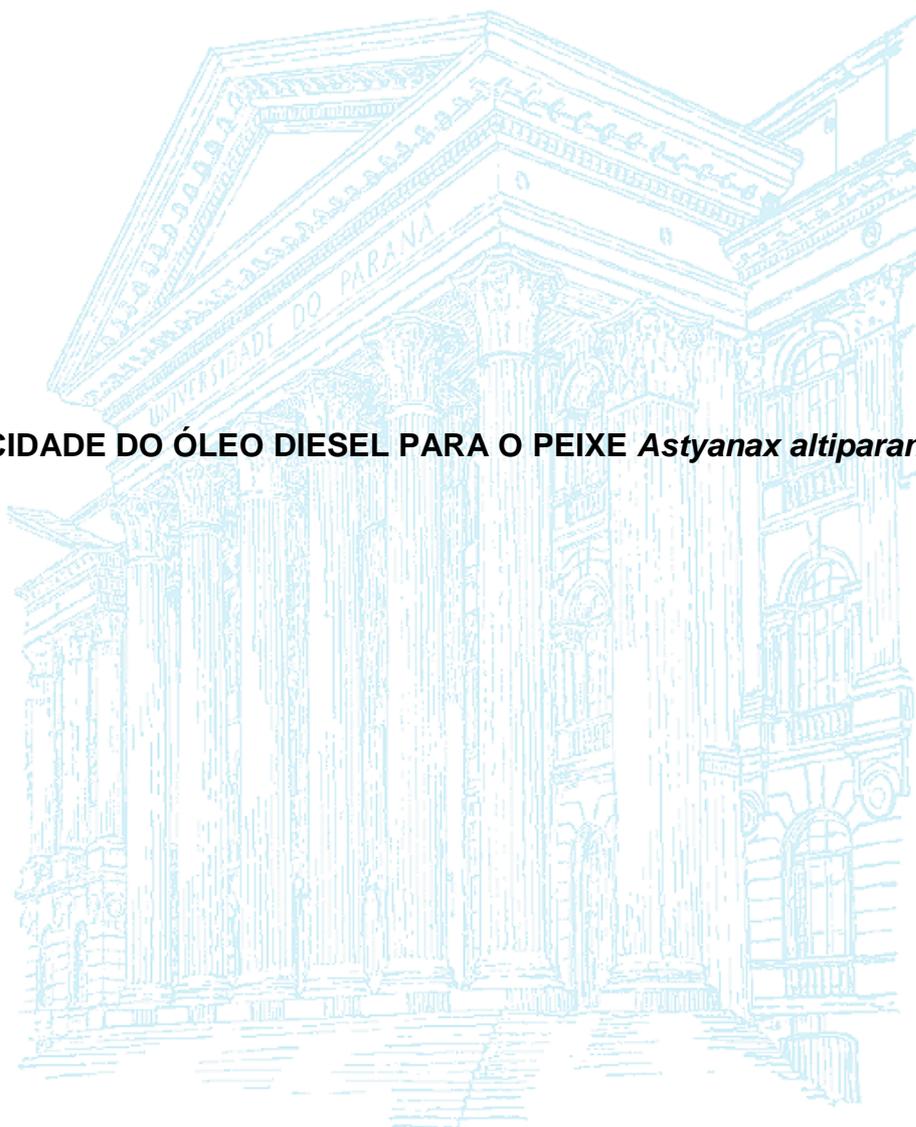


GIORGI DAL PONT

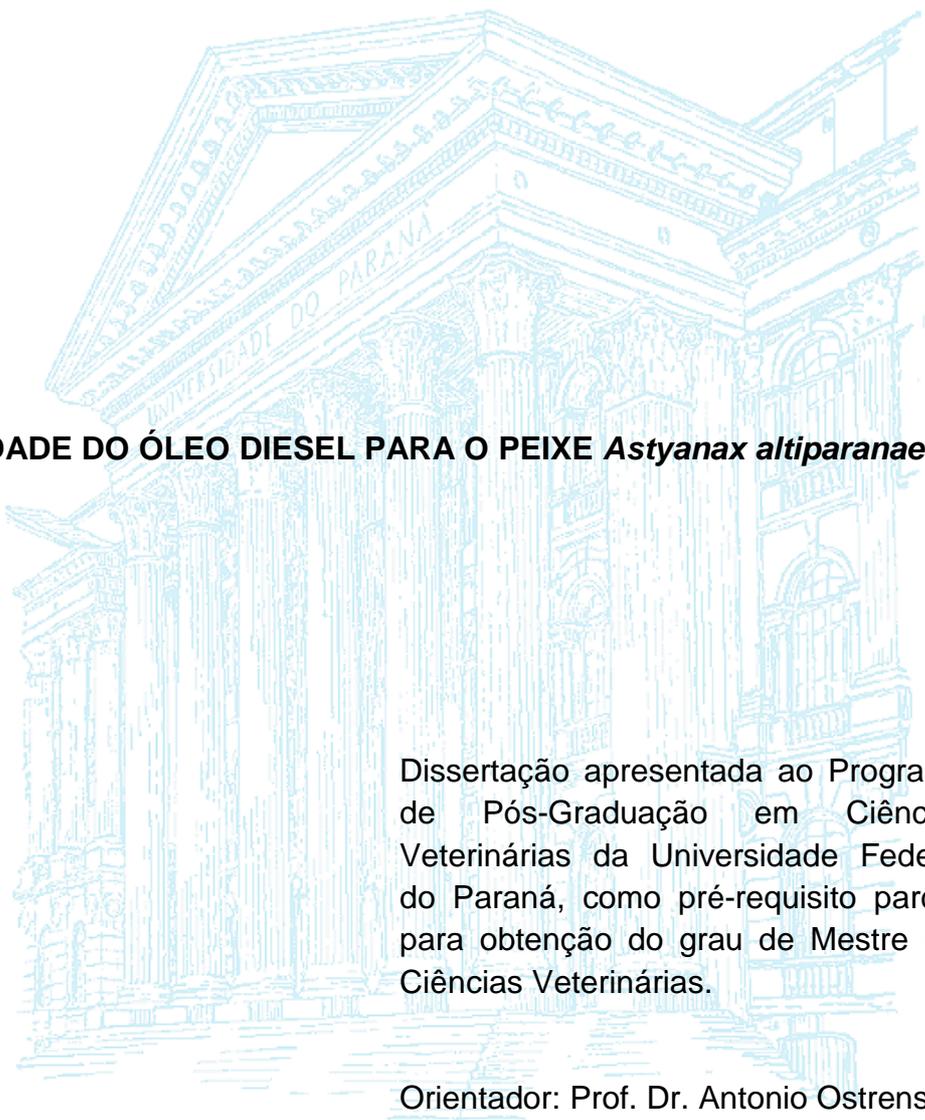
TOXICIDADE DO ÓLEO DIESEL PARA O PEIXE *Astyanax altiparanae*



CURITIBA

2012

GIORGI DAL PONT



TOXICIDADE DO ÓLEO DIESEL PARA O PEIXE *Astyanax altiparanae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ostrensky

CURITIBA

2012



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**TOXICIDADE DO ÓLEO DIESEL PARA O PEIXE *Astyanax altiparanae***” apresentada pelo Mestrando GIORGI DAL PONT declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, considerou o candidato Apto para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 20 de março de 2012

Professor Dr. Antonio Ostrensky Neto
Presidente/Orientador

Dra. Irene Terezinha Gabardo
Membro

Professora Dra. Marisa Fernandes de Castilho
Membro

RESUMO

A intensificação das atividades humanas, tanto urbanas quanto industriais, vem ocasionando o aumento dos aportes dos mais diferentes tipos de contaminantes químicos nos ambientes aquáticos continentais. Nesse contexto, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), constituintes do petróleo que apresentam maior potencial tóxico, e os hidrocarbonetos voláteis (BTEX) são exemplos de substâncias que podem afetar os corpos de água, prejudicando o funcionamento desses ecossistemas e comprometendo os serviços ambientais associados. O estado do Paraná, localizado na região Sul do Brasil, apresenta histórico de acidentes envolvendo derramamentos de óleo combustível que atingiram ambientes aquáticos. Apesar disso, pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos desses compostos sobre a ictiofauna nativa. Por esse motivo, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica (capítulo 1) sobre os efeitos do petróleo e seus subprodutos em peixes e avaliar a resposta toxicológica e histopatológica de uma espécie de peixe endêmica da região (*Astyanax altiparanae*) exposta, em laboratório, ao óleo diesel, a fração solúvel em água do óleo diesel (FSD) (capítulo 2 e 3) e a amônia (capítulo 4). Na revisão, foram abordados vários fatores que interferem na toxicidade do petróleo e seus derivados no ambiente aquático e porque as ferramentas histopatológicas vêm ganhando espaço em uma área que possui grande variedade de biomarcadores que podem demonstrar os efeitos de contaminantes ambientais. Nos capítulos 2 e 3 foi demonstrado que apesar da grande resistência dos exemplares de *A. altiparanae* frente às altas concentrações do óleo diesel e da FSD, os resultados sugerem uma maior toxicidade do óleo diesel. Além disso, o índice de Impacto nas Brânquias (IIBr) calculado para cada alteração histopatológica revelou que na exposição aguda houve uma relação direta entre a concentração de diesel e FSD e a indução de necrose, descamação do epitélio e hipertrofia celular. Para as demais alterações, o IIBr não apresentou qualquer relação com as concentrações do diesel e da FSD a que os peixes foram expostos. Após a exposição subcrônica o IIBr calculado para as diferentes alterações não apresentou uma relação dose/efeito com as concentrações de diesel e FSD. Frente ao teste de sensibilidade à amônia, a espécie *A. altiparanae* apresentou-se muito sensível ao composto. Entretanto, embora várias alterações histopatológicas tenham sido identificadas, o IIBr calculado para cada alteração demonstrou que apenas o descolamento epitelial apresentou uma relação direta com as concentrações de amônia testadas. O IIBr total calculado para cada concentração não apresentou qualquer relação com o aumento das concentrações de amônia. Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam que apesar dos efeitos tóxicos causados pelo óleo diesel, FSD e pela amônia, à espécie *A. altiparanae* as alterações histopatológicas avaliadas pelo IIBr não apresentaram-se como um indicador satisfatório de exposição a contaminantes ambientais

Palavras-chave: Amônia, derrame de óleo, HPA, óleo diesel, peixes nativos, poluição aquática

ABSTRACT

The intensification of human activities, both urban and industrial, has been increasing the contributions of many different types of chemicals contaminants in aquatic environments. In this context, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), oil constituents with a higher toxic potential, and the volatile monoaromatic hydrocarbons (BTEX) are examples of substances that may affect water bodies, impairing the functioning of these ecosystems and compromising the environmental services associated. The state of Paraná, located in southern Brazil, has a history of accidents involving spills of fuel oil reaching the aquatic environment. However, knowledge regarding the toxic effects of these compounds on the native fish fauna is lacking. Therefore, the goal of this study was to create a literature review (chapter 1) about the effects of crude oil and its derivatives to fish and evaluate the toxicological and histopathological response of a region endemic fish species (*Astyanax altiparanae*) exposed, in laboratory, to diesel, diesel water soluble fraction (DWSF) (Chapter 2 and 3) and ammonia (Chapter 4). In the review, we discussed several factors that influence the toxicity of petroleum and its derivatives in the aquatic environment and why histopathological tools are getting space in this field that has a wide range of biomarkers that are useful to demonstrate the effects of environmental contaminants. In Chapters 2 and 3 has been shown that despite the great resistance of *A. altiparanae* specimens to high concentrations of diesel and DWSF, the results suggest a higher toxicity of diesel oil. Moreover, the Gills Impact Rate (IIBr) calculated for each histopathological changes in acute exposure revealed that there was a direct relationship between the concentration of diesel and DWSF and the induction of necrosis, epithelium lifting and cellular hypertrophy. For other alterations, the IIBr not correlate with the concentrations of diesel and DWSF to which fish were exposed. After subchronic exposure to IIBr calculated for the different changes did not show a dose/effect relationship with the concentrations of diesel and DWSF. To the sensitivity to ammonia test, the species *A. altiparanae* presented a very sensitive response. However, even with the identification of several histopathological alterations, the IIBr calculated for each one showed that only the epithelial lifting showed a direct relationship with the ammonia concentrations tested. The results obtained in this work show, despite the toxic effects caused by diesel, DWSF and ammonia, to *A. altiparanae*, histopathological changes evaluated by IIBr can not be presented as a satisfactory indicator of exposure to environmental contaminants.

Keywords: Ammonia, diesel, native fish, oil spill, PAH, water pollution

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Antonio Ostrensky, pela orientação, confiança e oportunidades geradas durante o desenvolvimento desse trabalho.

A Dra. Fabíola X. Valdez Domingos, pela colaboração durante a execução desse trabalho, mas acima de tudo, pela confiança, amizade e respeito que construímos durante os últimos três anos.

Ao Dr. Marco Tadeu Grassi, pela realização de todas as análises de hidrocarbonetos, mas principalmente, por ter apoiado a execução desse trabalho desde a primeira conversa.

Aos colegas do GIA, Gisele, Alexandre, Thayzi, Aline H., Patrícia, Aline G., Priscila, Bruno, Thiago, Ricardo e Luís, pela ajuda, esforço, apoio e paciência durante a execução do trabalho.

Ao MSc. César Alexandro da Silva pela dedicação e cuidado durante as análises de hidrocarbonetos.

Aos professores Laila Talarico Dias e Marson Bruck Warpechowski, membros do comitê de orientação, pelas valiosas críticas e sugestões durante o processo de construção do projeto de mestrado e do primeiro capítulo dessa dissertação.

A Dra. Marisa Fernandes de Castilho, por todos os anos de orientação e ricos ensinamentos e, acima de tudo, pelas palavras de apoio nos momentos em que mais precisei.

A todos os colegas do GIA: Débora, Cristiane, Marcus, Karin, Fran, Leonardo, Roberto, Ana Silvia e Flávia, pelos momentos que compartilhamos nos últimos dois anos.

A coordenadora do PPGCV, professora Alda Lúcia Gomes Monteiro, e a secretária, Maria José Botelho Maeda, pela paciência e auxílio durante todo o período do curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e ao Programa de Reestruturação das Universidades – REUNI/CAPES, pela bolsa de mestrado.

Muito obrigado!

Dedico esse trabalho a minha família:
Juscelino, Terezinha, Giselle,
Júlia, Mateus, Allan,
Denise, Natália
e Alicia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Espectro de complexidade biológica no estudo do efeito de qualquer fator ambiental, incluindo poluição (adaptado de Heath (1995))...... 25
- Figura 2. Valores da CL_{50} e seus intervalos de confiança. A) óleo diesel e B) fração solúvel do óleo diesel (FSD), nos diferentes tempos de exposição (horas), para *Astyanax altiparanae*. 54
- Figura 3. Fotomicrografia das brânquias de *Astyanax altiparanae* do experimento agudo (96 horas) em coloração HE. A) brânquia apresentando morfologia normal; B) fusão lamelar (seta); C) descolamento de epitélio (seta); D) Congestão (seta) e hiperplasia celular (□) E) necrose do tecido branquial – presença de núcleos picnóticos (seta) e descamação do epitélio (□); F) aneurisma (□)...... 75
- Figura 4. Índice de impacto branquial (IIBr) da lesão necrose em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações do (A) óleo diesel e da (B) FSD durante o experimento de toxicidade aguda (96 horas). Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. 77
- Figura 5. Índice de Impacto Branquial (IIBr) em *Astyanax altiparanae* para as lesões (A) hiperplasia (na exposição ao diesel), (B) hiperplasia (na exposição à FSD), (C) descamação (na exposição ao diesel), (D) descamação (na exposição à FSD), (E) congestão lamelar (na exposição ao diesel) e (F) congestão na exposição à FSD durante o experimento de toxicidade aguda (96 horas). Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. 78
- Figura 6. Índice de impacto branquial (IIBr) em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações do A) óleo diesel e da B) FSD durante o experimento de toxicidade aguda (96 horas) em comparação ao tratamento controle. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. 80

- Figura 7. Fotomicrografia das brânquias de *Astyanax altiparanae* do experimento subcrônico (15 dias) em coloração HE. A) brânquia apresentando morfologia normal; B) fusão lamelar (seta); C) neoplasia celular (seta); D) descolamento de epitélio (seta) e cistos de protozoários (□); E) hipertrofia celular (seta); F) aneurisma. 82
- Figura 8. Índice de impacto branquial (IIBr) da lesão neoplasia celular em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações do (A) óleo diesel e da (B) FSD durante o experimento de toxicidade subcrônica (15 dias). Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis..... 83
- Figura 9. Índice de impacto branquial (IIBr) em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações do (A) óleo diesel e da (B) FSD utilizadas no teste de toxicidade subcrônica (15 dias) em comparação ao tratamento controle. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. 85
- Figura 10. Índice de impacto branquial (IIBr) nos exemplares de *Astyanax altiparanae* dos tratamentos controle, diesel e FSD nos experimentos de exposição aguda (96 horas) e subcrônica (15 dias) ao óleo diesel. Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos no experimento de exposição aguda e letras maiúsculas no experimento de exposição subcrônica pelo teste de Kruskal-Wallis..... 86
- Figura 11. Valores da CL_{50} e seus respectivos intervalos de confiança da (A) amônia total (N-AT) e (B) amônia gasosa (N-NH₃) em exemplares de *Astyanax altiparanae* nos diferentes períodos de exposição. 102
- Figura 12. Fotomicrografia das brânquias de *Astyanax altiparanae* expostos a amônia por 96 horas em coloração HE. A) brânquia apresentando morfologia normal; B) fusão lamelar (seta); C) descolamento epitelial (seta); D) hiperplasia celular (seta); E) hipertrofia celular (seta); F) congestão (seta). 105
- Figura 13. Índice de impacto branquial (IIBr) causado por descolamento epitelial em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações da

amônia. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de *Kruskal-Wallis*. 106

Figura 14. Índice de impacto branquial (IIBr) causado por (A) hipertrofia celular, (B) fusão lamelar, (C) hiperplasia celular, (D) congestão lamelar, (E) descamação epitelial e (F) aneurisma em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações da amônia. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de *Kruskal-Wallis*. 108

Figura 15. Índice de impacto branquial (IIBr) em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações da amônia em comparação ao tratamento controle. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de *Kruskal-Wallis*. 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de concentração de óleo diesel e da FSD utilizados no experimento de exposição aguda.	43
Tabela 2. Mediana (mín-máx) dos valores de oxigênio dissolvido (mg/L), temperatura (°C), pH, amônia total (N-AT= $\text{NH}_3+\text{NH}_4^+$) (mg/L) e amônia gasosa (N- NH_3) (mg/L) no experimento de exposição aguda ao óleo diesel e a fração solúvel do diesel (FSD) para a espécie <i>Astyanax altiparanae</i> . 46	46
Tabela 3. Concentração ($\mu\text{g/L}$) individual e total de HPAs na água do experimento de exposição aguda ao óleo diesel e a fração solúvel do diesel (FSD) para a espécie <i>Astyanax altiparanae</i>	48
Tabela 4. Concentração ($\mu\text{g/L}$) individual e total de BTEX na água do experimento de exposição aguda ao óleo diesel e a fração solúvel do diesel (FSD) para a espécie <i>Astyanax altiparanae</i>	51
Tabela 5. Comportamentos observados durante a condução do experimento de toxicidade aguda do óleo diesel e da fração solúvel do óleo diesel (FSD) para <i>Astyanax altiparanae</i>	52
Tabela 6. Gradiente de concentração da FSD e da FTD utilizados no experimento de exposição aguda.	68
Tabela 7. Mediana (mín-máx) dos valores de oxigênio dissolvido (OD) (mg/L), temperatura (°C), pH, amônia total (N-AT= $\text{NH}_3+\text{NH}_4^+$) (mg/L) e amônia gasosa (N- NH_3) (mg/L) nos diferentes experimentos de exposição ao óleo diesel.....	73
Tabela 8. Percentagem de exemplares de <i>Astyanax altiparanae</i> que apresentou alteração branquial após exposição aguda ao diesel e a FSD.	74
Tabela 9. Percentagem de exemplares de <i>Astyanax altiparanae</i> que apresentou alteração branquial após exposição subcrônica ao diesel e à FSD.....	81

Tabela 10. Mediana (mín-máx) da concentração de amônia total (N-AT= $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$), amônia gasosa (N- NH_3), pH, temperatura e oxigênio dissolvido (OD) na água dos diferentes tratamentos de exposição a amônia. 100

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
APRESENTAÇÃO	14
CAPÍTULO 1 – EFEITOS DO PETRÓLEO E DE SEUS SUBPRODUTOS EM PEIXES: UMA ABORDAGEM SOBRE A UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS HISTOLÓGICAS NA AVALIAÇÃO DE IMPACTOS AMBIENTAIS	16
1. RESUMO	16
2. ABSTRACT	17
3. INTRODUÇÃO	17
4. O COMPORTAMENTO DO PETRÓLEO E/OU SEUS SUBPRODUTOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS.....	21
5. O CONTEXTO DOS ACIDENTES COM PETRÓLEO NO ESTADO DO PARANÁ.....	23
6. BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....	24
6.1. O Uso de Biomarcadores Histopatológicos para Avaliação de Contaminação com Petróleo e/ou seus Subprodutos	27
7. CONCLUSÃO	31
8. AGRADECIMENTOS	31
9. BIBLIOGRAFIA	31
CAPÍTULO 2 – TOXICIDADE AGUDA DO ÓLEO DIESEL PARA <i>Astyanax altiparanae</i> (CHARACIFORMES: CHARACIDAE).....	38
RESUMO	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS	41
Obtenção e Manutenção dos Animais	41
Obtenção do Óleo diesel e da FSD.....	41
Exposição Aguda ao Óleo diesel e à FSD	42
Análises estatísticas.....	45
RESULTADOS	46
Alterações Comportamentais.....	52
Determinação da CL ₅₀ do Óleo Diesel e da FSD	53
DISCUSSÃO.....	55

BIBLIOGRAFIA.....	60
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA HISTOPATOLOGIA BRANQUIAL DE <i>Astyanax altiparanae</i> (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA E SUBCRÔNICA AO ÓLEO DIESEL.....	64
Resumo	64
Introdução.....	65
Material e Métodos	66
Aquisição e Manutenção dos Animais	66
Aquisição do Óleo diesel e Preparo da FSD	66
Exposição Aguda e Subcrônica	67
Análises da Água	70
Coleta de tecidos e análises histopatológicas.....	71
Análises estatísticas.....	72
RESULTADOS	72
Qualidade da Água	72
Alterações Histopatológicas nas Brânquias	74
DISCUSSÃO.....	87
BIBLIOGRAFIA.....	90
CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA À AMÔNIA SOBRE A TOXICIDADE E A HISTOPATOLOGIA BRANQUIAL DE <i>Astyanax altiparanae</i> (CHARACIFORMES: CHARACIDAE).....	94
RESUMO.....	94
1. INTRODUÇÃO	95
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	96
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
4. AGRADECIMENTOS	110
5. BIBLIOGRAFIA	110

APRESENTAÇÃO

A escassez de informações sobre a resposta toxicológica e histopatológica de espécies nativas frente à contaminação por óleo combustível motivou a realização do presente trabalho.

A dissertação aborda aspectos relacionados à toxicidade e à resposta histopatológica de peixes da espécie *Astyanax altiparanae* durante a exposição aguda e subcrônica a um óleo diesel e a sua fração solúvel em água. O objetivo dos experimentos foi de avaliar, em laboratório, as respostas toxicológicas relacionadas à mortalidade e a histologia branquial da espécie. Dessa forma, os experimentos foram conduzidos utilizando altas concentrações do óleo diesel e da fração solúvel em água do diesel, sendo que os peixes, em geral, não são expostos a tais concentrações no ambiente em virtude de vários fatores como: mobilidade e fuga dos peixes dos locais afetados pelo óleo, condições ambientais e o intemperismo sofrido pelo óleo no ambiente, como evaporação e diluição, por exemplo.

O trabalho foi dividido em quatro capítulos independentes. Cada capítulo foi redigido de acordo com as normas de importantes revistas científicas. O objetivo dessa formatação é de facilitar o preparo dos artigos para a futura publicação dos resultados obtidos.

No primeiro capítulo são revisados os principais efeitos do petróleo e outros derivados sobre organismos aquáticos, com enfoque nos diferentes tipos de metodologias histopatológicas empregadas pela comunidade científica internacional e nacional para a avaliação de impactos ambientais.

Posteriormente são descritos os experimentos conduzidos com *Astyanax altiparanae* com o objetivo de determinar a concentração letal (CL₅₀) do diesel e da fração solúvel em água do diesel (capítulo 2). No capítulo 3 são abordadas as alterações histopatológicas causadas nas brânquias durante a exposição aguda e subcrônica às mesmas substâncias. Durante a condução desses experimentos levantou-se a hipótese de que os compostos amoniacais (amônia total e gasosa), acumulados dentro dos aquários, poderiam interferir na resposta toxicológica e histopatológica da espécie. Dessa forma, no capítulo 4 são abordados os efeitos da amônia sobre tais respostas.

CAPÍTULO 1 – EFEITOS DO PETRÓLEO E DE SEUS SUBPRODUTOS EM PEIXES: UMA ABORDAGEM SOBRE A UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS HISTOLÓGICAS NA AVALIAÇÃO DE IMPACTOS AMBIENTAIS¹

(Effects of crude oil and sub products in fish: an approach of the use of histological tools on environmental impact assessment)

Giorgi Dal Pont¹; Fabíola Xochilt Valdez Domingos²; Antonio Ostrensky^{1*}

¹*Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais - GIA, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Curitiba – PR, Brasil.*

²*Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular - LEEM, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus – AM, Brasil.*

**Autor para correspondência: ostrensky@ufpr.br*

1. RESUMO

A intensificação das atividades humanas, tanto urbanas quanto industriais, vem ocasionando o aumento dos aportes dos mais diferentes tipos de contaminantes químicos nos ambientes aquáticos continentais. Nesse contexto, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), constituintes do petróleo que apresentam maior potencial tóxico, e os hidrocarbonetos voláteis (BTEX) são exemplos de substâncias que podem afetar os corpos de água, prejudicando o funcionamento desses ecossistemas e comprometendo os serviços ambientais associados. A ocorrência de acidentes ambientais gera demanda por estudos de biomonitoramento, com o objetivo de avaliar os efeitos adversos desses acidentes sobre a biota e monitorar o ritmo de recuperação ambiental. Uma das ferramentas metodológicas utilizadas para isso é a aplicação de técnicas histopatológicas. A ampla utilização da histopatologia como uma ferramenta para o diagnóstico de impacto ambiental reside na facilidade e rapidez da sua aplicação e na detecção de alterações provocadas após curtos e médios prazos de exposição. Nesta revisão, são abordados vários fatores que interferem na toxicidade do petróleo e seus derivados no ambiente aquático e porque as ferramentas histopatológicas vêm ganhando espaço em uma área que possui grande variedade de biomarcadores que podem demonstrar os efeitos de contaminantes ambientais.

Palavras-chave: Derrame de óleo, HPA, óleo diesel, peixes, poluição aquática;

¹ Artigo redigido de acordo com as normas da revista Archives of Veterinary Science (<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/veterinary>)

2. ABSTRACT

The intensification of human activities, both urban and industrial, has been increasing the contributions of many different types of chemicals contaminants in aquatic environments. In this context, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), oil constituents with a higher toxic potential, and the volatile monoaromatic hydrocarbons (BTEX) are examples of substances that may affect water bodies, impairing the functioning of these ecosystems and compromising the environmental services associated. Environmental accidents generate demand for studies of biomonitoring, in order to assess the adverse effects of these accidents on the biota and to identify the rate of ecological restoration. One methodological tool used to achieve this goal is the application of histopathological techniques. The widespread use of histopathology as a tool for diagnostic of environmental impact lies on it's easily and fast application and, most importantly, on the appearance of changes in short and medium-term, that will depending on the concentration of the contaminant and the time of exposure. This review addressed several factors that are able to affect the toxicity of petroleum and its derivatives in the aquatic environment and why histopathological tools are getting space in this field that has a wide range of biomarkers that are useful to demonstrate the effects of environmental contaminants.

Keywords: diesel oil, environmental contamination, fish, oil spill, PAH

3. INTRODUÇÃO

Pesquisas com o objetivo de elucidar o destino e os efeitos biológicos do petróleo derramado e/ou seus derivados no ambiente aumentaram drasticamente a partir da década de 1970. O derramamento ocorrido com o petroleiro Exxon Valdez, em Prince William Sound, Alasca, em 1989, e os lançamentos maciços de petróleo no Golfo Pérsico durante a Guerra do Golfo foram eventos de grande destaque e relevância internacional, resultando em um aumento na investigação ambiental em todo o mundo (Albers, 2003). Do início da década de 1970 até o final de 2009, aproximadamente 10 mil acidentes envolvendo petróleo foram registrados pela Federação Internacional dos Proprietários de Navios Poluidores (ITOPF - The International Tanker

Owners Pollution Federation Limited), que ocasionaram ao derramamento de 5,65 milhões de toneladas de petróleo e derivados em ecossistemas marinhos (Itpof, 2009). Apesar das evidências de que o número de derrames tem diminuído nas últimas décadas (Burgherr, 2007; Huijer, 2005; Itpof, 2009), ainda são registrados alguns incidentes de grande escala como os que envolveram o navio petroleiro Prestige, na costa espanhola em 2002 (Franco *et al.*, 2006; Martínez-Gómez *et al.*, 2006) e, mais recentemente, o que causou a explosão de uma plataforma de extração de petróleo no Golfo do México em 2010 (Harlow *et al.*, 2011; Merhi, 2010).

Além desses derramamentos de óleo cru registrados nas últimas décadas, outros vazamentos de subprodutos de petróleo, como gasolina e óleo diesel, têm sido registrados, afetando ambientes aquáticos continentais em diferentes países (Boeger *et al.*, 2003; Dou *et al.*, 1998; Katsumiti *et al.*, 2008; Schmidt-Etkin, 2011; Soriano *et al.*, 2006). Um grande acidente ocorreu em junho de 1996, nos Estados Unidos, quando aproximadamente um milhão de galões de óleo diesel vazaram de um oleoduto para o Rio Carolina do Sul. Naquela ocasião, a fração solúvel do óleo diesel, resultante da mistura do produto com a água, foi registrada até 34 milhas além do local do vazamento, provocando a morte de aproximadamente 35.000 peixes (Rose, 2004). As evidências indicam que em algumas áreas do mundo os riscos de derrames são mais acentuados devido ao aumento do consumo do petróleo e de seus subprodutos (Bowen e Depledge, 2006; Kirby e Law, 2010). Nesse sentido, pequenos vazamentos de tanques de armazenamento, como os de postos de combustíveis, e a descarga de resíduos industriais e domésticos também se caracterizam como importantes focos de contaminação crônica de rios e outros

ecossistemas aquáticos (Guadalupe Meniconi *et al.*, 2002; Pacheco e Santos, 2001). Além dessas, há outras fontes de contaminação que também contribuem para a introdução de compostos derivados do petróleo em ambientes aquáticos, como é o caso dos HPA de origem pirogênica, provenientes de processos de combustão e que são acumulados na atmosfera, principalmente em centros urbanos onde os níveis de poluição são extremamente altos (Veiga, 2003).

O impacto de diversos derramamentos tem sido documentado na literatura científica e técnica (Boeger *et al.*, 2003; Colombo *et al.*, 2005; Glegg *et al.*, 1999; González-Doncel *et al.*, 2008; Martínez-Gómez *et al.*, 2009; Ostrensky *et al.*, 2001). Embora nem todos os efeitos da poluição por hidrocarbonetos sejam adequadamente compreendidos (Epa, 2004; Unep, 2004), estudos realizados em comunidades ictíicas indicam que nem sempre são registrados danos ambientais significativos relacionados, principalmente, a estrutura populacional dessas comunidades. Esses trabalhos revelam que, embora o dano ocorra efetivamente para os indivíduos (Boeger *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2009), as populações mostram-se geralmente mais resistentes que o esperado (Ostrensky *et al.*, 2001). Assim, é razoável se postular que os processos naturais são capazes de reparar os danos e retornar o sistema para as funções normais (Itfop, 2010). Essa capacidade de regeneração natural é denominada “resiliência ambiental”, e se configura pela adaptação cíclica das populações e/ou comunidades frente a uma determinada deformação ambiental (Odum e Barrett, 2007).

Após a exposição do peixe antártico *Pagothenia borchgrevinki* à fração solúvel do óleo diesel foi observado que essa espécie apresentou significativo

aumento no hematócrito e na concentração de hemoglobina, tanto em condição crônica (Davison *et al.*, 1992) quanto aguda (Davison *et al.*, 1993). Por outro lado, Alkindi *et al.* (2004) e Simonato *et al.* (2008) avaliaram a influência da fração solúvel de petróleo e óleo diesel em peixes (*Pleuronectes flesus* e *Phrochilodus lineatus*, respectivamente) e observaram uma redução tanto no hematócrito quanto na concentração de hemoglobina. Esses resultados demonstram que um mesmo agente tóxico, nesse caso HPA, pode induzir diferentes respostas, possivelmente devido a distintos processos adaptativos das espécies, evidenciando que a utilização de alguns tipos de biomarcadores não apresenta efetividade prática no diagnóstico de impactos em casos de acidentes ambientais (Mount e Henry, 2008).

Os biomarcadores histológicos são uma ferramenta muito poderosa para detectar e caracterizar os parâmetros toxicológicos e cancerígenos (Lauren e Hinton, 1990). Em peixes, as lesões histológicas têm uma correlação com o dano oxidativo de alguns compostos presentes tanto no óleo cru quanto no óleo diesel (Pal *et al.*, 2011) como os HPA e os BTEX (Rodrigues *et al.*, 2010). Esses biomarcadores têm sido utilizados com bons resultados em uma série de estudos em América do Norte e Europa (Stentiford *et al.*, 2003) e no Brasil (Cardoso, 2006; Simonato *et al.*, 2008; Valdez-Domingos *et al.*, 2009).

O objetivo desta revisão foi descrever os efeitos dos derramamentos de petróleo e seus derivados, principalmente o óleo diesel, em ecossistemas de água doce, e sugerir um direcionamento sobre a utilização de ferramentas histopatológicas no diagnóstico de impactos ambientais causados por petróleo e derivados.

4. O COMPORTAMENTO DO PETRÓLEO E/OU SEUS SUBPRODUTOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS

O petróleo consiste da mistura complexa de vários compostos orgânicos distintos, principalmente hidrocarbonetos, formados pela decomposição incompleta da matéria orgânica (Neff, 1979). Entretanto, a composição do petróleo, assim como a de seus derivados, varia de acordo com a sua região de origem. Os hidrocarbonetos de cadeia curta, que incluem os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), são na sua maioria voláteis e possuem um baixo tempo de permanência no ambiente aquático (Heath, 1995). Esses hidrocarbonetos são considerados os principais compostos determinantes da toxicidade do petróleo para organismos aquáticos (Connell e Miller, 1981; French, 1991; Spies, 1987). Entretanto, a toxicidade de alguns tipos de derivados do petróleo, como a gasolina e o óleo diesel, está relacionada, principalmente, com a presença de hidrocarbonetos voláteis monoaromáticos (BTEX – benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) (Barron *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2010). Já os hidrocarbonetos de cadeia longa, apesar de apresentarem maior persistência no ambiente aquático, são considerados menos tóxicos para os peixes (Neff, 1979). Quando o petróleo ou um subproduto, como o óleo diesel, entra em contato com a água, ocorre: a solubilização de compostos polares e de baixo peso molecular, a evaporação dos componentes voláteis presentes na superfície da água ao mesmo tempo em que o óleo derramado se emulsifica na água e solubiliza parte do óleo derramado, formando a fração do petróleo solúvel em água ou a mesma fração solúvel de um derivado (Neff, 1985).

A fração solúvel do petróleo é uma mistura complexa de HPA, BTEX, fenóis e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre (Edema *et al.*, 2007; Saeed e Al-Mutairi, 1999). Essa fração é biodisponível para os organismos aquáticos e pode ocasionar sérios distúrbios em diversos níveis biológicos (Heath, 1995), sendo que os peixes podem entrar em contato com ela tanto de forma direta, pelo contato através das brânquias e da pele, quanto indiretamente, através da ingestão de alimento contaminado (Barron, 2003). Apesar da grande preocupação em relação à contaminação do ambiente com o petróleo, já existem evidências que as frações solúveis de produtos refinados como a gasolina e o diesel comercial apresentam toxicidade até cinco vezes maior que a apresentada pelo produto bruto (Rayburn *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 2010).

Dessa forma, a exposição aguda e crônica de peixes ao petróleo e derivados, ou à fração solúvel em água destes agentes, podem diminuir a eficiência alimentar, apesar do aumento no consumo de alimento, evidenciando alteração no metabolismo energético decorrente da exposição (Olsen *et al.*, 2007). Essa alteração metabólica causa redução no crescimento de peixes (Vignier *et al.*, 1992) e, além disso, pode provocar distúrbios na habilidade respiratória, alterações hematológicas e prejuízos ao sistema imunológico (Cohen *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2005; Gagnon e Holdway, 1999). Alterações morfológicas, mensuradas por meio de técnicas histopatológicas, já foram descritas em animais coletados após a ocorrência de derramamento de derivados de petróleo no sul do Brasil (Katsumiti *et al.*, 2008). Entretanto, os autores relatam que algumas lesões, como o descolamento do epitélio branquial, foram observadas tanto nos pontos considerados controle quanto

nos pontos diretamente afetados pelo derramamento, evidenciando que os danos poderiam ter sido causados por outros compostos já presentes no ambiente ou por um espalhamento muito rápido da mistura derramada.

5. O CONTEXTO DOS ACIDENTES COM PETRÓLEO NO ESTADO DO PARANÁ

O estado do Paraná apresenta relevante histórico de derrames de petróleo e derivados que afetaram ambientes aquáticos. Em julho de 2000 ocorreu aquele que é considerado o maior derramamento de óleo cru da história do Brasil. Aproximadamente quatro milhões de litros, ou cerca 25 mil barris de petróleo, vazaram do oleoduto OSPAR, já na área interna da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), localizada no município de Araucária, Paraná. Mesmo com o uso de técnicas e equipamentos de contenção, o óleo atingiu rios da região e alcançou uma área distante 45 km do local do acidente, contaminando a porção final do Rio Barigui e a região do Alto Rio Iguaçu (Boeger *et al.*, 2003; Ostrensky *et al.*, 2001). No ano seguinte, em fevereiro de 2001, aproximadamente 52 mil litros de óleo diesel vazaram do oleoduto OLAPA, que liga a Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), em Araucária, ao terminal de Paranaguá, na Serra do Mar paranaense. O óleo atingiu uma região de Mata Atlântica, incluindo o Rio do Meio, Rio Sagrado, manguezais e várzeas do Rio do Neves, Rio Nhundiaquara, chegando até à Baía de Paranaguá. Em março de 2002, em Londrina, região no norte do estado, o Ribeirão Lindóia foi contaminado por aproximadamente 100 mil litros de óleo diesel (Simonato *et al.*, 2004). Já em 2004 a Baía de Paranaguá, no litoral do Estado, foi afetada pelo vazamento de quase 1,5 milhões de litros de

óleo (*bunker oil*) e 4 mil toneladas de metanol do navio chileno Vicuña, que explodiu no Porto de Paranaguá (Katsumiti *et al.*, 2008).

Apesar desses acidentes terem sido amplamente divulgados pela mídia, outros de menor dimensão, em que a quantidade de contaminante derramado não chega a ser informada pelas autoridades, não recebem a mesma atenção, como em Medianeira, em Janeiro de 2007, quando uma mancha com aproximadamente 100 m de óleo diesel foi observada no Rio Alegria (Aen-Pr, 2007). Outro incidente similar ocorreu em Cascavel, em fevereiro de 2011, quando uma carga de óleo lubrificante que era transportado por um caminhão envolvido em um acidente rodoviário, atingiu o Rio Cascavel e deixou a cidade sem abastecimento de água (Cruz, 2011). Contudo, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar os efeitos desses pequenos acidentes sobre a ictiofauna (Akaishi *et al.*, 2004; Simonato *et al.*, 2004).

6. BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

O termo “biomarcador” já recebeu várias definições, sendo geralmente usado com o objetivo de incluir qualquer mensuração que reflita a interação entre um sistema biológico e um risco potencial, o qual pode ser químico, físico ou biológico (Van Der Oost *et al.*, 2003). Peakall (1994) definiu biomarcador como sendo uma mudança na resposta biológica, desde níveis moleculares, passando pelo nível celular e fisiológico até mudanças comportamentais, que pode ser relacionada à exposição a um determinado ambiente contaminado. Os biomarcadores podem ser classificados como de exposição ou efeito. O biomarcador de exposição é definido pela medição de uma substância

exógena, seus metabólitos ou o produto da interação entre um agente xenobiótico e alguma molécula ou célula alvo num compartimento de um organismo. O biomarcador de efeito se caracteriza pela alteração de um tecido ou fluido corporal que possa ser relacionada a um impedimento à saúde (Van Der Oost *et al.*, 2003).

Em geral, alterações decorrentes da exposição a um poluente apresentam maior frequência em nível celular do que em níveis de alta organização biológica, como reprodutivos e comportamentais (Van Der Oost *et al.*, 2003). Heath (1995) sugere que quando investigações sobre o efeito de um poluente sobre peixes, ou outros organismos, forem realizadas, deve-se focar no espectro de complexidade biológica demonstrado na Figura 1. Da esquerda para a direita, o autor exemplifica que xenobiontes, ou outros estressores ambientais, exercem seus efeitos primários em níveis enzimáticos ou alteram as funções celulares como a permeabilidade de membranas, por exemplo. Continuando através do espectro de complexidade biológica, a exposição crônica pode levar a disfunções orgânicas, redução do crescimento, alterações comportamentais e conseqüentemente, alterações populacionais. Dessa forma, o autor esquematiza que o grau de complexidade das respostas biológicas aumenta com o progresso da esquerda para a direita.



Figura 1. Espectro de complexidade biológica no estudo do efeito de qualquer fator ambiental, incluindo poluição (adaptado de Heath (1995)).

Vários biomarcadores têm sido avaliados para melhorar o entendimento das respostas de peixes a substâncias tóxicas e seu potencial uso como biomarcador de exposição ou efeito. Dentre esses marcadores, destacam-se enzimas de biotransformação, parâmetros de estresse oxidativo, produtos da biotransformação, proteínas de estresse (Heat Shock Proteins), metalotioneínas (MT's), parâmetros genotóxicos, hematológicos, imunológicos, endócrinos, reprodutivos, fisiológicos, histológicos e morfológicos (Van Der Oost *et al.*, 2003). Até recentemente, vários trabalhos que avaliaram a interação do petróleo e seus derivados em organismos aquáticos focavam esforços no diagnóstico de variações em níveis enzimáticos (Cohen *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2005; Croce e Stagg, 1997; Martínez-Gómez *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2010; Pacheco e Santos, 2001; Teles *et al.*, 2003), localizados na base do espectro de complexidade biológica. Entretanto, essa postura vem mudando. Uma nova tendência com enfoque na utilização de diferentes níveis do espectro de complexidade vem sendo adotada e tem sido denominada de múltiplos biomarcadores (Goanvec *et al.*, 2010; Katsumiti *et al.*, 2008; Mos *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Simonato *et al.*, 2008; Valdez-Domingos *et al.*, 2009). Essa abordagem vem fortalecendo a utilização de biomarcadores de níveis mais altos de complexidade biológica para avaliação de contaminação ambiental.

Complementando a nova tendência do desenvolvimento de pesquisas que utilizam a abordagem de múltiplos biomarcadores, diversos trabalhos vêm apresentando enfoque na utilização de ferramentas histológicas em relação ao diagnóstico de contaminação ambiental, sendo que o petróleo e seus derivados têm sido amplamente explorados, devido à frequência da ocorrência de

eventos que levam ao seu aporte em ambientes aquáticos (Akaishi *et al.*, 2004; Katsumiti *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2010; Simonato *et al.*, 2008; Valdez-Domingos *et al.*, 2009).

6.1. O Uso de Biomarcadores Histopatológicos para Avaliação de Contaminação com Petróleo e/ou seus Subprodutos

Os biomarcadores histopatológicos permitem visualizar os efeitos da exposição a vários poluentes (biológicos e químicos), sendo considerados como uma importante ferramenta na avaliação de características sanitárias em peixes (Van Der Oost *et al.*, 1996). A determinação de efeitos da contaminação por petróleo e seus derivados também pode ser realizada histologicamente, por meio da investigação de lesões e alterações em tecidos como brânquias e fígado (Van Der Oost *et al.*, 2003). A ampla utilização da histopatologia como uma ferramenta para o diagnóstico de impacto ambiental deve-se à sua posição intermediária dentro do espectro de complexidade biológica (Adams *et al.*, 1989; Heath, 1995) e no aparecimento de alterações em curto e médio prazo, dependendo da concentração do contaminante e do tempo de exposição (Johnson *et al.*, 1993). Além disso, essa técnica apresenta facilidade e rapidez na sua aplicação em vários órgãos (Johnson *et al.*, 1993), principalmente brânquias, fígado, rim e pele (Bernet *et al.*, 1999).

Várias metodologias para a avaliação histopatológica já foram descritas (Beçak e Paulete, 1976; Bernet *et al.*, 1999; Bucke, 1989; Cardoso, 2006; Walter *et al.*, 2000). Entretanto, essas metodologias apresentam diferentes abordagens na avaliação dos danos, sendo que uma das mais recentes,

descrita por Bernet *et al.* (1999) é baseada em dois fatores: o primeiro deles relaciona a extensão da mudança histopatológica causada pelo poluente a um escore de dano. Entretanto, essa avaliação apresenta um viés, pois depende da interpretação do observador, que confere às lesões escores de 0 a 6, dependendo do grau de extensão da alteração. O segundo fator classifica a relevância patológica de cada alteração observada, utilizando um Fator de Importância (FI), que considera como cada alteração afeta as funções dos órgãos ou a capacidade de sobrevivência dos peixes. Neste caso, atribuem-se às lesões valores de 1 a 3:

- 1- Mínima importância patológica: a lesão é facilmente recuperada ao final da exposição;
- 2- Moderada importância patológica: na maioria das vezes a lesão é recuperada ao final da exposição;
- 3- Acentuada importância patológica: a lesão é geralmente irreversível, o que ocasiona parcial ou total perda da função do órgão.

Dessa forma, duas grandes vantagens da metodologia proposta pelos autores é que ela pode ser aplicada aos quatro principais órgãos-alvo descritos na literatura (brânquia, fígado, rim e pele) e, além disso, comparações podem ser realizadas entre estudos que aplicaram essa metodologia nos mesmos órgãos alvo. Por outro lado, comparações entre órgão diferentes, dentro do mesmo trabalho, não podem ser realizadas uma vez que o FI confere para cada lesão, em cada órgão, valores distintos.

Cardoso (2006) também propõem uma nova metodologia de avaliação histopatológica, denominada de Índice de Impacto. O índice de impacto pode

ser aplicado à avaliação em diversos tecidos como brânquia, fígado e rins. Para a avaliação branquial, as análises quantitativas das alterações teciduais são realizadas por amostragem a partir da seleção de um corte histológico por animal. Todas as lamelas de cinco filamentos são analisadas e as alterações observadas registradas. Para outros órgãos, como fígado e rim, a extensão das alterações é mensurada utilizando um software de análise digital, possibilitando o cálculo da extensão efetiva das lesões no tecido, e dessa forma, eliminando a variação imposta por diferentes avaliadores. O cálculo do índice de impacto pode ser realizado por meio das seguintes fórmulas:

$$\text{IIBr} = \text{N}^\circ \text{ de lamelas alteradas} / \text{N}^\circ \text{ de lamelas analisadas}$$

$$\text{Iix} = \text{Área alterada} / \text{Área total analisada}$$

Onde:

IIBr: índice de impacto branquial

Iix: índice de impacto de outros tecidos estudados.

Tanto o IIBr quanto o Iix é calculado individualmente para cada alteração, onde obtendo-se valores entre 0 (valor mínimo = ausência de lesões) e 1 (valor máximo). Dessa forma, diferentemente do que se obtém com a aplicação da metodologia descrita por Bernet et al. (1999), podem ser realizadas comparações entre órgãos alvo distintos, pois os resultados das alterações observadas são transformados em valores de mesma ordem. Por outro lado, essa metodologia não considera a severidade da lesão e sim a sua ocorrência e prevalência.

Alguns autores já avaliaram os efeitos crônicos de misturas complexas de poluentes em espécies de água doce e estuarina (Katsumiti *et al.*, 2008; Valdez-Domingos *et al.*, 2009) e os efeitos agudos e subcrônicos da fração solúvel do petróleo em uma espécie de água doce (Akaishi *et al.*, 2004) utilizando a metodologia descrita por Bernet (1999). Nesses estudos, a utilização de ferramentas histológicas mostrou-se eficiente na avaliação de impactos sobre a ictiofauna, identificando alterações como descolamento de epitélio, fusão, hiperplasia e desorganização da estrutura lamelar, dilatação de vasos e aneurismas no tecido branquial, além de necrose, vacuolização dos hepatócitos, infiltração de leucócitos, estagnação biliar e degeneração celular no tecido hepático. A metodologia descrita por Cardoso (2006) também já foi empregada na avaliação de impactos no mesmo estado. Os trabalhos de Boeger *et al.* (2003) e Ostrensky *et al.* (2001) avaliaram o impacto da presença de petróleo em Rios da região metropolitana de Curitiba obtendo sucesso na detecção e comparação de efeitos histopatológicos causados por exposição ao petróleo e derivados.

Entretanto, como uma proposta de avaliação sistêmica, sugere-se que novos trabalhos utilizem uma combinação do FI descrito por Bernet *et al.* (1999) e da mensuração digital das lesões descrita por Cardoso (2006), com o objetivo de trazer ainda mais confiabilidade aos dados histopatológicos, principalmente em cenários de contaminação ambiental por petróleo e/ou seus derivados.

7. CONCLUSÃO

Apesar da tendência de redução de ocorrências de desastres ambientais envolvendo o vazamento de petróleo e seus derivados em ambientes aquáticos, é improvável que futuros acidentes não ocorram, principalmente em função da intensificação das atividades antrópicas. Nesse contexto, a disponibilidade de ferramentas metodológicas que são, ao mesmo tempo, práticas, simples e funcionais, tais como os biomarcadores histopatológicos, podem viabilizar um diagnóstico seguro e confiável dos efeitos da exposição de organismos aquáticos a hidrocarbonetos em caso de acidentes ambientais. No entanto, as metodologias disponíveis ainda precisam ser melhor avaliadas e validadas, bem como novas abordagens devem ser testadas com o objetivo de conferir um enfoque mais sistemático a essas técnicas, de modo, por exemplo, a permitir a comparação entre órgãos distintos e, ao mesmo tempo, considerar a severidade de cada lesão identificada.

8. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa REUNI/CAPES pela bolsa de mestrado do aluno Giorgi Dal Pont. Antonio Ostrensky Neto é bolsista produtividade do CNPq.

9. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, S. M., SHEPARD, K. L., JR, M. S. G., JIMENEZ, B. D., RYON, M. G., SHUGART, L. R., MCCARTHY, J. F. AND HINTON, D. E. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. **Marine Environmental Research**, v.28, 1-4, p.459-464, 1989.

AEN-PR. **Agência de Notícias do Estado do Paraná: IAP confirma origem de vazamento de óleo diesel em Medianeira** 2007. Disponível em: <http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=25700&tit=IAP-confirma-origem-de-vazamento-de-oleo-diesel-em-Medianeira>. Acesso em: 29/05/2011.

AKAISHI, F. M., SILVA DE ASSIS, H. C., JAKOBI, S. C. G., EIRAS-STOFELLA, D. R., ST-JEAN, S. D., COURTENAY, S. C., LIMA, E. F., WAGENER, A. L. R., SCOFIELD, A. L. AND OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax* sp.) After Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.46, 2, p.244-253, 2004.

ALBERS, P. H. Petroleum and Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *In*: HOFFMAN, D. J., B. A. RATTNER, G. A. BURTON AND J. CAIRNS. **Handbook of Ecotoxicology**. 2nd. New York: Lewis Publishers, 2003, 14, p.1315.

BARRON, M. G., PODRABSKY, T., OGLE, S. AND RICKER, R. W. Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? **Aquatic Toxicology**, v.46, 3-4, p.253-268, 1999.

BARRON, M. G. Bioaccumulation and Bioconcentration in Aquatic Organisms. *In*: HOFFMAN, D. J., B. A. RATTNER, G. A. BURTON AND J. CAIRNS. **Handbook of Ecotoxicology**. 2nd. New York: Lewis Publishers, 2003, p.1290.

BEÇAK, W. AND PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil: Livros Técnicos e Científicos S.A, 1976. p.305.

BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P. AND WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v.22, 1, p.25-34, 1999.

BOEGER, W. A., GUIMARÃES, A. T. B., ROMÃO, S., OSTRENSKY, A., ZAMBERLAN, E. AND FALKIEWICZ, F. H. Histopatologia as an approach to evaluated the effect of an oil spill on fishes of Arroio Saldanha and Rio Iguaçu (Brazil). *In*: INTERNATIONAL OIL SPILL CONFERENCE, 2003, Washington, USA. **Anais**. 2003,

BOWEN, R. E. AND DEPLEDGE, M. H. Rapid assessment of marine pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v.53, p.541-544, 2006.

BUCKE, D. Histology. *In*: AUSTIN, B. AND D. A. AUSTIN. **Methods for the microbiological examination of fish and shellfish**. Chichester: Ellis Horwood Ltda, 1989, p.69-97.

BURGHERR, P. In-depth analysis of accidental oil spills from tankers in the context of global spill trends from all sources. **Journal of Hazardous Materials**, v.140, p.245-256, 2007.

CARDOSO, M. F. Efeitos da sísmica com cabo de fundo sobre peixes recifais.

COHEN, A., NUGEGODA, D. AND GAGNON, M. M. Metabolic Responses of Fish Following Exposure to Two Different Oil Spill Remediation Techniques. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.48, 3, p.306-310, 2001.

COHEN, A., GAGNON, M. AND NUGEGODA, D. Alterations of Metabolic Enzymes in Australian Bass, *Macquaria novemaculeata*, After Exposure to

Petroleum Hydrocarbons. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.49, 2, p.200-205, 2005.

COLOMBO, J. C., BARREDA, A., BILOS, C., CAPPELLETTI, N., DEMICHELIS, S., LOMBARDI, P., MIGOYA, M. C., SKORUPKA, C. AND SUÁREZ, G. Oil spill in the Río de la Plata estuary, Argentina: 1. Biogeochemical assessment of waters, sediments, soils and biota. **Environmental Pollution**, v.134, 2, p.277-289, 2005.

CONNELL, D. W. AND MILLER, G. J. Petroleum hydrocarbons in aquatic ecosystems - behaviour and effects of sublethal concentrations. **Critical Reviews in Environmental Control**, v.11, p.37-104, 1981.

CROCE, B. AND STAGG, R. M. Exposure of atlantic salmon parr (*Salmo salar*) to a combination of resin acids and a water soluble fraction of diesel fuel oil: A model to investigate the chemical causes of Pigmented Salmon Syndrome. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.16, 9, p.1921-1929, 1997.

CRUZ, L. C. **Jornal Gazeta do Povo: Vazamento de óleo deixa Cascavel sem água por tempo indeterminado**. 2011. Disponível em: <http://www.gazetadopovo.com.br/vidaecidadania/conteudo.phtml?tl=1&id=1099052&tit=Vazamento-de-oleo-deixa-Cascavel-sem-agua-por-tempo-indeterminado>. Acesso em: 29/05/2011.

DAVISON, W., FRANKLIN, C. E., MCKENZIE, J. C. AND DOUGAN, M. C. R. The effects of acute exposure to the water soluble fraction of fuel oil on survival and metabolic rate of an Antarctic fish (*Pagothenia borchgrevinki*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.102C, p.185-188, 1992.

DAVISON, W., FRANKLIN, G. E., MCKENZIE, J. C. AND CAREY, P. W. The effects of chronic exposure to the water soluble fraction of fuel oil on an Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.104C, p.67-70, 1993.

DOU, L., ZHU, Y., YANG, T., XU, S. AND PING, X. Origins of heavy oils in the Erlian Basin, ne China. **Marine and Petroleum Geology**, v.15, 8, p.769-781, 1998.

EDEMA, N. E., OKOLOKO, E. G. AND AGBOGIDI, M. O. Physico-chemical characteristics of the water-soluble fraction of Ogini Well-Head crude oil and the effects on *Pistia Stratiotes* Linn (Water Lettuces) **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v.2, 6, p.633-638, 2007.

EPA. **United States Environmental Protection Agency: Guidelines for the bioremediation of oil-contaminated salt marshes** 2004. Disponível em: www.epa.gov/superfund/programs/nrd/index.htm. Acesso em: 12/12/2010.

FRANCO, M. A., VIÑAS, L., SORIANO, J. A., DE ARMAS, D., GONZÁLEZ, J. J., BEIRAS, R., SALAS, N., BAYONA, J. M. AND ALBAIGÉS, J. Spatial distribution and ecotoxicity of petroleum hydrocarbons in sediments from the Galicia continental shelf (NW Spain) after the Prestige oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v.53, 5-7, p.260-271, 2006.

FRENCH, D. P. Estimation of exposure and resulting mortality of aquatic biota following spills of toxic substances using a numerical model. *In*: MAYES, M. A. AND M. G. BARRON. **Aquatic Toxicology and Risk Assessment**. 1st. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1991, p.35-47.

GAGNON, M. M. AND HOLDWAY, D. A. Metabolic Enzyme Activities in Fish Gills as Biomarkers of Exposure to Petroleum Hydrocarbons. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.44, 1, p.92-99, 1999.

GLEGG, G. A., HICKMAN, L. AND ROWLAND, S. J. Contamination of limpets (*Patella vulgata*) following the Sea Empress oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v.38, 2, p.119-125, 1999.

GOANVEC, C., POIRIER, E., LE-FLOCH, S. AND THERON, M. Branchial structure and hydromineral equilibrium in juvenile turbot (*Cophthalmus maximus*) exposed to heavy fuel oil. **Fish Physiology and Biochemistry**, p.1-9, 2010.

GONZÁLEZ-DONCEL, M., GONZÁLEZ, L., FERNÁNDEZ-TORIJA, C., NAVAS, J. M. AND TARAZONA, J. V. Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). **Aquatic Toxicology**, v.87, 4, p.280-288, 2008.

GUADALUPE MENICONI, M. D. F., TEREZINHA GABARDO, I., ROCHA CARNEIRO, M. E., MARIA BARBANTI, S., CRUZ DA SILVA, G. AND GERMAN MASSONE, C. Brazilian Oil Spills Chemical Characterization--Case Studies. **Environmental Forensics**, v.3, 3-4, p.303-321, 2002.

HARLOW, W. F., BRANTLEY, B. C. AND HARLOW, R. M. BP initial image repair strategies after the Deepwater Horizon spill. **Public Relations Review**, v.37, 1, p.80-83, 2011.

HEATH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology**. 2nd Ed. Lewis Publishers, 1995.

HUIJER, K. Trends in oil spills from tanker ships 1995–2005.

ITPOF. **The International Tanker Owners Pollution Federation Limited - Oil tanker spill statistics: 2009**. p.1-8, 2009. Disponível em: <http://www.itopf.com>. Acesso em: 28/08/2010.

ITPOF. **The International Tanker Owners Pollution Federation Limited - Handbook 2010/11**. p.54, 2010. Disponível em: <http://www.itopf.com/>. Acesso em: 28/08/2010.

JOHNSON, L. L., STEHR, C. M., OLSON, O. P., MYERS, M. S., PIERCE, S. M., WIGREN, C. A., MCCAIN, B. B. AND VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States. **Environmental Science & Technology**, v.27, 13, p.2759–2771, 1993.

KATSUMITI, A., DOMINGOS, F., AZEVEDO, M., DA SILVA, M., DAMIAN, R., ALMEIDA, M., DE ASSIS, H., CESTARI, M., RANDI, M., RIBEIRO, C. AND FREIRE, C. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish (*Cathorops spixii*) after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.152, 1, p.209-222, 2008.

KIRBY, M. F. AND LAW, R. J. Accidental spills at sea – Risk, impact, mitigation and the need for co-ordinated post-incident monitoring. **Marine Pollution Bulletin**, v.60, p.797–803, 2010.

LAUREN, D. E. AND HINTON, D. J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: Potential biomarkers of exposure. *In*: MCCARTHY, J. F. AND L. R. SHUGART. **Biomarkers of Environmental Contamination**. CRC Press, 1990, p.472.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, C., CAMPILLO, J. A., BENEDICTO, J., FERNÁNDEZ, B., VALDÉS, J., GARCÍA, I. AND SÁNCHEZ, F. Monitoring

biomarkers in fish (*Lepidorhombus boscii* and *Callionymus lyra*) from the northern Iberian shelf after the Prestige oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v.53, 5-7, p.305-314, 2006.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, C., FERNÁNDEZ, B., VALDÉS, J., CAMPILLO, J. A., BENEDICTO, J., SÁNCHEZ, F. AND VETHAAK, A. D. Evaluation of three-year monitoring with biomarkers in fish following the *Prestige* oil spill (N Spain). **Chemosphere**, v.74, p.613–620, 2009.

MERHI, Z. O. Gulf Coast oil disaster: impact on human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.94, 5, p.1575-1577, 2010.

MOS, L., COOPER, G. A., SERBEN, K., CAMERON, M. AND KOOP, B. F. Effects of Diesel on Survival, Growth, and Gene Expression in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry. **Environmental Science & Technology**, v.42, 7, p.2656-2662, 2008.

MOUNT, D. R. AND HENRY, T. R. Ecological Risk Assessment. *In*: GIULIO, R. T. D. AND D. E. HINTON. **The toxicology of fishes**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 2008, 18, p.1101.

NEFF, J. M. **Polycyclic aromatic hydrocarbon in the aquatic environment: sources, fates and biological effects**. London: Applied Science Publishers, 1979.

NEFF, J. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons. *In*: RAND, G. M. AND S. R. PETROCELLI. **Fundamentals Aquatic Toxicology**. Bristol, PA: Taylor & Francis, 1985, p.416-454.

NOGUEIRA, L., RODRIGUES, A. C. F., TRÍDICO, C. P., FOSSA, C. E. AND ALMEIDA, E. A. D. Oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.Disponível online, 2010.

ODUM, E. P. AND BARRETT, G. W. **Fundamentos de Ecologia**. 5. Pioneira Thomson, 2007. p.632.

OLSEN, G. H., SVA, E., CARROLL, J., CAMUS, L., DE COEN, W., SMOLDERS, R., ØVERAAS, H. AND HYLLAND, K. Alterations in the energy budget of Arctic benthic species exposed to oil-related compounds. **Aquatic Toxicology**, v.83, 2, p.85-92, 2007.

OSTRENSKY, A., CHAVES, P. T. C., DUBOC, L. F., GUIMARÃES, A. T. B., CRUZ, S. R. Z., WEGBECHER, F. X., PILCHOWSKI, R. W., TEIXEIRA, U. A. AND BELZ, C. E. Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigüí e Iguaçu. *In*: 2º SEMINÁRIO DO RIO IGUAÇU, 2001, Araucária, Paraná, Brasil. **Anais**. 2001, p.32-52.

PACHECO, M. AND SANTOS, M. A. Tissue distribution and temperature-dependence of *Anguilla anguilla* L. EROD activity following exposure to model inducers and relationship with plasma cortisol, lactate and glucose levels. **Environment International**, v.26, 3, p.149-155, 2001.

PAL, S., KOKUSHI, E., CHEIKYULA, J. O., KOYAMA, J. AND UNO, S. Histopathological effects and EROD induction in common carp exposed to dietary heavy oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, 3, p.307-314, 2011.

PEAKALL, D. W. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicology and Ecotoxicology News**, v.1, p.55-60, 1994.

RAYBURN, J. R., GLAS, P. S., FOSS, S. S. AND FISHER, W. S. Characterization of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryo toxicity tests

using the water-soluble fraction of number 2 fuel oil. **Marine Pollution Bulletin**, v.32, 12, p.860-866, 1996.

RODRIGUES, R. V., MIRANDA-FILHO, K. C., GUSMÃO, E. P., MOREIRA, C. B., ROMANO, L. A. AND SAMPAIO, L. A. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. **Science of the Total Environment**, v.408, p.2054–2059, 2010.

ROSE, C. Overview of Recent CWA Judicial Enforcement to Address Oil Pipeline Spills.

SAEED, T. AND AL-MUTAIRI, M. Chemical composition of the water-soluble fraction of the leaded gasolines in seawater. **Environment International**, v.25, 1, p.117-129, 1999.

SCHMIDT-ETKIN, D. Spill Occurrences: A World Overview. *In: Oil Spill Science and Technology*. Boston: Gulf Professional Publishing, 2011, p.7-48.

SILVA, C. A., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., KATSUMITI, A., ARAÚJO, M. L. P., ZANDONÁ, E. M., COSTA SILVA, G. P., MASCHIO, J., ROCHE, H. AND SILVA DE ASSIS, H. C. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, 2, p.400-409, 2009.

SIMONATO, J. D., ALBINATI, A. C., GUEDES, C. L. B. AND MARTINEZ, C. B. R. Effects of diesel oil on some morphological and functional parameters of *Prochilodus lineatus* during acute and chronic exposure. *In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE BIOLOGY OF FISH*, 2004, Manaus, Brazil. **Anais**. 2004,

SIMONATO, J. D., GUEDES, C. L. B. AND MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, 1, p.112-120, 2008.

SORIANO, J. A., VIÑAS, L., FRANCO, M. A., GONZÁLEZ, J. J., ORTIZ, L., BAYONA, J. M. AND ALBAIGÉS, J. Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the Prestige oil spill. **Science of the Total Environment**, v.370, 1, p.80-90, 2006.

SPIES, R. B. The biological effects of petroleum hydrocarbons in the sea: Assessments from field and microcosms. *In: BOESCH, D. F. AND N. N. RABALAIS. Long-term environmental effects of offshore oil and gas development*. 1st. London: Elsevier-Applied Sciences, 1987, p.411-467.

STENTIFORD, G. D., LONGSHAW, M., LYONS, B. P., JONES, G., GREEN, M. AND FEIST, S. W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, v.55, 2, p.137-159, 2003.

TELES, M., PACHECO, M. AND SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and [beta]-naphthoflavone. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.55, 1, p.98-107, 2003.

UNEP. **United Nations Environment Programme: Manual of Natural Resource Damage Assessment and Restoration**. 2004. Disponível em: www.epa.gov/superfund/programs. Acesso em: 15/01/2011.

VALDEZ-DOMINGOS, F. X., ASSIS, H. C. S., SILVA, M. D., DAMIAN, R. C., ALMEIDA, A. I. M., CESTARI, M. M., RANDI, M. A. F. AND RIBEIRO, C. A. O.

Anthropic Impact Evaluation of Two Brazilian Estuaries Trough Biomarkers in Fish. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.4, 1-3, p.21-30, 2009.

VAN DER OOST, R., GOKSARYR, A., CELANDER, M., HEIDA, H. AND VERMEULEND, N. P. E. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. **Aquatic Toxicology**, v.36, p.189-222, 1996.

VAN DER OOST, R., BEYER, J. AND VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, 2, p.57-149, 2003.

VEIGA, I. G. Avaliação da Origem dos Hidrocarbonetos em Sedimentos Superficiais de Manguezais da Região Norte da Baía de Todos os Santos, Bahia.

VIGNIER, V., VANDERMEULEN, J. H. AND FRASER, A. J. Growth and Food Conversion by Atlantic Salmon Parr during 40 Days' Exposure to Crude Oil. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.122, p.322-332, 1992.

WALTER, G. L., JONES, P. D. AND GIESY, J. P. Pathologic alterations in adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to dietary 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. **Aquatic Toxicology**, v.50, 4, p.287-299, 2000.

CAPÍTULO 2 – TOXICIDADE AGUDA DO ÓLEO DIESEL PARA *Astyanax altiparanae* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)²

Giorgi Dal Pont,¹ Fabíola Xochilt Valdez Domingos,² Marco Tadeu Grassi,³
César Alexandro da Silva,³ Walter Antonio Pereira Boeger,¹ Antonio
Ostrensky^{1*}

¹Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais - GIA, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Rua dos Funcionários, 1540 – Juvevê, Curitiba – PR, Brasil.

²Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular - LEEM, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Avenida André Araújo, 2936 – Aleixo, Manaus – AM, Brasil.

³Grupo de Química Ambiental – GQA, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Departamento de Química, Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico - Jardim das Américas, Caixa Postal 1908, Curitiba – PR, Brasil

*Autor para correspondência: Antonio Ostrensky
E-mail: ostrensky@ufpr.br
Telefone: +5541 33505634

RESUMO

O estado do Paraná, localizado na região Sul do Brasil, apresenta histórico de grandes acidentes envolvendo derramamentos de óleo combustível que atingiram ambientes aquáticos. Apesar disso, pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos desses compostos sobre a ictiofauna nativa. Por esse motivo, foi avaliada a sensibilidade da espécie nativa *Astyanax altiparanae* ao óleo diesel e à sua fração solúvel em água (FSD). Os peixes foram expostos a diferentes concentrações de diesel e à da FSD por 96 horas, simulando um evento de vazamento de óleo diesel. O registro do número de peixes mortos e dos parâmetros de qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, pH, amônia total (N-AT = NH₃+NH₄⁺), amônia gasosa (N-NH₃), HPAs e BTEX), foram monitorados em 0, 24, 48, 72 e 96h após o início do experimento. A CL₅₀ do diesel e da FSD foram calculadas em 24, 48, 72 e 96h. Como esperado, maiores concentrações de hidrocarbonetos de petróleo foram detectadas nos tratamentos com o diesel em comparação a FSD, sendo que concentrações de até 5995,29 µg/L de HPAs e 6703,48 µg/L de BTEX foram alcançadas nos aquários contaminados com diesel. A CL₅₀ obtida após 96 horas de exposição foi de 1,35% (0,78-2,35%), para o diesel, e de 25,21% (17,43-36,46%) para a FSD. Apesar da grande resistência dos exemplares de *A. altiparanae* frente às altas concentrações do óleo diesel e da FSD, os resultados sugerem uma maior toxicidade do óleo diesel.

² Artigo redigido de acordo com as normas da revista Environmental Toxicology ([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1522-7278](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1522-7278))

Palavras-chave: BTEX; CL₅₀; Derivados do petróleo; Ecotoxicologia; HPAs; Poluição aquática

INTRODUÇÃO

O estado do Paraná, localizado na região Sul do Brasil, apresenta histórico de grandes acidentes envolvendo derramamentos de óleo combustível que atingiram ambientes aquáticos. Em julho de 2000 ocorreu aquele que foi considerado o maior derramamento de óleo cru da história do Brasil. Aproximadamente quatro milhões de litros de óleo combustível, vazaram do oleoduto OSPAR, em área interna da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Repar), localizada no município de Araucária, Paraná. Mesmo com o uso de técnicas e equipamentos de contenção, o óleo se dispersou por uma área distante até 45 km do local do acidente, alcançando dois importantes rios da região: o rio Barigui e o Rio Iguaçu (Boeger et al. 2003; Ostrensky et al. 2001). No ano seguinte, aproximadamente 57 mil litros de óleo diesel vazaram do oleoduto OLAPA, na Serra do Mar paranaense, que liga a própria Repar ao Porto de Paranaguá. O óleo atingiu uma região de Floresta Atlântica, incluindo vários rios e várzeas, chegando até à Baía de Paranaguá. Em março de 2002, em Londrina, região no norte do estado, o ribeirão Lindóia foi contaminado por aproximadamente 100 mil litros de óleo diesel (Simonato et al. 2004). Já em 2004 a Baía de Paranaguá, no litoral do estado, foi afetada pelo vazamento de quase 1,5 milhões de litros de óleo (*bunker*) e 4 mil toneladas de metanol do navio chileno Vicuña, que explodiu no Porto de Paranaguá (Katsumiti et al. 2008). Apesar de tais acidentes terem expostos esses ambientes aquáticos ao

contato com diferentes tipos de óleos combustíveis, pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos desses compostos sobre a ictiofauna nativa.

Peixes do gênero *Astyanax* sp. têm sido muito utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental na América do Sul (Akaishi et al. 2004; Boeger et al. 2003; Ostrensky et al. 2001; Schulz and Martins-Júnior 2001; Silva et al. 2009). As espécies desse gênero são conhecidas por não realizarem migração, possuírem papel central na cadeia trófica e apresentarem tolerância relativamente elevada à poluição (Schulz and Martins-Júnior 2001), além de apresentarem ampla distribuição em rios e córregos das bacias brasileiras (Gerry 1977).

Uma espécie muito encontrada na região sul do Brasil é *Astyanax altiparanae*, conhecida popularmente como lambari do rabo amarelo. É uma espécie de grande importância na pesca recreativa e muito utilizada na alimentação humana (Martinez et al. 2006). São peixes de pequeno porte, atingem em média 10 cm de comprimento padrão e apresentam grande flexibilidade alimentar, ingerindo principalmente insetos e sementes (Bennemann and Shibatta 2002), servindo também como importante fonte alimentar para peixes carnívoros (Prioli et al. 2002). Além da sua relevância ecológica, a espécie é produzida artificialmente em escala comercial. Essa grande disponibilidade de formas jovens a torna uma ótima opção para uso em ensaios laboratoriais. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade da espécie *Astyanax altiparanae* ao óleo diesel e à sua fração solúvel em água.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e Manutenção dos Animais

Os exemplares de *Astyanax altiparanae* foram adquiridos em uma distribuidora comercial de peixes, localizada no município de Curitiba/PR. Os peixes foram aclimatados no Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA) em tanques de polietileno (500L) dotados de sistema fechado de filtragem física e biológica e mantidos sob aeração constante e temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por duas semanas. Diariamente os peixes foram alimentados, *ad libitum*, com ração comercial floculada (TetraMin®) contendo 47% de proteína bruta.

Obtenção do Óleo diesel e da FSD

O óleo diesel utilizado nos experimentos foi adquirido diretamente em um posto de combustível. De acordo com o fabricante, o óleo diesel comercializado na cidade de Curitiba/PR é o S-50, que possui 0,005% de enxofre em sua composição, o que contribui para redução de emissão de material particulado para o meio ambiente. Além disso, o diesel S-50 contém 5% de biodiesel em sua composição (Petrobras 2010).

Os experimentos foram conduzidos utilizando o óleo diesel (óleo bruto) e a fração solúvel em água do óleo diesel (FSD). Nos tratamentos com o óleo diesel, este foi adicionado nos aquários sem nenhuma manipulação prévia. O preparo da FSD foi realizado de acordo com a metodologia descrita por

Anderson et al. (1974), com algumas modificações. Com o objetivo de simular um acidente em um ambiente aquático continental, uma parte de óleo foi cuidadosamente adicionada a quatro partes de água (1:4) e as duas substâncias foram agitadas vagarosamente, com auxílio de agitador magnético, observando-se a formação de um vórtex com cerca de 1/3 da altura do recipiente. Após 24 horas a solução foi mantida sem agitação por aproximadamente uma hora. Para uma separação mais eficiente da FSD, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico e a FSD retirada por gravidade. Imediatamente após a separação a FSD foi utilizada para a realização dos experimentos.

Exposição Aguda ao Óleo diesel e à FSD

O experimento foi conduzido de acordo com a metodologia de determinação de concentração letal (CL_{50}) (EPA 2002), com algumas modificações. O teste de CL_{50} avalia os efeitos do contaminante usando como índice a concentração da substância-teste que causa a mortalidade de 50% dos indivíduos durante um período de exposição (Sprague 1990). Diferentemente da metodologia padrão, que preconiza o uso de dez concentrações do agente tóxico, foram utilizadas apenas sete concentrações do óleo diesel e da FSD, além de um controle (peixes + água) e um branco (somente água), com o objetivo de reduzir o número de animais necessários para realização do experimento, sem comprometimento dos resultados obtidos.

Antes do início do experimento, os animais foram aclimatados às condições experimentais por 48 horas e ao final desse período as alíquotas do

óleo diesel e da FSD foram adicionadas ao sistema. Os peixes foram expostos às concentrações (em percentagem) do diesel e da FSD em aquários de vidro com aeração e temperatura controlados. Foram utilizados 10 animais por aquário, na densidade de 1g/L. O experimento foi conduzido em sistema semiestático, com renovação diária de 20% do conteúdo de água. A cada troca de água a FSD foi renovada, porém o diesel, que forma uma camada na interface ar/água, não foi renovado. Durante o período experimental os animais não receberam alimentação.

Tabela 1. Gradiente de concentração de óleo diesel e da FSD utilizados no experimento de exposição aguda.

	Concentração (%)								
Diesel	0,1*	01	02	04*	08	10	15*	Controle*	Branco*
FSD	0,5*	01	05	10*	20	40	80*		

* Indica os tratamentos nos quais as concentrações de HPAs e BTEX foram monitoradas.

O registro dos peixes mortos e dos parâmetros de qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, pH, amônia total (N-AT = $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$), amônia gasosa (N-NH₃), HPAs e BTEX), foram monitorados em 0, 24, 48, 72 e 96h após o início do experimento (CETESB 1990). Além disso, o registro de alterações comportamentais dos peixes também foi registrada durante todo o período experimental.

A CL₅₀ foi determinada em 24, 48, 72 e 96 horas com o auxílio do Software *LC50 Programs JSpearman Test*, que se baseia no método descrito por Hamilton et al. (1977).

O monitoramento da temperatura e das concentrações de oxigênio dissolvido foi realizado diretamente nos aquários experimentais com um oxímetro digital portátil (YSI-550A). O pH foi determinado com o auxílio de pHmetro portátil (Hanna – HI8424). A determinação da N-AT foi realizada de acordo com método colorimétrico de Nessler, descrito pela International Standards Worldwide (ASTM 1994). A percentagem de amônia gasosa (N-NH₃) foi mensurada a partir dos valores de N-AT, temperatura e pH, de acordo com o método descrito por Ostrensky et al. (1992).

As amostras de água para determinação de HPAs (EPA 1994) e BTEX (EPA 1989) foram coletadas em frascos âmbar, e mantidas refrigeradas por no máximo 96 horas até a realização das análises. A quantificação dos 16 HPAs sugeridos pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) (naftaleno, acenaftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[ghi]perileno, indeno[1,2,3-cd]pireno) foi realizada por extração líquido-líquido (EPA 1996d), seguida da análise e quantificação por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (EPA 1996c). Para isso foi utilizado um espectrofotômetro de massa (CG-EM/Focus-PolarisQ), acoplado a um autoamostrador (AS 3000/Thermo Electron Corporation). A identificação de cada composto foi feita pela comparação com injeção de solução padrão, contendo uma mistura de 16 HPAs, e consulta à biblioteca de espectros de massas NIST do equipamento. A quantificação foi realizada por curva analítica construída na faixa de concentração de 5 a 1000 ng/mL, utilizando como padrão interno uma solução contendo 5 HPAs deuterados (naftaleno-d₈,

acenafteno-*d*10, fenantreno-*d*10, criseno-*d*12, perileno-*d*12) na concentração de 100 ng/mL.

Para a determinação dos hidrocarbonetos voláteis (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) foi utilizada a análise direta, via Headspace, acoplado à cromatografia em fase gasosa (TraceGC ultra), com detecção por fotoionização e ionização em chama, baseando-se nos métodos descritos pela EPA (EPA 1996a; EPA 1996b). A calibração dos métodos de quantificação dos BTEX foi realizada por meio de curvas analíticas, preparadas em triplicata, com concentrações de 1-1000 µg/L a partir de soluções padrão de BTEX. Como controle de qualidade, foram injetadas diariamente soluções para a verificação da curva, aceitando-se desvios máximos de 10%.

Análises estatísticas

Os dados de OD, temperatura, pH, N-AT e N-NH₃ não apresentaram distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk's ($p < 0,05$). Dessa forma, os dados foram comparados entre os diferentes tempos de exposição, por meio do teste de *Kruskal-Wallis*. Em caso de diferença significativa ($p < 0,05$), foi aplicado teste a posteriori de *Dunn* (Zar 1984), utilizando o software Statistica 8.0[®].

RESULTADOS

As concentrações de oxigênio dissolvido e de N-AT, bem como os valores de temperatura não apresentaram variação entre os tratamentos ($p > 0,05$). Já o pH e a concentração de N-NH₃, apresentaram valores mais altos nos tratamentos controle e branco, em comparação aos tratamentos de exposição ao diesel e a FSD ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Mediana (mín-máx) dos valores de oxigênio dissolvido (mg/L), temperatura (°C), pH, amônia total (N-AT= NH₃+NH₄⁺) (mg/L) e amônia gasosa (N-NH₃) (mg/L) no experimento de exposição aguda ao óleo diesel e a fração solúvel do diesel (FSD) para a espécie *Astyanax altiparanae*.

Parâmetro	Tratamento			
	Óleo diesel	FSD	Controle	Branco
OD	6,4 (5,9-7,03)	6,6 (6,09-6,9)	6,5 (6,31-8,2)	7,03 (6,09-8,2)
Temperatura	22,1 (19,1-26,7)	21,8 (19,5-24,3)	21,9 (19,36-25,1)	21,9 (19,8-25,6)
pH	6,3 (6,0-6,7) ^a	6,2 (6,0-6,7) ^a	7,4 (7,1-7,4) ^b	7,2 (7,08-7,4) ^b
N-AT	1,1 (0,1-3,4)	0,81 (0,4-4,3)	0,60 (0,30-6,2)	1,41 (0,1-1,8)
N-NH ₃	0,0009 (0,0004-0,004) ^a	0,0007 (0,0004-0,004) ^a	0,005 (0,001-0,07) ^b	0,008 (0,001-0,02) ^b

Letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Na Tabela 3 podem ser observadas as concentrações de HPAs medidas na água dos diferentes tratamentos. Nota-se que as concentrações desses hidrocarbonetos apresentaram redução entre 0 e 96 horas nos tratamentos com óleo diesel nas concentrações 0,1 e 4%. Por outro lado, no tratamento que utilizou a maior concentração de diesel (15%) a concentração de HPAs aumentou com o passar do tempo, alcançando 5995,29 µg/L 48 horas após o início do experimento, quando todos os animais expostos a essa concentração

morreram. Já nos tratamentos com a FSD as concentrações de HPAs foram relativamente menores que as observadas com o diesel e a tendência de redução da quantidade de HPAs dissolvidos na água ao longo do tempo foi semelhante entre as diferentes concentrações.

Dos 16 HPAs monitorados, os compostos Indeno[1,2,3-CD]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[ghi]perileno não foram detectados em nenhuma análise realizada. Por outro lado, outros quatro compostos apareceram em maior proporção tanto nos experimentos realizados com diesel quanto FSD: naftaleno, fenantreno+antraceno e pireno. O naftaleno também foi detectado em maior concentração no controle e no branco.

Tabela 3. Concentração (µg/L) individual e total de HPAs na água do experimento de exposição aguda ao óleo diesel e a fração solúvel do diesel (FSD) para a espécie *Astyanax altiparanae*.

Fração/ Concentração	Tempo de exposição	HPAs (µg/L)										Σ HPAs
		Naftaleno	Acenaftaleno	Acenafteno	Fluoreno	Fenantreno+ Antraceno	Fluoranteno	Pireno	Benzo[a]antraceno+ Criseno	Benzo[b]fluoranteno+ Benzo[k]fluoranteno	Benzo[a]pireno	
Diesel 0,1%	0h	132,56	0,50	1,36	2,48	45,31	2,78	13,10	3,05	1,39	1,11	203,64
	24h	19,25	0,83	1,35	2,30	21,76	1,69	11,70	3,69	2,32	0,68	65,57
	48h	4,51	0,56	1,36	2,43	11,08	1,64	1,57	0,35	0,89	0,85	25,24
	72h	1,45	0,53	1,19	2,64	4,64	1,75	6,19	0,83	1,79	0,52	21,53
	96h	2,16	0,47	1,07	2,24	4,81	3,47	8,39	0,53	1,94	0,91	25,99
Diesel 4%	0h	4498,17	7,04	16,35	29,71	905,81	54,43	275,32	93,32	19,05	21,04	5920,24
	24h	2057,03	7,65	18,06	32,75	320,52	37,08	254,33	116,40	57,23	21,21	2922,26
	48h	1829,54	7,24	17,25	31,27	183,52	22,12	20,46	5,45	17,65	13,80	2148,30
	72h	1853,75	0,54	1,23	2,07	36,17	8,42	4,70	2,15	1,36	1,24	1911,63
	96h	378,13	0,43	1,26	2,31	30,52	21,18	30,64	8,68	3,98	1,45	478,58
Diesel 15%	0h	450,26	0,39	1,19	2,15	149,34	8,49	46,59	22,53	2,21	4,05	687,20
	24h	4206,76	10,92	24,80	41,83	609,37	61,17	454,98	175,44	36,06	20,95	5642,28
	48h	5419,09	11,34	27,73	50,02	352,76	43,65	38,58	14,77	34,60	17,52	6010,06
FSD 0,5%	0h	21,60	0,49	1,20	2,03	3,18	0,58	1,50	0,25	0,39	0,27	31,49
	24h	< LD	< LD	0,01	0,03	0,13	< LD	0,16	0,06	0,09	< LD	0,48
	48h	0,23	0,04	0,04	0,07	0,15	0,04	0,23	0,11	0,07	< LD	0,98
	72h	0,83	0,05	0,08	0,19	0,20	0,14	0,42	0,14	0,28	< LD	2,33
	96h	0,04	< LD	< LD	0,02	0,12	< LD	< LD	0,01	0,15	< LD	0,34
FSD 10%	0h	394,43	0,39	1,20	2,07	30,86	2,48	16,58	4,16	1,14	1,00	454,31
	24h	< LD	0,02	0,07	0,57	1,02	0,24	0,70	0,08	0,14	< LD	2,84
	48h	0,02	0,03	0,08	0,45	0,71	0,24	0,54	0,11	0,13	< LD	2,31
	72h	5,47	0,73	1,37	2,69	7,98	2,22	10,32	1,41	2,24	1,07	35,50
	96h	4,61	0,64	1,01	1,99	4,37	3,81	5,24	0,64	2,04	0,34	24,69
FSD 80%	0h	1490,50	4,56	12,30	22,65	1294,94	153,29	215,44	77,06	15,84	12,70	3299,28

Fração/ Concentração	Tempo de exposição	HPAs (µg/L)										Σ HPAs
		Naftaleno	Acenaftaleno	Acenafteno	Fluoreno	Fenantreno+ Antraceno	Fluoranteno	Pireno	Benzo[a]antraceno+ Criseno	Benzo[b]fluoranteno+ Benzo[k]fluoranteno	Benzo[a]pireno	
	24h	633,10	5,18	12,29	23,21	304,56	40,51	246,41	84,08	18,07	17,15	1384,56
Controle	0h	2,62	0,04	0,04	0,04	0,02	< LD	< LD	> LD	< LD	< LD	2,76
	24h	2,68	0,04	0,06	0,07	0,06	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	2,91
	48h	0,13	0,00	< LD	0,01	0,01	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,15
	72h	0,23	< LD	< LD	0,00	0,00	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,23
	96h	0,04	< LD	< LD	0,00	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,04
Branco	0h	6,79	0,19	0,26	0,35	0,23	0,00	0,07	> LD	< LD	< LD	7,89
	24h	15,05	0,86	1,22	1,40	0,66	0,03	0,11	< LD	< LD	< LD	19,33
	48h	0,67	0,02	0,02	0,04	0,07	0,00	0,00	< LD	< LD	< LD	0,82
	72h	0,60	0,00	0,00	0,02	0,03	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,65
	96h	1,14	0,14	0,16	0,26	0,24	0,03	0,15	< LD	< LD	< LD	2,12

<LD= menor que o limite de detecção.

A análise dos compostos voláteis (BTEX) permitiu detectar uma redução acentuada em suas concentrações após 24 horas de exposição nos dois tratamentos. Entretanto, no diesel 15% as concentrações voltaram a aumentar em 48 horas. Dentre os cinco hidrocarbonetos voláteis analisados, os que apresentaram maior concentração, tanto no diesel quanto na FSD foram: xilenos (*m,p*-xileno e *o*-xileno), tolueno e etilbenzeno (Tabela 4). A presença de BTEX em baixas concentrações foi detectada no aquário controle e branco.

Tabela 4. Concentração ($\mu\text{g/L}$) individual e total de BTEX na água do experimento de exposição aguda ao óleo diesel e a fração solúvel do diesel (FSD) para a espécie *Astyanax altiparanae*.

Fração/ Concentração	Tempo de Exposição	BTEX ($\mu\text{g/L}$)					Σ BTEX
		Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	<i>m,p</i> -Xileno	<i>o</i> -Xileno	
Diesel 0,1%	0h	< LD	9,93	30,76	92,28	105,83	238,80
	24h	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	48h	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	72h	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	96h	0,29	< LD	< LD	< LD	< LD	0,29
Diesel 4%	0h	46,11	450,16	198,01	374,82	410,93	1480,03
	24h	< LD	24,81	457,84	1669,83	1319,96	3472,44
	48h	< LD	0,12	15,42	44,43	68,45	128,42
	72h	< LD	< LD	67,65	308,82	263,20	639,67
	96h	< LD	< LD	30,17	135,95	129,78	295,90
Diesel 15%	0h	133,60	899,83	1272,12	2097,82	2300,12	6703,48
	24h	1,46	164,64	189,41	460,66	467,08	1283,26
	48h	< LD	107,29	772,14	1282,81	1678,24	3840,48
FSD 0,5%	0h	< LD	2,11	15,30	35,67	42,44	95,53
	24h	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	48h	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	72h	0,28	< LD	< LD	< LD	< LD	0,28
	96h	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
FSD 10%	0h	3,04	42,39	56,59	114,52	127,66	344,20
	24h	< LD	< LD	0,68	0,70	< LD	1,38
	48h	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,00
	72h	< LD	< LD	0,58	0,98	< LD	1,56
	96h	< LD	< LD	2,37	2,07	< LD	4,45
FSD 80%	0h	21,78	177,29	123,59	279,37	283,14	885,17
	24h	< LD	23,76	24,70	85,31	49,45	183,23
Controle	0h	4,83	12,76	5,47	8,39	6,82	38,27
	24h	2,27	1,02	2,40	3,65	1,75	11,09
	48h	2,10	< LD	2,22	2,51	0,57	7,39
	72h	2,02	< LD	1,79	0,90	< LD	4,71
	96h	1,97	< LD	1,79	0,90	< LD	4,66
Branco	0h	3,72	8,32	4,26	5,46	3,64	25,40
	24h	2,08	< LD	2,39	2,87	0,69	8,03
	48h	3,10	< LD	2,73	3,19	1,25	10,27
	72h	2,12	< LD	2,29	1,51	< LD	5,91
	96h	2,01	< LD	1,79	0,90	< LD	4,70

<LD= menor que o limite de detecção.

Alterações Comportamentais

Foram observadas algumas alterações comportamentais nos peixes expostos ao diesel e à FSD (Tabela 5). Os animais do tratamento controle e das duas menores concentrações do diesel e da FSD apresentaram comportamento de agitação durante as 96 horas de experimento. Além disso, esses peixes expostos às menores concentrações do diesel e da FSD também apresentaram comportamento canibalista de alguns indivíduos. Já nas maiores concentrações, os peixes apresentaram letargia, permanecendo imóveis, mesmo com a aproximação do observador, além de desequilíbrio, acompanhado de nado errático. A intensidade dessas alterações comportamentais foi gradativa, com maior ocorrência conforme o aumento das concentrações de diesel e FSD.

Tabela 5. Comportamentos observados durante a condução do experimento de toxicidade aguda do óleo diesel e da fração solúvel do óleo diesel (FSD) para *Astyanax altiparanae*.

	Tratamentos														Con.
	Diesel (%)							FSD (%)							
	0,1	1	2	4	8	10	15	0,5	1	5	10	20	40	80	
Desequilíbrio	nd	nd	nd	x	nd	x	x	nd	nd	x	nd	x	x	x	nd
Letargia	nd	nd	nd	nd	x	x	x	nd	nd	nd	x	x	x	nd	nd
Agitação	x	x	nd	nd	nd	nd	nd	x	x	nd	nd	nd	nd	nd	x
Canibalismo	x	x	nd	nd	nd	nd	nd	x	x	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd = não detectado, Con.= controle

Determinação da CL₅₀ do Óleo Diesel e da FSD

Não houve mortalidade no tratamento controle. Porém, em ambos os tratamentos a mortalidade apresentou relação direta com a concentração do contaminante.

A CL₅₀ do óleo diesel e da FSD em *A. altiparanae* foi calculada em 24, 48, 72 e 96 horas (Figura 2). Nota-se que a concentração de óleo diesel necessária para causar efeito letal para 50% dos peixes em 24 horas foi 25 vezes menor que a concentração da FSD, evidenciando sua maior toxicidade no início da exposição. Com o passar do tempo, para ambas as substâncias testadas, os efeitos tóxicos aumentaram e a CL₅₀ diminuiu, alcançando concentrações de 1,35% (0,78-2,35%), para o diesel, e de 25,21% (17,43-36,46%), para a FSD. Porém, houve uma tendência de estabilização da toxicidade do diesel entre 48 e 96 horas, sendo que isso não foi observado para a FSD que, de 24 até 96 horas, apresentou um aumento contínuo na sua toxicidade.

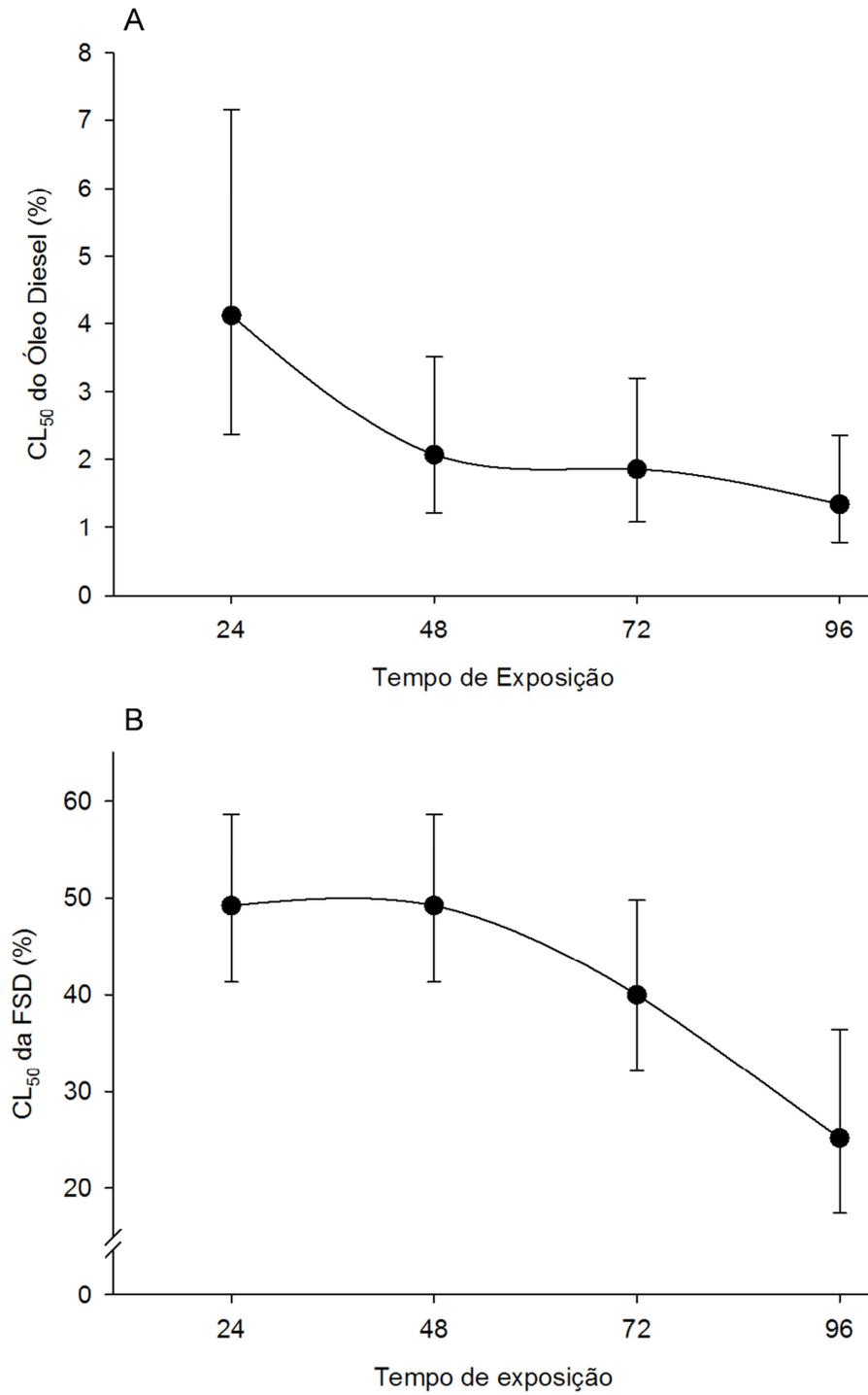


Figura 2. Valores da CL₅₀ e seus intervalos de confiança. A) óleo diesel e B) fração solúvel do óleo diesel (FSD), nos diferentes tempos de exposição (horas), para *Astyanax altiparanae*.

DISCUSSÃO

Observou-se que a qualidade da água nas soluções-teste apresentou diferenças significativas em relação ao pH e às concentrações de N-NH₃. Compostos amoniacais podem ser tóxicos para peixes principalmente quando estes são mantidos em altas densidades (Martinez et al. 2006). A forma gasosa da amônia (NH₃) é reconhecidamente tóxica para os peixes (Campbell 1991). Por sua vez, a concentração de amônia gasosa na água é diretamente dependente da concentração de amônia total, do pH e da temperatura (Heath 1995; Ostrensky et al. 1992). Apesar disso, as concentrações de N-NH₃ quantificadas possivelmente não foram suficientes para interferir nas taxas de sobrevivência observadas, principalmente, porque as maiores concentrações foram quantificadas nos tratamentos controle e branco, justamente onde a agitação e a atividade natatória dos peixes eram maiores.

Tanto os HPAs quanto os BTEX que apresentaram maior concentração no presente trabalho, também foram encontrados em maior concentração na água por vários autores que realizaram exposições em condições laboratoriais (Kakkar et al. 2011; Mos et al. 2008; Rodrigues et al. 2010; Simonato et al. 2008). Essa tendência de aumento da concentração de HPAs observado no diesel 15% pode ser explicada pela formação de uma espessa camada de óleo na superfície da lâmina d'água, que pode ter liberado os componentes tóxicos do diesel mais gradativamente para a coluna água.

No entanto, o somatório da concentração dos HPAs e BTEX foi, em geral, bastante superior às concentrações descritas na literatura, principalmente nos tratamentos que utilizaram altas porcentagens do diesel, alcançando valores de até 6010,06 e 6703,48 µg/L para HPAs e BTEX,

respectivamente. Já nos tratamentos com a FSD os valores foram menores, atingindo concentrações de 3299,28 µg/L para HPAs e 885,17 µg/L para BTEX. Essas diferenças marcantes em relação a outros dados publicados podem estar relacionadas principalmente com o método de preparo da FSD (Saeed and Al-Mutairi 1999). Além disso, grande parte dos autores citados realizaram testes somente com a FSD e não com o óleo diesel bruto.

A presença de HPAs (principalmente naftaleno) e BTEX (xilenos, tolueno e etileno) no controle e no branco pode ter sido resultado da volatilização dos compostos dentro do laboratório. De acordo com Varanasi e Stein (1991) hidrocarbonetos com dois ou três anéis aromáticos, como é o caso do naftaleno, apresentam maior solubilidade em água e alta volatilidade. Os BTEX, conhecidos como hidrocarbonetos voláteis também apresentam tais características. Como os experimentos foram conduzidos em local fechado e com temperatura ambiente mantida em torno de 28°C, assume-se que toda a contaminação observada teve origem nos processos de volatilização dentro do próprio ambiente experimental, uma vez que HPAs e BTEX não foram introduzidos nos aquários controle e branco e todo o material utilizado nos experimentos era novo.

As concentrações de hidrocarbonetos (HPAs e BTEX) presentes naturalmente no petróleo e, posteriormente, em seus derivados, são distintas e variam entre as regiões de origem do petróleo (Heath 1995). Dos três HPAs detectados em maior concentração (naftaleno, fenantreno+antraceno e pireno), tanto nos tratamentos com diesel quanto nos tratamentos com a FSD, dois deles (naftaleno, fenantreno) também apresentaram as maiores concentrações na FSD utilizada por Rodrigues et al. (2010). Para peixes, são os HPAs que

geralmente têm sido considerados como os componentes que causam maior toxicidade (Anderson et al. 1974). Por outro lado, Albers (2003) aponta, especificamente para o óleo diesel, que os compostos monoaromáticos (BTEX) são seus principais componentes tóxicos, pois em combustíveis leves são encontrados em maiores concentrações.

Para organismos aquáticos, a sensibilidade aos compostos tóxicos é afetada por diversos fatores como o estado nutricional, necessidades fisiológicas, comportamento, entre outros (Bhattacharyya et al. 2003; Van der Oost et al. 2003). Apesar de não ter sido empregada metodologia específica para a avaliação quantitativa das reações comportamentais nos animais expostos ao óleo diesel, é notório que os indivíduos expostos às concentrações mais altas do diesel e da FSD apresentaram alterações comportamentais em comparação aos exemplares do controle.

De acordo com Heath (1995) alterações comportamentais ocupam alto nível no espectro de complexidade biológica. No ambiente, a capacidade dos indivíduos de evitarem a predação depende da eficiência no comportamento de percepção e fuga em relação ao predador. Apesar dos peixes terem a capacidade de perceber a presença do diesel na água (Hellstrøm and Døving 1983), a exposição prolongada pode provocar a morte de células neurais ou mesmo alterações na síntese de neurotransmissores, podendo alterar diretamente aquelas respostas, tornando o indivíduo e a população mais vulneráveis à predação (Weis et al. 2001; Weis et al. 2000).

Alguns estudos realizados com peixes já descreveram alterações comportamentais decorrentes da exposição ao petróleo (Anderson 1975; Engelhardt et al. 1981; Hellstrøm and Døving 1983; Kochhann 2010).

Kochhann (2010) testou a influência de baixas concentrações do petróleo e de um óleo mineral inerte, e suas frações solúvel e insolúvel, sobre a atividade natatória do Tambaqui (*Colossoma macropomum*). A autora observou alteração comportamental em todos os tratamentos que utilizaram a fração insolúvel. Ela conclui que a redução da capacidade natatória pode ser consequência da diminuição da capacidade de trocas gasosas, causada pela presença física da fração insolúvel em contato com as brânquias do peixe. Dessa forma, sugere-se que novas investigações, com foco no comportamento da espécie *Astyanax altiparanae*, sejam conduzidas com o objetivo de quantificar as alterações comportamentais aqui reportadas.

Em geral, os trabalhos que expõem peixes de água doce a óleos combustíveis avaliam respostas bioquímicas, fisiológicas e histopatológicas em concentrações subletais (Akaishi et al. 2004; Silva and Martinez 2007; Silva et al. 2009; Simonato et al. 2004; Simonato et al. 2008). Entretanto, Pollino e Holdway (2002), testaram a toxicidade da fração acomodada do petróleo para uma espécie peixe ornamental de água doce (*Melanotaenia fluviatilis*) e a CL₅₀ obtida após 96 horas de exposição foi de aproximadamente 40%. Comparado ao resultado de CL₅₀-96h da FSD para o lambari do rabo amarelo, a toxicidade descrita por Pollino e Holdway (2002) foi cerca de 60% menor. Essa diferença pode estar relacionada a diferenças na sensibilidade das espécies e à metodologia de preparo da fração solúvel, pois durante o preparo a fração acomodada não é agitada e, dessa forma, apresenta menores concentrações de compostos tóxicos solúveis em água (Saco-Álvarez et al. 2008).

Apesar da toxicidade de óleos combustíveis ser, aparentemente, maior em espécies de água doce (Shukla et al. 2007), alguns estudos têm avaliado a

toxicidade aguda para peixes marinhos (Cohen and Nugegoda 2000; Neff et al. 2000; Rodrigues et al. 2010). Como esperado, a toxicidade da fração solúvel em água dos diferentes tipos de óleo estudados por Neff et al. (2000) e dos óleos estudados por Cohen e Nugegoda (2000) foram menores que os observados com a FSD, de 32 a 88% e 45%, respectivamente. Por outro lado, a CL₅₀ 96h da FSD avaliada por Rodrigues et al. (2010), para o peixe peixe-rei, *Odontesthes argentinensis*, apontou maior toxicidade da FSD em comparação à observada para o lambari do rabo amarelo, alcançando o valor de 13,46% (10,19–17,79%). Davison et al. (1992) expôs exemplares de *Pagothenia borchgrevinki*, uma espécie de peixe antártico, a 100% da FSD e não observou nenhuma mortalidade ao final de 72 horas. Esses resultados, aliados aos obtidos com o lambari do rabo amarelo, sugerem uma variação na sensibilidade a óleos combustíveis em diferentes espécies de peixes. Esse fato evidencia a necessidade de se conhecer esses efeitos nas espécies utilizadas como bioindicador de qualidade ambiental e reforçam a necessidade de realização de estudos com espécies nativas do Brasil.

De acordo com a literatura, a fração solúvel em água de um óleo combustível apresenta, em geral, maior toxicidade para peixes em comparação ao óleo bruto (Albers 2003). Porém, neste trabalho foi observado um efeito tóxico maior do diesel puro em comparação à FSD após 96 horas de exposição. Essa maior toxicidade pode estar relacionada à maior concentração de HPAs detectados no óleo diesel utilizado no teste agudo. Especialmente pela alta concentração apresentada por alguns compostos, como o naftaleno, por exemplo. Esse HPA apresenta, segundo Anderson (1979), maior potencial para a bioacumulação e retenção no organismo comparado a hidrocarbonetos

monoaromáticos. Além disso, já foi demonstrado que o naftaleno pode ser bioacumulado rapidamente, após 24h de exposição, nas brânquias, vesícula biliar, fígado, intestino, além de tecidos críticos como o cérebro de peixes (Domingos et al. 2011).

Resumidamente, os resultados obtidos neste estudo permitem a expansão o conhecimento sobre a toxicidade do óleo diesel, principalmente em futuros testes de exposição subcrônica e crônica. Além disso, demonstram que o peixe de água doce *A. altiparanae* apresenta maior sensibilidade ao óleo diesel que à sua fração solúvel em água.

BIBLIOGRAFIA

- Akaishi FM, Silva de Assis HC, Jakobi SCG, Eiras-Stofella DR, St-Jean SD, Courtenay SC, Lima EF, Wagener ALR, Scofield AL, Oliveira Ribeiro CA. 2004. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax* sp.) After Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46(2):244-253.
- Albers PH. 2003. Petroleum and Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA, Cairns J, editors. *Handbook of Ecotoxicology*. 2nd ed. New York: Lewis Publishers. p 1315.
- Anderson JW. 1975. Laboratory studies on the effects of oil on marine organisms: an overview. *American Petroleum Institute Publications* 4249:1-70.
- Anderson JW. 1979. An assessment of knowledge concerning the fate and effects of petroleum hydrocarbons in the marine environment. In: Vernberg WB, Calabresse A, Thurberg FP, Vernberg FJ, editors. *Marine Pollution: Functional Responses*. New York: Academic Press.
- Anderson JW, Neff JM, Cox BA, Tatem HE, Hightower GM. 1974. Characteristics of Dispersions and Water-Soluble Extracts of Crude and Refined Oils and Their Toxicity to Estuarine Crustaceans and Fish. *Marine Biology (Berlin)* 27:75-88.
- ASTM. 1994. Manual of water and environmental technology. Standard test methods for ammonia nitrogen in water (D1426-92). *International Standards Wordwild*
- Bennemann ST, Shibatta OA. 2002. Dinâmica de uma assembléia de peixes do rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA, editors. *A Bacia do Rio Tibagi*. Londrina/PR: Edição dos Editores.

- Bhattacharyya S, Klerks PL, Nyman JA. 2003. Toxicity to freshwater organisms from oils and oil spill chemical treatments in laboratory microcosms. *Environmental Pollution* 122(2):205-215.
- Boeger WA, Guimarães ATB, Romão S, Ostrensky A, ZAmberlan E, Falkiewicz FH. 2003. Histopathology as an approach to evaluate the effect of an oil spill on fishes of Arroio Saldanha and Rio Iguaçu (Brazil). International oil spill conference. Washington, USA: Amer Petroleum Inst.
- Campbell JW. 1991. Excretory nitrogen metabolism. In: Prosser CL, editor. *Environmental and metabolic animal physiology*. 4^o e d. New York: Wiley-Liss. p 277-324.
- CETESB. 1990. *Companhia de Tecnologia e Saniamento Ambiental - Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*.
- Cohen AM, Nugegoda D. 2000. Toxicity of Three Oil Spill Remediation Techniques to the Australian Bass *Macquaria novemaculeata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47(2):178-185.
- Davison W, Franklin CE, McKenzie JC, Dougan MCR. 1992. The effects of acute exposure to the water soluble fraction of fuel oil on survival and metabolic rate of an Antarctic fish (*Pagothenia borchgrevinki*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 102C:185–188.
- Domingos FXV, Ribeiro CAO, Pelletier E, Rouleau C. 2011. Tissue Distribution and Depuration Kinetics of Waterborne ¹⁴C-labeled Light PAHs in Mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environmental Science & Technology*.
- Engelhardt FR, Wong MP, Duey ME. 1981. Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water, as affected by petroleum exposure. *Aquatic Toxicology (Amsterdam)* 1:175-186.
- EPA. 1989. US Environmental Protection Agency - Method 502.2: Volatile organic compounds in water by purge and trap capillary column gas chromatography with photoionization and electrolytic conductivity detectors in series. p 1-34.
- EPA. 1994. US Environmental Protection Agency - Method 525.2: Determination of organic compounds in drinking water by liquid-solid extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry. p 1-55.
- EPA. 1996a. US Environmental Protection Agency - Method 5021: Volatile organic compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis. p 1-13.
- EPA. 1996b. US Environmental Protection Agency - Method 8021B: Aromatic and halogenated volatiles by gas chromatography using photoionization and/or electrolytic conductivity detectors. p 1-19.
- EPA. 1996c. US Environmental Protection Agency - Method 8270C: Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (gc/ms). p 1-54.
- EPA. 1996d. US Environmental Protection Agency: Method 3510C: Separatory funnel liquid-liquid extraction. p 1-8.
- EPA. 2002. United States of Environmental Protection Agency. Methods of measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Washington, EUA. p 266.
- Gerry J. 1977. *Characides of the World*. USA: TFH Publications.

- Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology* 11(7):714-719.
- Heath AG. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*: Lewis Publishers.
- Hellstrøm T, Døving KB. 1983. Perception of diesel oil by cod (*Gadus morhua* L.). *Aquatic Toxicology* 4(4):303-315.
- Kakkar PH, Saxena RM, Rathee NS, Joshi M. 2011. Water soluble fraction of diesel fuel induced histopathological alterations in the liver of *Channa punctatus*. *Toxicology International* 18(1):14-16.
- Katsumiti A, Domingos F, Azevedo M, da Silva M, Damian R, Almeida M, de Assis H, Cestari M, Randi M, Ribeiro C and others. 2008. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish (*Cathorops spixii*) after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment* 152(1):209-222.
- Kochhann D. 2010. Exposição do tambaqui ao petróleo: marcadores fisiológicos, bioquímicos e comportamentais. Manaus/AM: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 75 p.
- Martinez CBR, Azevedo F, Winkaler EU. 2006. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: Cyrino JEP, Urbinati EC, editors. *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura*. Jaboticabal - SP: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. p 81-95.
- Mos L, Cooper GA, Serben K, Cameron M, Koop BF. 2008. Effects of Diesel on Survival, Growth, and Gene Expression in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry. *Environmental Science & Technology* 42(7):2656-2662.
- Neff JM, Ostazeski S, Gardiner W, Stejskal I. 2000. Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(7):1809-1821.
- Ostrensky A, Chaves PTC, Duboc LF, Guimarães ATB, Cruz SRZ, Wegbecher FX, Pilchowski RW, Teixeira UA, Belz CE. 2001. Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigüí e Iguaçu. 2º Seminário do Rio Iguaçu. Araucária, Paraná, Brasil. p 32-52.
- Ostrensky A, Marchiori MA, Poersch LH. 1992. Toxicidade Aguda da Amônia no Processo Produtivo de Pós-Larvas de *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 64(4):383-389.
- Petrobras. 2010. Diesel S-50: Manual Técnico do Produto. 17 p.
- Pollino CA, Holdway DA. 2002. Toxicity Testing of Crude Oil and Related Compounds Using Early Life Stages of the Crimson-Spotted Rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52(3):180-189.
- Prioli SMAP, Prioli AJ, Júlio HF, Pavanelli CS, Oliveira AV, Carrer H, Carraro DM, Prioli LM. 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 25:421-430.
- Rodrigues RV, Miranda-Filho KC, Gusmão EP, Moreira CB, Romano LA, Sampaio LA. 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Science of the Total Environment* 408:2054-2059.
- Saco-Álvarez L, Bellas J, Nieto Ó, Bayona JM, Albaigés J, Beiras R. 2008. Toxicity and phototoxicity of water-accommodated fraction obtained from

- Prestige fuel oil and Marine fuel oil evaluated by marine bioassays. *Science of the Total Environment* 394(2–3):275-282.
- Saeed T, Al-Mutairi M. 1999. Chemical composition of the water-soluble fraction of the leaded gasolines in seawater. *Environment International* 25(1):117-129.
- Schulz UH, Martins-Júnior H. 2001. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 61(4):615-622.
- Shukla P, Gopalani M, Ramteke D, Wate S. 2007. Influence of Salinity on PAH Uptake from Water Soluble Fraction of Crude Oil in *Tilapia mossambica*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79(6):601-605.
- Silva AG, Martinez CBR. 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23:185–192.
- Silva CA, Oliveira Ribeiro CA, Katsumiti A, Araújo MLP, Zandoná EM, Costa Silva GP, Maschio J, Roche H, Silva de Assis HC. 2009. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(2):400-409.
- Simonato JD, Albinati AC, Guedes CLB, Martinez CBR. 2004. Effects of diesel oil on some morphological and functional parameters of *Prochilodus lineatus* during acute and chronic exposure. In: Sloman K, Wood C, MacKinlay D, editors. *International Congress on the Biology of Fish*. Manaus, Brazil.
- Simonato JD, Guedes CLB, Martinez CBR. 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69(1):112-120.
- Sprague JB. 1990. Aquatic Toxicology. In: SCHRECK CBM, P. B. , editor. *Methods for Fish Biology: American Fisheries Society*,. p 491-598.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(2):57-149.
- Varanasi U, Stein JE. 1991. Disposition of xenobiotic chemicals and metabolites in marine organisms. *Environmental Health and Perspective* 90:93-100.
- Weis JS, Smith G, Zhou T, Santiago-Bass C, Weis P. 2001. Effects of Contaminants on Behavior: Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences. *BioScience* 51:209-217.
- Weis JS, Smith GM, Santiago-Bass C. 2000. Predator/prey interactions: a link between the individual level and both higher and lower level effects of toxicants in aquatic ecosystems. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 7:145-153.
- Zar JH. 1984. *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc. 718 p.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA HISTOPATOLOGIA BRANQUIAL DE *Astyanax altiparanae* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA E SUBCRÔNICA AO ÓLEO DIESEL³

Giorgi Dal Pont, Marco Tadeu Grassi,² Walter Antonio Pereira Boeger,¹
Antonio Ostrensky Neto^{1*}

¹*Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais - GIA, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Rua dos Funcionários, 1540 – Juvevê, Curitiba – PR, Brasil.*

²*Grupo de Química Ambiental – GQA, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Departamento de Química, Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico - Jardim das Américas, Caixa Postal 1908, Curitiba – PR, Brasil*

*Autor para correspondência: Antonio Ostrensky Neto
E-mail: ostrensky@ufpr.br
Telefone: +5541 33505634

RESUMO

Hidrocarbonetos de petróleo, principalmente os policíclicos aromáticos (HPAs) e os monoarômáticos (BTEX) são conhecidos por provocarem diversos tipos de alterações em peixes. As alterações histológicas branquiais induzidas por esses compostos apresentam-se como uma importante ferramenta no diagnóstico de impacto ambiental. As brânquias de *Astyanax altiparanae* foram analisadas histologicamente após a exposição aguda (96 horas) e subcrônica (15 dias) ao óleo diesel e à fração solúvel do óleo diesel (FSD). Em ambos os experimentos foi analisada a presença de HPAs e BTEX na água. As brânquias dos peixes apresentaram uma série de lesões teciduais como fusão lamelar, descolamento de epitélio, congestão lamelar, hiperplasia celular e descamação epitelial. O índice de Impacto nas Brânquias (IIBr) calculado para cada alteração revelou que na exposição aguda houve uma relação direta entre a concentração de diesel e FSD e a indução de necrose, descamação do epitélio e hipertrofia celular. Para as demais alterações, o IIBr não apresentou qualquer relação com as concentrações do diesel e da FSD a que os peixes foram expostos. Após a exposição subcrônica o IIBr calculado para as diferentes alterações não apresentou uma relação dose/efeito com as concentrações de diesel e FSD.

Palavras-chave: Biomarcador; Derivados do petróleo; Hidrocarbonetos; Histologia; Peixe; Poluição aquática; Testes laboratoriais

³ Artigo redigido de acordo com as normas da revista Environmental Toxicology ([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1522-7278](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1522-7278))

INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos de petróleo, principalmente os policíclicos aromáticos (HPAs) e os monoarômáticos (BTEX) são conhecidos por induzir diversos tipos de alteração em peixes. Dentre elas, podem ser citadas alterações moleculares (Kleinjans e van Schooten 2002; Lemos et al. 2008), enzimáticas (Abrahamson et al. 2007; Pal et al. 2011), fisiológicas (Davison et al. 1992; Goanvec et al. 2010; Katsumiti et al. 2009) e histopatológicas (Akaishi et al. 2004; Boeger et al. 2003; Simonato et al. 2004; Simonato et al. 2008; Winkaler et al. 2001). Apesar de serem consideradas alterações distintas, a histopatologia é influenciada por alterações enzimáticas e fisiológicas que resultam em lesões teciduais que podem ser examinadas microscopicamente (Heath 1995; Van der Oost et al. 2003). Do ponto de vista ecotoxicológico, as brânquias dos peixes apresentam grande importância histológica, pois devido à necessidade de realização de trocas gasosas, a superfície desse órgão é extremamente fina e delicada, o que facilita a passagem de compostos tóxicos que podem danificar a sua estrutura (Heath 1995).

Peixes do gênero *Astyanax* sp. têm sido muito utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental (Akaishi et al. 2004; Schulz e Martins-Júnior 2001; Silva et al. 2009). Após um acidente que provocou o um dos maiores vazamentos de óleo combustível em ambientes de água doce do Brasil, Ostrensky et al. (2001) e Boeger et al. (2003) utilizaram esse gênero como bioindicador ambiental, e detectaram a ocorrência de várias alterações histológicas nas brânquias. Entretanto, como a região é exposta a outras substâncias tóxicas oriundas de atividades industriais e domésticas (Silva et al.

2009), não ficou claro se as alterações observadas foram causadas pela presença do óleo combustível ou se pela mistura de compostos químicos já presentes no ambiente. O objetivo desse trabalho foi avaliar, em condições laboratoriais, se a exposição aguda e subcrônica ao óleo diesel e a FSD pode induzir alterações histopatológicas nas brânquias de *Astyanax altiparanae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Aquisição e Manutenção dos Animais

Os exemplares de *A. altiparanae* foram adquiridos em uma distribuidora comercial de peixes, localizada no município de Curitiba/PR. Após a compra, os peixes foram transportados até o Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA). Imediatamente após a chegada ao laboratório foram acondicionados em tanque de polietileno (500L) e mantidos sob aeração constante e temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por duas semanas. O tanque de aclimação era equipado com um sistema fechado de filtragem para manutenção da qualidade da água. Diariamente os peixes foram alimentados, *ad libitum*, com ração comercial floculada (TetraMin®) contendo 47% de proteína bruta.

Aquisição do Óleo diesel e Preparo da FSD

O óleo diesel utilizado nos experimentos foi adquirido em um posto de combustível. De acordo com o fabricante, o óleo diesel comercializado na cidade de Curitiba/PR é o S-50, que possui 0,005% de enxofre na sua

composição, o que contribui para redução de emissão de material particulado para o meio ambiente. Além disso, o diesel S-50 contém 5% de biodiesel na sua composição (Petrobras 2010).

Os experimentos foram conduzidos utilizando o óleo diesel e a fração solúvel em água do óleo diesel (FSD). O preparo da FSD foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Anderson et al. (1974) com algumas modificações. Com o objetivo de simular um acidente em um ambiente aquático continental, uma parte de óleo diesel foi adicionada a quatro partes de água (1:4) e os dois compostos agitados vagarosamente, com auxílio de agitador magnético, observando-se a formação de um vórtex com cerca de 1/3 da altura do recipiente. Após 24 horas a solução foi mantida sem agitação por aproximadamente uma hora. A mistura foi cuidadosamente adicionada em um balão volumétrico para uma separação mais eficiente de partículas do óleo diesel da FSD. Após a separação a FSD foi imediatamente diluída nos aquários para a realização dos experimentos.

Exposição Aguda e Subcrônica

Foram realizados dois experimentos independentes e, em ambos, os animais foram submetidos por 48 horas à aclimação prévia às condições experimentais. Ao final desse período as alíquotas do óleo diesel e da FSD foram adicionadas ao sistema.

O primeiro consistiu na exposição aguda (96 horas) ao óleo diesel e à FSD. Esse experimento foi conduzido de acordo com a metodologia de determinação de concentração letal sugerida pela EPA (2002), com algumas

modificações. O teste de CL_{50} avalia os efeitos do contaminante usando como indicador a concentração da substância-teste que causa a mortalidade de 50% dos indivíduos durante determinado período de tempo (Sprague 1990). Para reduzir o número de animais usados no experimento, foram utilizadas apenas sete concentrações do óleo diesel e sete da FSD; diferente da metodologia padrão, que preconiza o uso de dez concentrações. Além do diesel e da FSD foi utilizado um tratamento controle e um branco.

Os peixes foram expostos às concentrações (%) do diesel e da FSD (Tabela 6) em aquários de vidro com aeração e temperatura controlados. Foram utilizados 10 animais por aquário na densidade de 1g/L. O experimento foi conduzido em sistema semiestático com renovação diária de 20% do conteúdo de água. Durante o período experimental os animais não receberam alimentação.

Tabela 6. Gradiente de concentração da FSD e da FTD utilizados no experimento de exposição aguda.

	Concentração (%)								
FSD	0,5	01	05	10	20	40	80	Controle	Branco
Diesel	0,1	01	02	04	08	10	15		

Devido à utilização de altas concentrações de diesel e de FSD no experimento agudo, a mortalidade dos animais foi monitorada a cada 2 horas, para que a perda dos tecidos por autólise fosse minimizada. Os parâmetros de qualidade da água: temperatura, oxigênio dissolvido, pH, amônia total ($N-AT = NH_3+NH_4^+$), amônia gasosa ($N-NH_3$), HPAs e BTEX, foram monitorados em 0, 24, 48, 72 e 96h após o início do experimento (CETESB 1990).

A partir dos valores da CL₅₀-96h do diesel e da FSD obtidos no experimento agudo foram estabelecidas as concentrações utilizadas no subcrônico (15 dias). Os valores da CL₅₀-96h foram previamente discutidos no Capítulo 2.

De acordo com Sprague (1971) estimativas de concentrações seguras de poluentes, ou seja, que não causariam mortalidade de peixes seria equivalente à concentração entre 1 a 40% da CL₅₀-96h. Dessa forma, para a exposição subcrônica foram utilizadas três concentrações, relativas às seguintes percentagens da CL₅₀-96h: 10, 20, 35 e 60%, tanto para o diesel quanto para a FSD. A concentração de 60% foi utilizada com o objetivo de testar o efeito da exposição a concentrações maiores que as sugeridas por Sprague.

No segundo experimento, de exposição subcrônica, todos os tratamentos foram conduzidos com quatro réplicas, inclusive o tratamento controle. Foram agrupados cinco peixes por aquário na densidade de 1g/L com temperatura e oxigênio controlados. Ao final do experimento, os peixes vivos foram anestesiados com benzocaína a 10%, insensibilizados, por meio de secção medular, identificados e fixados para posterior coleta das brânquias.

A temperatura, o oxigênio dissolvido e o pH da água foram monitorados em 0 e 24 horas e posteriormente em 3, 6, 9, 12 e 15 dias. As concentrações de HPAs, BTEX, N-AT e N-NH₃ foram mensuradas em 0 e 24 horas e posteriormente em 3, 12 e 15 dias. Os animais receberam alimento a cada três dias. Foi utilizada a mesma ração oferecida durante a aclimação. Para evitar o acúmulo de ração e fezes no aquário, o alimento foi ofertado, *ad libitum*, um dia antes do procedimento de coleta e renovação parcial da água (20%).

Análises da Água

Durante a execução dos experimentos a determinação da temperatura e das concentrações de oxigênio dissolvido foi realizada diretamente nos tanques, com auxílio de oxímetro digital portátil (YSI-550A). O pH foi determinado com o auxílio de pHmetro portátil (Hanna – HI8424).

A determinação do N-AT foi realizada de acordo com método colorimétrico de Nessler, descrito pela International Standards Worldwide (ASTM 1994). A percentagem de amônia gasosa (N-NH₃) foi mensurada a partir dos valores de N-AT, temperatura e pH, de acordo com a metodologia descrita por Ostrensky et al. (1992).

A quantificação dos 16 HPAs sugeridos pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) foi realizada por extração líquido-líquido (EPA 1996d), seguida da análise e quantificação por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (EPA 1996c). Para isso foi utilizado um espectrofotômetro de massa (CG-EM/Focus-PolarisQ), acoplado a um autoamostrador (AS 3000/Thermo Electron Corporation). Para determinação dos hidrocarbonetos voláteis (BETX) foi utilizada a análise direta via Headspace acoplado à cromatografia em fase gasosa (TraceGC ultra), com detecção por fotoionização e ionização em chama, baseando-se nos métodos descritos pela EPA (EPA 1996a; EPA 1996b).

Coleta de tecidos e análises histopatológicas

Foi analisado o tecido branquial de todos os peixes expostos ao diesel e à FSD no experimento agudo. No experimento subcrônico foram coletadas as brânquias apenas dos peixes que sobreviveram aos 15 dias de exposição. A coleta do tecido branquial foi realizada da mesma forma em ambos os experimentos. Após a morte os peixes foram identificados, fixados em solução de Davidson e preservados em álcool 70°GL (Beçak e Paulete 1976) para posterior coleta das brânquias.

Em seguida, o tecido branquial foi submetido ao processamento histológico de rotina, com inclusão em parafina histológica. Após ser seccionado em micrótomo rotativo (5 µm de espessura) os cortes foram corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Leica DMLS) para identificação de lesões histopatológicas.

As análises quantitativas de alterações brânquias foram realizadas por meio da seleção de um corte histológico por peixe. Neste corte foram escolhidos ao acaso cinco filamentos branquiais para análise. Todas as lamelas de cada filamento foram analisadas e todas as alterações observadas foram registradas. O número de alterações encontradas nas lamelas analisadas foi utilizado para calcular o Índice de Impacto Branquial (IIBr) de cada patogenia e concentração estudada, por meio da equação:

$$\text{IIBr} = \text{N}^\circ \text{ de lamelas alteradas} / \text{N}^\circ \text{ de lamelas analisadas}$$

O IIBr pode apresentar valores entre 0 (valor mínimo = ausência de patogenias) e 1,0 (valor máximo) (Cardoso 2006).

Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk's. A análise dos dados de qualidade da água e dos dados histológicos foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis*. Em caso de diferença significativa ($p < 0,05$), foi aplicado teste de *Dunn's* (Zar 1984). A aplicação dos testes estatísticos foi realizada com auxílio do software Statistica 8.0[®].

RESULTADOS

Qualidade da Água

No experimento de exposição aguda as concentrações de oxigênio dissolvido e de N-AT, bem como os valores de temperatura, não apresentaram variação entre os tratamentos utilizados ($p > 0,05$). Já o pH e a concentração de N-NH₃, apresentaram valores mais altos nos tratamentos controle e branco em comparação aos tratamentos expostos ao diesel e à FSD ($p < 0,05$). Por outro lado, no experimento de exposição subcrônica, que teve duração de 15 dias, houve diferença na concentração de oxigênio dissolvido e no pH ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Mediana (mín-máx) dos valores de oxigênio dissolvido (OD) (mg/L), temperatura (°C), pH, amônia total (N-AT= NH₃+NH₄⁺) (mg/L) e amônia gasosa (N-NH₃) (mg/L) nos diferentes experimentos de exposição ao óleo diesel.

Exposição	Parâmetro	Tratamento			
		Diesel	FSD	Controle	Branco
Aguda	OD	6,4	6,6	6,5	7,03
		(5,9-7,03)	(6,09-6,9)	(6,3-8,2)	(6,09-8,2)
	Temperatura	22,1	21,8	21,9	21,9
		(19,1-26,7)	(19,5-24,3)	(19,3-25,1)	(19,8-25,6)
	pH	6,3	6,2	7,4	7,2
		(6,0-6,7) ^a	(6,0-6,7) ^a	(7,1-7,4) ^b	(7,08-7,4) ^b
N-AT	1,1	0,8	0,6	1,4	
	(0,1-3,4)	(0,4-4,3)	(0,3-6,2)	(0,1-1,8)	
N-NH ₃	0,0009	0,0007	0,006	0,008	
	(0,003-0,004) ^a	(0,0004-0,004) ^a	(0,002-0,07) ^b	(0,001-0,02) ^b	
Subcrônica	OD	6,2	6,6	6,9	7,3
		(5,02-7,4) ^a	(5,2-7,2) ^b	(5,86-7,3) ^{ac}	(6,4-7,8) ^c
	Temperatura	25,2	24,9	25,0	24,8
		(23,1-26,8)	(22,8-26,3)	(23,6-26,8)	(23,1-25,7)
	pH	6,4	6,5	6,6	6,5
		(5,6-6,6) ^a	(5,8-6,8) ^b	(5,7-7,1) ^{ab}	(5,9-6,8) ^{ab}
N-AT	1,5	1,2	2,2	0,05	
	(0,32-5,8)	(0,07-2,8)	(0,4-5,2)	(0,03-1,2)	
N-NH ₃	0,003	0,002	0,0006	0,0007	
	(0,0003-0,009)	(0,0000-0,03)	(0,0002-0,01)	(0,0000-0,004)	

Letras indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis.

Em ambos os experimentos foi detectada a presença de HPAs e BTEX na água. Como esperado, maiores concentrações desses compostos foram observadas com o aumento gradativo das concentrações de diesel e FSD. Três HPAs apareceram em maior proporção tanto no experimento de exposição aguda quanto subcrônica: naftaleno e fenantreno+antraceno. Dentre os quatro hidrocarbonetos monoaromáticos analisados, os que apresentaram maiores concentrações foram: xilenos, tolueno e etilbenzeno.

Alterações Histopatológicas nas Brânquias

Exposição Aguda (96 horas)

No experimento agudo foi registrada uma série de lesões teciduais nas brânquias dos peixes (Tabela 8), havendo maior incidência de animais apresentando fusão lamelar (Figura 3B), descolamento de epitélio (Figura 3C), congestão lamelar e hiperplasia celular (Figura 3D), tanto no tratamento de exposição ao diesel como no de exposição à FSD.

Tabela 8. Percentagem de exemplares de *Astyanax altiparanae* que apresentou alteração branquial após exposição aguda ao diesel e a FSD.

Alterações	% de Peixes Afetados		
	Diesel n=70	FSD n=70	Controle n=10
Aneurisma	14	17	20
Cisto de protozoários	2	6	20
Congestão lamelar	74	65	100
Descamação do epitélio	41	16	10
Descolamento do epitélio	88	62	70
Fusão lamelar	89	73	90
Hiperplasia celular	50	52	80
Hipertrofia celular	20	11	10
Necrose	36	17	0
Neoplasia	0	0	0

n= número de animais analisados.

Também foi observada, em menor frequência, a ocorrência de descamação epitelial (Figura 3E), necrose (Figura 3E), hipertrofia celular, aneurisma (Figura 3F) e a presença de cistos de protozoários.

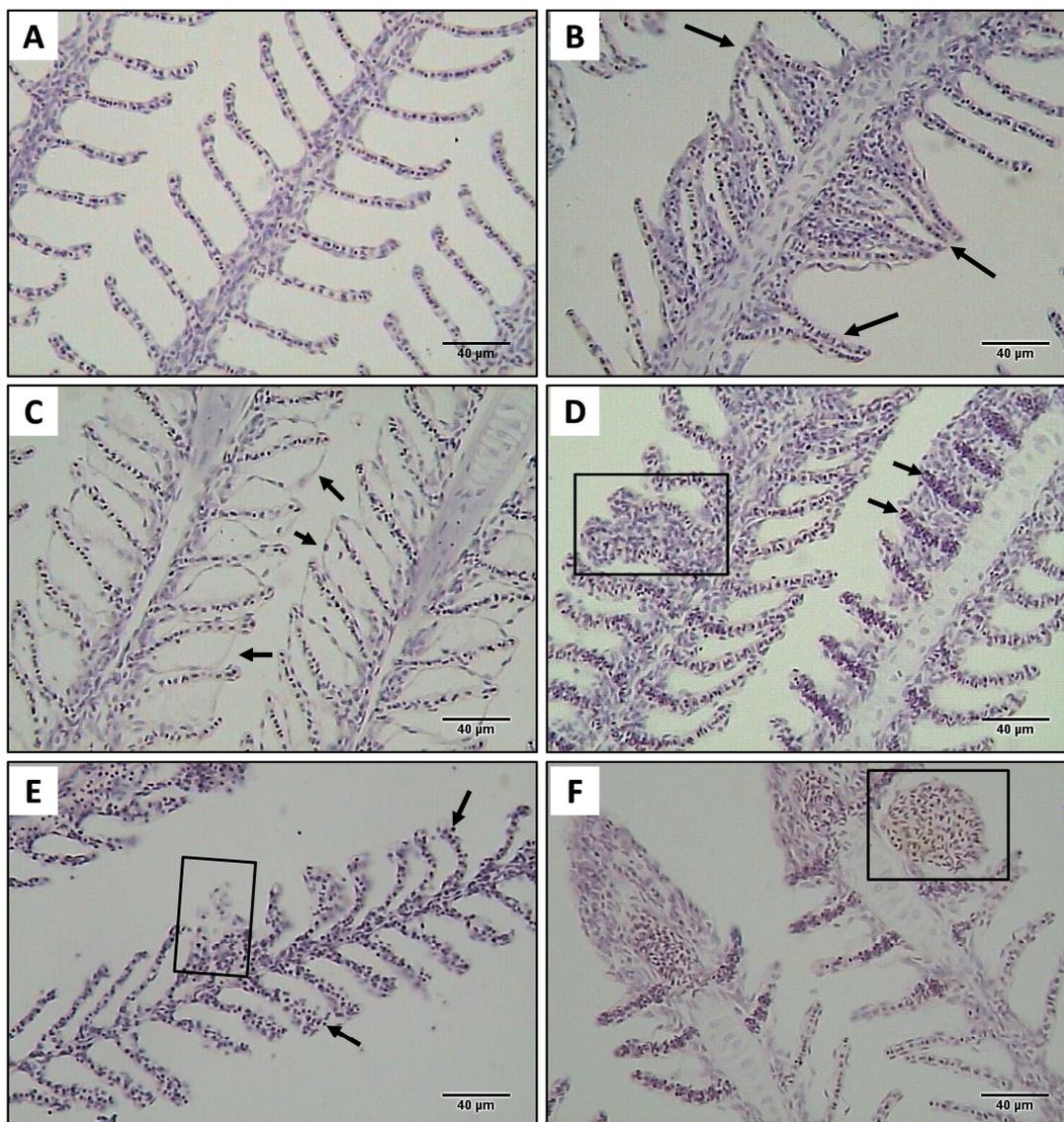


Figura 3. Fotomicrografia das brânquias de *Astyanax altiparanae* do experimento agudo (96 horas) em coloração HE. A) brânquia apresentando morfologia normal; B) fusão lamelar (seta); C) descolamento de epitélio (seta); D) Congestão (seta) e hiperplasia celular (□) E) necrose do tecido branquial – presença de núcleos picnóticos (seta) e descamação do epitélio (□); F) aneurisma (□).

Apesar da ocorrência em baixa frequência, algumas alterações foram responsáveis por causar maior dano ao tecido branquial que outras. A mediana

do IIBr da necrose celular, por exemplo, foi próximo a 1,0 em quatro das sete concentrações de diesel testadas. Porém, nas maiores concentrações (10 e 15%) ocorreu uma queda do IIBr da necrose (Figura 4A). Essa queda abrupta pode estar relacionada à rapidez com que as maiores concentrações de diesel causaram a morte dos indivíduos expostos, cerca de 48 horas após o início do experimento. Já na exposição à FSD, essa alteração foi observada somente nas duas maiores concentrações testadas, apresentando IIBr mediano de 1,0 (Figura 4B).

Além da necrose, o IIBr calculado para hipertrofia celular (Figura 5A e B) e para a descamação do epitélio (Figura 5C e D) também apresentaram tendência de aumento nas maiores concentrações de diesel e FSD no experimento de exposição aguda. Por outro lado, o IIBr da congestão lamelar apresentou uma relação inversa (Figura 5E e F).

Para as demais alterações, o IIBr não apresentou qualquer relação com as concentrações do diesel e da FSD a que os peixes foram expostos.

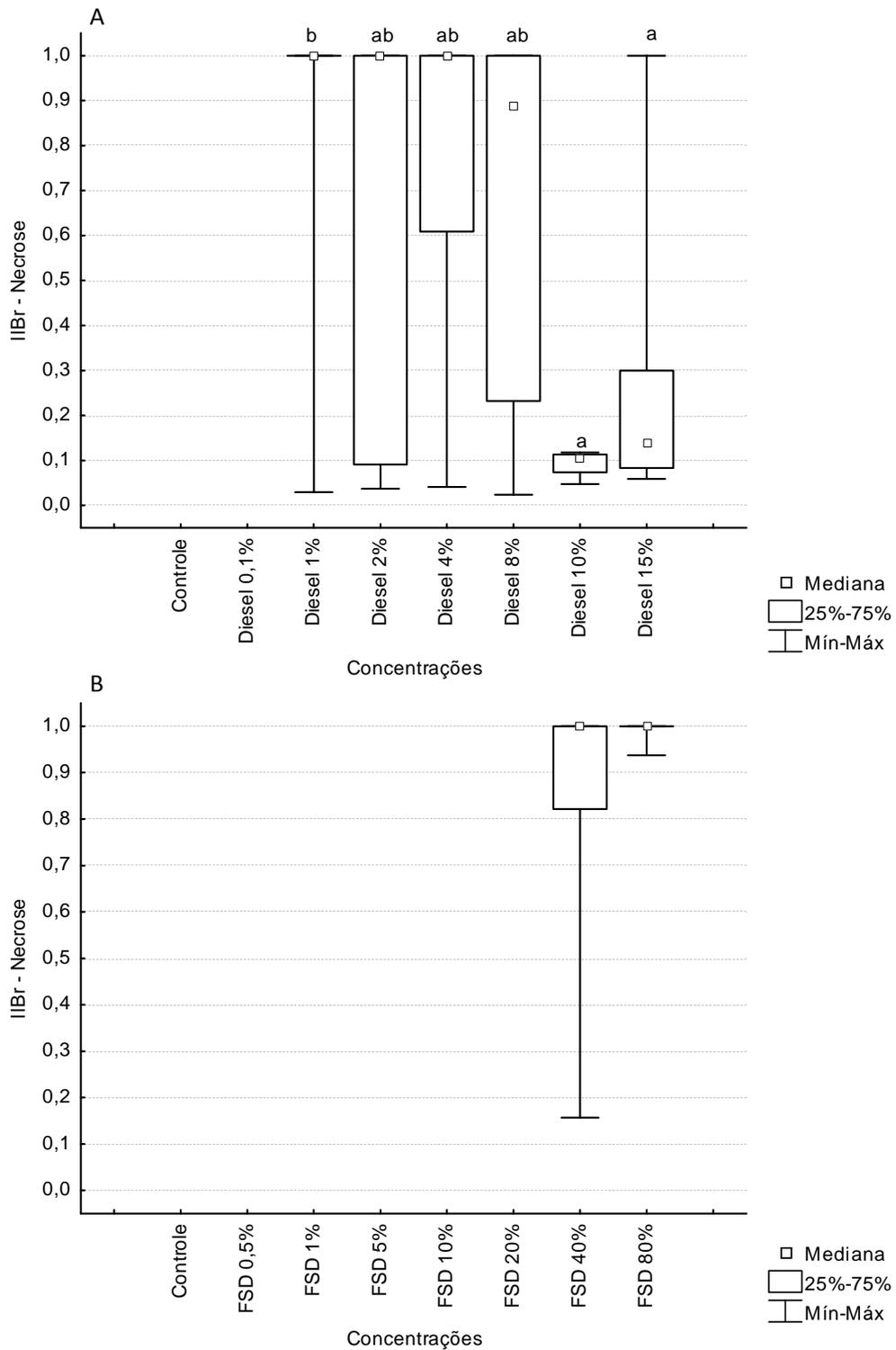


Figura 4. Índice de impacto branquial (IIBr) da lesão necrose em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações do (A) óleo diesel e da (B) FSD durante o experimento de toxicidade aguda (96 horas). Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

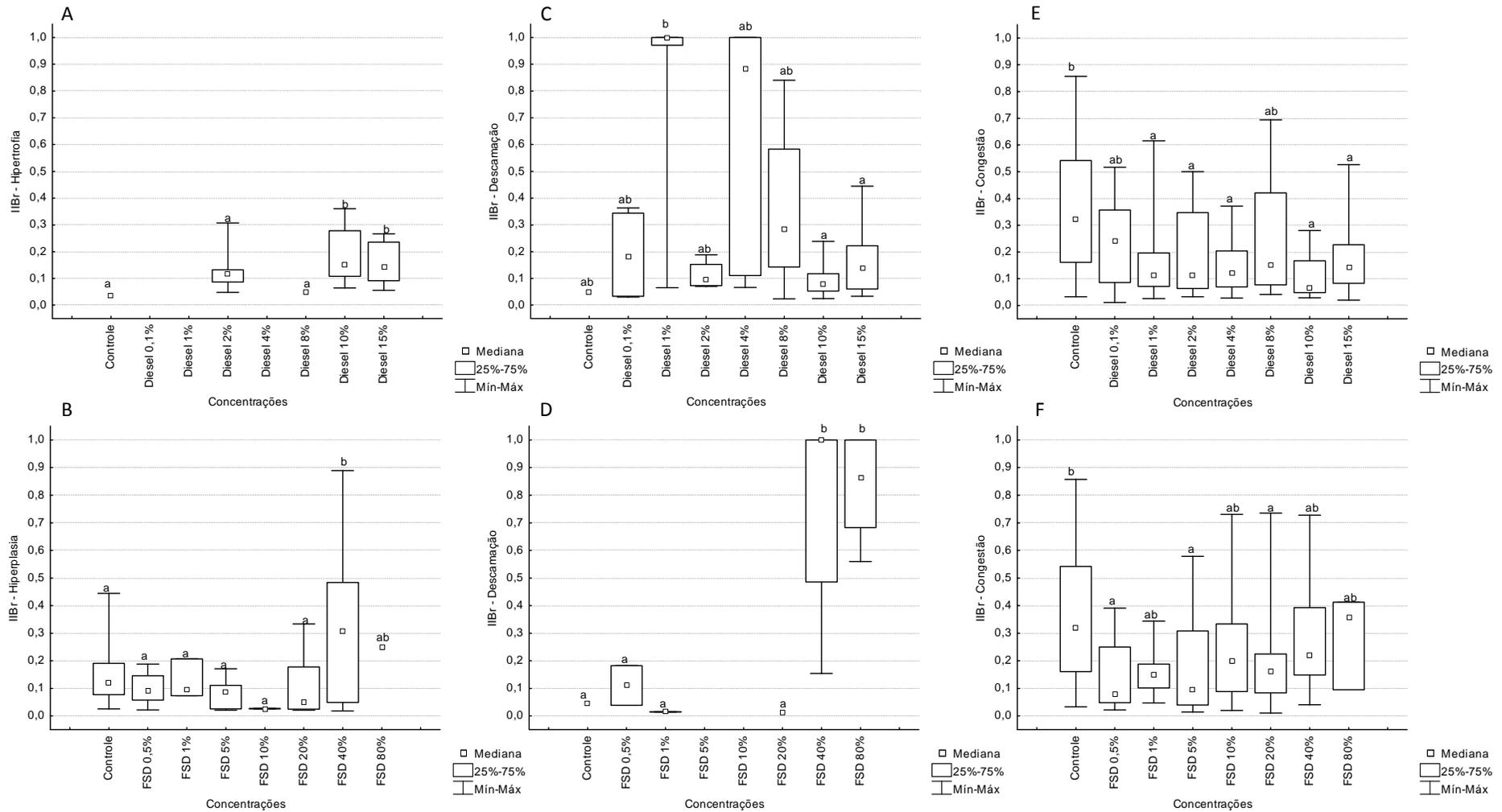


Figura 5. Índice de Impacto Branquial (IIBr) em *Astyanax altiparanae* para as lesões (A) hiperplasia (na exposição ao diesel), (B) hiperplasia (na exposição à FSD), (C) descamação (na exposição ao diesel), (D) descamação (na exposição à FSD), (E) congestão lamelar (na exposição ao diesel) e (F) congestão na exposição à FSD durante o experimento de toxicidade aguda (96 horas). Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

O IIBr, gerado a partir do somatório de todas as alterações, não apresentou uma relação com o aumento da concentração do diesel na exposição aguda (Figura 6A). Por outro lado, o mesmo índice, nos peixes expostos à FSD, exibiu um aumento gradual a partir de 5% até alcançar seu maior valor em 80% (Figura 6B). Essa tendência evidenciaria uma relação dose/efeito da FSD sobre as lesões no tecido branquial. Contudo, o tratamento controle apresentou IIBr similar ao dos peixes expostos ao diesel ($p>0,05$) e, na FSD apresentou IIBr acima dos apresentados pelas concentrações 0,5%, 1%, 5% e 20%. Comparado a esse tratamento, o IIBr do controle só foi menor que o apresentado pela da maior concentração da FSD utilizada: 80% ($p<0,05$).

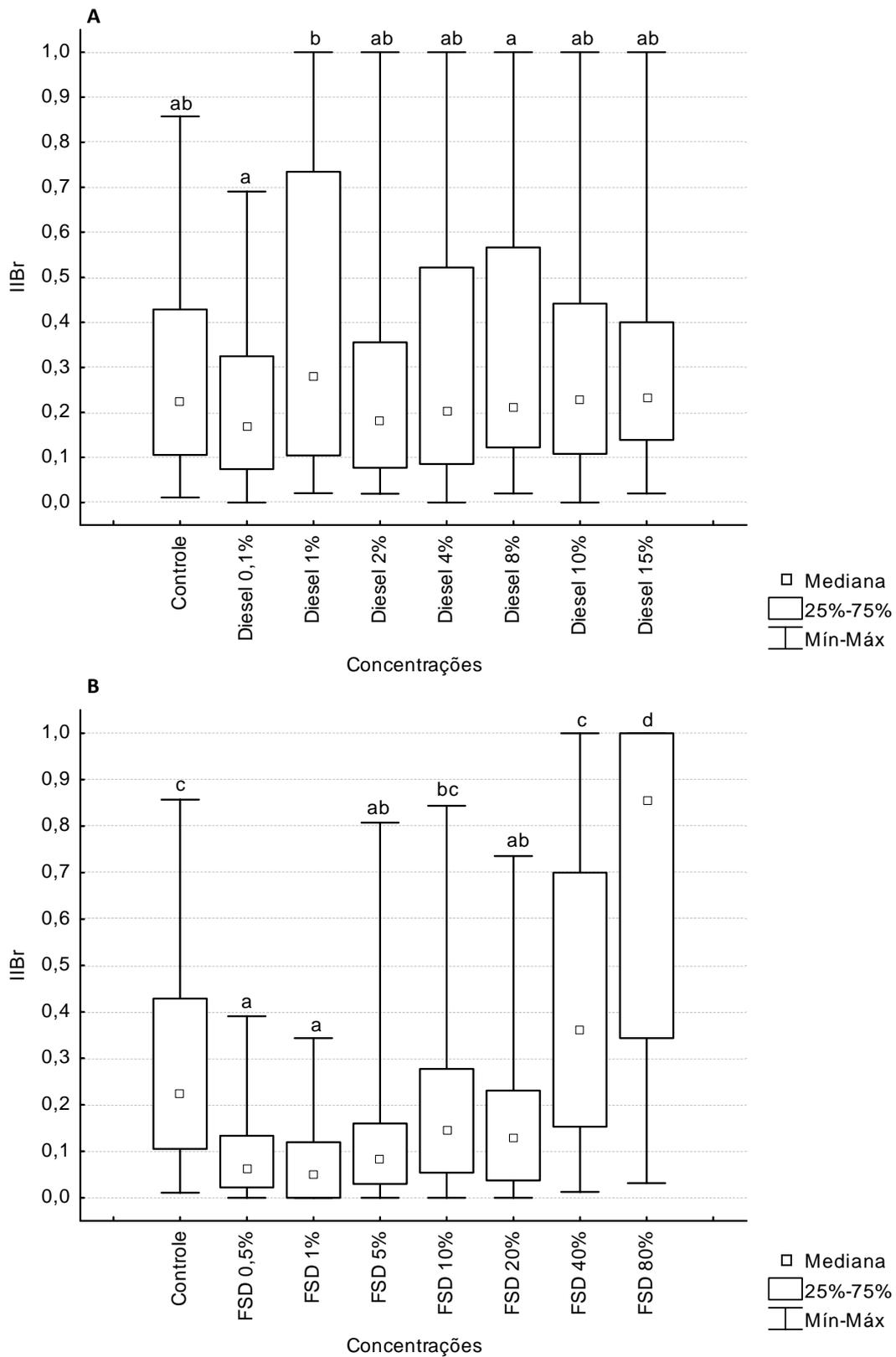


Figura 6. Índice de impacto branquial (IIBr) em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações do A) óleo diesel e da B) FSD durante o experimento de toxicidade aguda (96 horas) em comparação ao tratamento controle. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Exposição subcrônica (15 dias)

Nas brânquias dos peixes expostos subcronicamente ao diesel e à FSD também foi identificada uma série de lesões teciduais (Tabela 9).

Tabela 9. Percentagem de exemplares de *Astyanax altiparanae* que apresentou alteração branquial após exposição subcrônica ao diesel e à FSD.

Alterações	% de Peixes Afetados		
	Diesel n=70	FSD n=70	Controle n=10
Aneurisma	32	3	0
Cisto de protozoários	5	10	0
Congestão lamelar	37	26	14
Descamação do epitélio	42	45	0
Descolamento do epitélio	95	94	71
Fusão lamelar	89	94	86
Hiperplasia celular	37	42	57
Hipertrofia celular	53	48	86
Necrose	32	13	0
Neoplasia	89	94	86

n= número de animais analisados.

Nenhum exemplar de *A. altiparanae* sobreviveu aos 15 dias de exposição à concentração 60% do tratamento diesel. Aqueles que sobreviveram, apresentaram maior incidência de fusão lamelar (Figura 7B), neoplasia (Figura 7C), descolamento do epitélio (Figura 7D) e hipertrofia celular (Figura 7E). Outras alterações observadas nesse experimento, porém em menor frequência, foram: hiperplasia celular, descamação do epitélio, congestão lamelar, necrose, aneurisma (Figura 7F), e a presença de cistos de protozoários (Figura 7D).

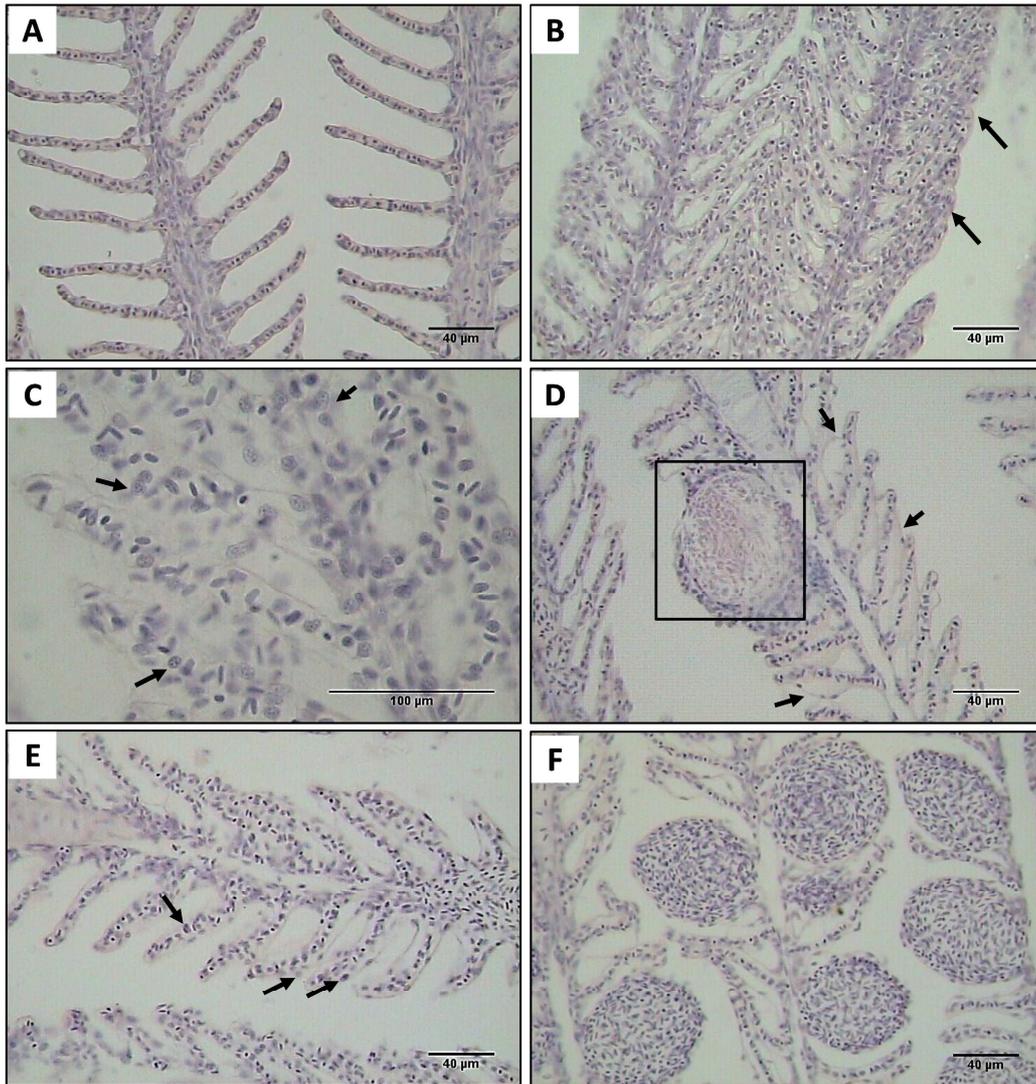


Figura 7. Fotomicrografia das brânquias de *Astyanax altiparanae* do experimento subcrônico (15 dias) em coloração HE. A) brânquia apresentando morfologia normal; B) fusão lamelar (seta); C) neoplasia celular (seta); D) descolamento de epitélio (seta) e cistos de protozoários (□); E) hipertrofia celular (seta); F) aneurisma.

Diferentemente dos resultados observados no experimento de exposição aguda, no subcrônico o IIBr apresentado pelas diferentes alterações não apresentou uma relação dose/efeito com as concentrações de diesel e da FSD. Dentre essas alterações destaca-se o IIBr da neoplasia celular que, além de apresentar os maiores valores medianos dentre todas as alterações observadas, afetou os animais do controle (Figura 8A e B).

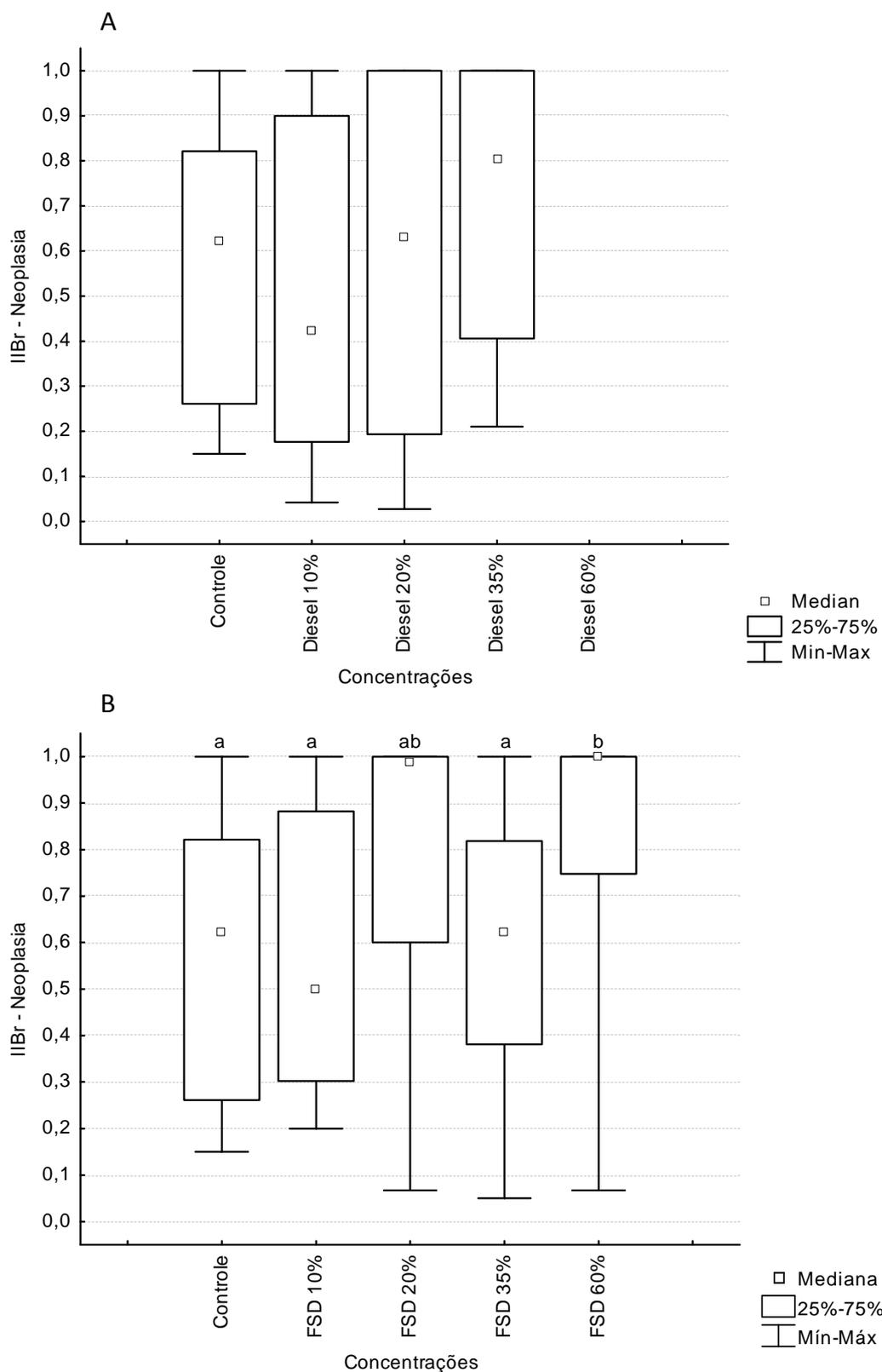


Figura 8. Índice de impacto branquial (IIBr) da lesão neoplasia celular em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações do (A) óleo diesel e da (B) FSD durante o experimento de toxicidade subcrônica (15 dias). Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Nos animais expostos ao diesel, o IIBr total observado no controle foi semelhante aos calculados nas concentrações 10% e 35%, e superior ao da concentração de 20% (Figura 9A). Na FSD houve diferença ($p < 0,05$) entre a menor e a maior concentração utilizada, porém o controle apresentou efeito similar às duas ($p > 0,05$) (Figura 9B). Em geral, o tratamento controle, do experimento de exposição subcrônica, apresentou elevados valores de IIBr (Figura 9).

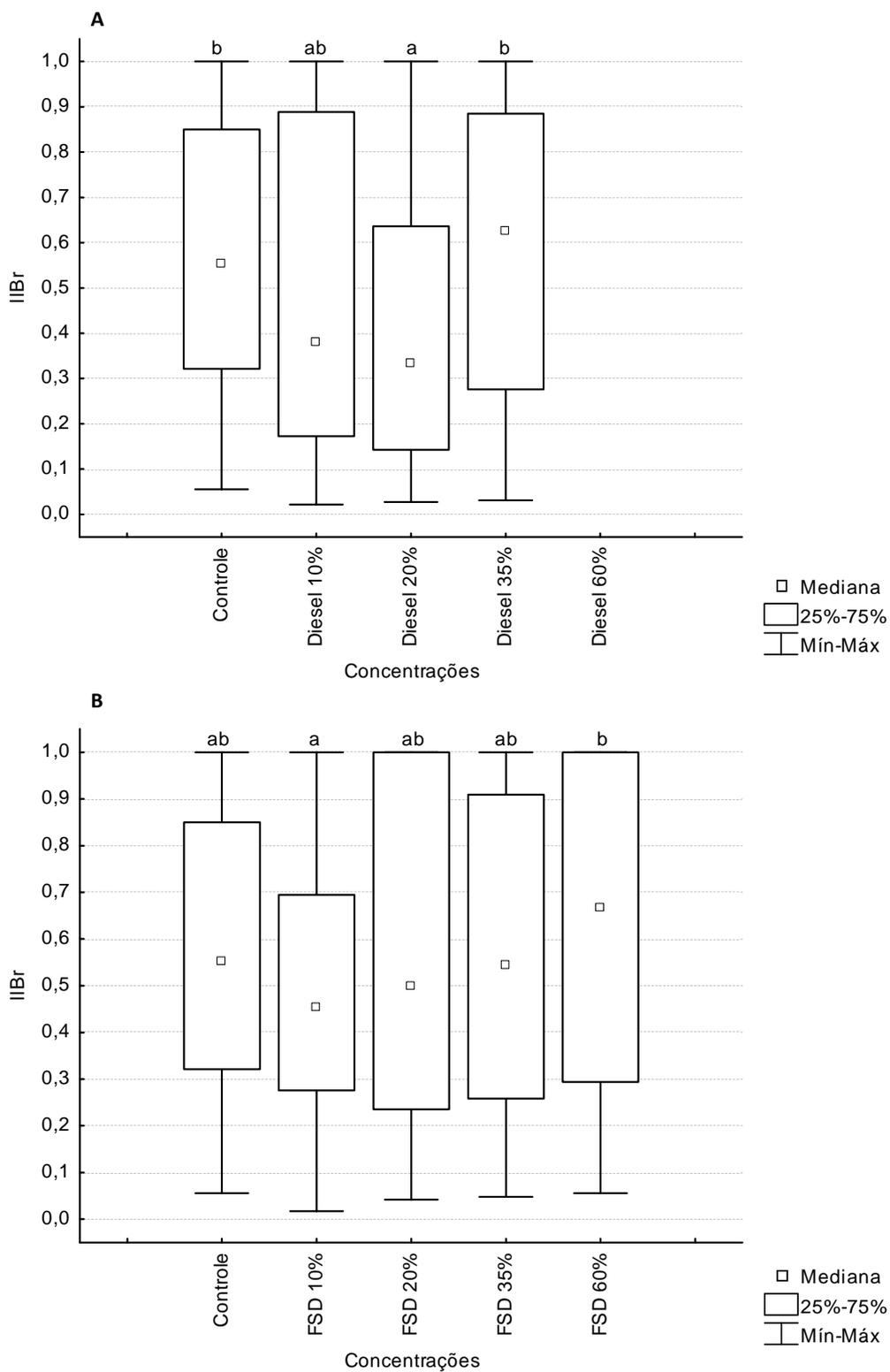


Figura 9. Índice de impacto branquial (IIBr) em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações do (A) óleo diesel e da (B) FSD utilizadas no teste de toxicidade subcrônica (15 dias) em comparação ao tratamento controle. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

No experimento de exposição aguda não houve diferença significativa entre os tratamentos controle, diesel e FSD ($p>0,05$). Por outro lado, na exposição subcrônica os tratamentos controle e FSD apresentaram IIBr total superior ao do diesel ($p<0,05$) (Figura 10).

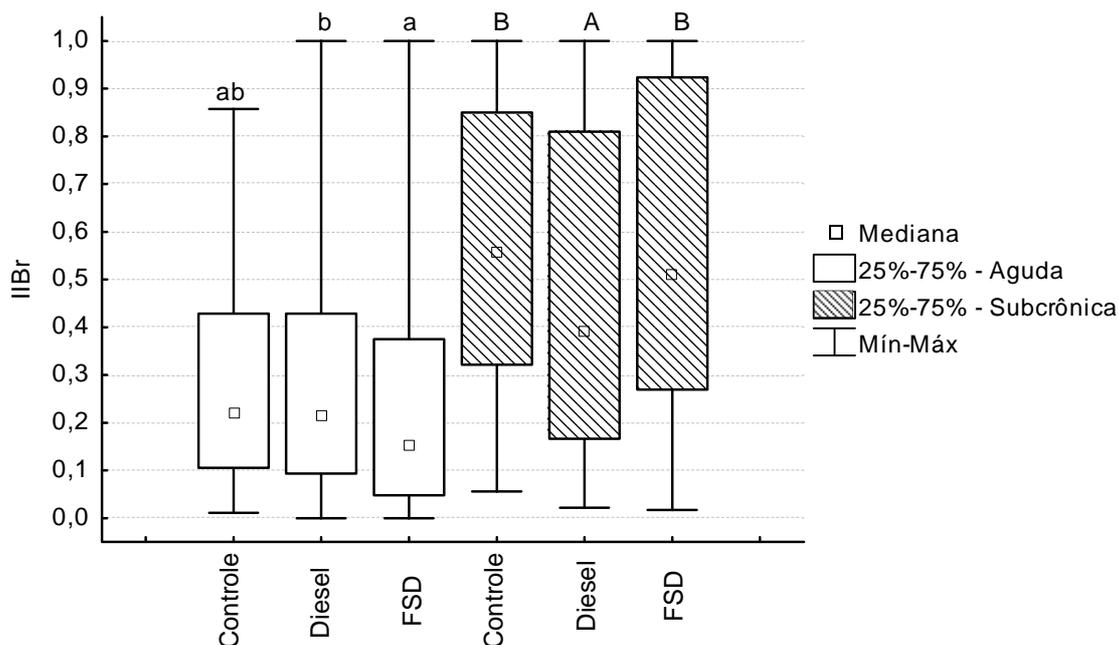


Figura 10. Índice de impacto branquial (IIBr) nos exemplares de *Astyanax altiparanae* dos tratamentos controle, diesel e FSD nos experimentos de exposição aguda (96 horas) e subcrônica (15 dias) ao óleo diesel. Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos no experimento de exposição aguda e letras maiúsculas no experimento de exposição subcrônica pelo teste de Kruskal-Wallis.

DISCUSSÃO

Apesar das diferenças observadas no pH e na concentração de N-NH₃, no experimento agudo, e do pH e oxigênio dissolvido, no experimento subcrônico, elas não foram suficientes para interferir nas taxas de mortalidade, pois nenhum dos valores observados ficaram fora de uma faixa considerada ótima para a sobrevivência da maior parte de espécies de peixes teleósteos (Burggren e Roberts 1991). Além disso, as maiores concentrações de N-NH₃ foram identificadas justamente nos tratamentos controle e branco, mas sempre em valores muito reduzidos.

A utilização de ferramentas histológicas para detecção de lesões morfológicas no tecido branquial está intimamente relacionada à fragilidade e à grande extensão desse epitélio respiratório. Como o fluxo de água que passa através das lamelas branquiais é alto, mesmo em um peixe em repouso, é grande a possibilidade de que substâncias tóxicas dissolvidas na água possam entrar em contato com essa frágil superfície (Heath 1995). As lesões branquiais observadas no presente trabalho já foram descritas por outros autores. Em condições experimentais, Akaishi et al. (2004) detectaram a presença de aneurisma, fusão lamelar e hiperplasia epitelial em peixes do gênero *Astyanax* sp. expostos a três concentrações (15, 33 e 50%) da fração solúvel do petróleo. Além dessas alterações, Silva et al. (2009) também detectou necrose nas brânquias de *Astyanax* sp. expostos por 96 horas a 50 e 100% da água de rios afetados por vazamento de petróleo, cinco anos após o acidente. Simonato et al. (2008) também observaram alterações semelhantes nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a fração solúvel do óleo diesel. Larvas de

Odontesthes argentinensis apresentaram principalmente hiperplasia celular após a exposição à fração solúvel em água do petróleo, óleo diesel e gasolina (Rodrigues et al. 2010).

In loco, exemplares de *Abramis brama* apresentaram uma série de alterações branquiais como aneurisma, hiperplasia celular, fusão lamelar e descolamento de epitélio apenas seis dias após o vazamento de óleo combustível que atingiu um afluente do rio Po, localizado no norte da Itália (Giari et al. 2012). Katsumiti et al. (2009) observaram as mesmas alterações nas brânquias do peixe marinho *Cathorops spixii* após o vazamento de óleo *bunker* e metanol na Baía de Paranaguá, sul do Brasil. Apesar dessas alterações também terem sido detectadas no presente estudo, apenas necrose celular, hipertrofia celular, descamação do epitélio, no experimento de exposição aguda, apresentaram uma tendência de relação direta com as concentrações de diesel e da FSD.

Já nos indivíduos expostos ao óleo diesel no experimento agudo, bem como aqueles expostos ao diesel e à FSD no subcrônico, o IIBr não apresentou relação com as concentrações testadas. Esse padrão é semelhante ao observado por Simonato et al. (2008), que não constatou mudança nas alterações branquiais em *Prochilodus lineatus* após 6, 24, 96 horas e 15 dias de exposição a fração solúvel do óleo diesel.

Contudo, ao se comparar os tratamentos controle, diesel e FSD, dos dois experimentos, evidencia-se que no experimento de exposição subcrônica os valores de IIBr foi maior, em comparação ao experimento agudo. Apesar da diferença entre os experimentos, grande parte das alterações não apresentou tal relação, pois os tratamentos controle também apresentaram aumento

proporcional no IIBr. Dessa forma, pode-se afirmar que, através da análise do IIBr, foram detectadas somente algumas alterações específicas no tecido branquial. Em relação à grande maioria das alterações analisadas, tanto na exposição aguda quanto na subcrônica, não houve evidências claras de relação entre essas alterações e a exposição ao óleo.

Apesar da íntima relação com a presença de hidrocarbonetos do petróleo no meio aquático, respostas histopatológicas em peixes também já foram correlacionadas com fatores patológicos (Mitchell et al. 2011; Rodger et al. 2011), limnológicos e comportamentais (Van der Oost et al. 2003). Como descrito no Capítulo 2, os exemplares de *A. altiparanae* apresentaram alterações no repertório comportamental entre os diferentes tratamentos durante a execução do experimento agudo. No experimento subcrônico tais alterações também foram observadas. O estresse que induziu tais alterações comportamentais pode ser responsável pelo alto índice de mortalidade (70%) que ocorreu no experimento de exposição subcrônica, mesmo nas concentrações mais baixas e no controle, e pela similaridade do IIBr entre as diferentes concentrações a que os peixes foram expostos. Os resultados obtidos sugerem que a ocorrência de altos valores do IIBr nos indivíduos do controle, em ambos os experimentos, possa ser resultado de uma incompatibilidade adaptativa da espécie às condições experimentais devido, principalmente, à agressividade e à agitação demonstrada pela espécie durante a condução dos experimentos. Apesar das evidências de que exemplares dessa espécie possuam grande capacidade de ajustes a diversas situações ambientais (Orsi et al. 2004; Suzuki e Orsi 2008), o comportamento

social dessa espécie em condições laboratoriais e a sua adequação ao uso em bioensaios toxicológicos são ainda muito pouco conhecidos.

Os resultados obtidos nesse trabalho evidenciam que a exposição aguda à FSD, em altas concentrações, podem causar alterações histopatológicas específicas nas brânquias de *A. altiparanae*. Porém, ao contrário do que seria esperado, em função da fragilidade e da grande exposição do tecido branquial, essas alterações não são evidentes e generalizadas, não permitindo, por exemplo, afirmar que a morte dos peixes expostos ao óleo diesel seja causada por alterações estruturais do epitélio branquial.

Além disso, ficou evidenciado que *A. altiparanae* é uma espécie que precisa ser melhor estudada, principalmente em função de suas características comportamentais em condições laboratoriais. Durante a execução, tanto do experimento de exposição aguda quanto de exposição subcrônica, o repertório comportamental apresentado pelos exemplares de *A. altiparanae* torna mais complexa a interpretação dos dados histopatológicos em comparação com os obtidos por espécies tradicionalmente utilizadas em bioensaios.

BIBLIOGRAFIA

- Abrahamson A, Andersson C, Jönsson ME, Fogelberg O, Örberg J, Brunström B, Brandt I. 2007. Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish--A study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala waters. *Aquatic Toxicology* 85(1):1-8.
- Akaishi FM, Silva de Assis HC, Jakobi SCG, Eiras-Stofella DR, St-Jean SD, Courtenay SC, Lima EF, Wagener ALR, Scofield AL, Oliveira Ribeiro CA. 2004. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax* sp.) After Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46(2):244-253.

- Anderson JW, Neff JM, Cox BA, Tatem HE, Hightower GM. 1974. Characteristics of Dispersions and Water-Soluble Extracts of Crude and Refined Oils and Their Toxicity to Estuarine Crustaceans and Fish. *Marine Biology* (Berlin) 27:75-88.
- ASTM. 1994. Manual of water and environmental technology. Standard test methods for ammonia nitrogen in water (D1426-92). Edição ed. International Standards Wordwild
- Beçak W, Paulete J. 1976. Técnicas de Citologia e Histologia. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil: Livros Técnicos e Científicos S.A.
- Boeger WA, Guimarães ATB, Romão S, Ostrensky A, ZAmberlan E, Falkiewicz FH. 2003. Histopatologia as an approach to evaluated the effect of an oil spill on fishes of Arroio Saldanha and Rio Iguaçu (Brazil). International oil spill conference. Edição ed. Washington, USA: Amer Petroleum Inst.
- Burggren W, Roberts J. 1991. Respiration and Metabolism. In: Prosser CL, editor. Environmental and Metabolic Animal Physiology. Edição ed. New York: Wiley-Liss. p 353-435.
- Cardoso MF. 2006. Efeitos da sísmica com cabo de fundo sobre peixes recifais. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 81 p.
- CETESB. 1990. Companhia de Tecnologia e Saniamento Ambiental - *Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. Edição ed.
- Davison W, Franklin CE, McKenzie JC, Dougan MCR. 1992. The effects of acute exposure to the water soluble fraction of fuel oil on survival and metabolic rate of an Antarctic fish (*Pagothenia borchgrevinki*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 102C:185–188.
- EPA. 1996a. US Environmental Protection Agency - Method 5021: Volatile organic compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis. Edição ed. p 1-13.
- EPA. 1996b. US Environmental Protection Agency - Method 8021B: Aromatic and halogenated volatiles by gas chromatography using photoionization and/or electrolytic conductivity detectors. Edição ed. p 1-19.
- EPA. 1996c. US Environmental Protection Agency - Method 8270C: Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (gc/ms). Edição ed. p 1-54.
- EPA. 1996d. US Environmental Protection Agency: Method 3510C: Separatory funnel liquid-liquid extraction. Edição ed. p 1-8.
- EPA. 2002. United States of Environmental Protection Agency. Methods of measuring the acute toxicity of effluents and receiving eaters to freshwater and marine organisms. Edição ed. Washington, EUA. p 266.
- Giari L, B.S.Dezfuli, M.Lanzoni, G.Castaldelli. 2012. The impact of an oil spill on organs of bream *Abramis brama* in the Po River. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 77:18-27.
- Goanvec C, Poirier E, Le-Floch S, Theron M. 2010. Branchial structure and hydromineral equilibrium in juvenile turbot (*Cophthalmus maximus*) exposed to heavy fuel oil. *Fish Physiology and Biochemistry*:1-9.
- Heath AG. 1995. Water Pollution and Fish Physiology: Lewis Publishers.
- Katsumiti A, Domingos F, Azevedo M, da Silva M, Damian R, Almeida M, de Assis H, Cestari M, Randi M, Ribeiro Ce outros. 2009. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after

- the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment* 152(1):209-222.
- Kleijnans JCS, van Schooten F-J. 2002. Ecogenotoxicology: the evolving field. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11(3-4):173-179.
- Lemos CTd, Iranço FdA, Oliveira NCDAd, Souza GDd, Fachel JMG. 2008. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. *Science of the Total Environment* 406(1-2):337-343.
- Mitchell SO, Baxter EJ, Rodger HD. 2011. Gill pathology in farmed salmon associated with the jellyfish *Aurelia aurita*. *Veterinary Record* 169(609a).
- Orsi ML, Carvalhol ED, Forestil F. 2004. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21(2):207-218.
- Ostrensky A, Chaves PTC, Duboc LF, Guimarães ATB, Cruz SRZ, Wegbecher FX, Pilchowski RW, Teixeira UA, Belz CE. 2001. Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigüí e Iguaçu. 2º Seminário do Rio Iguaçu. Edição ed. Araucária, Paraná, Brasil. p 32-52.
- Ostrensky A, Marchiori MA, Poersch LH. 1992. Toxicidade Aguda da Amônia no Processo Produtivo de Pós-Larvas de *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 64(4):383-389.
- Pal S, Kokushi E, Cheikyula JO, Koyama J, Uno S. 2011. Histopathological effects and EROD induction in common carp exposed to dietary heavy oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(3):307-314.
- Petrobras. 2010. Diesel S-50: Manual Técnico do Produto. 17 p.
- Rodger HD, Murphy K, Mitchell SO, Henry L. 2011. Gill disease in marine farmed Atlantic salmon at four farms in Ireland. *Veterinary Record* 168:663-668.
- Rodrigues RV, Miranda-Filho KC, Gusmão EP, Moreira CB, Romano LA, Sampaio LA. 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Science of the Total Environment* 408:2054–2059.
- Schulz UH, Martins-Júnior H. 2001. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. *Brasilian Journal of Biology* 61(4):615-622.
- Silva CA, Oliveira Ribeiro CA, Katsumiti A, Araújo MLP, Zandoná EM, Costa Silva GP, Maschio J, Roche H, Silva de Assis HC. 2009. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(2):400-409.
- Simonato JD, Albinati AC, Guedes CLB, Martinez CBR. 2004. Effects of diesel oil on some morphological and functional parameters of *Prochilodus lineatus* during acute and chronic exposure. In: Sloman K, Wood C, MacKinlay D, editores. *International Congress on the Biology of Fish*. Edição ed. Manaus, Brazil.
- Simonato JD, Guedes CLB, Martinez CBR. 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69(1):112-120.

- Sprague JB. 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish--III: Sublethal effects and "safe" concentrations. *Water Research* 5(6):245-266.
- Sprague JB. 1990. Aquatic Toxicology. In: SCHRECK CBM, P. B. , editor. *Methods for Fish Biology*. Edição ed: American Fisheries Society,. p 491-598.
- Suzuki FM, Orsi ML. 2008. Formação de cardumes por *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae) no Rio Congonhas, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 25(3):566-569.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(2):57-149.
- Winkaler EU, Silva AG, Galindo HC, Martinez CBR. 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum* 23(2):507-514.
- Zar JH. 1984. *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc. 718 p.

CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA À AMÔNIA SOBRE A TOXICIDADE E A HISTOPATOLOGIA BRANQUIAL DE *Astyanax altiparanae* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)⁴

Giorgi Dal Pont^a, Gisela Geraldine Castilho-Westphal^a, Walter Antonio Pereira Boeger^a, Antonio Ostrensky^{a*}

^aGrupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais - GIA, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Rua dos Funcionários, 1540 – Juvevê, Curitiba – PR, Brasil.

*Autor para correspondência:
E-mail: ostrensky@ufpr.br
Telefone: +5541 33505634

RESUMO

A utilização de ferramentas histológicas para detecção de lesões morfológicas no tecido branquial está intimamente relacionada à fragilidade e a grande extensão desse epitélio respiratório. O objetivo desse trabalho foi estimar a sensibilidade de *Astyanax altiparanae* à amônia e avaliar as alterações branquiais decorrentes da exposição aguda. Os peixes foram expostos a diferentes concentrações do N-AT por 96 horas. O registro do número de peixes mortos e dos parâmetros de qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, pH, N-AT e N-NH₃) foram monitorados em 0, 24, 48, 72 e 96h após o início do experimento. A CL₅₀ do N-AT e N-NH₃ foram calculadas em 24, 48, 72h. As brânquias dos animais foram submetidas ao processo histológico. A toxicidade do N-AT foi de 120,81 mg/L de N-AT (90,9-160,05) e a do N-NH₃ foi de 1,19 mg/L de N-NH₃ (1,02-1,04) em 72 horas de exposição. Embora várias alterações tenham sido identificadas, o Índice de Impacto nas Brânquias (IIBr) calculado para cada alteração demonstrou que apenas descolamento epitelial apresentou uma relação direta com as concentrações de amônia testadas. O IIBr total calculado para cada concentração não apresentou qualquer relação com o aumento das concentrações de amônia.

Palavras-chave: Amônia total; Amônia gasosa; Compostos nitrogenados;

CL₅₀; Histologia branquial, Peixes dulcícolas

⁴ Artigo redigido de acordo com as normas da revista Aquaculture (<http://www.journals.elsevier.com/aquaculture/>)

1. INTRODUÇÃO

A amônia está presente em vários efluentes industriais e agrícolas, mas também pode ser gerada naturalmente pelo processo de decomposição da matéria orgânica (Heath, 1995). No ambiente aquático a amônia está presente em duas formas químicas: a ionizada (NH_4^+) e a não-ionizada ou gasosa (NH_3); e a soma delas é denominada de amônia total ($\text{AT} = \text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) (Thurston et al., 1981). O pH é o principal fator que contribui no processo químico de dissociação de NH_4^+ em NH_3 , apresentando uma relação direta com a concentração de NH_3 no meio aquático (Randall e Tsui, 2002). É a forma gasosa da amônia que é considerada tóxica para os peixes, pois apresenta grande permeabilidade em membranas biológicas e, conseqüentemente, tem sua concentração intracelular rapidamente aumentada (Campbell, 1991).

A utilização de ferramentas histológicas para detecção de lesões morfológicas no tecido branquial está intimamente relacionada à fragilidade e à grande extensão desse epitélio respiratório. Como o fluxo de água que passa através das lamelas branquiais é alto, mesmo em um peixe em repouso, é grande a possibilidade de que substâncias tóxicas dissolvidas no meio aquoso possam entrar em contato com essa superfície (Heath, 1995). Efeitos histopatológicos nas brânquias, causados pela exposição a compostos nitrogenados como amônia, nitrito e nitrato já foram descritos pela literatura (Benli et al., 2008; Frances et al., 1998; Gisbert et al., 2004; Rodrigues et al., 2011). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da exposição aguda da amônia nas brânquias de *Astyanax altiparanae*, uma espécie de água doce que ocorre na região Sul e Sudeste do Brasil (Graça e Pavanelli, 2002), e que apresenta grande potencial para testes ecotoxicológicos devido à sua

importância ecológica, ao seu pequeno porte e à sua ampla produção em cativeiro. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi estimar a sensibilidade de *Astyanax altiparanae* à amônia e avaliar as alterações branquiais decorrentes da exposição aguda a compostos nitrogenados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Após a compra dos juvenis de *Astyanax* sp. de uma distribuidora comercial de peixes, localizada no município de Curitiba/PR, os animais foram transportados até o Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA). No laboratório os peixes foram acondicionados em tanques de polietileno (500L) com aeração constante e temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por três semanas. O tanque de aclimação utilizado possuía um sistema fechado de filtragem e recirculação de água, evitando o aumento da concentração de amônia na água. Diariamente os peixes foram alimentados, *ad libitum*, com ração comercial floculada (TetraMin®) contendo 47% de proteína bruta.

Para realização do experimento foi adotada metodologia de determinação da CL_{50} sugerida pela EPA (2002) em sistema estático (sem renovação de água). Foram utilizadas 10 concentrações de N-AT (1, 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, e 350 mg/L de N-AT) e um tratamento controle.

Antes do início do experimento os peixes foram aclimatados às condições laboratoriais por 48 horas e, ao final do período, a amônia foi adicionada ao sistema na forma de cloreto de amônio (NH_4Cl). Dez peixes (peso= $1,17 \pm 0,3\text{g}$; comprimento padrão= $3,67 \pm 0,27$ cm) foram utilizados, em

aquários de vidro, na densidade de 1g/L, sob temperatura e aeração controlados. Durante o período experimental os peixes não foram alimentados.

A mortalidade dos animais, a concentração de N-AT, N-NH₃ nas soluções-teste e os valores de temperatura, oxigênio dissolvido e pH foram mensurados em 0, 24, 48, 72 e 96 horas (CETESB, 1986).

A determinação da temperatura e das concentrações de oxigênio dissolvido foi realizada, diretamente nos tanques, com auxílio de oxímetro digital portátil (YSI-550A) e o pH foi determinado com o auxílio de pHmetro portátil (Hanna – HI8424). A análise de N-AT foi realizada colorimetricamente de acordo com a metodologia descrita por Baptista et al. (1987). As concentrações de amônia gasosa foram mensuradas de acordo com as seguintes equações (Ostrensky et al., 1992):

$$[\text{N-NH}_3] = ([\text{N-AT}]) / (1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH})})$$

$$\text{pKa} = (\text{pKs} + 0,0324) \times (298 - (273 + T))$$

$$\text{pKs} = 9,2516 + 0,153 \times F$$

$$F = 19,9273 \times S / (1000 - (1,005109 \times S))$$

Onde:

NH₃= Amônia gasosa ou não-ionizada;

NH₄⁺= Amônia ionizada;

N-NH₃= Concentração de nitrogênio na forma de amônia gasosa ou não-ionizada;

N-AT= Concentração de nitrogênio na forma de amônia total (NH₃ + NH₄⁺);

T= Temperatura em °C;

S= Salinidade.

A CL_{50} foi determinada a partir dos valores de N-AT, N-NH₃ e do número de indivíduos mortos em durante o período de exposição (24, 48, 72 e 96 horas). Para isso, foi utilizado o Software *LC50 Programs JSpearman Test*, que se baseia no método desenvolvido por Hamilton et al. (1977).

Imediatamente após a morte, os peixes foram identificados, fixados em solução de Davidson e preservados em álcool 70°GL (Beçak e Paulete, 1976) para coleta da brânquia e posterior processamento histológico de rotina, com inclusão em parafina histológica. As brânquias foram seccionadas em micrótomo rotativo (5 µm de espessura), corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE). As lâminas permanentes foram analisadas em microscópio óptico (Leica DMLS) para identificação das alterações histopatológicas.

As análises quantitativas de alterações brânquias foram realizadas por meio da seleção de um corte histológico por peixe. Neste corte foram escolhidos aleatoriamente cinco filamentos branquiais para análise. Todas as lamelas de cada filamento foram analisadas e as alterações analisadas e registradas. A extensão das alterações encontradas nas lamelas analisadas, determinadas por uma patogenia, gerou um Índice de Impacto Branquial (IIBr) de cada indivíduo. O IIBr foi calculado individualmente para cada patogenia e concentração estudada por meio da equação estabelecida por Cardoso (2006):

$$\text{IIBr} = \text{N}^{\circ} \text{ de lamelas alteradas} / \text{N}^{\circ} \text{ de lamelas analisadas}$$

O IIBr pode apresentar valores entre 0, que indica ausência de patogenias, e 1,0, indicando presença da patogenia em todas as lamelas observadas.

Para aplicação dos testes estatísticos foi utilizado o software Statistica 8.0[®]. A comparação das características da água e do IIBr em entre as diferentes concentrações de amônia foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* e, em caso de diferença significativa ($p < 0,05$), foi aplicado o teste de *Dunn's* (Zar, 1984).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores medianos da N-AT, N-NH₃, pH, temperatura e oxigênio dissolvido podem ser observados na Tabela 10. Nota-se que os valores medianos de amônia total mensurados em cada tratamento apresentaram concentrações superiores aos valores nominais atribuídos para cada tratamento. Os valores de pH, temperatura e a concentração de oxigênio dissolvido na água não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as concentrações testadas.

Tabela 10. Mediana (mín-máx) da concentração de amônia total (N-AT= NH₃+NH₄⁺), amônia gasosa (N-NH₃), pH, temperatura e oxigênio dissolvido (OD) na água dos diferentes tratamentos de exposição a amônia.

Tratamento (mg/L)	Parâmetro				
	N-AT (mg/L)	N-NH ₃ (mg/L)	pH	Temperatura (°C)	OD (mg/L)
Controle	1,5 (0,01-3,5)	0,003 (0,000-0,02)	6,5 (6,2-7,1)	25,5 (25,1-26,1)	6,7 (6,5-6,7)
1	3,3 (1,2-4,01)	0,009 (0,001-0,04)	6,7 (6,3-7,2)	25,3 (25,1-25,8)	6,8 (6,6-7,1)
2	4,2 (3,6-5,9)	0,02 (0,01-0,04)	6,9 (6,7-7,1)	25,4 (25,2-25,8)	6,7 (6,7-6,8)
5	5,7 (5,1-6,1)	0,02 (0,008-0,06)	6,7 (6,4-7,2)	25,3 (25,2-25,8)	6,7 (6,6-7,2)
10	12,1 (10,04-13,03)	0,05 (0,02-0,1)	6,8 (6,5-7,3)	25,7 (25,1-26,1)	6,6 (6,4-6,9)
25	28,2 (26,6-34,5)	0,2 (0,07-0,4)	7,09 (6,6-7,2)	25,3 (25,1-25,8)	6,9 (6,6-7,1)
50	55,4 (49,5-57,8)	0,3 (0,1-0,5)	7,05 (6,7-7,2)	25,2 (25,0-25,9)	6,7 (6,6-7,2)
75	80,09 (78,1-83,5)	0,6 (0,2-0,8)	7,1 (6,8-7,2)	25,7 (25,1-26,2)	6,8 (6,8-7,2)
100	108,2 (100,06-132,1)	1,07 (0,3-1,3)	7,1 (6,7-7,2)	25,7 (25,2-26,3)	6,9 (6,7-7,1)
200	211,1 (209,07-217,9)	1,5 (0,6-1,7)	7,1 (6,7-7,1)	25,8 (25,2-26,3)	6,9 (6,7-7,4)
350	354,8 (350,6-359,05)	1,5 (0,9-2,1)	6,8 (6,6-7,01)	25,2 (25,1-25,4)	6,7 (6,7-6,7)

Foi observada uma tendência de aumento temporal das taxas de mortalidade dos peixes nas menores concentrações. Além dos efeitos agudos da amônia, esse aumento pode estar relacionado ao comportamento canibalístico expressado pelos peixes nos aquários, nas concentrações mais baixas, a partir de 72 horas de exposição. Nas últimas 24 horas de experimento, 73,3% dos peixes dos tratamentos com 1, 2 e 5 mg/L de N-AT apareceram mortos e parcialmente canibalizados (apresentando perda de tecido muscular, nadadeiras, globo ocular e até do conteúdo celomático). Esse comportamento também foi observado, porém em menores proporções, no tratamento controle. Dessa forma, o cálculo da CL_{50} do N-AT e do N-NH₃ foi feito apenas para 24, 48 e 72 horas.

A toxicidade da N-AT se acentuou (Figura 11A) durante o experimento, passando de 166,06 (103,2-267,05) em 24h para 120,81 mg/L de N-AT (90,9-160,05) em 72 horas. Por outro lado, a toxicidade do N-NH₃ permaneceu praticamente estável, variando de 1,12 (0,6-2,0) para 1,19 mg/L de N-NH₃ (1,02-1,04) entre 24 e 72 horas (Figura 11B).

Assim, apesar do valor da CL_{50} do N-AT ter sido consideravelmente elevada, a CL_{50} do N-NH₃, substância reconhecidamente mais tóxica para os peixes (Heath, 1995; Randall e Tsui, 2002), obtida no presente trabalho sugere que os peixes da espécie *A. altiparanae* apresentam sensibilidade à amônia gasosa semelhante à de peixes dulcícolas considerados sensíveis ao N-NH₃.

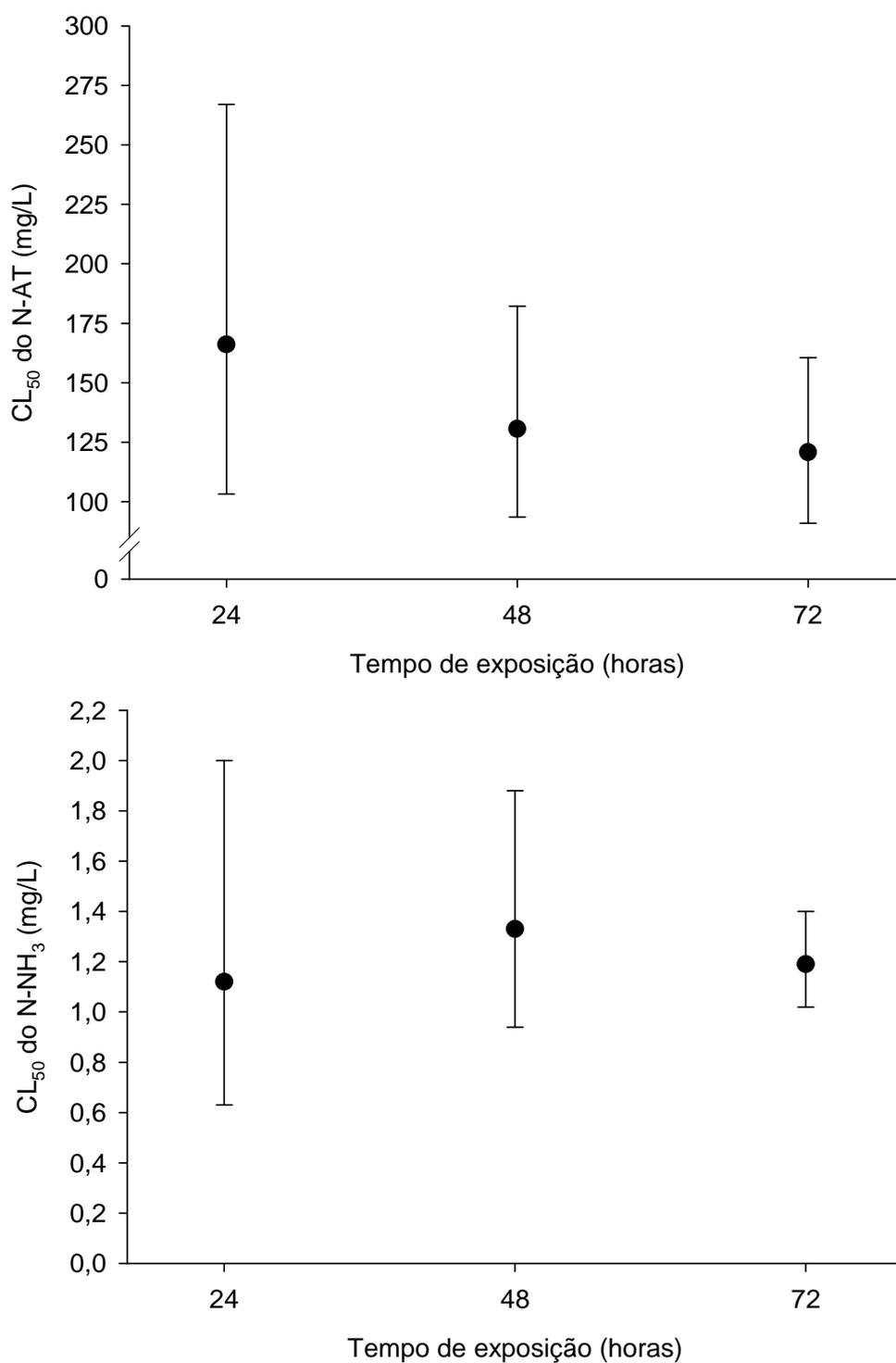


Figura 11. Valores da CL₅₀ e seus respectivos intervalos de confiança da (A) amônia total (N-AT) e (B) amônia gasosa (N-NH₃) em exemplares de *Astyanax altiparanae* nos diferentes períodos de exposição.

Martinez et al. (2006) reportou valores de CL_{50-24h} do N-AT, para exemplares de *A. altiparanae*, de 5,21 mg/L. Esse valor é 32 vezes menor que o observado no presente trabalho. De fato, existem poucos relatos de peixes que apresentam tolerância tão alta ao N-AT. Entretanto, Wang e Walsh (2000) observou CL_{50-96h} de aproximadamente 110 mg/L de N-AT para o peixe *Porichthys notatus*.

Os valores médios de CL_{50} do N-NH₃ apresentados por 32 espécies de água doce foi estimado em 2,79 mg/L (Randall e Tsui, 2002). Entretanto, as espécies de peixes apresentam diferenças expressivas quanto à sensibilidade a tal substância. A CL_{50-48h} para juvenis de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, uma das maiores já observada em peixes de água doce, é de 7,4 mg/L (Karasu Benli e Köksal, 2005). Por outro lado, uma espécie de carpa (*Cirrhinus mrigala*) apresentou CL_{50} de 1,03 mg/L (Das et al., 2004). Essa concentração é semelhante à observada para *A. altiparanae* em 24 e 72 horas de exposição, sendo que para ambas as espécies a CL_{50} foi aproximadamente um terço da CL_{50} exibida por outras espécies dulcícolas. Os mecanismos que conferem maior ou menor sensibilidade de peixes à amônia, N-AT ou N-NH₃, podem variar. Wang e Walsh (2000) sugerem que esse mecanismo pode estar relacionado à redução da permeabilidade da membrana branquial, que evita, dessa forma, a entrada do composto no organismo; à capacidade do organismo em reduzir a toxicidade dos compostos nitrogenados através de processos de transformação química ou até mesmo maior rapidez no processo de excreção realizada, por exemplo, pelo aumento da produção de urina (Heath, 1995).

A avaliação histopatológica das brânquias dos exemplares de *Astyanax altiparanae*, expostos às diferentes concentrações de amônia, detectou fusão lamelar (Figura 12B), descolamento epitelial (Figura 12C), hiperplasia epitelial (Figura 12D), hipertrofia celular (Figura 12E), e congestão lamelar (Figura 12F). Além dessas alterações também foram detectados: descamação epitelial, aneurisma e cistos de protozoários. Porém, essas alterações ocorreram somente em alguns exemplares analisados.

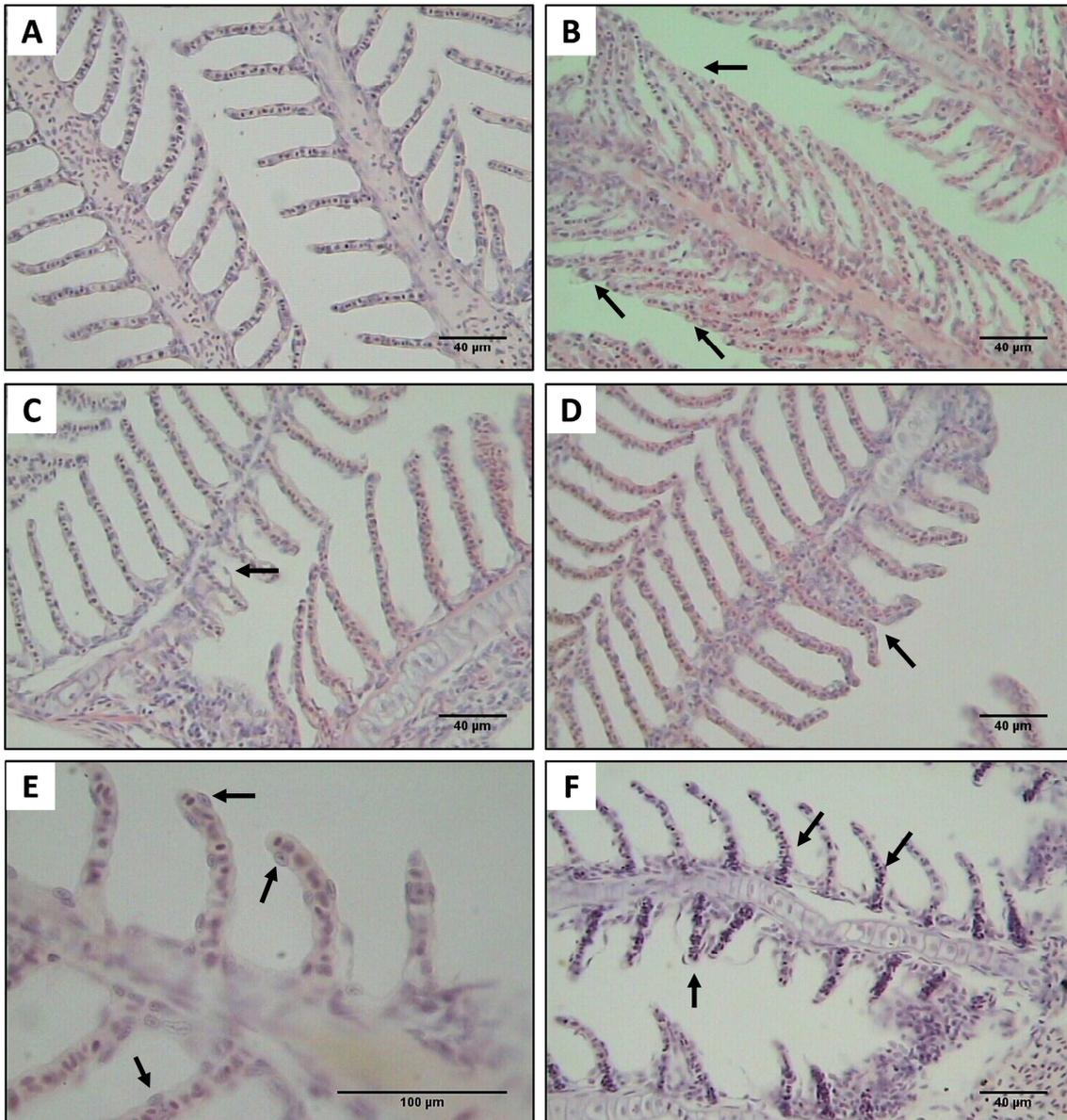


Figura 12. Fotomicrografia das brânquias de *Astyanax altiparanae* expostos a amônia por 96 horas em coloração HE. A) brânquia apresentando morfologia normal; B) fusão lamelar (seta); C) descolamento epitelial (seta); D) hiperplasia celular (seta); E) hipertrofia celular (seta); F) congestão (seta).

Embora várias alterações tenham sido identificadas, o IIBr calculado para cada alteração demonstrou que apenas descolamento epitelial (Figura 13) pode ter apresentado uma relação mais direta com as concentrações de amônia testadas. Entretanto, há que se considerar que os indivíduos do controle também apresentaram elevado valor do IIBr. Essa alteração já foi

observada em peixes expostos a altas concentrações de compostos nitrogenados. As alterações branquiais mais observadas em *Rachycentron canadum* expostos a altas concentrações de nitrato foram hiperplasia epitelial e fusão lamelar e descolamento epitelial (Rodrigues et al., 2011). Benli et al. (2008) também observaram descolamento epitelial nas brânquias de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a amônia. Hipertrofia celular e descolamento epitelial foram descritas em *Bidyanus bidyanus* (Franceset al., 1998) expostos ao nitrito e em *Cyprinus carpio* expostos a amônia (Chezhian et al., 2012). De fato, essa alteração pode reduzir superfície funcional das brânquias para a troca gasosa, prejudicando a função respiratória (Miron et al., 2008).

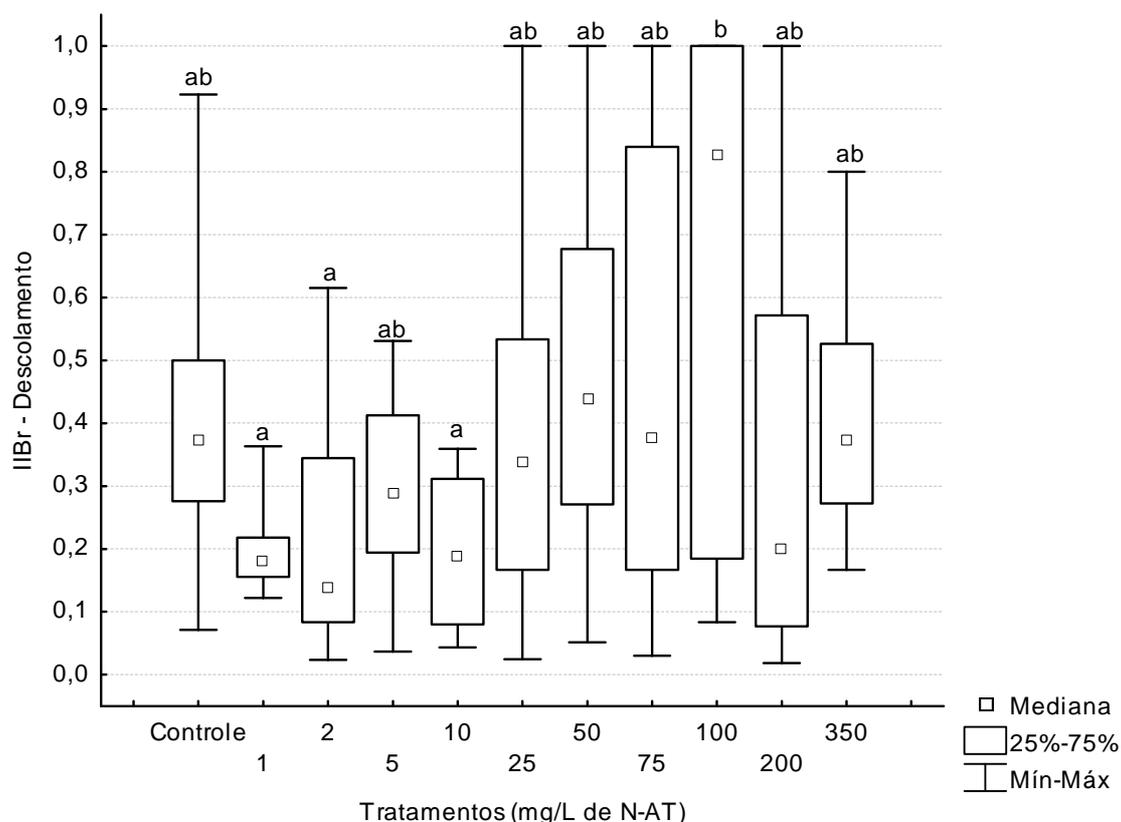


Figura 13. Índice de impacto branquial (IIBr) causado por descolamento epitelial em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações da amônia. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de *Kruskal-Wallis*.

O IIBr das demais alterações detectadas não apresentaram qualquer relação dose/efeito com as diferentes concentrações de amônia testadas (Figura 14). Gisbert et al (2004) afirmaram que a presença de algumas alterações branquiais do esturjão siberiano (*Acipenser baerii*) expostos ao nitrito podem ser consideradas como uma resposta ao estresse (mecanismo de defesa) devido às condições experimentais do teste de exposição aguda. Além disso, os autores também detectaram a presença de alterações nas brânquias dos animais do tratamento controle, reforçando a teoria de que algumas alterações podem ser induzidas pelo estresse e não efetivamente pela exposição ao contaminante.

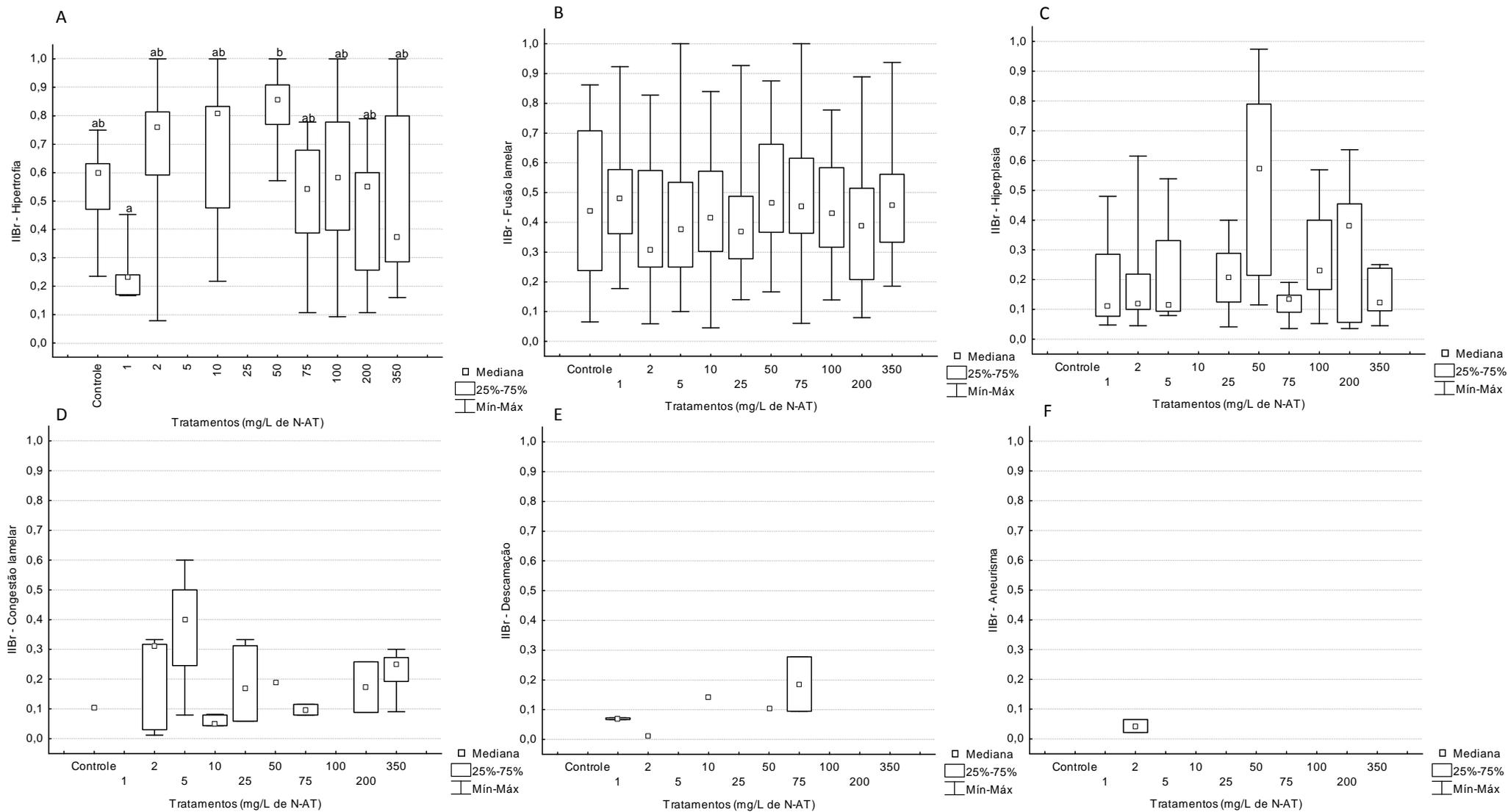


Figura 14. Índice de impacto branquial (IIBr) causado por (A) hipertrofia celular, (B) fusão lamelar, (C) hiperplasia celular, (D) congestão lamelar, (E) descamação epitelial e (F) aneurisma em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações da amônia. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de *Kruskal-Wallis*.

Quando todas as alterações são agrupadas, as diferenças observadas no IIBr do descolamento epitelial desaparecem e, desse forma, o IIBr calculado para cada concentração não apresentou qualquer relação com o aumento da amônia (Figura 15).

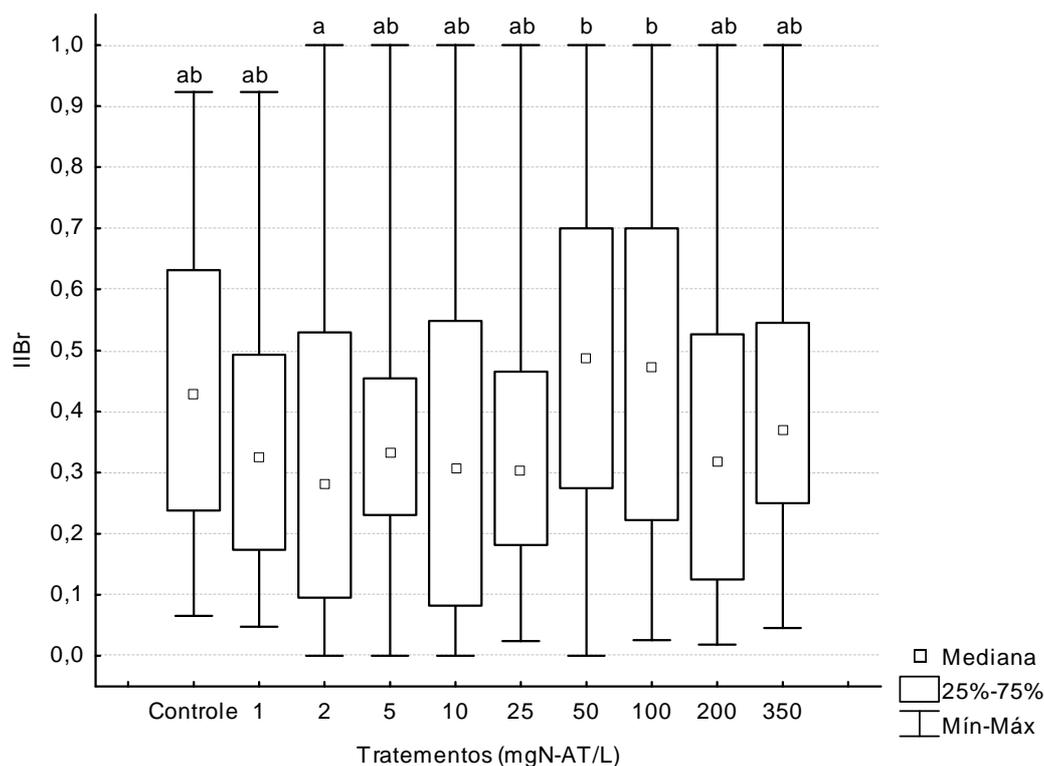


Figura 15. Índice de impacto branquial (IIBr) em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações da amônia em comparação ao tratamento controle. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de *Kruskal-Wallis*.

Essa semelhança entre os diferentes tratamentos e o controle, evidenciada pelo IIBr, pode estar relacionada à presença de algumas alterações nas brânquias dos exemplares de *A. altiparanae* antes do início dos experimentos, ou mesmo à sua indução pelo estresse durante a condução do experimento. O mesmo comportamento do IIBr foi observado após a exposição aguda e subcrônica de espécimes de *A. altiparanae* ao diesel e a FSD (vide capítulo 3). Dessa forma, sugere-se que novos experimentos sejam conduzidos

com o objetivo de avaliar o estresse induzido durante os testes de exposição aguda para *A. altiparanae*.

Os resultados obtidos no presente estudo revelam que a espécie de peixe *A. altiparanae* apresenta grande sensibilidade ao N-NH₃ em condições experimentais. Porém, as alterações histológicas branquiais mostraram-se não ser diretamente afetadas pela exposição à amônia.

4. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao REUNI/CAPES pela bolsa de mestrado do aluno Giorgi Dal Pont. Antonio Ostrensky é bolsista produtividade do CNPq.

5. BIBLIOGRAFIA

- Baptista, J.M.R., Baumgarten, M.G.Z., Niencheski, L.F.H., 1987. Caderno de Análises em Oceanografia Química. Editora da FURG.
- Beçak, W., Paulete, J., 1976. Técnicas de Citologia e Histologia. Livros Técnicos e Científicos S.A, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Benli, A.C.K., Köksal, G., Özkul, A., 2008. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere*. 72, 1355–1358.
- Campbell, J.W., 1991. Excretory nitrogen metabolism. in: Prosser, C.L. (Ed.), *Environmental and metabolic animal physiology*. Wiley-Liss, New York, pp. 277-324.
- Cardoso, M.F., 2006. Efeitos da sísmica com cabo de fundo sobre peixes recifais, Departamento de Zootecnia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, pp. 81.
- CETESB, 1986. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Desenvolvimento de métodos para o estabelecimento de critério ecotoxicológicos.
- Chezian, A., Senthamilselvan, D., Kabilan, N., 2012. Histological Changes Induced by Ammonia and pH on the Gills of Fresh Water Fish *Cyprinus carpio* var. *communis* (Linnaeus). *Asian J Anim Vet Adv*. 7, 588-596.
- Das, P.C., Ayyappan, S., Jena, J.K., Das, B.K., 2004. Acute toxicity of ammonia and its sub-lethal effects on selected haematological and enzymatic parameters of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquacult. Res*. 35, 134-143.

- EPA, 2002. United States of Environmental Protection Agency. Methods of measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, Washington, EPA, pp. 266.
- Frances, J., Allan, G.L., Nowak, B.F., 1998. The effects of nitrite on the short-term growth of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*. 163, 63–72.
- Gisbert, E., Rodríguez, A., Cardona, L., Huertas, M., Gallardo, M.A., Sarasquete, C., Sala-Rabanal, M., Ibarz, A., Sánchez, J., Castelló-Orvay, F., 2004. Recovery of Siberian sturgeon yearlings after an acute exposure to environmental nitrite: changes in the plasmatic ionic balance, Na⁺–K⁺ ATPase activity, and gill histology. *Aquaculture*. 239, 141–154.
- Graça, W.J.d., Pavanelli, C.S., 2002. *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) in the Iguazu River basin. *Acta Sci.* 24, 451-453.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11, 714-719.
- Heath, A.G., 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*, 2nd Ed ed. Lewis Publishers.
- Karasu Benli, A.C., Köksal, G., 2005. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 29, 339-344.
- Martinez, C.B.R., Azevedo, F., Winkler, E.U., 2006. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. in: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C. (Eds.), *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal - SP, pp. 81-95.
- Miron, D.d.S., Moraes, B., Becker, A.G., Crestani, M., Spanevello, R., Loro, V.L., Baldisserotto, B., 2008. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture*. 277, 192-196.
- Ostrensky, A., Marchiori, M.A., Poersch, L.H., 1992. Toxicidade Aguda da Amônia no Processo Produtivo de Pós-Larvas de *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *An. Acad. Bras. Cienc.* 64, 383-389.
- Randall, D.J., Tsui, T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 17-23.
- Rodrigues, R.V., Schwarz, M.H., Delbos, B.C., Carvalho, E.L., Romano, L.A., Sampaio, L.A., 2011. Acute exposure of juvenile cobia *Rachycentron canadum* to nitrate induces gill, esophageal and brain damage. *Aquaculture*. 322-323, 223–226.
- Thurston, R.V., Russo, R.C., Vinogradov, G.A., 1981. Ammonia toxicity to fishes. Effect of pH on the toxicity of the un-ionized ammonia species. *Environ. Sci. Technol.* 15, 837-840.
- Wang, Y., Walsh, P.J., 2000. High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). *Aquat. Toxicol.* 50, 205-219.
- Zar, J.H., 1984. *Biostatistical analysis*, 2nd ed. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs.