

# **EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DA GASOLINA, DO PETRÓLEO E DO ÓLEO MINERAL EM EMBRIÕES E LARVAS DE *Astyanax altiparanae* (PISCES, CHARACIFORMES)**

Diego Junqueira Stevanato<sup>1</sup>, Fernanda Thaline da Silva Martins<sup>2\*</sup>, Raphaela Toniolo Trauczynski<sup>2</sup>, Antônio Ostrensky<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, 80210-170 Curitiba PR, Brasil

<sup>2</sup>Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba PR, Brasil. fthaline@ufpr.br (autor correspondente)\*

<sup>3</sup>Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais – GIA/UFPR, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba PR, Brasil.

## **RESUMO**

Embora exista uma extensa literatura descrevendo os efeitos de hidrocarbonetos derivados de petróleo em peixes, poucos estudos abordam os efeitos crônicos da exposição ao petróleo e derivados no desenvolvimento embrio-larval de espécies neotropicais. O presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos sub-letais da fração solúvel em água (FSA) do petróleo, da gasolina e do óleo mineral, sobre o desenvolvimento ontogenético inicial de embriões e larvas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae*. Para isso embriões e larvas foram mantidos individualmente em placas de cultivo celular de 6 poços, alojadas em uma estufa vertical, em temperatura ajustada a 25 °C. Os exemplares foram expostos a 0,04% da fração solúvel em água (FSA) da gasolina, 34,79% do óleo mineral e 50,88% do petróleo. Durante o período de exposição foram mensurados os parâmetros de qualidade da água e realizadas análises morfométricas dos exemplares, sendo registrado todos os *endpoints*. A gasolina foi o derivado que apresentou maiores concentrações de hidrocarbonetos, apresentando concentrações de BTEX 13,44 % a mais do que o petróleo e 44,27 % a mais que o óleo mineral. Os resultados obtidos apontam que mesmo em baixas concentrações a gasolina pode trazer consequências drásticas a curto prazo.

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o ambiente aquático natural sofreu vários impactos em decorrência de ações antrópicas, em especial as de origem petrolífera (Incardona, Collier et al. 2004, Silva 2013). Quando esses compostos são introduzidos na água acarretam em alterações na qualidade do ambiente, que nem sempre são favoráveis ao desenvolvimento dos organismos ali presentes (Sibaúba-Tavares 1995). A principal forma de introdução desses compostos é decorrente de falhas na exploração, refino e transporte (Teas, Kalligeros et al. 2001), atingindo o ambiente muitas vezes de maneira contínua, podendo trazer consequências ecológicas desastrosas aos recursos pesqueiros (Boehmer-Christiansen 2008, Perrichon, Le Menach et al. 2016).

Os efeitos biológicos e toxicológicos do petróleo e seus derivados estão principalmente relacionados com a forma em que estão disponíveis no meio (Kettrup, Schramm et al. 1999, Hodson 2017), por sua persistência (Neff 1979, Sandrini Neto 2015), pela capacidade que cada organismo vivo tem em acumular e reagir (Pinto 2013), além do tempo de exposição. Mesmo com avanços com pesquisas na área, não é possível descrever quando os processos naturais serão capazes de restabelecer seu completo equilíbrio após a exposição a agentes tóxicos (ITPOF 2012).

Os estudos na área de toxicologia aquática, com foco nas espécies nativas, se tornaram fundamentais para a compreensão desses processos, permitindo a valoração dos danos ambientais (Dal Pont 2012). Os peixes, em geral, estão cada vez mais sendo usados como indicadores da qualidade ambiental (Akaishi 2012, Silva 2013), fornecendo informações necessárias para a compreensão dos efeitos crônicos no meio aquático natural, sendo as fases iniciais de ontogenia ainda mais susceptíveis quando comparados à indivíduos adultos (Eaton, McKim et al. 1978, Incardona, Collier et al. 2004, Hallare, Nagel et al. 2006, Alves, da Silva et al. 2016).

Embora exista uma extensa literatura descrevendo os efeitos de hidrocarbonetos derivados de petróleo em peixes, poucos estudos abordam os efeitos crônicos da exposição ao petróleo e derivados no desenvolvimento embrio-larval de espécies neotropicais. O presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos sub-letais da fração solúvel em água (FSA) do petróleo, da

gasolina e do óleo mineral, sobre o desenvolvimento ontogenético inicial de embriões e larvas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa com Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), localizado no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

### 2.1 ORGANISMOS-TESTE

Os bioensaios foram realizados com embriões e larvas de *Astyanax altiparanae* obtidos de desovas realizadas pelo GIA. Para a desova, foram utilizados dois machos para cada fêmea, de acordo com características morfológicas que indicam o adequado estágio de maturação gonadal: machos, pela textura áspera na nadadeira anal e, fêmeas, pelo ventre abaulado e poro urogenital avermelhado. Após selecionados, os animais receberam uma dose única (5 µL) de gonadorelina coriônica humana – HCG (1000 UI/kg) (Vetecor®, Hertape Calier), para a indução da ovulação e da espermiacção. Após a aplicação do hormônio, os indivíduos foram acondicionados em aquários de 25 litros, com água mantida a 25 °C, até a liberação dos gametas e consequente fertilização dos óvulos.

### 2.2 BIOENSAIO

Embriões de *A. altiparanae* foram incubados em placas de cultivo celular de 06 poços (KASVI K12-006, China), na proporção de um embrião/poço, totalizando 32 placas. As placas foram posteriormente acondicionadas em estufa vertical do tipo DBO (ADAMO, Brasil), com temperatura ajustada para 25 °C, em sistema semi-estático, conforme preconiza a NBR 12715 (ABNT, Brasil), fotoperíodo ajustado para 12 h luz/12 h escuro, com intensidade luminosa entre 700 a 900 lux (MLM-1010, Brasil).

O bioensaio foi executado segundo as normas internacionais descritas pela OECD (1994): controle negativo (água sem o xenobionte); concentração

teste (CT) da gasolina (0,04%), óleo mineral (34,79%) e do petróleo (50,88%). A água utilizada nos ensaios era previamente clorada (com hipoclorito 10%); neutralizada (com tiosulfato de sódio 50%), filtrada em filtro bag (50 µm) com carvão ativado e permanecia dentro da incubadora pelo tempo necessário até atingir a temperatura de 25 °C. O tempo de exposição aos compostos foram: 24, 48, 72 e 96 horas.

### 2.3 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA E MERÍSTICA

A mortalidade foi monitorada diariamente e as anormalidades foram registradas e pontuadas seguindo os métodos relatados por Perrichon, Le Menach et al. (2016), com modificações: 1. Edemas (pericárdio, saco vitelino); 2. Malformações estruturais (notocorda, cérebro, lesões nas nadadeiras); 3. Deformidades (pigmentação do corpo, anemia, olhos e cabeça); 4. Tempo de absorção total da reserva vitelínica.

Para realização das análises morfométricas, as placas de cultivo foram retiradas individualmente da incubadora e cada poço foi sifonado em 3/4 do seu volume, com auxílio de uma pipeta de Pasteur e, em seguida, os animais foram observados individualmente (dentro dos próprios poços) com auxílio de estereomicroscópio óptico (Discovery V8, Zeiss, Alemanha). Foram mensurados o comprimento total, a altura do corpo, o comprimento do saco vitelínico (CV), a altura do saco vitelínico (HV) e o volume da reserva vitelínica (V), calculado de acordo com a equação:

$$V (mm^3) = \frac{(\pi \cdot CV \cdot HV^2)}{6}$$

No período de 48 horas de exposição, foi realizada a contagem de batimentos por minuto (bpm) de 12 exemplares de cada concentração. Neste período também, 06 exemplares foram observados com auxílio de microscópio óptico Leica® DMLS, para avaliação da absorção da reserva vitelínica, caracterizada através de registros realizados a cada duas horas. Ao término das observações, o volume original de água em cada poço foi renovado e as placas foram novamente tampadas, realojadas na incubadora e mantidas até o período subsequente de observação.

## 2.4 QUALIDADE DA ÁGUA

Os seguintes parâmetros físico-químicos da água foram analisados diariamente como rotina durante o experimento: pH, através de peagâmetro digital (AZ-86505, Taiwan); oxigênio dissolvido e percentual de saturação de oxigênio, por meio de oxímetro digital (YSI Pro20, EUA); alcalinidade mensurada por titulometria com ácido sulfúrico 0,02N (APHA 2005); concentração de nitrogênio na forma de amônia total [N-AT= NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] obtida pelo método do indofenol (APHA 2005) e nitrito (APHA 1995) seguido de leitura das amostras em espectrofotômetro de bancada (Spectronic 20 Genesys, EUA).

## 2.5 CARACTERIZAÇÃO GEOQUÍMICA DOS XENOBIONTES

Amostras dos óleos e das suas respectivas frações solúveis em água foram coletadas para caracterização geoquímica por meio das determinações das frações voláteis (BTEX) e dos hidrocarbonetos de petróleo (THP, UCM e HPA), descritos na Tabela 1. A quantificação foi realizada segundo EPA (1996): 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, realizadas por extração líquido-líquido, seguido por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Para isso foi utilizado um espectrofotômetro de massa (CG-EM/Focus-PolarisQ), acoplado a um auto amostrador (AS 3000/Thermo Electron Corporation).

A identificação dos compostos foi feita por comparação com uma solução padrão, contendo uma mistura de 16 HPA. 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 HPA deuterados (naftaleno-*d*8, acenafteno-*d*10, fenantreno-*d*10, criseno-*d*12, perileno-*d*12) na concentração de 100 ng/ml.

A determinação dos hidrocarbonetos voláteis (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) foi realizada diretamente, via *Head space*, acoplado à cromatografia em fase gasosa (TraceGC ultra), com detecção por fotoionização e ionização em chama, baseando-se nos métodos descritos por EPA (1996). A

calibração dos métodos de quantificação dos BTEX foi realizada por meio de curvas analíticas, preparadas em triplicata, com concentrações de 1 - 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  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%.

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados foi gerado e organizado através do uso dos *softwares* Excel<sup>®</sup> e Access<sup>®</sup> (Microsoft Office Professional Plus 2016). A caracterização geoquímica do petróleo e derivados foi realizada no laboratório de Química da Universidade Federal do Paraná. Os dados de qualidade da água e biométricos foram analisados através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido pelo teste Tukey. A sobrevivência foi analisada pela curva de Kaplan-Meier. A concentração letal ( $CL_{50}$ ) mediana foi estimada através do programa estatística Trimmed Spearman-Kärber "LC<sub>50</sub> Programs JSPear Test". As demais análises foram realizadas utilizando-se o *software* Statsoft Statistica<sup>MR</sup> versão 12.0<sup>®</sup>.

## 3 RESULTADOS

As concentrações de hidrocarbonetos estimadas após a preparação da FSA da gasolina, do petróleo e do óleo mineral estão apresentadas na Tabela 1. A gasolina foi o derivado que apresentou maiores concentrações de hidrocarbonetos, totalizando 2.506,40  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A gasolina apresentou concentrações de BTEX 13,44 % a mais do que o petróleo e 44,27 % a mais que o óleo mineral. A quantificação de HPA do óleo mineral deu-se apenas para o Naftaleno, ficando os demais abaixo do limite de quantificação de 0,25  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Tabela 1 – Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) dos hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX) e policíclicos aromáticos (HPA) da fração solúvel em água (FSA) da gasolina, do petróleo e do óleo mineral utilizados nos bioensaios com *Astyanax altiparanae*.

Hidrocarboneto	Gasolina	Petróleo	Óleo Mineral
Benzeno	1033	63	8
Etilbenzeno	1118	69	<0,5
Tolueno	99	51	18
Xileno	103	<0,5	14
m+p+xileno	107	<0,5	15
<b><math>\Sigma</math> BTEX</b>	<b>2460</b>	<b>183</b>	<b>55</b>
Acenaftaleno	<0,25	9,2	<0,25
Acenafteno	<0,25	<0,25	<0,25
Antraceno	<0,25	<0,25	<0,25
Benzo[a]antraceno	<0,25	<0,25	<0,25
Benzo[a]fluoranteno	<0,25	7,2	<0,25
Benzo[a]pireno	<0,25	7,1	<0,25
Benzo[ghi]pirileno	1,5	<0,25	<0,25
Benzo[k]fluoranteno	1,8	1,0	<0,25
Criseno	3,8	0,7	<0,25
Dibenzo[a,h]antraceno	4,6	0,6	<0,25
Fenantreno	5,5	1,3	<0,25
Fluoranteno	5,6	1,1	<0,25
Fluoreno	4,2	1,0	<0,25
Indeno[1,2,3-cd]pireno	5,4	1,2	<0,25
Naftaleno	5,3	1,2	0,33
Pireno	5,4	1,1	<0,25
<b><math>\Sigma</math> HPA</b>	<b>46,4</b>	<b>32,6</b>	<b>0,33</b>

\*Limite de quantificação BTEX:  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ; HPA:  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Não houve mortalidade de nenhum indivíduo do grupo controle durante o período de 96 horas. Houve uma acentuada mortalidade nas primeiras 24 horas após a eclosão dos embriões expostos a gasolina (56,67%), ao petróleo (43,33%) e óleo mineral (26,67%). Todos os embriões expostos a FSA gasolina, morreram após 72 horas de exposição (Figura 1). A taxa de sobrevivência de embriões ao final de 96 horas foi de 13,33% para os animais expostos a FSA do petróleo e 36,67 % para os expostos a FSA óleo mineral.

A sobrevivência de larvas ao final de 96 horas foi de 63,33% para os expostos a FSA do petróleo, 60,00% para os expostos a FSA do óleo mineral e, 26,67% para os expostos a FSA da gasolina (Figura 2).

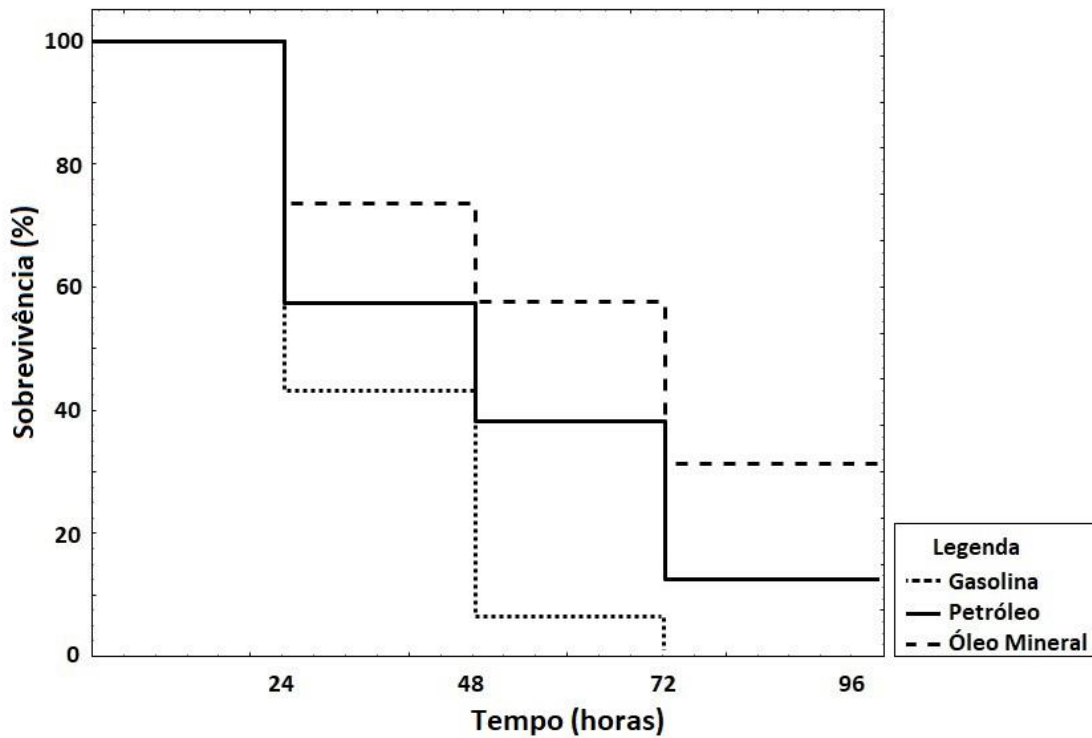


Figura 1. Taxa de sobrevivência (%) de embriões de *Astyanax altiparanae* expostos à FSA da gasolina, do petróleo e do óleo mineral durante o período de 96 horas.

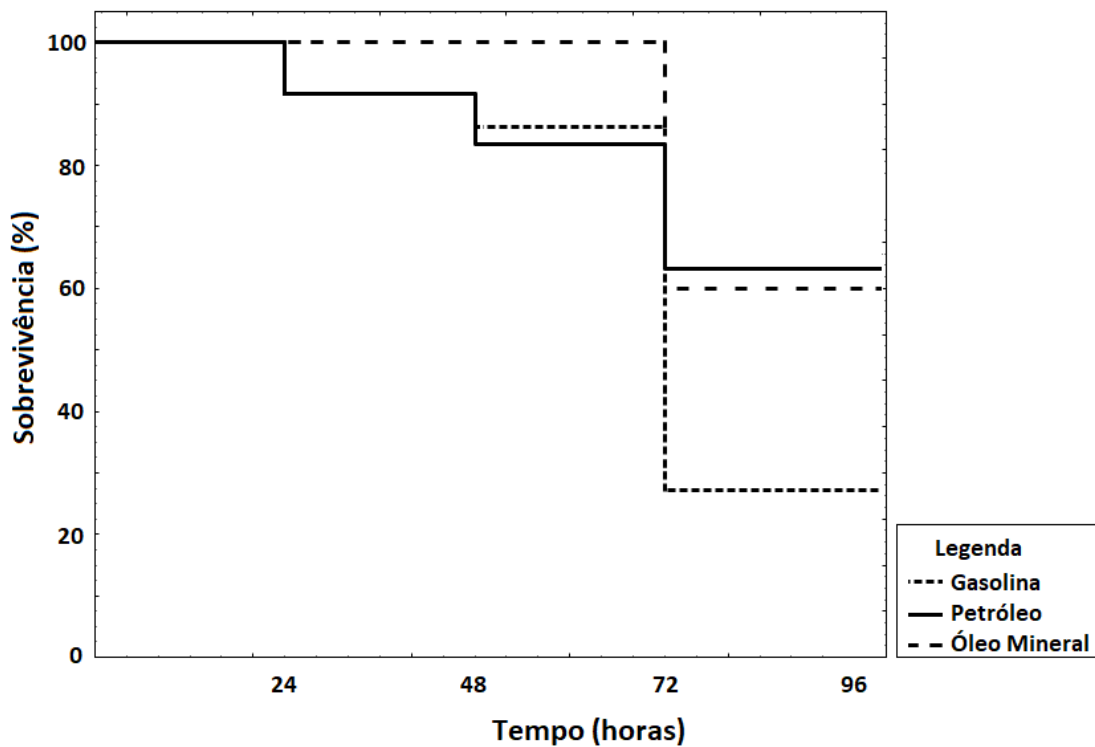


Figura 2. Taxa de sobrevivência (%) de larvas de *Astyanax altiparanae* expostas à FSA da gasolina, do petróleo e do óleo mineral durante o período de 96 horas.



O contato com a FSA dos compostos gerou muito mais efeitos negativos em embriões do que em larvas. Os sinais mais evidentes de malformações foram identificados nas deformações nas nadadeiras e no coração, como a ocorrência de edemas no pericárdio (vide Tabela 2). Disfunções no pericárdio foram observadas em 84,61% dos embriões expostos a gasolina e em 52,94% dos embriões expostos ao petróleo, não sendo relatada a nenhum embrião exposto ao óleo mineral.

A exposição ao petróleo ocasionou um maior número de deformações na nadadeira caudal dos embriões. Houve uma diferença estatística ( $p < 0,05$ ) no tempo de absorção da reserva vitelínica entre os tratamentos. Observou-se que os embriões expostos a gasolina e ao petróleo absorveram suas reservas mais rápidas que os demais exemplares, além de apresentarem uma menor contagem de batimentos cardíacos.

Tabela 2 – Parâmetros mensurados durante a exposição crônica de embriões e larvas de *Astyanax altiparanae* a FSA da gasolina, do petróleo e do óleo mineral durante o período de 96 horas.

Parâmetro	Controle	Gasolina		Petróleo		Óleo Mineral	
		Embriões	Larvas	Embriões	Larvas	Embriões	Larvas
Anemia	0	9	4	6	1	0	0
Ausência Nadadeira Caudal	0	12	4	7	4	2	0
Deformação da cabeça	0	2	0	4	0	0	0
Edema no pericárdio	0	11	0	9	0	0	0
Edema no saco vitelínico	0	4	6	5	4	2	0
Lesões nas nadadeiras	0	1	17	17	7	3	1
Malformação da notocorda	0	8	7	5	4	2	1
Malformação da boca	0	2	0	3	0	0	0
Malformação de anus	0	6	0	7	0	0	0
Pigmentação do corpo	0	1	0	5	0	0	0
Mortalidade a eclosão	0	17	2	13	2	8	0
Absorção da reserva (horas) <sup>1</sup>	74 <sup>a</sup> (62 - 78)	56 <sup>b</sup> (52 - 60)	60 <sup>ab</sup> (54 - 70)	57 <sup>b</sup> (52 - 60)	68 <sup>ab</sup> (56 - 70)	65 <sup>ab</sup> (58 - 74)	76 <sup>ab</sup> (52 - 76)
Batimentos cardíacos (bpm) <sup>1</sup>	128 <sup>a</sup> (126 - 131)	117 <sup>b</sup> (114 - 119)	128 <sup>a</sup> (126 - 131)	119 <sup>b</sup> (117 - 121)	129 <sup>a</sup> (126 - 131)	128 <sup>a</sup> (126 - 131)	130 <sup>a</sup> (126 - 131)
Comprimento total (mm) <sup>2</sup>	3,07 ± 0,06	3,01 ± 0,13	3,07 ± 0,03	2,99 ± 0,18	3,17 ± 0,12	3,10 ± 0,08	3,17 ± 0,07
Altura do corpo (mm)	0,17 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,02
Comprimento vitelo (mm)	0,70 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,70 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,10 <sup>bc</sup>	0,69 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,69 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,67 ± 0,12 <sup>ab</sup>
Altura do vitelo (mm)	0,45 ± 0,07	0,44 ± 0,03	0,45 ± 0,05	0,44 ± 0,03	0,48 ± 0,03	0,47 ± 0,07	0,50 ± 0,06
Volume do vitelo (mm <sup>3</sup> )	0,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Valores apresentados como mediana (mínimo – máximo). <sup>2</sup>Valores apresentados como mediana ± desvio padrão. Letras minúsculas (<sup>a,b</sup>) indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os tratamentos e o grupo controle.

Como pode ser observado na Tabela 3, de uma forma geral, observou-se uma tendência de queda nas concentrações de oxigênio dissolvido e nos níveis de saturação de oxigênio e na alcalinidade em relação aos valores quantificados na água usada para renovação dos poços de cultivo em todos os tratamentos experimentais.

Observou-se uma leve tendência de acidificação da água em todos os tratamentos em relação a água de reposição. Não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nas concentrações dos compostos nitrogenados avaliados na água dos tratamentos com embriões. Já para larvas, houve um leve aumento das concentrações de amônia da água dos tratamentos em relação a água de reposição. Não houve nenhuma diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre a água do grupo controle com a água dos tratamentos.

Tabela 3 – Parâmetros de qualidade de água monitorados durante o período de exposição crônica de embriões e larvas de *Astyanax altiparanae* a FSA da gasolina, do petróleo e do óleo mineral.

Concentração	pH	OD (mg L <sup>-1</sup> )	OD (%)	N-AT (mg L <sup>-1</sup> )	N-NO <sup>2-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Alcalinidade (mg L <sup>-1</sup> )
Reposição Embriões	7,52 <sup>a</sup> (7,38 - 7,63)	6,69 <sup>a</sup> (6,56 - 7,01)	81,10 <sup>a</sup> (79,00 - 89,80)	0,01 (0,01 - 0,01)	0,01 (0,01 - 0,01)	67,00 <sup>a</sup> (60,80 - 68,00)
Reposição Larvas	7,55 <sup>x</sup> (7,39 - 7,62)	6,90 <sup>x</sup> (6,63 - 7,06)	86,90 <sup>x</sup> (81,36 - 89,50)	0,01 (0,00 - 0,01)	0,01 <sup>x</sup> (0,00 - 0,01)	69,20 <sup>x</sup> (63,50 - 72,20)
Controle Embriões	6,61 <sup>b</sup> (6,58 - 6,62)	4,57 <sup>b</sup> (4,53 - 4,61)	56,38 <sup>b</sup> (52,00 - 61,95)	0,01 (0,01 - 0,01)	0,02 (0,01 - 0,02)	41,10 <sup>b</sup> (36,90 - 45,80)
Controle Larvas	6,65 <sup>y</sup> (6,43 - 6,66)	4,53 <sup>y</sup> (4,47 - 4,60)	56,38 <sup>y</sup> (52,00 - 61,95)	0,01 (0,01 - 0,01)	0,02 <sup>y</sup> (0,02 - 0,03)	40,05 <sup>y</sup> (38,90 - 46,50)
Óleo Mineral Embriões	6,64 <sup>b</sup> (6,49 - 6,88)	4,50 <sup>b</sup> (4,44 - 4,53)	53,13 <sup>b</sup> (49,00 - 55,95)	0,02 (0,01 - 0,02)	0,01 (0,01 - 0,01)	33,70 <sup>b</sup> (31,00 - 41,80)
Óleo Mineral Larvas	6,66 <sup>y</sup> (6,53 - 6,93)	4,50 <sup>y</sup> (4,39 - 4,53)	53,13 <sup>y</sup> (49,00 - 55,95)	0,01 (0,01 - 0,01)	0,01 <sup>xy</sup> (0,01 - 0,03)	35,80 <sup>y</sup> (33,50 - 39,20)
Petróleo Embriões	6,65 <sup>b</sup> (6,59 - 6,88)	4,45 <sup>b</sup> (4,39 - 4,53)	53,93 <sup>b</sup> (48,80 - 58,16)	0,02 (0,01 - 0,02)	0,02 (0,01 - 0,02)	37,45 <sup>b</sup> (33,90 - 41,00)
Petróleo Larvas	6,66 <sup>y</sup> (6,59 - 6,92)	4,43 <sup>y</sup> (4,39 - 4,49)	53,93 <sup>y</sup> (48,80 - 58,16)	0,01 (0,01 - 0,01)	0,02 <sup>xy</sup> (0,01 - 0,02)	36,40 <sup>y</sup> (32,90 - 41,20)
Gasolina Embriões	6,54 <sup>b</sup> (6,49 - 6,61)	4,38 <sup>b</sup> (4,29 - 4,46)	50,45 <sup>b</sup> (48,35 - 52,02)	0,01 (0,01 - 0,02)	0,02 (0,01 - 0,02)	39,55 <sup>b</sup> (30,80 - 45,80)
Gasolina Larvas	6,57 <sup>y</sup> (6,46 - 6,65)	4,40 <sup>y</sup> (4,35 - 4,47)	50,49 <sup>y</sup> (48,38 - 52,09)	0,01 (0,01 - 0,01)	0,02 <sup>xy</sup> (0,01 - 0,03)	37,20 <sup>y</sup> (30,80 - 46,50)

\*Valores apresentados como mediana (mínima-máxima). Letras minúsculas (<sup>a,b</sup>) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os compostos e a água da reposição do experimento com embriões. Letras minúsculas (<sup>x,y</sup>) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os parâmetros de qualidade de água dos compostos e a água da reposição do experimento com larvas.

## 4 DISCUSSÃO

Sabe-se que os agentes tóxicos encontrados no meio aquático podem se acumular em ovos de peixes e trazer consequências muito piores para as larvas após a eclosão dos embriões (Goksoyr et al., 1991). Isso pode ser observado neste trabalho pela alta intensidade de anomalias morfológicas vistos em animais que foram expostos quando ainda eram embriões em relação aos exemplares que foram expostos somente após a sua eclosão.

Em todos os compostos testados, os embriões recém-eclodidos apresentaram padrões morfológicos altriciais, conforme descrito por Fuiman and Werner (2009) e Stevanato (2016) como típicos de animais pouco desenvolvidos. A exposição ao petróleo resultou em uma maior quantidade de deformações na nadadeira caudal, porém, a maioria dos exemplares expostos a gasolina, nem se quer apresentavam esta estrutura anatômica ao eclodirem. O desenvolvimento anormal de estruturas morfológicas na porção distal dos peixes (como a abertura de anus, malformação da notocorda e as deformações da nadadeira) também foram reportadas por Carls and Rice (1990) e Pereira, Lewis et al. (1992) que identificaram alterações significativas e anormais na nadadeira caudal de embriões e larvas de peixes expostos a fração solúvel em água do petróleo.

Outro caractere morfológico que foi afetado pela exposição aos compostos em geral foi o coração. Incardona, Swarts et al. (2013) e Hodson (2017) relatam que malformações cardíacas são comuns para indivíduos que são expostos a xenobiontes derivados do petróleo. A gravidade e a natureza desse problema no desenvolvimento embrionário variam de acordo com o tipo e com a quantidade de hidrocarbonetos (Incardona, Linbo et al. 2011), sendo aqui relatado o maior número de disfunções no pericárdio nos animais expostos a gasolina e ao petróleo, em contra partida, não surtindo efeitos aos exemplares do grupo controle e nem aos que foram expostos ao óleo mineral.

Outra anomalia cardíaca registrada foi a batimetria cardíaca dos exemplares expostos ao petróleo e a gasolina em relação aos demais tratamentos. Strmac, Oberemm et al. (2002) e Perrichon, Le Menach et al. (2016) observaram consequências diretas no batimento cardíaco de embriões e larvas de *Danio rerio* expostos a fração solúvel em água do petróleo,

considerando consequências admissíveis na sobrevivência dos peixes. Ficou claro que houve uma forte influência dessas anomalias na sobrevivência dos exemplares aqui avaliados. Segundo Rebouças, de Lima et al. (2014), as fases iniciais da vida dos peixes são bastante suscetíveis aos mais variados agentes estressores, que podem, mesmo em uma baixa intensidade, levar os exemplares à morte em poucos dias, como foi aqui observado, com a alta taxa de mortalidade de embriões expostos a gasolina logo nas 24 primeiras horas de exposição.

Entretanto, os indivíduos expostos a gasolina e ao petróleo foram os que apresentaram o consumo de suas reservas de forma mais rápida. Isso se deve ao fato de que, após as 48 horas de exposição, edemas no saco vitelínico tornavam-se cada vez maiores e mais evidentes, oprimindo o conteúdo vitelínico, dificultando a sua visualização a partir de 60 horas. Destaca-se ainda que, grande parte das anormalidades surgem ao longo do desenvolvimento dos exemplares e que, muitas foram exclusivamente registradas em embriões, e em especial, aos que foram expostas as frações solúveis do petróleo e da gasolina.

Observou-se que praticamente não houve alterações nos padrões de qualidade da água nos tratamentos e no grupo controle. Era-se esperado (e desejado) que a água utilizada na renovação diária dos poços tivesse os melhores parâmetros de qualidade da água. Todavia, mesmo com poucas informações sobre os níveis críticos de cada um dos parâmetros de qualidade da água nas fases iniciais de vida de *A. altiparanae*, os exemplares do grupo controle conseguiram sobreviver até o final do período experimental, permitindo se descartar a hipótese de que, os parâmetros de qualidade do meio também tenham influenciado na mortalidade larval.

Nota-se que a fração solúvel em água do óleo mineral é pouco tóxica aos embriões e larvas dessa espécie. Os resultados aqui obtidos apontam que mesmo em baixas concentrações a gasolina pode trazer consequências drásticas a curto prazo. Mesmo com o manejo diário, embriões expostos ao petróleo e ao óleo mineral conseguiram sobreviver, mesmo que em uma menor concentração.

## 5 REFERÊNCIAS

Akaishi, F. M. (2012). "Aplicação de biomarcadores de contaminação ambiental em estudos de laboratório e monitoramento em campo."

Alves, D. E. O., M. d. F. M. da Silva, W. F. Molina, S. A. G. L. da Costa and R. S. S. do Nascimento (2016). "Desenvolvimento ontogenético inicial de *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875)(Characiformes)." *Biota Amazônia* (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota) 6(1): 70-75.

APHA (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater: 4500-NH<sub>3</sub> Método fenol de determinação de Amônia Total*. Washington, DC, USA.

APHA, A. P. H. A. (2005). "Standard methods for the examination of water and wastewater. Method 4500 F. 4-114." 21.

Boehmer-Christiansen, S. (2008). "Estimates of oil entering the marine environment from sea-based activities, reports and studies no. 75." *Energy & Environment* 19(5): 765-765.

Carls, M. G. and S. D. Rice (1990). "Abnormal development and growth reductions of pollock *Theragra chalcogramma* embryos exposed to water-soluble fractions of oil." *Fishery Bulletin* 88(1): 29-37.

Dal Pont, G. (2012). *Toxicidade do óleo diesel para o peixe *Astyanax altiparanae**. Mestrado em Ciências Veterinárias Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná.

Eaton, J., J. McKim and G. Holcombe (1978). "Metal toxicity to embryos and larvae of seven freshwater fish species—I. Cadmium." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 19(1): 95-103.

EPA (1996). *US Environmental Protection Agency - Method 5021: Volatile organic compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis*: 1-13.

EPA (1996). *US Environmental Protection Agency - Method 8021B: Aromatic and halogenated volatiles by gas chromatography using photoionization and/or electrolytic conductivity detectors*: 1-19.

Fuiman, L. A. and R. G. Werner (2009). *Fishery science: the unique contributions of early life stages*, John Wiley & Sons.

Hallare, A., K. Nagel, H.-R. Köhler and R. Tribskorn (2006). "Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos." *Ecotoxicology and environmental safety* 63(3): 378-388.

Hodson, P. V. (2017). "The toxicity to fish embryos of PAH in crude and refined oils." *Archives of environmental contamination and toxicology* 73(1): 12-18.

Incardona, J. P., T. K. Collier and N. L. Scholz (2004). "Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons." *Toxicology and applied pharmacology* 196(2): 191-205.

Incardona, J. P., T. L. Linbo and N. L. Scholz (2011). "Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development." *Toxicology and Applied Pharmacology* 257(2): 242-249.

Incardona, J. P., T. L. Swarts, R. C. Edmunds, T. L. Linbo, A. Aquilina-Beck, C. A. Sloan, L. D. Gardner, B. A. Block and N. L. Scholz (2013). "Exxon Valdez to Deepwater Horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages." *Aquatic toxicology* 142: 303-316.

ITPOF (2012). *The International Tanker Owners Pollution Federation Limited - Handbook 2010/11*: 54.

Kettrup, A., K.-W. Schramm, P. Marth, K. Oxynos and J. Schmitzer (1999). "Specimen banking as an environmental surveillance tool." *Annali di chimica* 89(7-8): 489-498.

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

OECD (1994). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Organization for Economic.

Pereira, J. J., E. J. Lewis, Jr., R. L. Spallone and C. Sword (1992). "Bifurcation of gill filaments in winter flounder (*Pleuronectes americanus* Walbaum) from Long Island Sound." *Journal of Fish Biology* 41(2): 327-338.

Perrichon, P., K. Le Menach, F. Akcha, J. Cachot, H. Budzinski and P. Bustamante (2016). "Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two different oils using a zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval bioassay with a multilevel approach." *Science of the Total Environment* 568: 952-966.

Pinto, E. D. C. P. (2013). "Toxicidade de petróleo bruto sobre microcrustáceo *Daphnia similis* em água de rio e água de produção de petróleo."

Rebouças, P. M., L. R. de Lima, Í. F. Dias and J. A. D. Barbosa Filho (2014). "Influence of thermal oscillation on pisciculture water." *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology* 2(2): 35-42.

Sandrini Neto, L. (2015). "Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos em distintos níveis de organização biológica."

Sibaúba-Tavares, L. (1995). *Limnologia Aplicada à Aquicultura*. Funep, Jaboticabal: 70.



Silva, S. C. F. (2013). "Sensibilidade ambiental ao derrame de biocombustível e óleo: uma análise da estrutura genética populacional do Curimba (*Prochilodus lineatus*)."

Stevanato, D. J. (2016). ONTOGENIA LARVAL E PÓS-LARVAL DE *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) EM LABORATÓRIO, Universidade Federal do Paraná.

Strmac, M., A. Oberemm and T. Braunbeck (2002). "Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae." *Journal of Fish Biology* 61(1): 24-38.

Teas, C., S. Kalligeros, F. Zanikos, S. Stournas, E. Lois and G. Anastopoulos (2001). "Investigation of the effectiveness of absorbent materials in oil spills clean up." *Desalination* 140(3): 259-264.