,10</td></ld<>	119,00	DI	2,20	3,20	2,90	2472,00	68,00	DI	1,50	1,80	DI	1146,00	16,80	2,10
	SER - II	1338,00	7,30	269,00	DI	2,10	10,10	3,00	5840,00	111,00	DI	2,30	7,50	DI	1684,00	27,50	11,80
	SER - III	1742	8,80	255,00	DI	3,40	10,90	3,30	7057,00	239,00	DI	2,10	8,90	DI	4751,00	67,70	14,40
	Média	1742,00	8,05	255,0	-	2,20	10,10	3,06	5840,00	111,00	-	2,10	7,50	-	1684,00	27,50	11,80
Sedimentos	DP	318,71	1,06	82,85	-	0,72	4,23	0,20	2375,10	88,95	-	0,41	3,76	-	1944,73	26,83	6,48
	MUR - I	1543,00	<ld< td=""><td>58,00</td><td>DI</td><td>2,70</td><td>5,70</td><td>3,80</td><td>3674,00</td><td>127,00</td><td>DI</td><td>2,30</td><td>2,10</td><td>DI</td><td>2999,00</td><td>42,20</td><td>5,20</td></ld<>	58,00	DI	2,70	5,70	3,80	3674,00	127,00	DI	2,30	2,10	DI	2999,00	42,20	5,20
	MUR - II	1295,00	<ld< td=""><td>39,00</td><td>DI</td><td>4,70</td><td>5,90</td><td>3,70</td><td>4970,00</td><td>233,00</td><td>DI</td><td>2,40</td><td>3,50</td><td>DI</td><td><ld< td=""><td>72,90</td><td>5,90</td></ld<></td></ld<>	39,00	DI	4,70	5,90	3,70	4970,00	233,00	DI	2,40	3,50	DI	<ld< td=""><td>72,90</td><td>5,90</td></ld<>	72,90	5,90
	MUR - III	2146,00	<ld< td=""><td>77,00</td><td>DI</td><td>3,30</td><td>1,60</td><td>1,80</td><td>871,00</td><td>17,00</td><td>DI</td><td>2,10</td><td><ld< td=""><td>DI</td><td>361,00</td><td>5,40</td><td><ld< td=""></ld<></td></ld<></td></ld<>	77,00	DI	3,30	1,60	1,80	871,00	17,00	DI	2,10	<ld< td=""><td>DI</td><td>361,00</td><td>5,40</td><td><ld< td=""></ld<></td></ld<>	DI	361,00	5,40	<ld< td=""></ld<>
	Média	1543,00	-	58,00	-	3,30	5,70	3,70	3674,00	127,00	-	2,30	2,80	-	1680,00	42,20	5,55
	DP	437,66	-	19,00	-	1,02	2,42	1,12	2095,16	108,00	-	0,15	0,98	-	1864,34	33,79	0,49

**Tabela 2.** Concentrações individuais (µg/g peso seco), média e desvio padrão de elementos nos sedimentos e *Palythoa variabilis* das praias de Muro Alto e Serrambi (PE, Brasil) após o derramamento de óleo em intervalos aproximados de 6 meses (Campanha II), 1 ano (Campanha II) e 1,5 ano (Campanha III).

Al = Alumínio; As = Arsênio; Ba = Bário; Cd = Cádmio; Co = Cobalto; Cr = Cromo; Cu = Cobre; Fe = Ferro; Mn = Manganês; Mo = Molibdênio; Ni = Níquel; Pb = Chumbo; Sr = Estrôncio; Ti = Titânio; V = Vanádio; Zn = Zinco;

DP: Desvio Padrão;

<LD: Abaixo do limite de detecção.

DI: Dados indisponíveis

A concentração individual dos elementos variou entre as praias (locais) e, principalmente entre o sedimento e o zoantídeo (origem) (Figuras 4 e 5). Os elementos Al, Ni, Zn apresentaram maior ocorrência nos organismos e sedimentos coletados na praia de Muro Alto (Figura 4). Regiões próximas ao porto de Suape são afetadas por contaminantes químicos derivados de efluentes industriais e urbanos e são poluídas por metais pesados como Al, Ni e Zn (BARCELLOS e SANTOS, 2018). Em contrapartida, os elementos Ba e Ti demonstraram maiores médias nos organismos e sedimentos coletados nos recifes de Serrambi. O Ba está relacionado com o assentamento de matéria biogênica e com a produtividade marinha (SCHROEDER *et al.*, 1997), já o Ti tem alto potencial de atingir os oceanos na forma de dióxido de titânio nanométrico (nTiO2), devido ao seu uso em uma ampla gama de indústrias, incluindo produção de plástico, tintas e cosméticos, como protetores solares químicos (DEDMAN *et al.*, 2021).

Figura 4. *Boxplot* da ocorrência de cada elemento presente em ambas as origens (organismos e sedimentos) em relação ao local (Serrambi ou Muro Alto - PE, Brasil).



Al = Alumínio; As = Arsênio; Ba = Bário; Cd = Cádmio; Co = Cobalto; Cr = Cromo; Cu = Cobre; Fe = Ferro; Mn = Manganês; Mo = Molibdênio; Ni = Níquel; Pb = Chumbo; Sr = Estrôncio; Ti = Titânio; V = Vanádio; Zn = Zinco.

A Figura 5 apresenta as concentrações dos elementos nas origens analisadas (organismos ou sedimentos), sem relacionar com os locais de coleta. Considerando a origem, os elementos Al, Ba, Cr, Cu, Fe e Mn apresentaram valores maiores nos sedimentos do que bioacumulados por *P. variabilis*. Os sedimentos frequentemente

apresentam maiores concentrações de contaminantes em comparação com a coluna de água, e podem constituir uma fonte secundária de contaminantes para a coluna de água e a biota (BARUAEM *et al.*, 2012).

Já os elementos As, Ni e Zn tiveram maior ocorrência nos organismos do que nos sedimentos, isto sugere que as concentrações desses elementos nos tecidos podem refletir um acúmulo com o passar do tempo. Em particular, as maiores concentrações de metais pesados, como o zinco, podem estar relacionadas com a atuação como elementos-chave da anidrase carbônica, uma enzima abundante em organismos que mantêm relação simbiótica com microalgas fotossintetizantes (MUÑOZ-VERA *et al.*, 2015), como a espécie *P. variabilis*.



Figura 5. Boxplot da ocorrência de cada elemento em relação a origem (organismo ou sedimento).

Al = Alumínio; As = Arsênio; Ba = Bário; Cd = Cádmio; Co = Cobalto; Cr = Cromo; Cu = Cobre; Fe = Ferro; Mn = Manganês; Mo = Molibdênio; Ni = Níquel; Pb = Chumbo; Sr = Estrôncio; Ti = Titânio; V = Vanádio; Zn = Zinco.

Na análise conjunta, a maior concentração dos elementos foi observada nos sedimentos de Serrambi. Foi encontrada diferença significativa entre os locais e na interação local e origem (Tabela 3; Figura 6), com os valores do sedimento de Serrambi diferindo dos valores dos organismos em Serrambi (p < 0,0001) e dos sedimentos de Muro Alto (p = 0,031).

**Figura 6.** *Boxplot* da concentração total dos elementos presentes em cada origem (organismos ou sedimentos) em relação ao local (Serrambi ou Muro Alto).



**Tabela 3.** Resultados da ANOVA de 2 fatores: local (Serrambi e Muro Alto) e origem (sedimento e organismo) sobre a concentração dos elementos. \*\*\*p<0,001.

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	21.3299	1	219.1469	< 2.2e-16 ***
Local	0.0215	1	0.2204	0.6393879
Origem	2.8102	1	28.8723	2.85e-07 ***
Local:Origem	1.1623	1	11.9418	0.0007117 ***
Residuals	14.7944	152		

Sum Sq = soma dos quadrados; Df = grau de liberdade; F value = valor de F.

As diferenças encontradas entre o acúmulo de elementos nos sedimentos e nos animais podem ser explicadas pelas diferentes formas físico-químicas que os metais são encontrados no ambiente marinho, apresentando diferentes graus de biodisponibilidade, bioacumulação, mobilidade e taxas de biodegradação. Adicionalmente, se no ambiente as concentrações de metais forem elevadas, o mecanismo de desintoxicação dos organismos pode ser sobrecarregado, aumentando as concentrações de metais nos tecidos, como aconteceu com os organismos de Muro Alto, assim, os metais podem se ligar a alvos intracelulares, induzindo toxicidade. Além disso, essas diferenças entre locais ocorrem pois organismos sésseis detectam valores de um único local (ROVETA *et al.*, 2021).

#### 3.3 Análises multivariadas dos dados

A análise dos componentes principais para os elementos nos zoantídeos resultou em dois componentes que descrevem juntos 66,29% da variância total. O componente 1, responsável por 41,29% da variância total, apresentou as maiores correlações com as concentrações de Ba, Cd, Pb, As e V nos organismos (S1; Figura 7). A PCR mostrou esse eixo correlacionado com o ID e com níveis de MDA e carbonilas (Tabela 4). Já os metais pesados Pb e Mo bioacumulados pelos organismos encontram-se mais relacionados com os níveis de carbonilas e o ID. O componente 2 foi responsável por 25% da variância total com correlação positiva com o Cu e o As. Por outro lado, o Ti esteve negativamente relacionado com esse eixo (S1; Figura 7). O componente 2 foi correlacionado com carbonilas e com MDA (Tabela 4).

**Figura 7.** Análise de componentes principais (PCA) dos elementos bioacumulados pelos organismos da espécie *Palythoa variabilis* de Serrambi e Muro Alto.



As-O = Arsênio detectado no organismo; Ba-O = Bário detectado no organismo; Cd-O = Cádmio detectado no organismo; Cu-O = Cobre detectado no organismo; Mo-O = Molibdênio detectado no organismo; Ni-O = Níquel detectado no organismo; Pb-O = Chumbo detectado no organismo; Ti-O = Titânio detectado no organismo; V-O = Vanádio detectado no organismo; MDA = níveis de malondialdeído; ID = índice de dano genético; Dim = dimensão.

Os resultados da PCA para os sedimentos produziram dois componentes que juntos descrevem 69,41% da variância total. O componente 1, responsável por 41,16% da variância total, demonstrou que os elementos Cu, Ni e Co (S1; Figura 8) encontram-se correlacionados e são responsáveis por explicar os níveis de MDA, ou seja, mesmo sem ocorrer a bioacumulação desses compostos pelos zoantídeos, a presença deles nos sedimentos pode ser capaz de induzir danos aos organismos. Por outro lado, esse eixo esteve negativamente relacionado com as carbonilas e sulfidrilas

(Tabela 4). Já o elemento Al também compõe esse eixo e correlaciona-se negativamente com os níveis de MDA e positivamente com carbonilas e sulfidrilas.



Figura 8. Análise de componentes principais (PCA) dos elementos e HPAs totais nos sedimentos de Serrambi e Muro Alto.

AI-S = Alumínio detectado no sedimento; Ba-S = Bário detectado no sedimento; Co-S = Cádmio detectado no sedimento; Cu-S = Cobre detectado no sedimento; Ni-S = Níquel detectado no sedimento; Ti-S = Titânio detectado no sedimento; V-S = Vanádio detectado no sedimento; HPA total-S= soma dos HPAs detectados no sedimento; MDA = níveis de malondialdeído; ID = índice de dano genético; Dim = dimensão.

Além desses elementos, as concentrações de HPAs também estavam associadas aos danos encontrados. Os HPAs encontrados nos organismos tiveram correlação positiva com MDA e negativa com carbonilas (Tabela 4a,b), já os HPAs dos sedimentos foram correlacionados positivamente com MDA, ID e negativamente com as sulfidrilas (Tabelas 4a,c, 5) . Por outro lado, os níveis de HPAs nos organismos não explicam os danos genéticos encontrados. O componente "cs2" demonstrou ser redundante, por isso, esta variável foi eliminada do modelo.

**Tabela 4.** Regressão por componentes principais (PCR) para peroxidação lipídica (a), oxidação de proteínas (b) e grupos sulfidrilas (c) em relação aos HPAs totais nos organismos e nos sedimentos e aos componentes principais identificados na PCA dos elementos nos organismos (co1 e co2) e no sedimento (cs1).

a	Estimate	Std. error	t value	Pr(>  t  )
(Intercept)	22.9079	26.7788	0.855	0.4049
HPA_total_o	6.8596	2.5842	2.654	0.0173 *
HPA_total_s	1.5384	0.1302	11.811	2.59e-09 ***
co1	31.4108	3.9340	7.984	5.69e-07 ***
co2	-63.1012	10.6641	-5.917	2.17e-05 ***
cs1	42.0141	8.1849	5.133	0.0001 ***

b	Estimate	Std. error	t value	Pr(>  t  )
(Intercept)	18.419681	1.230877	14.965	2.01e-10 ***
HPA_total_o	-0.744537	0.114357	-6.511	9.85e-06 ***
HPA_total_s	0.011662	0.005889	1.980	0.06631.
co1	0.638406	0.183186	3.485	0.00332 **
co2	2.811863	0.511263	5.500	6.11e-05 ***
cs1	-1.271921	0.371164	-3.427	0.00375 **
c	Estimate	Std. error	t value	<b>Pr(&gt;  t  )</b>
(Intercept)	1.402e-01	1.099e-02	12.766	8.36e-10 ***
HPA_total_o	-1.706e-03	1.010e-03	-1.689	0.110577
HPA_total_s	-1.506e-03	5.357e-05	-2.812	0.012524 *
co1	-2.565e-03	1.559e-03	-1.645	0.119405
co2	2.975e-03	4.413e-03	0.674	0.509885
cs1	-1.576e-02	3.319e-03	-4.750	0.000217 ***

**Tabela 5.** Regressão por componentes principais (PCR) para índice de dano genético em relação aos HPAs totais nos organismos e nos sedimentos e aos componentes principais identificados na PCA dos elementos nos organismos (co1 e co2) e no sedimento (cs1).

	Estimate	Std. error	t value	Pr(>  t  )
(Intercept)	68.03371	9.34268	7.282	5.09e-08 ***
HPA_total_o	-1.55091	0.86839	-1.786	0.08457.
HPA_total_s	0.13832	0.04603	3.005	0.00543 **
co1	8.00816	1.34351	5.961	1.77e-06 ***
co2	-3.38407	3.74979	-0.902	0.37424
cs1	3.77130	2.78371	1.355	0.18595
Signi	f. codes: 0 "***	·" 0.001 ··**" 0.0	1 "*" 0.05 "."	0.1 " " 1

Nos organismos, a maioria dos elementos bioacumulados e os danos biológicos estiveram associados às amostras de Muro Alto, visto que estas variáveis encontram-se do lado direito do gráfico, e Serrambi encontra-se do lado oposto (Figura 7). A praia de Muro Alto está localizada próxima ao porto de Suape, local onde há o lançamento de efluentes industriais e domésticos, principais fontes de contaminação por metais (BARCELLOS e SANTOS, 2018), além de ter sido diretamente atingida pelo

derramamento de óleo, fator que explica a bioacumulação de elementos pelos zoantídeos e, consequentemente, os danos biológicos.

Os contaminantes bioacumulados pelos organismos marinhos induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (TABAN *et al.*, 2004). As ROS, como: radical superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio podem gerar danos a lipídios, proteínas e DNA (LESSER, 2006). As ROS são as principais iniciadoras da peroxidação de lipídios, ao remover um átomo de hidrogênio de um carbono metileno na molécula lipídica (BHAGAT *et al.*, 2017). Segundo Aljbour *et al.* (2019), a peroxidação dos lipídios de membrana é estimulada pela interação com metais, como por exemplo o Cd. A peroxidação lipídica induz a perturbação da estrutura e função da membrana celular, alterando sua fluidez e integridade, inativando enzimas e interrompendo moléculas receptoras de superfície. Aldeídos, como o malondialdeído (MDA), são formados como produto final da peroxidação lipídica e são moléculas capazes de gerar adutos de DNA e proteínas (HANNAM *et al.*, 2010). Em nossa análise o Cd foi altamente correlacionado com o eixo associado aos níveis elevados de MDA.

A oxidação de proteínas é um dos eventos que ocorrem durante a oxidação celular (DAVIES e DELSIGNORE, 1987). Uma das alterações movidas pela oxidação proteica é a adição de grupos carbonila às proteínas, associada à perda de função e modificação irreversível da proteína podendo levar à eliminação ou acúmulo de proteínas danificadas. De acordo com Kaloyianni *et al.* (2009), níveis de proteínas carboniladas em organismos expostos a metais podem ocorrer em resposta à reações de oxidação catalisadas por metais, dado que há um aumento significativo de carbonilas em mexilhões expostos a metais. De fato, no presente estudo os valores de carbonilas estiveram associadas a todos os componentes resultantes da análise dos elementos, tanto nos zoantídeos quanto no sedimento.

Complementarmente, segundo Dai *et al.* (2012), o chumbo (Pb) é um elemento capaz de induzir estresse oxidativo e danos genéticos de forma dose-dependente em peixes, visto que metais são responsáveis por potencializar a produção de ROS e por gerar quebras na cadeia de DNA (AKCHA *et al.*, 2003). Já os tióis são moléculas chave no estresse oxidativo (DALLE-DONNE *et al.*, 2006) e atuam como efetores metabólicos essenciais, assim, danos oxidativos levam ao esgotamento de grupamentos sulfidrilas e tióis, que, por sua vez, pode induzir alterações fisiológicas (GRINTZALIS *et al.*, 2012). Isso explica a correlação negativa entre a concentração de sulfidrilas e os metais no sedimento.

Os danos genéticos de *P. variabilis* podem ter sido desenvolvidos como resposta ao estresse oxidativo que pode ser genotóxico ao causarem quebras na molécula de DNA e oxidação de nucleobases (MARTINS *et al.*, 2013). De acordo com Avery *et al.* (1996), níveis de danos ao DNA foram correlacionados especialmente com concentrações de chumbo bioacumulados. Além disso, metais apresentam alto potencial genotóxico, a exemplo do Cd, que induz apoptose e mudanças no DNA de invertebrados marinhos (SLOBODSKOVA *et al.*, 2019).

Os índices de danos ao DNA, medidos como quebras de fitas, podem ocorrer como efeito direto ou secundário de poluentes (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998; WEBER *et al.*, 2013). Danos ao DNA ocorrem comumente por absorção de radiação UV e interação com espécies reativas de oxigênio e contaminantes. O acúmulo de compostos tóxicos gera a modificação estrutural do DNA, que induz transcrição incompleta e disfunções metabólicas, como reações enzimáticas prejudicadas, envelhecimento, imunidade enfraquecida e desenvolvimento de doenças. Portanto, quebras de fitas de DNA são biomarcadores capazes de detectar a genotoxicidade (WOO *et al.*, 2006) e a técnica do ensaio cometa alcalino é sensível a danos ao DNA induzidos por substâncias genotóxicas de ambientes poluídos e é uma ferramenta utilizada como biomarcador na investigação da toxicidade genética da poluição por óleo através da análise de quebras de fitas de DNA (LEE *et al.*, 2011).

Em relação aos sedimentos, a maioria dos elementos e os níveis de MDA estiveram associados aos sedimentos de Serrambi, ou seja, os níveis de MDA podem ser modulados pela interação direta dos organismos com o sedimento, sem necessariamente haver a bioacumulação dos contaminantes (Figura 8). Aumentos nos índices de lipoperoxidação foram relatados em diversos estudos *in situ* com invertebrados marinhos expostos à HPAs nos sedimentos (GRINTZALIS *et al.*, 2012; BHAGAT *et al.*, 2016, 2017). Níveis mais altos de MDA podem ser consequências da saturação dos sistemas antioxidantes e sobrecarga das defesas antioxidantes dos organismos (FROUIN *et al.*, 2007). Apesar disso, segundo Quinlan *et al.* (1988), o alumínio (Al) em si não é capaz de induzir a peroxidação lipídica em sistemas de membranas. Ademais, em estudos de Hartl *et al.* (2007) e Lemos *et al.* (2005), foram observados danos ao DNA em peixes de locais que continham sedimentos poluídos com metais.

Os resultados da análise de PCR deste estudo corroboram análises prévias que destacam a capacidade dos HPAs e metais de induzir a produção de ROS e danos oxidativos a proteínas e lipídios (DAVIES e DELSIGNORE, 1987). Estudos como o de

Rougee *et al.* (2006) mostram que, assim como em outras espécies marinhas, a exposição de cnidários a HPAs pode estimular a regulação positiva de enzimas antioxidantes, resultando em alterações na composição proteica (TARRANT *et al.*, 2014). Segundo Sun *et al.* (2021), os níveis de peroxidação lipídica em tecidos de bivalves foram significativamente aumentados pela exposição a HPAs, atingindo aproximadamente 4 vezes as concentrações do grupo controle. Além disso, Overmans *et al.* (2018) indicam que a atividade média da enzima superóxido dismutase (SOD), responsável por mitigar os danos causados pelas ROS, diminui conforme aumenta a concentração de fenantreno, o HPA predominante na amostra de óleo analisada e nos sedimentos, especialmente em Muro Alto, induzindo o aumento das concentrações de MDA nos organismos.

As concentrações de HPAs nos organismos teve forte efeito sobre as carbonilas. Kaloyianni *et al.* (2009) encontraram níveis significativamente elevados de proteínas carboniladas em moluscos expostos a contaminantes orgânicos e inorgânicos, destacando o papel desses compostos na indução de danos oxidativos às proteínas. De forma complementar, Almroth *et al.* (2005) também evidenciaram níveis aumentados de proteínas carboniladas em peixes após exposição a HPAs e Grintzalis *et al.* (2012) associaram as modificações nas moléculas de tiol ao estresse oxidativo mediado por HPAs. Em ambientes naturais, os organismos estão expostos simultaneamente à radiação UV e a contaminantes como os HPAs, o que pode levar à produção aumentada de ROS, uma vez que a exposição aos raios UV modifica a reatividade dos HPAs, resultando em maior toxicidade (TARRANT *et al.*, 2014).

A exposição a HPAs pode levar à quebra da dupla hélice do DNA e à formação e retardamento na recuperação de adutos de DNA (LEE *et al.*, 2011). Além disso, os HPAs podem ser metabolicamente ativados, gerando ROS que induzem a quebra direta ou indireta das fitas de DNA, através do reparo incompleto de bases oxidadas. De acordo com Woo *et al.* (2006), existem altas correlações entre danos ao DNA e concentrações de HPAs em sedimentos, indicando um efeito genotóxico exercido por sedimentos contaminados. A genotoxicidade pode ser atenuada em exposições a baixas concentrações de hidrocarbonetos (GALVAN *et al.*, 2016), devido a mecanismos de reparo do DNA presentes nos organismos, que contribuem para a moderação dos danos genéticos (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998; WEBER et al., 2013), demonstrando a capacidade dos animais de recuperarem-se de lesões ao DNA (WOO *et al.*, 2006).

## 4 CONCLUSÃO

Conclui-se que há uma fraca correlação entre os HPAs nos sedimentos e na borra de óleo, e a sua bioacumulação pelos organismos, mas, há uma alta correlação entre os HPAs presentes nos sedimentos de ambas as praias, os quais também apresentam correlação significativa com os HPAs presentes na borra de óleo. Além disso, a maior parte dos elementos e danos biológicos associados aos organismos ocorreu nos animais coletados em Muro Alto, já em relação aos sedimentos, a maioria dos contaminantes e os níveis de MDA estão associados aos sedimentos coletados em Serrambi. Os elementos Ba, Cd, Cu, Pb, As e V bioacumulados são correlacionados aos danos oxidativos e genéticos. Nos sedimentos, Al, Cu, Ni e Co correlacionam-se com os danos oxidativos. Os principais HPAs responsáveis por induzir os danos biológicos foram o fluoreno bioacumulado e o fenantreno presente nos sedimentos, sendo relacionados a estresse oxidativo.

O presente estudo destaca a complexidade da contaminação por petróleo em *P. variabilis* e, consequentemente, em ecossistemas recifais e a necessidade de um monitoramento detalhado dos diferentes contaminantes e seus efeitos biológicos. Embora a bioacumulação de HPAs nos organismos não tenha mostrado forte correlação com os sedimentos e a borra de óleo, a presença de HPAs nos sedimentos indica uma fonte constante de poluição e risco para organismos marinhos. Os danos biológicos observados enfatizam a necessidade urgente de medidas de mitigação de danos gerados como resultado de derramamentos de óleo.

# **5 REFERÊNCIAS**

ACOSTA, A.; GONZÁLEZ, A. M. Fission in the Zoantharia Palythoa caribaeorum (Duchassaing and Michelotii, 1860) populations: a latitudinal comparison. **Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR**, v. 36, n. 1, p. 151-165, 2007. ISSN: 0122-9761.

AKCHA, F. et al. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (Limanda limanda) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1-2, p. 21-32, 2003. doi: https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00244-9. ALJBOUR, S. M. et al. Metabolic and oxidative stress responses of the jellyfish *Cassiopea* sp. to changes in seawater temperature. **Journal of Sea Research**, v. 145, p. 1-7, 2019. doi: https://doi.org/10.1016/j.seares.2018.12.002. ALMROTH, B. C. et al. Oxidative damage in eelpout (Zoarces viviparus), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic toxicology**, v. 73, n. 2, p. 171-180, 2005. doi: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.007.

ARAÚJO, M. E. et al. Artisanal fishers, consumers and the environment: immediate consequences of the oil spill in Pernambuco, Northeast Brazil. **Cadernos de saúde pública**, v. 36, e00230319, 2020. doi: https://doi.org/10.1590/0102-311X00230319. AUED, A. W. et al. Large-scale patterns of benthic marine communities in the Brazilian Province. **PloS one**, v. 13, n. 6, e0198452, 2018. doi: https://doi.org/10.1371/journal. pone.0198452.

AVERY, E. L.; DUNSTAN, R. H.; NELL, J. A. The detection of pollutant impact in marine environments: condition index, oxidative DNA damage, and their associations with metal bioaccumulation in the Sydney rock oyster Saccostrea commercialis.

Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 31, p. 192-198, 1996. doi: https://doi.org/10.1007/BF00212365.

BARCELLOS, R. L.; SANTOS, L. D. Histórico de impactos ambientais e o estado da arte em Oceanografia no sistema estuarinolagunar de Suape-Ipojuca (PE). **Parcerias Estratégicas**, v. 23, n. 46, 2018.

BURUAEM, L. M. et al. Contamination of port zone sediments by metals from Large Marine Ecosystems of Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 64, n. 3, p. 479-488, 2012. doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.01.017.

BENSON, A. A.; MUSCATINE, L. Wax in coral mucus: energy transfer from corals to reef fishes 1. **Limnology and Oceanography**, v. 19, n. 5, p. 810-814, 1974. doi: https://doi.org/10.4319/lo.1974.19.5.0810.

BHAGAT, J. et al. Effects of benzo(k)fluoranthene, a polycyclic aromatic hydrocarbon on DNA damage, lipid peroxidation and oxidative stress in marine gastropod *Morula granulata*. **Chemistry and Ecology**, v. 33, n. 9, p. 869-882, 2017. doi: https://doi.org/ 10. 1080/ 02757540.2017.1384470.

BLACKBURN, M. et al. Oil in our oceans: a review of the impacts of oil spills on marine invertebrates. **Portland, OR: The Xerces Society for Invertebrate Conservation**, v. 152, 2014.

BRUM, H. D.; CAMPOS-SILVA, J. V.; OLIVEIRA, E. G. Brazil oil spill response: government inaction. **Science**, v. 367, n. 6474, p. 155-156, 2020. doi: 10.1126/science. aba0369.

BUEGE, J. A; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 52, p. 302-10, 1978. doi: https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6.

CARLS, M. G.; MEADOR, J. P. A perspective on the toxicity of petrogenic PAHs to developing fish embryos related to environmental chemistry. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 15, n. 6, p. 1084-1098, 2009. doi: https://doi.org/10.1080/10807030903304708.

CERQUEIRA, W. R. P. et al. Registro de petróleo em poríferos e cnidários durante o impacto agudo de derramamento no Nordeste brasileiro em 2019. **Scientia Plena**, v. 16, n. 8, 2020; doi: https://doi.org/10.14808/sci.plena.2020.088001.

CHOUERI, R. B. et al. PAH residues and toxicity levels two years after an extensive oil spill on the northeast Brazilian coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 200, p. 116063, 2024. doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116063.

COSTA, D. H. L. O. Avaliação do zoantídeo Palythoa caribaeorum (Cnidaria, Anthozoa) como bioacumulador de metais pesados. 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

DAI, W. et al. Lead (Pb) accumulation, oxidative stress and DNA damage induced by dietary Pb in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Research, v. 43, n. 2, p. 208-214, 2012. doi: https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02817.x.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica chimica acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003. doi: https://doi.org/10.1016/S0009-8981 (03)00003-2.

DAVIES, K. J.; DELSIGNORE, M. E. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 20, p. 9908-9913, 1987. doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48020-9.

DEDMÁN, C. J. et al. Environmentally relevant concentrations of titanium dioxide nanoparticles pose negligible risk to marine microbes. **Environmental Science: Nano**, v. 8, n. 5, p. 1236-1255, 2021. doi: 10.1039/D0EN00883D.

DISNER, G. R.; TORRES, M. The environmental impacts of 2019 oil spill on the Brazilian coast: Overview. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e** 

**Sustentabilidade**, v. 7, n. 15, p. 241-256, 2020. doi: 10.21438/rbgas(2020)071518. ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys.**, v. 82, n. 1, p. 70-7, 1959. doi: https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6.

FENG, J. et al. The role of sediment resuspension duration in release of PAHs. **Chinese Science Bulletin**, v. 53, n. 18, p. 2777-2782, 2008. doi: https://doi.org/10.1007/s11434-008-0389-z.

FROUIN, H. et al. Physiological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on softshell clam Mya arenaria. **Aquatic toxicology**, v. 82, n. 2, p. 120-134, 2007. doi: https:// doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.02.005.

GRINTZALIS, K. et al. Total thiol redox status as a potent biomarker of PAH-mediated effects on mussels. **Marine environmental research**, v. 81, p. 26-34, 2012. doi: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.08.004.

HAN, M. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in corals of the South China Sea: occurrence, distribution, bioaccumulation, and considerable role of coral mucus. **Journal of hazardous materials**, v. 384, p. 121299, 2020. doi: 10.1016/j.jhazmat. 2019.121299.

HANNAM, M. L. et al. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 779-784, 2010. doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere. 2009.12.049.

HARTL, M. G. J. et al. Hepatic biomarkers of sediment-associated pollution in juvenile turbot, Scophthalmus maximus L. **Marine environmental research**, v. 64, n. 2, p. 191-208, 2007. doi: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2007.01.002.

HUANG, X. et al. Oxidative stress induced by titanium dioxide nanoparticles increases under seawater acidification in the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. **Marine environmental research**, v. 137, p. 49-59, 2018. doi: https://doi.org/10.1016/j. marenvres.2018.02.029.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Localidades afetadas. Disponível em: <a href="http://www.ibama.gov.br/phocadownload/emergenciasambientais/2019/manchasdeoleo/2019-11-24\_localidades\_afetadas.pdf">http://www.ibama.gov.br/phocadownload/emergenciasambientais/2019/manchasdeoleo/2019-11-24\_localidades\_afetadas.pdf</a>>. Acesso em: 25/10/2021.

JAFARABADI, A. R. et al. First report of bioaccumulation and bioconcentration of aliphatic hydrocarbons (AHs) and persistent organic pollutants (PAHs, PCBs and PCNs) and their effects on alcyonacea and scleractinian corals and their endosymbiotic algae from the Persian Gulf, Iran: inter and intra-species differences. **Science of the total environment**, v. 627, p. 141-157, 2018. doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01. 185.

JAFARABADI, A. R. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the non-bleached and bleached corals and their ambient environment: The role of suspended particulate matter, mucus, and positive matrix factorization model for identifying contributions to the carcinogenicity of PAH sources. **Science of the Total Environment**, v. 787, p. 147688, 2021. doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021. 147688.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207-221, 2008. doi: https://doi.org/10.1093/mutage/gen014. KAFILZADEH, F. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water and sediments of the Kor River, Iran. **Middle-East journal of scientific research**, v. 10, n. 1, p. 01-07, 2011. ISSN 1990-9233.

KALOYIANNI, M. et al. Oxidative effects of inorganic and organic contaminants on haemolymph of mussels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 4, p. 631-639, 2009. doi: https://doi.org/10. 1016/j.cbpc.2009.01.006.

KO, F. C.; CHANG, C. W.; CHENG, J. O. Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons in coral tissues and the ambient sediments from Kenting National Park, Taiwan. **Environmental Pollution**, v. 185, p. 35-43, 2014. doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.025.

LATIMER, J. S.; ZHENG, J. The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. **PAHs: an ecotoxicological perspective**, p. 7-33, 2003. doi: 10.1002/0470867132.

LEE, H. J. et al. Temporal and geographical trends in the genotoxic effects of marine sediments after accidental oil spill on the blood cells of striped beakperch (*Oplegnathus fasciatus*). **Marine pollution bulletin**, v. 62, n. 10, p. 2264-2268, 2011. doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.07.008.

LEMOS, N. G. et al. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 19, n. 2, p. 197-201, 2005. doi: https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.03.011.

LESSER, M. P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 68, p. 253-278, 2006. doi: 10.1146/annurev. physiol.68.040104.110001.

LOURENÇO, R. A. et al. Mysterious oil spill along Brazil's northeast and southeast seaboard (2019–2020): Trying to find answers and filling data gaps. **Marine Pollution Bulletin** 156, 111219. 2020. doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111219.

LOYA, Y.; RINKEVICH, B. Effects of oil pollution on coral reef communities. Marine **Ecology Progress Series**, v. 3, n. 16, p. 180, 1980.

MALLMANN, D. et al. Classificação morfodinâmica das praias arenosas de Ipojuca (Pernambuco, Brasil) através da análise semântica de imagens de satélite pancromáticas. **Pesquisas em Geociências**, v. 41, n. 2, p. 169-189, 2014. doi: https://doi.org/10.22456/ 1807-9806.78094.

MARINHA DO BRASIL - MB. Combate às Manchas de Óleo | Marinha do Brasil. 2020. URL: https://www.marinha.mil.br/manchasdeoleo. Acesso em: 29/06/20.

MARINHA DO BRASIL - MB. Nota à imprensa - Ressurgimento de vestígios de óleo. 2020b. Disponível em: <a href="https://www.marinha.mil.br/sites/default/files/nota\_a\_">https://www.marinha.mil.br/sites/default/files/nota\_a\_</a> imprensa oleo pe al.pdf>. Acesso em: 14/05/2024.

MARTINS, K. A. Serviços ecossistêmicos de ambientes recifais costeiros do litoral de Pernambuco. 124 p., 2020. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco.

MARTINS, M. et al. Comparative DNA damage and oxidative effects of carcinogenic and non-carcinogenic sediment-bound PAHs in the gills of a bivalve. **Aquatic toxicology**, v. 142, p. 85-95, 2013. doi: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.07.019.

MEADOR, J. P. Bioaccumulation of PAHs in marine invertebrates. PAHs: An

ecotoxicological perspective, p. 147-171, 2003. doi: 10.1002/0470867132.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. Gerência de Biodiversidade Aquática e Recursos Pesqueiros. **Panorama da conservação dos ecossistemas costeiros e** 

**marinhos no Brasil.** Brasília: MMA/SBF/GBA, p.148, 2010. Disponível em: https://ciencia.estadao.com.br/blogs/herton-escobar/wp-content/uploads/sites/81/2018/0

2/205\_publicacao03022011100749.pdf. Acesso em: 17/06/2022.

MIRANDA, R. J. et al. Oil Spill Disaster in Southwest Atlantic Coast: an Evaluation of Short-Term Effects on Coral Reef Benthic Assemblages. 2022. Anais da Academia

Brasileira de Ciências, 94. doi: 10.1590/0001- 3765202220210401.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2, p.

**Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2, p. 135-147, 1998. doi: https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00252-2.

MUÑOZ-VERA, A.; GARCÍA, G.; GARCÍA-SÁNCHEZ, A. Metal bioaccumulation pattern by *Cotylorhiza tuberculata* (Cnidaria, Scyphozoa) in the Mar Menor coastal lagoon (SE Spain). Environmental Science and Pollution Research, v. 22, p. 19157-19169, 2015. doi: https://doi.org/10.1007/s11356-015-5119-x.

NIEHAUS J. R. W. G.; SAMUELSSON, B. Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. **European journal of** 

**biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 126-130, 1968. doi: https://doi.org/10.1111/j.1432-1033. 1968.tb00428.x.

OLIVEIRA, A. F. B. et al. A Multi-Geochemical Characterization to Evaluate Anthropogenic Contamination in Marine Sediments from Port of Suape, Northeast of Brazil. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 35, n. 4, p. e-20230154, 2024. doi: https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230154.

OLIVEIRA, T. R. S. et al. Benthic foraminifera of tropical estuarine-lagoonal-bays system, in the suape harbor, Brazil: a case study. **Journal of Foraminiferal Research**, v. 52, n. 1, p. 4-20, 2022. doi: https://doi.org/10.2113/gsjfr.52.1.4.

PENA, P. G. L. et al. The crude oil spill on the Brazilian coast in 2019: the question of public health emergency. **Cadernos de Saúde Pública,** v. 36, p. e00231019, 2020; doi: https://doi.org/10.1590/0102-311X00231019.

QUINLAN, G. J. et al. Action of lead (II) and aluminium (III) ions on iron-stimulated lipid peroxidation in liposomes, erythrocytes and rat liver microsomal fractions.

**Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 962, n. 2, p. 196-200, 1988. doi: https://doi.org/10.1016/0005-2760(88)90159-2.

RABELO, E. F. et al. Competitive interactions among zoanthids (Cnidaria: Zoanthidae) in an intertidal zone of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 61, p. 35-42, 2013.

REDDY, C. M. et al. Synergy of Analytical Approaches Enables a Robust Assessment of the Brazil Mystery Oil Spill. **Energy and Fuels,** v. 36, n. 22, p. 13688-13704. 2022. doi:10.1021/acs.energyfuels.2c00656.

ROCHA, R. J. M. et al. Do microplastics affect the zoanthid Zoanthus sociatus?. **Science of The Total Environment**, v. 713, p. 136659, 2020. doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv. 2020.136659.

ROVETA, C. et al. Biomonitoring of heavy metals: the unexplored role of marine sessile taxa. **Applied Sciences**, v. 11, n. 2, p. 580, 2021. doi: https://doi.org/10.3390/app11020580.

SANTANA, E. F. C. et al. Trophic ecology of the zoanthid Palythoa caribaeorum (Cnidaria: Anthozoa) on tropical reefs. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 95, n. 2, p. 301-309, 2015. doi: https://doi.org/10.1017/S0025315414001726.

SCHROEDER, J. O. et al. Barium in equatorial Pacific carbonate sediment: Terrigenous, oxide, and biogenic associations. **Paleoceanography**, v. 12, n. 1, p. 125-146, 1997. doi: https://doi.org/10.1029/96PA02736.

SHEEDY, B. R. et al. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons by the freshwater oligochaete *Lumbriculus variegatus*. **Chemosphere**, v. 36, n. 15, p. 3061-3070, 1998. doi: https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00007-1.

SHIGENAKA, G. Oil Spills in Coral Reefs: Planning and response considerations. **National Oceanic and Atmospheric Administration, National Ocean Service** (Washington DC), 84 pp. 2010.

SILVA, J. F. et al. Growth of the tropical zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) on reefs in northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 985-996, 2015. doi: https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140475.

SLOBODSKOVA, V. V. et al. Evaluation of DNA damage in the marine mussel Crenomytilus grayanus as a genotoxic biomarker of pollution. **Journal of Ocean University of China**, v. 18, p. 159-164, 2019. doi:

https://doi.org/10.1007/s11802-019-3573-7.

SOARES, E. C. et al. Oil impact on the environment and aquatic organisms on the coasts of the states of Alagoas and Sergipe, Brazil-A preliminary evaluation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 171, p. 112723, 2021. doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul. 2021.112723.

SOARES, M. O.; RABELO, E. F. Severe ecological impacts caused by one of the worst orphan oil spills worldwide. **Marine Environmental Research**, p. 105936, 2023. doi: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.105936

STEBBING, A. R. D. Tolerance and hormesis—increased resistance to copper in hydroids linked to hormesis. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3-5, p. 805-809, 2002. doi: https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00119-8.

SUCHANEK, T. H.; GREEN, D. J. Interspecific competition between Palythoa caribaeorum and other sessile invertebrates on St. Croix reefs, US Virgin Islands. In:

**Proceedings of the 4th international coral reef symposium**. 1981. p. 679-684. SUN, S. et al. The toxic impacts of microplastics (MPs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on haematic parameters in a marine bivalve species and their potential mechanisms of action. **Science of the Total Environment**, v. 783, p. 147003, 2021. doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147003.

TABAN, I. C. et al. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. **Marine environmental research**, v. 58, n. 2-5, p. 701-705, 2004. doi: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.018.

TARRANT, A. M. et al. Activation of the cnidarian oxidative stress response by ultraviolet radiation, polycyclic aromatic hydrocarbons and crude oil. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 9, p. 1444-1453, 2014; doi: https://doi.org/10. 1242/jeb.093690.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.206-221, 2000. doi: http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:33.0.co;2-j.

WEBER, L. et al. Genotoxic effects of the water-soluble fraction of heavy oil in the brackish/freshwater amphipod Quadrivisio aff. lutzi (Gammaridea) as assessed using the comet assay. **Ecotoxicology**, v. 22, p. 642-655, 2013. doi: https://doi.org/10.1007/s10646-013-1055-z.

WOO, S. et al. Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Marine pollution bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1768-1775, 2006. doi: https://doi.org/10. 1016/j.marpolbul.2006.08.027.

XIANG, N. et al. Occurrence and distribution of Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seawater, sediments and corals from Hainan Island, China. **Ecotoxicology and environmental safety**, 152, 8-15. 2018. doi: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018. 01.006.

YANG, T. et al. Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals (HMs) in corals, sediments and seawater from coral reefs of Hainan, China. **Environmental Pollution**, v. 264, p. 114719, 2020. doi: 10.1016/j.envpol. 2020.114719.

YANG, G. P.; ZHENG, X. Estudos sobre os comportamentos de sorção do fenantreno em sedimentos marinhos. **Toxicologia e química ambiental**, v. 29, n. 10, pág. 2169-2176, 2010.

ZANATTA, A. Neurochemical evidence that the metabolites accumulating in 3methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency induce oxidative damage in cerebral cortex of young rats. **Cell Mol Neurobiol.**, v. 33, p. 137-46, 2013. doi: https://doi.org/10.1007/s10571-012-9879-2.

ZHANG, Haijiang et al. New diagnostic ratios based on phenanthrenes and anthracenes for effective distinguishing heavy fuel oils from crude oils. **Marine Pollution Bulletin**, v. 106, n. 1-2, p. 58-61, 2016. doi:https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.036.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela S1.** Correlação entre os componentes da PCA para os organismos (a) e para os sedimentos (b) e cada elemento.

a	Element	Correlation	p value		
	Ba	0.9139058	1.798186e-14		
	Cd	0.8647014	2.137100e-11		
	Pb	0.7713102	5.868202e-08		
Component 1	As	0.7697187	6.494950e08		
	V	0.7456285	2.753116e-07		
	Мо	0.3839049	2.280068e-02		
	Cu	-0.4494578	6.754934e-03		
	Cu	0.8483531	1.235409e-10		
	As	0.5327930	9.840249e-04		
Component 2	Pb	- 0.4803247	3.496689e-03		
	Ti	- 0.9026535	1.252609e-13		
b	Element	Correlation	p value		
	Cu	0.8297503	7.200839e-10		
<b>C</b> (1	Ni	0.7948055	1.186271e-08		
Component I	Co	0.5228544	1.270947e-03		
	Al	-0.8887724	1.015857e-12		
	Ba	0.6918150	4.168392e-06		
Component 2	Cu	0.3662211	3.048685e-02		

As = Arsênio; Ba = Bário; Cd = Cádmio; Co = Cobalto; Cu = Cobre; Mo = Molibdênio; Ni = Níquel; Pb = Chumbo; Ti = Titânio; V = Vanádio.

# **TERCEIRO MANUSCRITO**

Toxicidade experimental aguda de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) do

óleo cru ao zoantídeo Palythoa variabilis (Duerden, 1898)

Artigo a ser submetido na revista Journal of Experimental Biology (https://journals.biologists.com/jeb/pages/manuscript-prep). Qualis: A2.

#### RESUMO

Os recifes são ecossistemas de alta diversidade que abrigam muitas espécies de invertebrados os quais atuam na sustentação e manutenção da biodiversidade. Zoantídeos são animais abundantes nos recifes brasileiros e desempenham papeis fundamentais nas teias alimentares e dinâmica da comunidade. No entanto, os recifes estão sujeitos a poluentes, como derramamentos de óleo, que induzem impactos letais e subletais aos cnidários. Contaminantes do petróleo podem levar à produção de espécies reativas de oxigênio, gerando estresse oxidativo e impactos genéticos na forma de quebra de fitas de DNA em animais expostos de forma aguda. Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar, experimentalmente, o efeito agudo da exposição ao óleo cru sobre a sobrevivência, comportamento, morfologia, geração de estresse oxidativo e genotoxicidade em Palythoa variabilis. Para tal, pólipos foram coletados em recifes de Serrambi (PE) e aclimatados por uma semana. Para a preparação da WAF, a água do mar filtrada e o óleo cru foram agitados magneticamente. Os organismos foram expostos à WAF por 96 horas em tratamentos de 25%WAF, 12,5%WAF e grupo controle, sob condições controladas. Cada tratamento continha quatro réplicas com 24 fragmentos provenientes de, ao menos, seis colônias. Após 96 h de exposição, os organismos foram processados para análises de estresse oxidativo e genotoxicidade através do ensaio cometa. Ao final do experimento, a mortalidade de pólipos foi de 1% e em todos os aquários havia pólipos que apresentaram retração e interrupção do comportamento normal (discos orais fechados e tentáculos cobertos). Apesar disso, a morfologia externa dos pólipos continuou a mesma durante o experimento e não houve alterações entre os tratamentos. O conteúdo de MDA, índice de dano genético (ID) e frequência de dano genético (FD) apresentaram maiores concentrações médias de forma dose-dependente. O conteúdo de proteínas carboniladas nos zoantídeos apresentou maiores concentrações nos animais expostos à 25%WAF. Não houve diferença significativa nos níveis de sulfidrilas e GSH entre os três tratamentos. As concentrações médias das enzimas antioxidantes SOD e CAT reduziram nos grupos tratados com WAF. Assim, a exposição experimental aguda a HPAs do petróleo induz alterações comportamentais, estresse oxidativo e danos genéticos subletais a P. variabilis. Estes resultados contribuem para entender os danos do derramamento de óleo sobre organismos chaves para o funcionamento dos recifes brasileiros.

Palavras-chave: Comportamento. Ensaio cometa. Estresse oxidativo. Fração de óleo acomodada em água. Petróleo.

#### ABSTRACT

Reefs are highly diverse ecosystems that harbor many species of invertebrates which play a crucial role in supporting and maintaining biodiversity. Zoanthids are abundant animals in Brazilian reefs and play fundamental roles in food webs and community dynamics. However, reefs are susceptible to pollutants such as oil spills, which induce both lethal and sublethal impacts on cnidarians. Petroleum contaminants can lead to the production of reactive oxygen species, causing oxidative stress and genetic impacts in the form of DNA strand breaks in animals acutely exposed. Therefore, the present study aims to experimentally assess the acute effect of crude oil exposure on the survival, behavior, morphology, generation of oxidative stress, and genotoxicity in *Palythoa variabilis*. For this purpose, polyps were collected from Serrambi reefs (PE) and acclimated for one week. To prepare the Water Accommodated Fraction (WAF), filtered seawater and crude oil were magnetically stirred. Organisms were exposed to WAF for 96 hours in treatments of 25%WAF, 12.5%WAF and control group under controlled conditions. Each treatment contained four replicates with 24 fragments from at least six colonies. After 96 hours of exposure, organisms were processed for oxidative stress and genotoxicity analyses using the comet assay. At the end of the experiment, polyp mortality was 1%, and in all tanks polyps showed retraction and interruption of normal behavior (closed oral discs and covered tentacles). However, the external morphology of the polyps remained the same during the experiment without differences between treatments. MDA content, DNA damage indices (DI), and frequencies of DNA damage (DF) showed higher average concentrations in a dose-dependent manner. The content of carbonylated proteins in zoanthids showed higher concentrations in animals exposed to 25%WAF. There was no significant difference in levels of sulfhydryls and GSH between the three treatments. The average concentrations of the antioxidant enzymes SOD and CAT decreased in groups treated with WAF. Thus, acute experimental exposure to petroleum PAHs induces behavioral changes, oxidative stress, and sublethal genetic damage to P. variabilis. These results contribute to understanding the damage caused by oil spills on key organisms essential for the functioning of Brazilian reefs.

**Keywords:** Behavior. Comet assay. Morphology. Oxidative stress. Petroleum. Water accommodated Fractions (WAF).

### 1 INTRODUÇÃO

Recifes tropicais são ecossistemas de alta diversidade e produtividade (SOARES e RABELO, 2014) que oferecem locais de refúgio, desova, criação, alimentação e reprodução para muitas espécies. Os grupos que interagem com recifes são essenciais para a manutenção da resiliência desses ecossistemas ao desempenhar suas funções (MOBERG e FOLKE, 1999). Os invertebrados, como cnidários, desempenham tarefas estruturais e funcionais nos recifes, atuando na sustentação e manutenção da biodiversidade, visto que abrigam outros animais e formam a base de cadeias alimentares (BLACKBURN *et al.*, 2014).

Especificamente, zoantídeos (Cnidaria: Anthozoa: Zoantharia) são importantes em ecossistemas recifais pela transferência de biomassa fixada e são fundamentais para os fluxos de energia e teias tróficas marinhas (SANTANA *et al.*, 2015). Zoantídeos podem ocupar até 50% da superfície de um recife, demonstrando sua elevada abundância (ACOSTA e GONZALEZ, 2007), detêm alta plasticidade, capacidade de adaptação e resiliência a estressores, fatores que lhes conferem relevância para a avaliação do efeito de estressores antropogênicos (ROCHA *et al.*, 2020). Vários são os serviços ecossistêmicos fornecidos pelos recifes e suas comunidades (CESAR, 1996), contudo estão sendo degradados e sujeitos a poluentes como derramamentos de óleo, que representam impactos nas comunidades de invertebrados (FERRANDO *et al.*, 2015).

O petróleo é constituído por hidrocarbonetos (TONINI *et al.*, 2010), classificados como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e hidrocarbonetos alifáticos; componentes organometálicos (VAN HAMME *et al.*, 2003); e voláteis (PENA *et al.*, 2020). Os HPAs são compostos que estão presentes na fração de óleo acomodada em água (WAF), e são formados por dois ou mais anéis de benzeno fundidos (DISNER e TORRES, 2020). Os HPAs em ambiente natural causam danos aos organismos (HONDA e SUZUKI, 2000) e são compostos críticos em termos de impactos ambientais, assim, a toxicidade do óleo é diretamente relacionada à proporção de HPAs presentes (SUCHANEK, 1993).

O principal efeito agudo do óleo nos organismos de um ambiente recifal é a mortalidade por asfixia (NADEAU e BERGQUIST, 1977). Quando não ocorre mortalidade, as funções de cnidários mais comumente alteradas são: reprodução, crescimento, alimentação, movimento, resposta ao estímulo e suscetibilidade a doenças (SUCHANEK, 1993), além da quimiorrecepção e do comportamento quimicamente mediado (BLUMER *et al.*, 1971). Devido ao hábito alimentar, cnidários bioacumulam hidrocarbonetos (GALVAN,
2015), com a absorção pelas zooxantelas, que são expelidas (SHIGENAKA, 2010), iniciando o desenvolvimento de manchas e branqueamento (BLACKBURN *et al.*, 2014).

Mudanças na condição celular de cnidários após a exposição aguda ao óleo incluem lesões consistentes com o perfil patológico da interação com HPAs e alterações nas proporções de proteínas e lipídios (BENSON e MUSCATINE, 1974). Adicionalmente, são induzidos danos ao sistema reprodutivo (RINKEVICH e LOYA, 1977), produção excessiva de muco (REIMER, 1975), danos à alimentação e respostas táteis alteradas (LOYA e RINKEVICH, 1979; 1980).

Outras formas pelas quais o óleo cru e os HPAs afetam cnidários consistem em alterações na expressão gênica e atividade enzimática. Contaminantes presentes no petróleo podem levar à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem danificar o DNA celular, lipídios, proteínas e atividade enzimática (LESSER, 2006), gerando o estresse oxidativo, o qual leva ao dano celular (TARRANT *et al.*, 2014). Adicionalmente, é possível notar impactos genéticos como quebras de fitas de DNA em animais expostos ao óleo, que estão diretamente relacionadas com a capacidade de eliminação de oxiradicais das células e com o estresse oxidativo (JHA, 2008).

A adoção de um sistema integrado de abordagem fornece indicações sobre riscos associados às condições ambientais (FRENZILLI *et al.*, 2001) e análises experimentais fornecem dados sobre impactos de derramamentos de óleo em ambientes recifais, que prevêem os danos em campo (TURNER *et al.*, 2021), mesmo com a existência de limitações que não exatamente replicam as condições do ambiente natural. Assim, análises experimentais fornecem informações importantes que subsidiam a gestão e intervenção em futuros derramamentos de óleo (FROMETA *et al.*, 2017), pois avaliam o risco multifacetado em ecossistemas de recifes que estão cada vez mais vulneráveis (DE LEO *et al.*, 2015).

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar, experimentalmente, o efeito agudo da exposição ao óleo cru sobre a sobrevivência, comportamento, morfologia, geração de estresse oxidativo e genotoxicidade em *Palythoa variabilis* (Duerden, 1898).

# 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e manutenção dos organismos

Amostras de pólipos e fragmentos de colônias de *Palythoa variabilis* (n = 288) foram coletadas em grupos de colônias diferentes, de modo que, posteriormente, cada aquário tivesse indivíduos oriundos de seis colônias diferentes evitando o uso de clones. Os pólipos

foram coletados utilizando-se espátulas e pinças de metal e acondicionadas em recipientes de vidro. As coletas foram realizadas no dia 02 de agosto de 2023 em ambiente recifal da praia de Serrambi, localizada na costa nordeste do Brasil, no estado de Pernambuco, situada no município de Ipojuca (8°33'21"S e 35°00'21"W), cerca de 70 km ao sul da cidade do Recife (Figura 1). No local, os parâmetros abióticos foram mensurados e registrados com o uso de sonda multiparâmetro.



Figura 1. Local de coleta na praia de Serrambi, Ipojuca - PE.

Fonte: Google Earth (2023).

No laboratório, os organismos foram mantidos em aquários para aclimatação em água do mar (coletada no mesmo local), sem ser alimentados, com aeração e iluminação UV em fotoperíodo de 12 h. Os fragmentos de colônias dos zoantídeos foram cortados a fim de individualizar os pólipos, os quais foram colados com uma quantidade mínima de cola de cianoacrilato atóxica (p. ex. RENEGAR *et al.*, 2016; TURNER *et al.*, 2021) sobre pastilhas de vidro para manter a posição dos indivíduos nos aquários.

O tempo de aclimatação para *P. variabilis* foi de uma semana, visto que sofreram estresse durante o processamento devido aos cortes dos pólipos. Durante a aclimatação, o pH, a salinidade e a temperatura da água foram monitorados utilizando sonda multiparâmetro a cada 24 h e mantidos em torno dos níveis registrados em ambiente natural ( $8,27 \pm 0,11$ ;  $35,05 \pm 1,31$  psu;  $26,27 \pm 1,61$ °C, respectivamente), assim como os níveis de amônia tóxica foram monitorados e, quando necessário, foi adicionado estabilizador de amônia à água. Após a aclimatação/recuperação, os organismos foram testados quanto à salubridade e vitalidade de

acordo com metodologia adaptada de Elgershuizen e De Kruijf (1976), em que os zoantídeos são considerados saudáveis quando ao menos 50% dos pólipos estão estendidos.

### 2.2 Preparação e análise da WAF

O óleo utilizado para o experimento foi doado pela Petrobras. Previamente ao início dos experimentos, foi preparada a WAF (*Water Accommodated Fraction*) de acordo com metodologia adaptada de Frometa *et al.* (2017), em que 10 L de água do mar filtrada em malha de 20 micras foi adicionada em frasco de vidro e agitada magneticamente até criar um vórtice de cerca de 20% da altura do frasco, onde foram adicionados 50 g do petróleo cru. A velocidade de agitação foi então aumentada para criar um vórtice atingindo aproximadamente 25% da altura da solução, que foi agitada por 18 h e deixada em repouso por 3 h. Após esse tempo, a solução foi adicionada em funil de separação (MAY *et al.*, 2020) e deixada por 15 minutos em repouso e a solução sob a camada de óleo foi dispensada em recipiente de vidro. Essa solução estoque (força total) foi diluída com água do mar proveniente do local previamente filtrada para uso nos experimentos. Com base em análise da literatura, foram escolhidas concentrações subletais de 25% e 12,5% da solução de WAF força total.

Para avaliar a concentração de HPAs nas WAFs e a efetividade das diluições, amostras de 1 L de cada solução de WAF (100%, 25% e 12,5%) e 4 L da água do mar do local de coleta filtrada (controle) foram estocadas em vidro âmbar para análise da assinatura de HPAs. As amostras de 1 L de WAF foram extraídas com 20 mL de n-hexano (grau pesticida); sobre as amostras foram adicionados 100  $\mu$ L de uma mistura de HPAs deuterados (acenafteno-d10, fenantreno-d10 e criseno-d12, em concentração de 1000 ng mL-1) atuando como padrões surrogados (MÜLLER *et al.*, 2021). Cada frasco contendo as amostras foi agitado vigorosamente por 2 minutos e, após 5 minutos, a fase orgânica foi separada e concentrada em 1 mL em sistema de evaporação rotativo. Na sequência, uma alíquota de 100  $\mu$ L dos padrões deuterados fluoreno-d10, benzo[a]antraceno-d12 e benzo[a]pyrene-d12 (Absolute Standards INC), 1000 ng mL-1, foi adicionada em cada extrato, como padrão interno para o cálculo da recuperação dos surrogados.

Os 16 HPAs prioritários e os homólogos alquilados dos naftalenos, fluorenos, fenantreno + antracenos, fluorantenos + pirenos e benzo[a]antracenos + crisenos foram analisados e quantificados em sistema de cromatografía a gás (Agilent Technologies, modelo 7820A GC System) acoplado à um detector de espectrometria de massas (Agilent technologies 5975 Series MSD) no modo de monitoramento de íon selecionado. Os detalhes da parte instrumental e analítica estão descritos em Arruda-Santos *et al.* (2018) e

Zanardi-Lamardo *et al.* (2019). A recuperação dos surrogados variou de 51,3 a 110%, que são valores aceitáveis pela comunidade científica (LAUENSTEIN e CANTILLO, 1998). O limite de quantificação (LOQ) foi 0,25 ng L-1 para todos os analitos.

## 2.3 Desenho Experimental e condições de teste

Os indivíduos de *P. variabilis* foram expostos à fração do óleo acomodada em água -WAF (FROMETA *et al.*, 2017) por 96 horas em três tratamentos: 25%WAF, 12,5%WAF e grupo controle, com apenas água do mar do local de coleta, filtrada (NEGRI *et al.*, 2021). Cada tratamento continha 4 réplicas (aquários) com 24 pólipos provenientes de, ao menos, seis colônias diferentes. Os zoantídeos foram posicionados em aquários de vidro de 4 L, contendo as soluções de teste (Figura 2).





As exposições foram estáticas e a solução de teste não foi renovada durante o experimento. Os animais foram mantidos a pH  $8,26 \pm 0,03$ ;  $35,3 \pm 1,66$  psu;  $24,6 \pm 0,12$ °C com aeração fornecida por compressor de ar eletromagnético, monitorados através de testes de pH para aquários marinhos, refratômetro e termômetro digital, a cada 24 h durante o experimento e mantidos em iluminação artificial ultravioleta de LED.

Após 96 h de exposição aguda ao óleo cru, os pólipos foram removidos de cada aquário e processados em laboratório, de acordo com os procedimentos adequados para cada espécie e análise. As informações sobre o processamento estão dispostas na Tabela 1.

Análise	Número amostral ou Massa	Acondicionamento
Análises morfológicas	n = 24	Álcool 70%
Estresse oxidativo	4 pool de 6 g/tratamento	Tubo Falcon Congelados a -20°C
Genotoxicidade (ensaio cometa)	8 indivíduos/tratamento (n = 24)	Processados in vivo

**Tabela 1.** Número amostral ou massa de pólipos de *Palythoa variabilis* e forma de acondicionamento das amostras para cada análise realizada.

## 2.4 Análises morfológicas e comportamentais

A cada 24 h de exposição aguda ao óleo, todos os organismos de *P. variabilis* foram avaliados visualmente quanto ao aparecimento de manchas (MAY *et al.*, 2020; DE LEO *et al.*, 2015), anomalias morfológicas e alterações na coloração (TURNER *et al.*, 2021). Também foram observadas alterações comportamentais na extensão dos pólipos, de acordo com metodologia de Turner *et al.* (2021) e na abertura dos discos orais. Após a exposição, 20 pólipos foram avaliados morfologicamente e, para isso, a espessura das camadas teciduais (epiderme, mesogleia e gastroderme) e da faringe dos zoantídeos (n = 20) foram medidas através do uso de lente ocular milimetrada acoplada em estereomicroscópio (Figura 3).

**Figura 3.** Lente ocular milimetrada para medir as camadas teciduais (a) e faringe (b) dos pólipos de *Palythoa variabilis*.



Ep = Epiderme; Me = Mesogleia; Ga = Gastroderme.

### 2.5 Análises de estresse oxidativo

2.5.1 Homogeneização das amostras, extração e dosagem de proteínas

As amostras de zoantídeos foram maceradas de maneira mecânica em um tubo contendo tampão de extração. Para a extração de proteínas, as amostras foram homogeneizadas em tampão de extração (solução Tris Base 50 mM, pH 7,4; com adição do inibidor de fosfatases ortovanadato de sódio 1 mM, inibidor de proteases PMSF 2 mM e detergente não iônico e não desnaturante Nonidet 1 mM). Em seguida, foram centrifugadas a

15.000 g, durante 15 min a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi submetido a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida de absorbância do complexo proteína-corante em comprimento de onda de 595 nm. Assim, a absorbância é diretamente proporcional à concentração de proteínas na solução analisada, onde a solução de albumina de soro bovino (BSA) a 2 mg/mL foi utilizada como padrão.

### 2.5.2 Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo

Para a avaliação da oxidação de lipídios foram analisados os níveis de malondialdeído (MDA), substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), através da técnica colorimétrica de Buege e Aust (1978). As amostras de 300 µg de proteína foram misturadas com 30% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e um tampão TRIS 10 mM, pH 7,4. Esta mistura foi centrifugada a 1180 g, durante 10 min e o sobrenadante foi fervido durante 15 min com 0,73% (p/v) de ácido tiobarbitúrico. O pigmento rosa produzido foi medido a 535 nm de absorção por um espectrofotômetro visível Biochrom Libra S12 (Biochrom, EUA) à temperatura ambiente e os resultados expressos em µg/mg de proteína.

Os níveis de carbonilas para avaliação da oxidação de proteínas foram mensurados segundo Zanatta *et al.* (2013). Com as amostras de 300 µg de proteína em gelo, 30% (p/v) de TCA foi adicionado à amostra e centrifugado por 15 min a 1180 g. O sedimento foi ressuspenso em 10 mM 2.4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) e imediatamente incubado no escuro por 1h, centrifugado duas vezes em tampão de 1:1 etila/acetato. O sedimento final foi ressuspenso em 6 M de cloridrato de guanidina, em seguida, a absorbância lida a 370 nm (37°C) utilizando espectrofotômetro visível Biochrom Libra S12 (Biochrom, USA). Os resultados foram expressos em  $\mu$ M/mg de proteína.

O conteúdo de tiois totais para dosagem de sulfidrilas (-SH) foi determinado a partir da reação com o composto DTNB (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico). A alíquota do homogenato (300 µg de proteína) foi incubada no escuro com 30 µL de DTNB 10 mM e 1 mL de tampão de extração. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro LIBRA S12 UV/VISIBLE a 412 nm. Os resultados foram expressos em M/mg de proteína (ELLMAN, 1959).

### 2.5.3 Avaliação do sistema antioxidante enzimático

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Misra e Fridovich (1972). Para a avaliação da atividade da SOD

foi adicionado o homogenato de 100 µg de proteína a um tampão de carbonato 0,05 M com EDTA 0,1 mM, pH 10,2. A ação foi iniciada com epinefrina 150 mM e a atividade da SOD determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina a 30°C. A redução da absorbância foi monitorada através de espectrofotômetro durante 1,5 min, a 480 nm e os resultados expressos como U/mg de proteína. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína necessária para inibir a auto-oxidação de 1 µmol de epinefrina por minuto.

A avaliação da atividade da enzima Catalase (CAT) foi realizada como descrito por Aebi (1984), baseado na determinação da constante de decomposição de  $H_2O_2$ . Assim, 0,3 M de  $H_2O_2$  foi adicionado à amostra de 50 g de proteína para os zoantídeos, seguido de adição do tampão fosfato 50 mM, pH 7.0, a 20°C. A absorção de decaimento foi monitorada por 1,5 min a 240 nm em espectrofotômetro Biochrom Libra S12 Visible-USA. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de catalase foi definida como a quantidade de proteína requerida para converter 1 µmol de  $H_2O_2$  em H2O por minuto.

A atividade da Glutationa-S-Transferase (GST) foi realizada em cubeta de quartzo onde foi adicionado 1 mL da amostra (100 µg de proteína) ao tampão fosfato (0.1 M) e EDTA (1 mM), GSH (1 mM) e CDNB (1 mM). A absorbância de 340 mm foi registrada por aproximadamente 1,5 min com controle da temperatura (30°C), em espectrofotômetro Biochrom Libra S12 Visible-USA. Os resultados foram expressos em U/mg proteína. Uma unidade de atividade enzimática da GST foi definida como a quantidade necessária para catalisar a formação de 1 µmol do composto DNP-SG por minuto (HABIG *et al.*, 1974).

### 2.6 Análises de genotoxicidade - Ensaio cometa alcalino

As análises genotóxicas foram realizadas através da técnica da eletroforese celular em microgel, ou ensaio cometa, de acordo com o protocolo de Tice *et al.* (2000), em que é obtida uma suspensão de células e são preparadas lâminas com as células em agarose, que são lisadas para liberar DNA e expostas a álcalis (pH>13) para obter DNA de fita simples. Subsequentemente é realizada a eletroforese sob condições alcalinas (pH>13), a neutralização do álcali, a coloração do DNA e a visualização e pontuação dos cometas.

Foram utilizadas lâminas para microscopia onde as células de *P. variabilis* (n = 19) foram homogeneizadas com 100  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (LM, 0,5%), previamente aquecida à 37°C em banho maria. Em seguida, 100  $\mu$ L dessa mistura foram depositados em lâminas cobertas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Após a deposição do material, as lâminas foram cobertas por lamínulas e refrigeradas a 4 °C por 10 min para a solidificação do gel de agarose. Após o resfriamento, as lamínulas foram retiradas

e as lâminas imersas em cubas contendo solução de lise (2.5 M cloreto de sódio [NaCl], 100 mM ácido etilenodiamino tetra-acético [EDTA], 10 mM tris(hidroximetil)aminometano [Tris], 1% Triton X-100, 10% dimetilsulfóxido [DMSO], pH 10, 4°C) por sete dias. Após o tempo de lise, as lâminas foram posicionadas horizontalmente em uma cuba de eletroforese contendo tampão alcalino (1 M NaOH e 200 mM EDTA, pH 13, 4°C), onde permaneceram em repouso por 20 min e, posteriormente, submetidas à eletroforese por 20 min (300 mA/ 32V). As lâminas tiveram o seu pH neutralizado em tampão Tris-HCl (0,4 M Tris - ácido clorídrico [HCl], pH 7,5) durante 15 min e foram fixadas em álcool absoluto por 5 min. Estas etapas foram realizadas sob iluminação de luz vermelha, a fim de evitar danos genéticos induzidos pela luz. Para a avaliação do dano genético, as lâminas foram coradas com 100 μL do corante laranja de acridina e analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com objetiva de 40x, utilizando o filtro AlexaFluor 488.

Foram analisados 100 nucleoides por amostra, levando em consideração a relação entre a quantidade de DNA presente na cauda do cometa e a quantidade de DNA presente no nucleoide. Assim, cada nucleoide foi classificado em uma das seguintes categorias: 0 (sem dano, sem qualquer migração de DNA); 1 (pouco dano aparente, poucos fragmentos de DNA formando uma pequena cauda); 2 (dano médio, formação de uma cauda de tamanho significativo); 3 (dano intenso, formação de uma cauda muito prolongada) e 4 (dano máximo, pouco DNA presente no nucleoide e cauda muito extensa) (COLLINS *et al.*, 2008). A partir dos resultados de avaliação de cada nucleoide foram calculados o índice de dano (ID), em que os valores podem variar de 0 a 400, a depender do dano genético em cada nucleoide; e a frequência de dano (FD) que representa a diferença entre o número total de nucleoides analisados por amostra e o número de nucleoides que não apresentaram dano genético (categoria 0), utilizando as seguintes equações: ID =  $\sum$ (classe do nucleoide x número de nucleoides na classe); FD = (total de nucleoides) – (nucleoides com dano 0).

## 2.7 Análises dos dados

As análises das WAFs e água do mar foram determinadas de forma descritiva, assim como as medidas morfológicas dos pólipos. Estas últimas foram apresentadas como média e desvio padrão. Para comparação dos dados de estresse oxidativo, foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA One Way seguido do pós-teste de comparações múltiplas Tukey. O nível de significância foi mantido em 5% (p<0,05). Para as análises do índice e frequência de dano genético, foi aplicado o teste de normalidade para determinar se o conjunto de dados

foi modelado por uma distribuição normal. A partir disso, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis (não paramétrico) para determinar a diferença entre os grupos.

# **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 3.1 Análises dos parâmetros de qualidade da água

Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados durante todo o período de 96 horas de experimento e apresentaram-se próximos àqueles encontrados em campo, durante a coleta. A temperatura média dos aquários foi de  $24,54 \pm 0,2$ °C, a salinidade média foi de  $35,38 \pm 2,2$  psu e o pH médio foi de  $8,26 \pm 0,02$ . Esses parâmetros permaneceram estáveis e dentro de faixas aceitáveis em todos os aquários de teste, sem diferenças significativas entre os aquários de tratamento durante o experimento, assim como nos ensaios de Echols *et al.* (2016) e Weinning *et al.* (2020).

### 3.2 Análises das WAFs

O somatório dos HPAs analisados ( $\Sigma$ HPA) na solução estoque (100%WAF) foi de 229,4 ng L-1, sendo mais de três vezes maior do que na 25%WAF (68,1 ng L-1), quase sete vezes maior do que na 12,5%WAF (36,07 ng L-1) e mais de dez vezes maior do que no grupo controle, que apresentou 22,3 ng L-1 de  $\Sigma$ PAH (Tabela 2). O HPA acenaftileno não foi detectado nos grupos tratados e dibenzo[a,h]antraceno foi detectado apenas na maior concentração de WAF (25%WAF). Os HPAs mais abundantes nas WAFs foram naftalenos, fluorenos, fenantrenos e antracenos. No grupo controle foram detectadas baixas concentrações de HPAs que podem ser explicadas pela presença natural desses compostos ou por fontes de atividades antropogênicas, assim os HPAs podem ser transportados para o ambiente marinho por vias aquáticas e/ou aéreas (LAW *et al.*, 1997).

Os principais HPAs presentes em análises de WAF são aqueles de 2 a 5 anéis aromáticos (ver FASKNESS *et al.*, 2008), assim como detectado no presente estudo. Especialmente o naftaleno e seus homólogos apresentam alta concentração e solubilidade em água, apesar disso, são facilmente voláteis, constatando sua capacidade de induzir efeitos tóxicos agudos aos organismos e ao ambiente. Já HPAs de alto peso molecular são pouco representados em amostras de WAF, visto que não se acomodam em água devido a sua capacidade altamente lipofílica. (JIANG *et al.*, 2010). As diferenças nas concentrações indicam níveis de exposição adequados durante o experimento.

Solução	Controle	12,5%WAF	25%WAF	100%WAF
Analito de Interesse				
Naftaleno	5,70	4985,00	8850,00	28694,00
1-Metilnaftaleno	2,20	3355,00	6244,00	20431,00
2-Metilnaftaleno	3,80	4721,00	8698,00	26882,00
C1 Naftalenos	5,90	8076,00	14942,00	47312,00
C2 Naftalenos	2,30	4262,00	8142,00	26625,00
C3 Naftalenos	0,60	2128,00	4132,00	13726,00
C4 Naftalenos	ND	645,00	1301,00	4566,00
Acenaftileno	<lq< td=""><td>ND</td><td>ND</td><td>ND</td></lq<>	ND	ND	ND
Acenafteno	<lq< td=""><td>83,10</td><td>165,00</td><td>564,00</td></lq<>	83,10	165,00	564,00
Fluoreno	0,40	314,00	637,00	2152,00
C1 Fluorenos	0,30	734,00	1492,00	5029,00
C2 Fluorenos	ND	898,00	1798,00	6923,00
C3 Fluorenos	ND	733,00	1636,00	6352,00
Fenantreno	0,90	801,00	1429,00	4807,00
Antraceno	<lq< td=""><td>10,00</td><td>19,00</td><td>96,00</td></lq<>	10,00	19,00	96,00
C1 Fenantrenos + Antracenos	0,30	1168,00	2104,00	7812,00
C2 Fenantrenos + Antracenos	ND	925,00	1800,00	7461,00
C3 Fenantrenos + Antracenos	ND	544,00	1118,00	4570,00
C4 Fenantrenos + Antracenos	ND	234,00	560,00	2252,00
Fluoranteno	<lq< td=""><td>10,80</td><td>21,00</td><td>67,00</td></lq<>	10,80	21,00	67,00
Pireno	<lq< td=""><td>50,30</td><td>94,00</td><td>363,00</td></lq<>	50,30	94,00	363,00
C1 Fluorantenos + Pirenos	ND	162,00	318,00	1379,00
C2 Fluorantenos + Pirenos	ND	219,00	458,00	2023,00
C3 Fluorantenos + Pirenos	ND	249,00	532,00	2361,00
Benzo[a]antraceno	<lq< td=""><td>9,60</td><td>15,00</td><td>78,00</td></lq<>	9,60	15,00	78,00
Criseno	<lq< td=""><td>105,00</td><td>201,00</td><td>775,00</td></lq<>	105,00	201,00	775,00
C1 Benzo[a]antracenos + Crisenos	ND	203,00	402,00	1615,00
C2 Benzo[a]antracenos + Crisenos	ND	237,00	571,00	2263,00
C3 Benzo[a]antracenos + Crisenos	ND	171,00	395,00	1777,00
Benzo[b]fluoranteno	ND	9,00	25,30	116,40
Benzo[k]fluoranteno	ND	3,00	6,40	25,10
Benzo[a]pireno	ND	16,00	31,90	148,00
Indeno[1,2,3-cd]pireno	ND	4,30	12,90	80,60
Dibenzo[a,h]antraceno	ND	ND	3,00	20,60
Benzo[ghi]perileno	ND	5,90	15,00	76,30
Somatório	22,30	36,072	68,167	229,421
∑BPM	22,30	34,617	65,065	216,253
∑APM	0,00	1,456	3,101	13,168

 Tabela 2. Concentrações dos HPAs (ng L-1) nas amostras de controle, 12,5%WAF, 25%WAF e 100%WAF.

Unidade	ng L-1	ng L-1	ng L-1	ng L-1

ND = Não detectado; <LQ = Abaixo do limite de detecção;  $\sum$ APM: Alto peso molecular;

# $\sum$ BPM: Baixo peso molecular.

Entretanto, estas concentrações de HPAs foram mensuradas no início do experimento, podendo reduzir com o passar do tempo de exposição (MAY *et al.*, 2020), refletindo perdas de compostos aromáticos ao longo do tempo. Apesar disso, de acordo com Negri *et al.* (2021), a concentração média ponderada de HPAs é maior em testes estáticos, provavelmente devido à adsorção em sistemas de fluxo contínuo.

## 3.3 Análises morfológicas e comportamentais

Em relação à mortalidade de *P. variabilis*, após as primeiras 48 h de exposição, ocorreu mortalidade de um dos pólipos expostos à 25%WAF e, após as 96 h, de dois pólipos dos aquários de controle e dois pólipos expostos à 12,5%WAF. No entanto, essas mortalidades de zoantídeos foram previamente consideradas, por isso, foram adicionados dois pólipos extras em cada aquário. A mortalidade de pólipos durante o experimento foi de 1%, percentual também observado nos testes de Bytingsvik *et al.* (2020). Os pólipos mortos foram removidos dos aquários com o auxílio de pinça metálica, a fim de manter os mínimos níveis de nitrogênio inorgânico, para que os pólipos vivos não fossem afetados, visto que, nitrato, nitrito e amônia são formados como resultado do metabolismo microbiológico e não devem estar presentes em quantidades detectáveis em aquários, pois são tóxicos para cnidários (DRAZENOVIC e FAGAN, 2015).

Durante o experimento alguns pólipos abriram seus discos orais e ficaram estendidos gradativamente com o passar do tempo. Ao final do experimento, em todos os aquários havia pólipos estendidos, com os discos orais abertos e tentáculos expostos. Os demais apresentaram retração e interrupção do comportamento normal (discos orais fechados e tentáculos cobertos), assim como observado por Turner *et al.* (2021) e May *et al.* (2020) em exposições agudas por 48 e 96 h, respectivamente. Adições de petróleo bruto induzem efeitos prejudiciais à respostas comportamentais, como uma marcada redução no número de tentáculos expandidos (LOYA e RINKEVICH, 1980).

Morfologicamente, a aparência externa de saúde dos pólipos continuou a mesma durante o experimento, tal qual ensaios experimentais realizados por De Leo *et al.* (2016), em que tratamentos com WAF permaneceram com os parâmetros de "saúde" estáveis, enquanto que aqueles com dispersantes foram os que apresentaram "danos à saúde". Após as 96 horas de exposição, a espessura das camadas teciduais (epiderme, mesogleia e gastroderme) dos zoantídeos expostos a 25%WAF se tornaram levemente mais inchadas, em relação às demais, porém sem diferenças consideráveis (Tabela 3). De acordo com Cervino *et al.* (2003), respostas morfológicas teciduais agudas a contaminantes dependem da espessura dos tecidos de cada espécie, assim, cnidários com tecidos mais espessos respondem mais lentamente à exposições agudas, esse resultado pode se relacionar com os resultados para *P. variabilis* no presente trabalho. Além disso, danos mais intensos aos tecidos de cnidários são induzidos sob exposição a hidrocarbonetos de petróleo de forma crônica (p. ex. LOYA e RINKEVICH, 1980) e podem ser melhor visualizadas microanatomicamente.

	Medidas do Pólipo (em mm)			Medidas das Camadas (em mm)			Medidas da Faringe (em mm)	
Iratamentos	Altura	Diâmetro		Ep.	Me.	Ga.	Vertical	Horizontal
		D.O.	Coluna					
	15,0	4,0	1,5	0,80	0,08	0,80	2,72	3,46
	8,0	4,0	2,0	0,48	0,04	0,80	2,04	3,46
	12,0	4,0	2,0	0,64	0,08	0,60	1,36	3,06
	14,5	5,0	2,0	0,40	-	1,00	2,04	4,42
25%WAF	12,5	5,0	2,0	0,60	-	0,80	3,26	4,42
	9,0	4,0	2,0	0,64	-	1,00	1,02	3,74
	10,0	4,0	2,0	0,60	0,12	0,80	1,63	3,40
	6,0	4,0	2,0	0,68	0,04	0,80	1,36	3,60
Média	10,8	4,2	1,9	0,6	0,07	0,8	1,8	3,5
DP	3,1	0,4	0,1	0,1	0,03	0,1	0,7	0,4
12,5%WAF	10,0	3,5	1,5	0,40	0,04	0,40	1,42	3,40
	5,0	1,0	0,5	0,40	0,12	0,40	0,68	1,76
	11,0	4,0	1,0	0,40	0,12	0,20	2,38	2,38
	9,0	4,0	3,0	0,76	0,04	0,40	1,70	3,74
	10,0	5,5	4,0	0,60	-	0,60	2,38	5,10

**Tabela 3.** Medidas morfológicas dos pólipos de *Palythoa variabilis* (em mm) expostos ao óleo cru de forma aguda à 12,5%WAF, 25%WAF e grupo controle.

	5,0	3,5	2,0	0,60	0,04	0,64	1,29	4,08
	13,0	4,5	3,0	0,48	0,2	0,60	2,04	3,46
	7,0	3,5	2,0	0,60	0,04	0,76	1,02	4,08
Média	9,5	3,7	2,1	0,5	0,08	0,5	1,5	3,6
DP	2,8	1,2	1,1	0,1	0,06	0,1	0,6	1,04
Grupo Controle	8,0	2,0	1,5	0,20	0,04	0,32	1,02	2,04
	10,0	4,0	3,5	0,64	0,08	0,28	1,56	3,40
	10,0	3,5	2,0	0,36	0,04	0,40	1,36	2,72
	7,0	3,5	2,0	0,40	0,08	0,44	1,42	3,40
Média	7,0	3,2	1,8	0,4	0,06	0,3	1,3	3,06
DP	1,5	0,8	0,8	0,1	0,02	0,07	0,2	0,6

D.O. = Disco Oral; Ep. = Epiderme; Me. = Mesogleia; Ga. = Gastroderme

#### 3.4 Análises de estresse oxidativo

De modo geral, foi observado um aumento significativo no estresse oxidativo, evidenciado por maiores níveis de peroxidação lipídica e dano oxidativo às proteínas nos organismos expostos às concentrações mais altas de WAF. Além disso, houve uma redução na atividade das enzimas antioxidantes, sugerindo um comprometimento na capacidade de defesa antioxidante dos zoantídeos. Esses resultados indicam que a exposição à WAF, especialmente em concentrações mais elevadas, pode ter efeitos prejudiciais significativos na saúde dos zoantídeos, comprometendo funções celulares e aumentando o estresse oxidativo.

O conteúdo de MDA no tecido do zoantídeo apresentou maior concentração média (896,7  $\pm$  229 µg/mg proteína) quando os organismos foram expostos à maior concentração de WAF (25%WAF), significativamente diferente das médias do grupo controle (544,9  $\pm$  159,4 µg/mg proteína) e do grupo 12,5%WAF (470,8  $\pm$  39,9 µg/mg proteína) (Figura 4a). De acordo com Kteifan *et al.* (2017), as concentrações de MDA, que resultam da oxidação de lipídios, é proporcional ao grau de dano oxidativo induzido por poluentes nas células animais, representando um bom biomarcador para a detecção do estresse oxidativo. Ademais, a exposição a HPAs induz a produção de ROS em organismos aquáticos (WOO *et al.*, 2014), que pode levar a danos celulares em vários níveis (KTEIFAN *et al.*, 2017).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio na relação oxidante/antioxidante, em que o aumento de oxidantes é favorecido, resultando em dano

oxidativo (DOWNS *et al.*, 2002). O metabolismo celular envolve a produção de radicais livres de oxigênio e espécies reativas de oxigênio (ROS), estas últimas são as causadoras de danos oxidativos aos componentes celulares. O ensaio mais utilizado para a determinação da peroxidação de lipídios é o teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em que ocorre a formação de malondialdeído (MDA) como um produto da peroxidação lipídica (VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

**Figura 4.** Níveis de biomarcadores do estresse oxidativo (a, b, c) em  $\mu$ g/mg proteína e sistema antioxidante enzimático (d, e, f) em U/mg proteína de *Palythoa variabilis* expostos de forma aguda à 12,5%WAF, 25%WAF e grupo controle. a) níveis de malondialdeído (MDA); b) níveis de carbonilas; c) níveis de sulfidrilas; d) níveis de superóxido dismutase (SOD); e) níveis de catalase (CAT); f) níveis de glutationa-S-transferase (GST). Resultados expressos em média e erro padrão da média, sendo utilizado o teste Anova One-Way seguido do pós-teste de tukey (p<0,05).





O conteúdo de proteínas carboniladas nos zoantídeos apresentou maiores concentrações nos animais expostos à 25%WAF (195,6  $\pm$  10,8 µg/mg proteína), com diferença entre o grupo de 12,5%WAF (132,2  $\pm$  20,8 µg/mg proteína). No entanto, o controle também teve valores elevados de carbonilas (162,8  $\pm$  32,4 µg/mg proteína) (Figura 4b), provavelmente em resposta à exposição de cnidários a ROS de diversas fontes, incluindo metabólitos celulares endógenos, processos fotoquímicos e contaminantes ambientais (TARRANT *et al.*, 2014). As reações de oxidação de proteínas envolvem vários radicais, mas, principalmente, ROS e os resultados apresentam-se como modificações oxidativas nas cadeias de aminoácidos, clivagem de peptídeos, reações de peptídeos com produtos de oxidação de lipídios e carboidratos e formação de derivados carbonílicos de proteínas (VALAVANIDIS *et al.*, 2006). Ou seja, proteínas carboniladas são aquelas que sofreram modificações oxidativas, resultando na introdução de grupos carbonila (aldeídos ou cetonas) em seus resíduos aminoacídicos (DALLE-DONNE *et al.*, 2006).

Não houve diferença significativa nos níveis de sulfidrilas entre os três tratamentos (controle:  $0,07 \pm 0,01$ ; 12,5%WAF:  $0,08 \pm 0,008$ ; 25%WAF:  $0,05 \pm 0,009 \mu g/mg$  proteína) (Figura 4c). De acordo com Farina *et al.* (2008), a exposição de larvas de corais da espécie *Porites astreoides* Lamarck, 1816 ao HPA benzo(a)pireno foi capaz de aumentar significativamente o conteúdo de radicais sulfidrilas livres, sugerindo resposta ao estresse oxidativo causado pela exposição ao B(a)P. Os grupos sulfidrila (-SH) são radicais importantes em reações bioquímicas, afetando os sistemas enzimáticos, o transporte através da membrana celular e a estrutura conformacional de proteínas (LORBER *et al.*, 1970). Apesar do reconhecido potencial de dano dos HPAs nos níveis utilizados no experimento, não ocorreu alteração nas concentrações de sulfidrilas, demonstrando maiores efeitos sobre as espécies reativas de oxigênio, em comparação com as espécies reativas de enxofre.

A concentração média da SOD reduziu-se com o aumento das concentrações de WAF. Os zoantídeos não tratados (grupo controle) apresentaram quase o triplo da concentração média de SOD (139,5  $\pm$  11 U/mg proteína), em relação aos zoantídeos tratados com 12,5%WAF (47,4  $\pm$  14,1 U/mg proteína) e 25%WAF (39,6  $\pm$  23,9 U/mg proteína), os quais não foram significativamente diferentes entre si (Figura 4d). Estes resultados estão em concordância com aqueles apresentados por Overmans *et al.* (2018), que também obtiveram médias próximas da atividade da SOD entre os tratamentos de larvas do coral *Acropora tenuis* (Dana, 1846) expostos ao HPA fenantreno.

As células são capazes de reparar alguns danos oxidativos e neutralizar as ROS através de ações de enzimas antioxidantes, como por exemplo: superóxido dismutase e catalase. A SOD é responsável por catalisar a oxidação do radical superóxido para oxigênio molecular e redução para peróxido de hidrogênio. De acordo com Downs *et al.* (2002), a SOD representa um componente significativo da capacidade antioxidante dos corais. Estas atividades podem ser modificadas por condições que induzem o estresse oxidativo em cnidários, como, por exemplo, a exposição a HPAs (DOWNS *et al.*, 2006; RAMOS e GARCIA, 2007; ROUGEE *et al.*, 2006).

No entanto, no presente estudo, a exposição à concentrações de WAF a 12,5% e 25% diminuiu a atividade da SOD em zoantídeos da espécie *P. variabilis*. Embora a atividade da SOD normalmente seja aumentada sob condições de estresse, alguns estudos identificaram que a SOD também pode ser suprimida com a exposição ao HPA antraceno (ZBIGNIEW e WOJCIECH, 2006). Uma possível explicação para este resultado pode ser que as concentrações de antraceno e fenantreno tenham danificado a enzima através de mudanças conformacionais nas membranas biológicas ou da superprodução e interrupção do metabolismo de ROS (ALMEDA *et al.*, 2013), visto que as ROS têm o potencial de danificar proteínas antioxidantes se os níveis de estresse estiverem além da capacidade de mitigação (OVERMANS *et al.*, 2018).

Os resultados da concentração média de CAT mostraram maiores níveis nos organismos do grupo controle  $(0,48 \pm 0,08 \text{ Ug/mg proteína})$  e menores níveis nos grupos tratados  $(12,5\%\text{WAF}: 0,24 \pm 0,1; 25\%\text{WAF}: 0,29 \pm 0,05 \text{ Ug/mg proteína})$  (Figura 4e). Apesar disso, os resultados do presente estudo encontram-se em consonância com os achados de Farina *et al.* (2008) em avaliações de larvas do coral *Porites astreoides* Lamarck, 1816 expostas ao HPA benzo(a)pireno, em que a atividade da catalase permaneceu inalterada mesmo com a presença do contaminante, com concentrações da enzima ainda maiores nos organismos do grupo controle. Portanto, pode-se presumir que a resposta da atividade da catalase seja variável quando cnidários são expostos a contaminantes orgânicos (FARINA *et al.*, 2008).

A catalase é uma proteína citosólica responsável por converter o peróxido de hidrogênio (H2O2) em oxigênio molecular (O2) e água (H2O) (TARRANT *et al.*, 2014). O efeito adverso do aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio nos organismos inclui a geração de radicais hidroxila (·OH), que podem resultar em lesões de proteínas, lipídios e

DNA além de estimular a liberação de ferro das moléculas heme, resultando em danos a moléculas e morte celular (DOWNS *et al.*, 2002; 2006). Logo, condições que reduzem as taxas de renovação de proteínas, como o estresse, podem diminuir a atividade da catalase (LESSER *et al.*, 2006).

A concentração média de GST demonstrou ser maior nos zoantídeos expostos a 25%WAF (1,6  $\pm$  0,2 Ug/mg proteína), quando comparados com aqueles expostos a 12,5%WAF (0,6  $\pm$  0,2 Ug/mg proteína), porém sem diferença significativa com o grupo controle (1,03  $\pm$  0,4 Ug/mg proteína) (Figura 4f). Segundo Farina *et al.* (2008), as alterações de valores da enzima GST em cnidários sugerem uma perturbação do status redox induzida pela exposição química. Da mesma forma, de acordo com Ramos e Garcia (2006), a atividade e concentrações da GST são alteradas em corais da espécie *Orbicella faveolata* (Ellis e Solander, 1786) (citada como *Montastraea faveolata*) quando expostos de forma aguda ao HPA benzo(a)pireno durante 72 horas.

A glutationa-S-transferase (GST) é uma enzima, que carrega um grupo funcional sulfidrila, responsável por quebrar cadeias de reações de radicais livres e conjugar a glutationa (GSH) com compostos eletrofílicos exógenos e endógenos, e metabólitos tóxicos (DOWNS *et al.*, 2006). Ela forma um radical tiol que reage com uma glutationa oxidada (GSSG), formando uma ligação dissulfeto. Assim, a manutenção dos níveis de glutationa, pela redução do ambiente das células, previne danos aos organismos expostos a condições que promovam o estresse oxidativo (LESSER *et al.*, 2006), como por exemplo, a exposição aguda ao óleo, por meio da aclimatação fisiológica ao estressor, aumentando sua capacidade antioxidante em resposta ao dano oxidativo (DOWNS *et al.*, 2002).

### 3.5 Análises de genotoxicidade - Ensaio cometa alcalino

Após as 96 horas de exposição, o índice de dano genético (ID) aos zoantídeos, medido pelo ensaio cometa, foi crescente em relação ao aumento das concentrações de WAF. Os zoantídeos do grupo controle obtiveram danos genéticos significativamente menores (p = 0,00021) (88,14 ± 20,5), quando comparados com IDs médios de 189,42 ± 90,6 e 392,8 ± 4,2 nos zoantídeos expostos a 12,5%WAF e 25%WAF, respectivamente (Figura 5a). Estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos por Mitchelmore e Hyatt (2004), que também observaram o aumento dose-dependente de quebras de fitas de DNA em anêmonas da espécie *Anthopleura elegantissima* (Brandt, 1835) expostas a diferentes concentrações do HPA benzo(a)pireno.

Da mesma forma, o percentual da frequência de células com DNA danificado (FD) também aumentou significativamente com o aumento das concentrações de WAF. Os zoantídeos do grupo controle apresentaram menor frequência de dano (p = 0,00025) (51,28%  $\pm$  8,7%) em comparação com 78,14%  $\pm$  12,4% de dano nos zoantídeos expostos a 12,5%WAF e 100%  $\pm$  0% para o tratamento de 25%WAF (Figura 5b), ou seja, todos os organismos expostos à maior concentração de WAF testada apresentaram algum dano genético. Embora os zoantídeos do grupo controle tenham demonstrado algum dano ao DNA em suas células, pode-se considerar ser uma linha de base normal de danos encontrados em cnidários saudáveis (KTEIFAN *et al.*, 2017), visto que, em condições normais, danos ao DNA podem resultar de processos fisiológicos normais (SHUGART, 2000).

**Figura 5.** a) Índice de dano genético (ID) (0-400) b) frequência de dano genético (FD) (0-100%) de *Palythoa variabilis* expostos de forma aguda à 12,5% WAF, 25% WAF e grupo controle. Resultados expressos pelo teste de Kruskal-Wallis (p = 0,00021; p = 0,00025, respectivamente).





Além disso, os danos genéticos podem ter sido induzidos pelo estresse oxidativo sofrido pelos organismos tratados, dado que, o aumento da produção e o acúmulo de ROS são responsáveis pelo aumento de danos celulares e, consequentemente, degradação do DNA (KTEIFAN *et al.*, 2017). De forma direta, a geração de radicais livres representa um fator genotóxico que induz quebras da cadeia de DNA (SHUGART, 2000), assim, o dano oxidativo ao DNA também é relevante para a análise dos efeitos de HPAs, que podem produzir espécies reativas de oxigênio através da ciclagem redox de metabólitos (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998). A exposição de um organismo a um agente genotóxico pode interromper processos celulares normais e gerar modificações estruturais no DNA, induzindo problemas subsequentes para a célula e para o processamento do DNA, como a replicação, metilação e reparo, que podem resultar em mutações (SHUGART, 2000).

Existem vários estudos que examinaram respostas genotóxicas a poluentes em organismos aquáticos como peixes e moluscos, no entanto as análises de cnidários ainda são bastante limitadas (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998). Apesar disso, a exposição ao petróleo em laboratório pode causar alterações nos perfis celulares normais de corais, incluindo danos ao DNA e outros componentes celulares (DOWNS *et al.*, 2006; ROUGEE *et al.*, 2006). Assim, o ensaio cometa representa um biomarcador geral não específico eficaz na detecção de danos ao DNA na forma de quebras de fitas (MITCHELMORE e HYATT, 2004). Adicionalmente, a detecção de danos induzidos por um suspeito causal, como, por exemplo,

danos ao DNA a partir da exposição aguda a contaminantes do petróleo, gera dados que corroboram com as evidências do mecanismo de toxicidade de algum componente no perfil desse agente suspeito (DOWNS et al., 2006).

# 4 CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que a exposição experimental aguda a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de petróleo é responsável por induzir respostas comportamentais, estresse oxidativo e danos genéticos subletais a zoantídeos da espécie *Palythoa variabilis*. Através de respostas biológicas e biomarcadores celulares, como utilizados no presente estudo, é possível avaliar parâmetros que refletem aspectos decorrentes da toxicidade ambiental. Estes resultados contribuem para entender os danos do derramamento de óleo sobre organismos chaves para o funcionamento dos recifes brasileiros ao fornecerem o mecanismo de respostas subletais destes animais.

# **5 REFERÊNCIAS**

ACOSTA, A.; GONZÁLEZ, A. M. Fission in the Zoantharia Palythoa caribaeorum (Duchassaing and Michelotii, 1860) populations: a latitudinal comparison. **Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR**, v. 36, n. 1, p. 151-165, 2007. ISSN: 0122-9761.

AEBI, H. Catalase in vitro. Methods Enzimol 105: 121-126. 1984.

ALMEDA, R. et al. Interactions between zooplankton and crude oil: toxic effects and bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e67212, 2013. doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067212.

ARRUDA-SANTOS, R. H. et al. Sources and distribution of aromatic hydrocarbons in a tropical marine protected area estuary under influence of sugarcane cultivation. Science of the total environment, v. 624, p. 935-944, 2018. doi:

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.174.

BENSON, A. A.; MUSCATINE, L. Wax in coral mucus: energy transfer from corals to reef fishes 1. Limnology and Oceanography, v. 19, n. 5, p. 810-814, 1974; doi: https://doi.org/ 10.4319/lo.1974.19.5.0810.

BLACKBURN, M. et al. Oil in our oceans: a review of the impacts of oil spills on marine invertebrates. **Portland, OR: The Xerces Society for Invertebrate Conservation**, v. 152, 2014.

BLUMER, M. et al. An ocean of oil: a small oil spill. **Environment: Science and Policy for Sustainable Development**, v. 13, n. 2, p. 2-12, 1971; doi: https://doi.org/10.1080/00139157. 1971. 9930568.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. doi: https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

CERVINO, J. M. et al. Changes in zooxanthellae density, morphology, and mitotic index in hermatypic corals and anemones exposed to cyanide. **Marine pollution bulletin**, v. 46, n. 5, p. 573-586, 2003. doi: https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00071-7.

CESAR, H. Economic analysis of indonesian coral reefs. 108 pp. 1996.

CHAN, E. I. Oil pollution and tropical littoral communities: biological effects of the 1975 Florida Keys oil spill. In: **International Oil Spill Conference**. American Petroleum Institute, 1977. p. 539- 542. doi: https://doi.org/10.7901/2169-3358-1977-1-539.

COHEN, Y.; NISSENBAUM, A.; EISLER, R. Effects of Iranian crude oil on the Red Sea octocoral Heteroxenia fuscescens. Environmental Pollution (1970), v. 12, n. 3, p. 173-186, 1977. doi: https://doi.org/10.1016/0013-9327(77)90051-9.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica chimica acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003. doi: https://doi.org/10.1016/S0009- 8981 (03)00003-2.

DE LEO, D. M. et al. Response of deep-water corals to oil and chemical dispersant exposure. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, 129, 137-147. 2015. doi: https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.02.028.

DISNER, G. R.; TORRES, M. The environmental impacts of 2019 oil spill on the Brazilian coast: Overview. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 7, n. 15, p. 241-256, 2020; doi: 10.21438/rbgas(2020)071518.

DOWNS, C. A. et al. Cellular physiological effects of the MV Kyowa Violet fuel-oil spill on the hard coral, Porites lobata. **Environmental Toxicology and Chemistry**: An International Journal, v. 25, n. 12, p. 3171-3180, 2006. doi: https://doi.org/10.1897/05-509R1.1.

DOWNS, C. A. et al. Oxidative stress and seasonal coral bleaching. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 4, p. 533-543, 2002. doi: https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00907-3.

DRAZENOVIC, M.; FAGAN, J. M. The Effects of Aquarium Size, Temperature, and Dissolved Ion Concentrations on Growth Rates of Stony Corals and Colonial Anemones. 2015.

ECHOLS, B. S. et al. The use of ephyrae of a scyphozoan jellyfish, Aurelia aurita, in the aquatic toxicological assessment of Macondo oils from the Deepwater Horizon incident. **Chemosphere**, v. 144, p. 1893-1900, 2016.

ELGERSHUIZEN, J. H. B. W.; DE KRUIJF, H. A. M. Toxicity of crude oils and a dispersant to the stony coral Madracis mirabilis. **Marine pollution bulletin**, v. 7, n. 2, p. 22-25, 1976. doi: https://doi.org/10.1016/0025-326X(76)90305-2.

FARINA, O. et al. Biochemical responses of cnidarian larvae to mercury and benzo (a) pyrene exposure. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 81, p. 553-557, 2008. doi:https://doi.org/10.1007/s00128-008-9534-2.

FAKSNESS, L. G.; BRANDVIK, P. J.; SYDNES, L. K. Composition of the water accommodated fractions as a function of exposure times and temperatures. **Marine pollution bulletin**, v. 56, n. 10, p. 1746-1754, 2008. doi:

https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.07.001.

FERRANDO, A. et al. Oil spill effects on macrofaunal communities and bioturbation of pristine marine sediments (Caleta Valdés, Patagonia, Argentina): experimental evidence of low resistance capacities of benthic systems without history of pollution. Environmental Science and Pollution Research, v. 22, n. 20, p. 15294-15306, 2015; doi:

https://doi.org/10.1007/s11356-015-4167-6.

FRENZILLI, G. et al. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, Mytilus galloprovincialis: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. **Aquatic Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 19-32, 2001. doi:

https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00159-4.

FROMETA, J. et al. Toxicity of oil and dispersant on the deep water gorgonian octocoral *Swiftia exserta*, with implications for the effects of the Deepwater Horizon oil spill. **Marine pollution bulletin**, 122(1-2), 91-99. 2017. doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017. 06.009.

GALVAN, G. L. Efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo e gasolina: integrando relevantes organismos e biomarcadores. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2015. (Thesis). Disponível em: http://hdl.handle.net/1884/40362. Acesso em: 01/08/2022.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974. doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8.

HICKMAN, C. P. J. *et al.* Princípios Integrados de Zoologia. 16<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1405 p., 2016; ISBN: 978-0-07-352421-4.

HONDA, M. SUZUKI, N. Toxicities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Aquatic Animals. **Int J Environ Res Public Health**. 2000;17(1363):1-23. doi: https://doi.org/10.3390/ijerph17041363.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207-221, 2008. doi: https://doi.org/10.1093/mutage/gen014.

JIANG, Z. et al. Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. **Acta Ecologica Sinica**, v. 30, n. 1, p. 8-15, 2010. doi: https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2009.12.002.

KTEIFAN, M.; WAHSHA, M.; AL-HORANI, F. A. Assessing stress response of Stylophora pistillata towards oil and phosphate pollution in the Gulf of Aqaba, using molecular and biochemical markers. **Chemistry and Ecology**, v. 33, n. 4, p. 281-294, 2017. doi: https://doi.org/10.1080/02757540.2017.1308500.

LAUENSTEIN, G. G.; CANTILLO, Adriana Y. Sampling and analytical methods of the national status and trends program mussel watch project: 1993-1996 update. 1998. URI: http://hdl.handle.net/1834/20017.

LAW, R. J. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in seawater around England and Wales. **Marine pollution bulletin**, v. 34, n. 5, p. 306-322, 1997. doi: https://doi.org/10.1016/S0025-326X(96)00096-3.

LESSER, M. P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 68, p. 253-278, 2006. doi: https://doi.org/10.1146/annurev. physiol.68.040104.110001.

LORBER, A. et al. Effect of thiols in biological systems on protein sulfhydryl content. **Biochemical Pharmacology**, v. 19, n. 5, p. 1551-1560, 1970. doi: https://doi.org/10. 1016/0006-2952(70)90143-7.

LOYA, Y.; RINKEVICH, B. Abortion effect in corals induced by oil pollution. Mar. Ecol. **Prog. Ser**, v. 1, n. 1, p. 77-80, 1979.

LOYA, Y.; RINKEVICH, B. Effects of oil pollution on coral reef communities. **Mar. Ecol. Prog. Ser**, v. 3, n. 16, p. 180, 1980.

MATHER, J. Marine invertebrates: communities at risk. **Biology**, v. 2, n. 2, p. 832-840, 2013; doi: https://doi.org/10.3390/biology2020832.

MAY, L. A. et al. Effect of Louisiana sweet crude oil on a Pacific coral, Pocillopora damicornis. **Aquatic Toxicology**, 222, 105454. 2020. doi: https://doi.org/10.1016/j. aquatox.2020.105454.

MCCLINTOCK, J. B. Trophic biology of Antarctic shallow-water echinoderms. Marine ecology progress series. Oldendorf, v. 111, n. 1, p. 191-202, 1994.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972. doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45228-9. MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation** 

Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 399, n. 2, p.

135-147, 1998. doi: https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00252-2.

MITCHELMORE, C. L.; HYATT, S. Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay. **Marine environmental research**, v. 58, n. 2-5, p. 707-711, 2004. doi: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.019.

MOBERG, F.; FOLKE, C. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. **Ecological economics**, v. 29, n. 2, p. 215-233, 1999. doi: https://doi.org/10.1016/S0921-8009(99)00009-9.

MÜLLER, M. N. et al. Cellular accumulation of crude oil compounds reduces the competitive fitness of the coral symbiont Symbiodinium glynnii. **Environmental Pollution**, v. 289, p. 117938, 2021. doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117938.

NADEAU R. J.; BERGQUIST E. T. Effects of the march 18, 1973 oil spill near Cabo Rojo, Puerto Rico on tropical marine communities. **Int Oil Spill Conference**, Proceed. 1977 March; (1):535 - 538, 1977; doi: https://doi.org/10.7901/2169-3358-1977-1-535.

OVERMANS, S. et al. 2018. Phototoxic effects of PAH and UVA exposure on molecular responses and developmental success in coral larvae. Aquatic toxicology, 198, 165-174. doi: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.03.008.

PENA, P. G. L. et al. The crude oil spill on the Brazilian coast in 2019: the question of public health emergency. **Cadernos de Saúde Pública,** v. 36, p. e00231019, 2020; doi: https://doi.org/10.1590/0102-311X00231019.

RAMOS, R.; GARCIA, E. Induction of mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes in the coral Montastraea faveolata on acute exposure to benzo (a) pyrene.

**Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 144, n. 4, p. 348-355, 2007. doi: https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.11.006.

REIMER, A. A. Effects of crude oil on the feeding behaviour of the zoanthid Palythoa variabilis. **Environmental physiology & biochemistry**, v. 5, n. 4, p. 258-266, 1975; PMID: 240674.

RINKEVICH, B.; LOYA, Y. Harmful Effects of Chronic Oil Pollution on a Red Sea Scleractinian Coral Population. **Proc. 3rd Int. Coral Reef Symp**, 1977. p. 585-591. ROCHA, R. J. M. et al. Do microplastics affect the zoanthid Zoanthus sociatus?. **Science of The Total Environment**, v. 713, p. 136659, 2020. doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv. 2020.136659.

ROUGEE, L. et al. Alteration of normal cellular profiles in the scleractinian coral (Pocillopora damicornis) following laboratory exposure to fuel oil. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 25, n. 12, p. 3181-3187, 2006. doi: https://doi.org/10.1897/05-510R2.1.

SANTANA, E. F. C. et al. Trophic ecology of the zoanthid Palythoa caribaeorum (Cnidaria: Anthozoa) on tropical reefs. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, v. 95, n. 2, p. 301-309, 2015. doi: https://doi.org/10.1017/S0025315414001726. SANTOS, D. L. A. Redundância funcional em recifes impactados pelo turismo em Porto de Galinhas, Nordeste do Brasil. 2017. 64 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ecologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SHIGENAKA, G. Toxicity of oil to reef-building corals: A spill response perspective. 2001. Corporate Authors: United States, National Ocean Service., Office of Response and

Restoration; United States, National Oceanic and Atmospheric Administration,;Coral Reef Conservation Program (U.S.); Series : **NOAA technical memorandum NOS-OR&R** ; URL: https://repository.library.noaa. gov/view/noaa/452. Acesso em: 01/08/2022.

SHUGART, L. R. DNA damage as a biomarker of exposure. **Ecotoxicology**, v. 9, n. 5, p. 329-340, 2000. doi: https://doi.org/10.1023/A:1026513009527.

SOARES, M. O.; RABELO, E. F. Primeiro registro de branqueamento de corais no litoral do Ceará (NE, Brasil): indicador das mudanças climáticas?. **Geociências** (São Paulo), v. 33, n. 1, p. 1-10, 2014.

SUCHANEK, T. H. Oil impacts on marine invertebrate populations and communities. **American Zoologist**, v. 33, n. 6, p. 510-523, 1993; doi: https://doi.org/10.1093/icb/33.6.510. SUCHANEK, T. H. Temperate coastal marine communities: biodiversity and threats. **American zoologist**, v. 34, n. 1, p. 100-114, 1994. doi: https://doi.org/10.1093/icb/34.1.100. TARRANT, A. M. et al. Activation of the cnidarian oxidative stress response by ultraviolet radiation, polycyclic aromatic hydrocarbons and crude oil. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 9, p. 1444-1453, 2014; doi: https://doi.org/10.1242/jeb.093690. TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [s.1.], v. 35, n. 3, p.206-221, 2000. doi: http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:33.0.co;2-j. TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação

de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 4, p. 1025-1035, 2010. doi: 10.4257/oeco.2010.1404.11.

TURNER, N. R. et al. 2021. Toxicity of two representative petroleum hydrocarbons, toluene and phenanthrene, to five Atlantic coral species. **Marine Pollution Bulletin**, 169, 112560. doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112560.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003. doi: https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003.

VALAVANIDIS, Athanasios et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 64, n. 2, p. 178-189, 2006. doi: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013. WEINNING, A. M. et al. 2020. Cold-water coral (Lophelia pertusa) response to multiple stressors: High temperature affects recovery from short-term pollution exposure. **Scientific Reports**, 10(1), 1-13. doi: https://doi.org/10.1038/s41598-020-58556-9.

WOO, S. et al. Transcript response of soft coral (Scleronephthya gracillimum) on exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental science and pollution research**, v. 21, p. 901-910, 2014. doi: https://doi.org/10.1007/s11356-013-1958-5.

ZANARDI-LAMARDO, E. et al. Distribution and sources of organic contaminants in surface sediments of Hooghly river estuary and Sundarban mangrove, eastern coast of India. **Marine pollution bulletin**, v. 146, p. 39-49, 2019. doi:

https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.05.043.

ZBIGNIEW, T.; WOJCIECH, P. Individual and combined effect of anthracene, cadmium, and chloridazone on growth and activity of SOD izoformes in three Scenedesmus species.

Ecotoxicology and environmental safety, v. 65, n. 3, p. 323-331, 2006. doi:

https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.12.001.

# **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos tóxicos da exposição ao óleo cru sobre o zoantídeo *Palythoa variabilis*, tanto *in situ* quanto *ex situ*, proporcionando uma compreensão abrangente dos impactos desse poluente em um organismo comum nos recifes brasileiros. Inicialmente, a revisão sistemática da literatura atual revelou uma escassez de estudos sobre os efeitos agudos do óleo cru em Cnidaria, especialmente em relação a análises fisiológicas e genéticas. Estes déficits destacam a necessidade do preenchimento de lacunas e padronização das metodologias utilizadas para atingir uma melhor comparabilidade dos resultados. Assim, a revisão sistemática permitiu a reunião e análise de dados dispersos, proporcionando uma visão mais clara sobre o conhecimento atual dos efeitos agudos do óleo cru em cnidários.

Posteriormente, a avaliação dos efeitos induzidos pela exposição ao óleo cru *in situ* demonstrou correlações significativas entre HPAs presentes nos sedimentos dos recifes das praias estudadas (Muro Alto e Serrambi) e a borra de óleo que atingiu a costa brasileira, bem como entre os elementos bioacumulados e os danos oxidativos e genéticos sofridos por *P. variabilis*. Esses resultados são importantes pois explicam, de forma realista e prática, como os HPAs e elementos se comportam e impactam esses organismos em ambiente natural.

Finalmente, as análises *ex situ* dos danos induzidos pela exposição aos HPAs do óleo cru forneceram informações importantes sobre os efeitos diretos dos hidrocarbonetos de petróleo em *P. variabilis*, ao evidenciar alterações comportamentais, estresse oxidativo e danos genéticos subletais em organismos expostos à 12,5%WAF e 25%WAF. Esses resultados são fundamentais para o entendimento dos danos em derramamento de óleo, pois fornecem mecanismos de resposta subletal dos animais ao realizar análises dos efeitos diretos da exposição aguda.

Conclui-se que a compreensão da extensão dos impactos de derramamentos de óleo no tempo e no espaço é um desafio crítico. Coletar dados extensivamente e correlacionar diferentes tipos de análises é essencial para uma visão mais ampla dos impactos em organismos associados aos recifes. Assim, a aplicação de uma abordagem integrada é importante para o desenvolvimento e implementação de estratégias eficazes de mitigação de danos, garantindo a conservação dos ecossistemas recifais.