

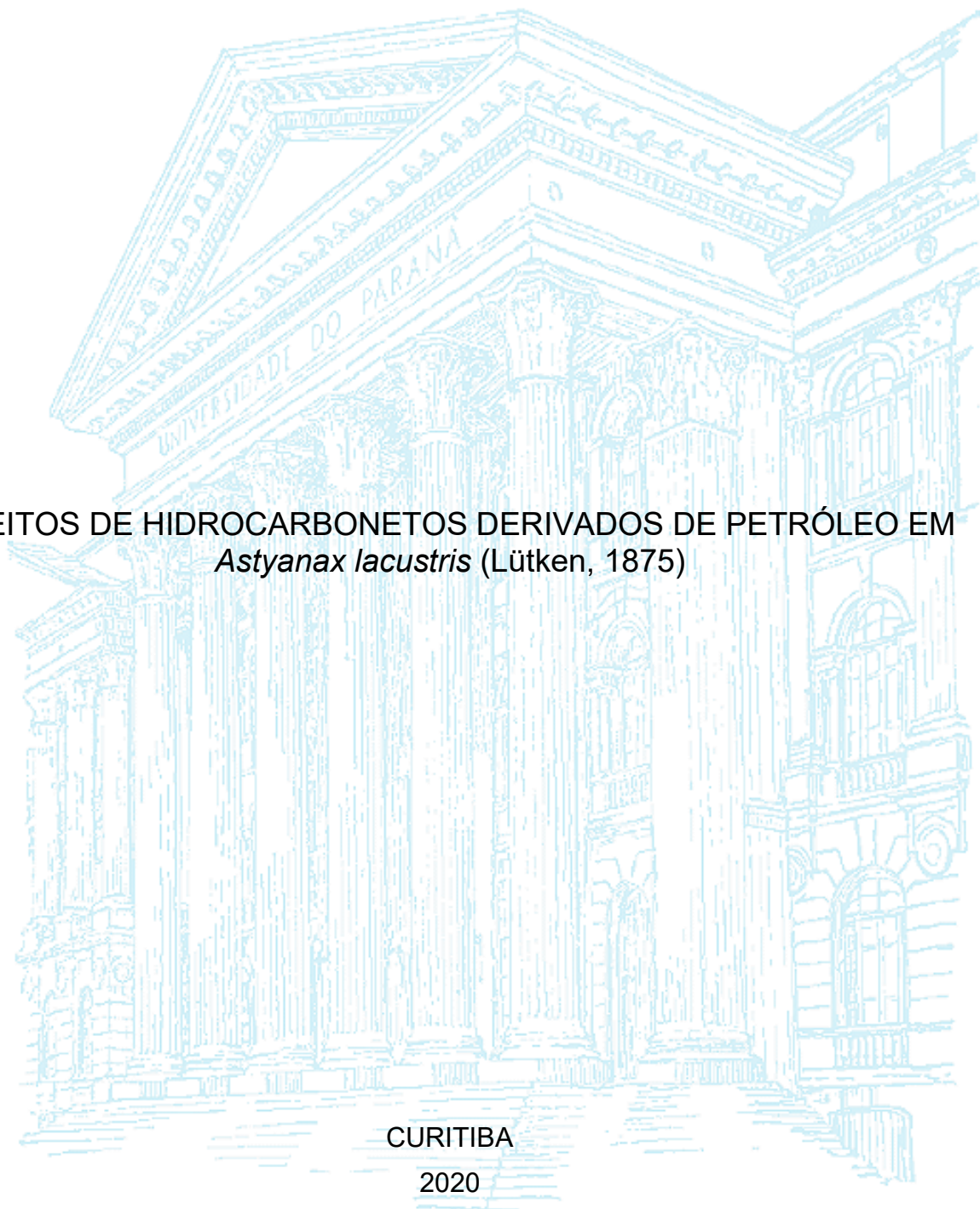
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIEGO JUNQUEIRA STEVANATO

EFEITOS DE HIDROCARBONETOS DERIVADOS DE PETRÓLEO EM
Astyanax lacustris (Lütken, 1875)

CURITIBA

2020



DIEGO JUNQUEIRA STEVANATO

EFEITOS DE HIDROCARBONETOS DERIVADOS DE PETRÓLEO EM *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875)

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ostrensky

CURITIBA

2020



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA -
40001016082P0

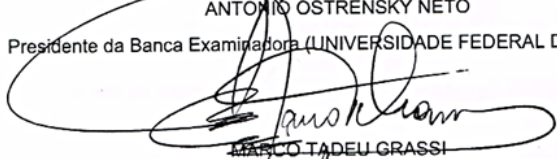
TERMO DE APROVAÇÃO

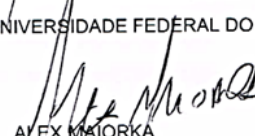
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DIEGO JUNQUEIRA STEVANATO** intitulada: **EFEITOS DE HIDROCARBONETOS DERIVADOS DE PETRÓLEO SOBRE A ONTOGÊNESE DE *Astyanax lacustris* (LÜTKEN, 1875)**, sob orientação do Prof. Dr. ANTONIO OSTRENSKY NETO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

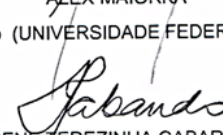
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2020.


ANTONIO OSTRENSKY NETO
Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


MARCO TADEU GRASSI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


ALEX MAIORKA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


IRENE TEREZINHA GABARDO
Avaliador Externo (PETROBRÁS)

RESUMO GERAL

A intensa exploração de petróleo tem causado diversas polêmicas ambientais, principalmente em relação aos possíveis impactos nos ecossistemas aquáticos. O petróleo e seus derivados são formados por misturas complexas de hidrocarbonetos e sua composição química é totalmente dependente de sua origem geográfica e do nível de craqueamento (processamento). Os hidrocarbonetos constituem uma das classes de poluentes mais encontrados nos ambientes aquáticos. O presente trabalho avalia os efeitos da exposição à fração solúvel do petróleo, da gasolina, do óleo diesel, de dois óleos minerais e de um óleo lubrificante sobre os processos ontogenéticos de embriões, larvas e de pós-larvas do lambari *Astyanax lacustris*. O estudo foi conduzido em três diferentes momentos. Primeiramente definiu-se a concentração letal mediana (CL_{50}) da do petróleo (FSA_P), do diesel (FSA_D), da gasolina (FSA_G), de um óleo lubrificante (FSA_{OL}) e de dois óleos minerais (FSA_{OM1} e FSA_{OM2}), realizados em dois ensaios em condições controladas de laboratório, um envolvendo embriões e o outro larvas da espécie. Os experimentos foram realizados em placas de cultivo celular de 6 poços, totalizando 30 exemplares para cada concentração-teste. A FSA_G foi a que apresentou a maior concentração total de hidrocarbonetos ($335.543,1 \mu g L^{-1}$) e, ao mesmo tempo, foi a que provocou maiores danos, tanto para embriões como para larvas de *A. lacustris*. Os embriões se mostraram muito sensíveis à exposição aos derivados de petróleo, mesmo quando expostos a baixas concentrações. As larvas foram afetadas apenas pela exposição à FSA_G e FSA_P . Uma vez definido os valores da CL_{50} de cada um dos compostos, avaliou-se os processos ontogenéticos dos exemplares expostos ao composto mais tóxico para os embriões (FSA_G), intermediário (FSA_P) e pouco tóxico (FSA_{OM}). Os exemplares foram expostos a 0,04% da FSA_G , 34,79% da FSA_P e 50,88% do petróleo FSA_{OM} . A exposição, mesmo em baixas concentrações, ocasionou efeitos subletais e letais aos embriões e larvas. A FSA_G foi, novamente, a que apresentou maiores concentrações de hidrocarbonetos e também a que provocou maiores danos aos organismos testados. Entre as alterações mais relatadas estão lesões nas nadadeiras e edemas cardíacos, que foram registrados em 36,7% dos exemplares expostos. A FSA_P ocasionou efeitos semelhantes aos da gasolina e a FSA_{OM} foi a que apresentou menores efeitos. Definidos as toxicidades desses derivados nas fases iniciais de vida, investigou-se os efeitos na reprodução da espécie. Juvenis foram expostos à 0,5% de FSA_G , 1,76% de FSA_P e a 11,24% de FSA_{OM} por 15 dias. Ao atingirem tamanho próximo a $7,0 \pm 1,0$ cm para os machos e $9,0 \pm 1,0$ cm, exemplares foram selecionados ao acaso e submetidos ao processo de indução hormonal. Esse procedimento foi repetido por mais três vezes, com intervalo de 30 dias a cada evento. A exposição dos juvenis à FSA_G e à FSA_P apresentou maior influência sobre as taxas de sobrevivência das larvas geradas por *A. lacustris*. Já a fração solúvel em água do óleo mineral (FSA_{OM}), novamente, se mostrou muito pouco tóxica para a espécie. Quanto menor foi o tempo decorrido entre a exposição e a reprodução, menor foi o número de ovócitos produzidos pelas fêmeas e maior a probabilidade de geração de embriões malformados. Entretanto, com o passar do tempo, essas diferenças foram diminuindo e decorridos 102 dias da exposição, os tratamentos não apresentavam mais diferenças reprodutivas significativas em relação ao grupo controle ou mesmo entre si.

Palavras-chave: exposição, fração solúvel em água, hidrocarbonetos, toxicidade.

GENERAL ABSTRACT

The intense exploitation of oil has several environmental controversies, mainly in relation to the possible impacts on aquatic ecosystems. Petroleum and its derivatives are formed by mixtures of hydrocarbons and their chemical composition is totally dependent on their geographic origin and cracking level (processing). Hydrocarbons created one of the most pollutant classes found in aquatic environments. This work evaluates the effects of exposure to the fraction soluble in oil, gasoline, diesel oil, two mineral oils and a lubricating oil on the ontogenetic processes of embryos, larvae and post-larvae of tetra *Astyanax lacustris*. The study was conducted at three different times. Firstly, the median lethal concentration (CL_{50}) of that of petroleum (WSF_P), diesel (WSF_D), gasoline (WSF_G), a lubricating oil (WSF_{LO}) and two mineral oils (WSF_{MO1} and WSF_{MO2}), carried out in two tests under controlled laboratory conditions, one involving embryo and the other larvae of the species. The experiments were carried out in cell culture plates of 6 wells, totaling 30 specimens for each test concentration. WSF_G was the one with the highest total hydrocarbon concentration ($335.543,1 \mu\text{g L}^{-1}$) and, at the same time, it caused the most damage, both for embryos and larvae. Embryos were very sensitive to exposure to petroleum products, even when exposed to low concentrations. The larvae were affected only by exposure to WSF_G and WSF_P . Once the LC_{50} values of each of the compounds were defined, the ontogenetic processes of the specimens exposed to the most toxic to the embryos (WSF_G), intermediate (WSF_P) and low toxic (WSF_{MO}) compounds were evaluated. The specimens were exposed to 0.04% of WSF_G , 34.79% of WSF_P and 50.88% of WSF_{MO} oil. Exposure, even in low concentrations, caused sublethal and lethal effects on embryos and larvae. WSF_G was, again, the one with the highest concentrations of hydrocarbons and also the one that caused the greatest damage to the organisms tested. Among the most reported alterations are lesions in the fins and cardiac edema, which were recorded in 36.7% of the exposed specimens. WSF_P had similar effects to WSF_G and WSF_{MO} had the least effect. Once the toxicities of these derivatives were defined in the early stages of life, the effects on the reproduction of the species were investigated. Juveniles were exposed to 0.5% WSF_G , 1.76% WSF_P and 11.24% WSF_{MO} for 15 days. When reaching a size close to 7.0 ± 1.0 cm for males and 9.0 ± 1.0 cm, specimens were selected at random and submitted to the hormonal induction process. This procedure was repeated three more times, with an interval of 30 days at each event. The exposure of juveniles to WSF_G and WSF_P had a greater influence on the survival rates of larvae generated by *A. lacustris*. The water-soluble fraction of the mineral oil (WSF_{MO}), again, proved to be very little toxic for the species. The shorter the time elapsed between exposure and reproduction, the smaller the number of oocytes produced by the females and the greater the probability of generating malformed embryos. However, over time, these differences have diminished and after 102 days of exposure, the treatments no longer showed significant reproductive differences in relation to the control group or even among themselves.

Keywords: exposure, water-soluble fraction, hydrocarbons, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese dos principais acidentes relatados no mundo entre 1970 a 2019.	19
Figura 2. Síntese dos principais acidentes relatados envolvendo petróleo e derivados no Brasil.	20
Figura 3. Lambari-do-rabo-amarelo <i>Astyanax lacustris</i> (Lütken, 1875).....	27
Figura 4. Concentração letal (CL ₅₀ – 96 horas) do petróleo (FSA _P), diesel (FSA _D), gasolina (FSA _G), de dois óleos minerais comerciais (FSA _{OM1} e FSA _{OM2}) e óleo lubrificante (FSA _{OL}) para embriões de <i>Astyanax lacustris</i> . As barras representam os valores médios observados de CL ₅₀ e os respectivos limites superiores estimados. Linha pontilhada representa o valor máximo da fração solúvel (100%).	50
Figura 5. Taxa de coagulação de ovos de <i>Astyanax lacustris</i> expostos à fração solúvel em água de petróleo e derivados: óleo diesel (FSA _D), gasolina (FSA _G), óleo mineral isolante (FSA _{OM1} e FSA _{OM2}), óleo lubrificante (FSA _{OL}), controle positivo (etanol) e controle negativo (controle). Valores apresentados como média ± desvio padrão. Letras (sobrescritas) indicam diferenças significativas (p < 0,05).	51
Figura 6. Concentração letal (CL ₅₀ – 96 horas) da fração solúvel em água do petróleo (FSA _P) e da gasolina (FSA _G), de larvas de <i>Astyanax lacustris</i> . Barras representam o valor de CL ₅₀ observado e seus respectivos limites obtidos. Linha pontilhada representa o valor máximo da fração solúvel (100%).	52
Figura 7. Taxa de sobrevivência (%) de embriões (A) e larvas (B) de <i>Astyanax lacustris</i> expostos à fração solúvel em água da gasolina (FSA _G), do petróleo (FSA _P) e do óleo mineral (FSA _{OM}) durante o período de 96 horas.	72
Figura 8. Principais malformações relatadas após a exposição de <i>Astyanax lacustris</i> a diferentes derivados de petróleo. Setas indicam a região pericárdica de <i>A. lacustris</i> : A) Exemplar do grupo controle apresentando desenvolvimento normal para a espécie; B) exemplar exposto a FSA _P apresentando início de edema cardíaco; C) exemplar exposto à fração solúvel em água da gasolina (FSA _G) apresentando edema cardíaco (a); D) exemplar exposto à fração solúvel em água do petróleo (FSA _P) apresentando malformação na porção final da notocorda e na nadadeira caudal (b); E) exemplar exposto à fração solúvel em água da gasolina (FSA _G) com deformação na cabeça (c) e na nadadeira caudal (d); F) exemplar exposto à fração solúvel em água do petróleo (FSA _P) apresentando deformação na nadadeira caudal (e).	75
Figura 9. Síntese das etapas do experimento de exposição à fração solúvel em água do petróleo, da gasolina e de um óleo mineral em juvenis de <i>Astyanax lacustris</i>	93

- Figura 10. Disposição dos tanques utilizados para exposição de juvenis de *Astyanax lacustris* e respectivas concentrações das frações solúveis em água da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P), do óleo mineral (FSA_{OM}).....94
- Figura 11. Resultado da Análise de Cluster (pelo método da distância de ligação completa e mensuração por r de Pearson -1) dos dados obtidos a partir da exposição de juvenis de *Astyanax lacustris* à derivados do petróleo. Os grupos formados foram denominados: Grupo 1: Outros; Grupo 2: Desenvolvimento embrionário; Grupo 3: Índices reprodutivos; Grupo 4: Índices biométricos..... 107
- Figura 12. Taxa de malformações embrionárias de *Astyanax lacustris* obtidos de diferentes desovas de reprodutores expostos a fração solúvel em água do petróleo (FSA_P), da gasolina (FSA_G) e de um óleo mineral (FSA_{OM}). Letras minúsculas (^{a,b,c}) indicam diferenças no tempo 67. Letras maiúsculas (^{A,B}) indicam diferença estatísticas entre os tratamentos no tempo 102. Letras maiúsculas (^{X,Y,Z}) indicam diferença entre os diferentes tempos para cada tratamento..... 108
- Figura 13. Relação entre as taxas de eclosão (TE) e de sobrevivência (TS) de embriões de *Astyanax lacustris* com o tempo decorrido após a exposição de animais, ainda na fase juvenil, às frações solúveis em água do petróleo (FSA_P), da gasolina (FSA_G) e do óleo mineral (FSA_{OM}). Letras minúsculas (^{a,b}) indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos quanto a taxa de eclosão. Letras minúsculas (^{A,B}) indicam diferença estatística entre os tratamentos quanto a taxa de sobrevivência embrionária (96 h)..... 109
- Figura 14. Porcentagem de fêmeas de *Astyanax lacustris* que desovaram durante os quatro diferentes eventos de reprodução artificial ocorridos após a exposição à fração solúvel em água do petróleo (FSA_P), da gasolina (FSA_G) e do óleo mineral (FSA_{OM}). Letras minúsculas (^{a,b,c}), indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos para o mesmo tratamento. Letras maiúsculas (^{X,Y,Z}), indicam diferença estatística entre o mesmo tempo, entre os diferentes tratamentos. . 110
- Figura 15. Índice de desova (%) de exemplares de *Astyanax lacustris* expostos à fração solúvel em água da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P) e do óleo mineral (FSA_{OM}) e reproduzidos artificialmente em quatro diferentes tempos após a exposição. Letras minúsculas (^{a,b,c}), indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos para o mesmo tratamento. Letras maiúsculas (^{X,Y,Z}), indicam diferença estatística entre o mesmo tempo, entre os diferentes tratamentos. . 111
- Figura 16. Número de ovócitos obtidos de exemplares de *Astyanax lacustris* induzidos artificialmente à reprodução em tempos diferentes após a exposição crônica às frações solúveis em água da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P), e de um óleo mineral lubrificante (FSA_{OM}). Letras minúsculas (^{a,b}) indicam diferença significativas pelo teste de comparação de médias (ANOVA) seguido de post-teste de Tukey ($p < 0,05$) entre o mesmo tratamento. Letras maiúsculas (^{A,B}) indicam diferença estatística entre os diferentes tempos..... 112

Figura 17. Peso gonadal (g) de fêmeas de <i>Astyanax lacustris</i> induzidas artificialmente à reprodução em tempos diferentes após a exposição subletais às frações solúveis em água da gasolina (FSA _G), do óleo mineral (FSA _{OM}) e do petróleo (FSA _P). Letras minúsculas (^{a,b}) indicam diferença significativas pelo teste de comparação de médias (ANOVA) seguido de post-teste de Tukey ($p < 0,05$) entre o mesmo tratamento. Letras maiúsculas (^{A,B}) indicam diferença estatística entre os diferentes tempos.....	113
Figura 18. Extração da fração solúvel em água da gasolina com auxílio de um frasco tipo Mariotte.	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico químicas dos hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX) presentes nos principais derivados do petróleo.	24
Tabela 2. Óleo cru e derivados usados na exposição aguda (CL ₅₀ - 96 horas) de embriões e larvas de <i>Astyanax lacustris</i>	41
Tabela 3. Concentrações das frações solúveis em água (FSA) do óleo diesel (FSA _D), da gasolina (FSA _G), do petróleo (FSA _P), de dois óleos minerais comerciais lubrificantes (FSA _{OM1} e FSA _{OM2}) e de um óleo lubrificante (FSA _{OL}) usados na exposição aguda (CL ₁₀ e CL ₅₀ – 96 horas) de embriões e larvas de <i>Astyanax lacustris</i>	43
Tabela 4. Parâmetros toxicológicos usados na expressão dos resultados obtidos da exposição de embriões e larvas de <i>Astyanax lacustris</i> com petróleo e derivados.	44
Tabela 5. Concentração média (µg L ⁻¹) de hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX) e policíclicos aromáticos (HPA) obtidos das frações solúveis em água (FSA) do óleo diesel (FSA _D), da gasolina (FSA _G), do petróleo (FSA _P), de dois óleos minerais comerciais (FSA _{OM1} e FSA _{OM2}) e de um óleo lubrificante (FSA _{OL}) e usados na toxicidade aguda de embriões e larvas de <i>Astyanax lacustris</i>	46
Tabela 6. Parâmetros de qualidade de água analisados durante os testes de toxicidade aguda em embriões e larvas de <i>Astyanax lacustris</i> expostos às frações solúveis em água (FSA) do óleo diesel (FSA _D), da gasolina (FSA _G), do petróleo (FSA _P), de dois óleos minerais comerciais (FSA _{OM1} e FSA _{OM2}), de um óleo lubrificante (FSA _{OL}), de um controle negativo e controle positivo (etanol).	48
Tabela 7. Concentração letal (CL ₁₀ e CL ₅₀) e Concentração de efeito (CE ₀) obtidos da exposição ao petróleo e derivados durante a exposição aguda (96 horas) às respectivas frações solúvel em água – FSA sobre os embriões e larvas de <i>Astyanax lacustris</i>	53
Tabela 8. Concentração (µg L ⁻¹) de hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX) e policíclicos aromáticos (HPA) da fração solúvel em água da gasolina (FSA _G), do petróleo (FSA _P) e do óleo mineral (FSA _{OM}), utilizados nos bioensaios com <i>Astyanax lacustris</i>	70
Tabela 9. Parâmetros mensurados durante a exposição crônica de embriões (n=30) e larvas (n=30) de <i>Astyanax lacustris</i> à fração solúvel em água da gasolina (FSA _G), do petróleo (FSA _P) e do óleo mineral (FSA _{OM}) durante o período de 96 horas..	74
Tabela 10. Parâmetros indicativos da qualidade da água monitorados durante a exposição subcrônica de embriões e larvas de <i>Astyanax lacustris</i> as frações	

solúveis em água de gasolina (FSA _G), petróleo (FSA _P) e óleo mineral (FSA _{OM}).	77
Tabela 11. Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) de hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX) e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) presentes na fração solúvel em água (FSA) da gasolina (FSA _G), do petróleo (FSA _P), e do óleo mineral (FSA _{OM}), utilizados nos bioensaios com juvenis de <i>Astyanax lacustris</i>	99
Tabela 12. Parâmetros indicativos da qualidade da água durante as diferentes etapas do experimento de exposição de <i>Astyanax lacustris</i> à fração solúvel em água da gasolina (FSA _G), do petróleo (FSA _P), e do óleo mineral lubrificante (FSA _{OM})..	101
Tabela 13. Índices biométricos e reprodutivos monitorados durante quatro eventos de indução hormonal ocorridos após a exposição de <i>Astyanax lacustris</i> à fração solúvel em água da gasolina (FSA _G), do petróleo (FSA _P) e de um óleo mineral lubrificante (FSA _{OM}) em diferentes tempos: Reprodução 1: 67 dias; Reprodução 2: 102 dias; Reprodução 3: 137 dias e Reprodução 4: 172 dias após o final da exposição.	104
Tabela 14. Síntese dos resultados obtidos após exposição de juvenis de <i>Astyanax lacustris</i> às frações solúveis em água da gasolina (FSA _G), do petróleo (FSA _P) e de um óleo mineral lubrificante (FSA _{OM}).	113

LISTA DE SIGLAS

API – Unidade internacional de densidade dos derivados de petróleo
APHA - American Public Health Association
APP – Área de proteção permanente
CAS – Chemical Abstract Service
CE – Concentração de efeito
CL₁₀ – Concentração letal (10%)
CL₅₀ – Concentração letal (50%)
EPA – Environmental Protection Agency
FSA – Fração solúvel em água
IEA – International Energy Agency
ITPOF - The International Tanker Owners Pollution Federation Limited
mL L⁻¹ – Mililitro por litro
mg L⁻¹ - Miligramas por litro
NC – Número de cetano
NO₃ – Nitrato
N-AT – Amônia
N-NH₃ – Nitrogênio amoniacal
N-NO₂- Nitrito
pH – Potencial hidrogênio
OD – Oxigênio dissolvido
OS – Percentual de saturação de oxigênio
°C – Grau Celsius
ND – Não disponível
h – Unidade de tempo (horas)
LAPOA – Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos
GIA – Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais
UFPR – Universidade Federal do Paraná
GQA - Grupo de Química Ambiental da Universidade Federal do Paraná
REPAR - Refinaria Presidente Getúlio Vargas
OECD - Guidelines for the Testing of Chemicals
UI/kg – Unidade internacional / quilograma

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO.....	18
1.1	Acidentes com petróleo e derivados: um breve histórico da presença desses xenobiontes em meio aquático natural.....	18
1.2	A presença de petróleo e derivados em ambientes dulcícolas brasileiros.....	20
1.3	O petróleo e o meio aquático natural.....	22
1.4	A ecotoxicologia.....	25
1.5	O lambari <i>Astyanax lacustris</i>	26
1.6	Relevância da Pesquisa.....	28
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Geral.....	29
2.2	Específicos.....	29
3	HIPÓTESES.....	30
4	REFERÊNCIAS.....	31

CAPÍTULO 1. EFEITOS AGUDOS DO PETRÓLEO E DERIVADOS PARA EMBRIÕES E LARVAS DE *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875)

5	INTRODUÇÃO.....	38
6	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
6.1	Organismos-teste.....	40
6.2	Produtos testados.....	41
6.3	Testes preliminares de toxicidade.....	41
6.4	Testes definitivos de toxicidade.....	42
6.5	Qualidade da água.....	43
6.6	Análise estatística.....	44
7	RESULTADOS.....	44
8	DISCUSSÃO.....	53
9	REFERÊNCIAS.....	57

CAPÍTULO 2. EFEITOS SUBLETAIS DA EXPOSIÇÃO DE EMBRIÕES E LARVAS DE *Astyanax lacustris* (PISCES, CHARACIFORMES) ÀS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM ÁGUA DA GASOLINA, DO PETRÓLEO E DE UM ÓLEO MINERAL LUBRIFICANTE

10	INTRODUÇÃO	64
11	MATERIAL E MÉTODOS.....	65
11.1.	Produtos testados.....	66
11.2.	Preparação das frações solúveis em água (FSA)	66
11.3.	Bioensaios	67
11.4.	Avaliação morfométrica e merística.....	68
11.5.	Qualidade da água	69
11.6.	Análise estatística.....	69
12	RESULTADOS.....	70
13	DISCUSSÃO	78
14	REFERÊNCIAS	81

CAPÍTULO 3. EFEITOS REPRODUTIVOS DA EXPOSIÇÃO DE *Astyanax lacustris* (PISCES, CHARACIFORMES) ÀS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM ÁGUA DA GASOLINA, DO PETRÓLEO E DE UM ÓLEO MINERAL LUBRIFICANTE

15	INTRODUÇÃO	90
16	MATERIAL E MÉTODOS.....	92
16.1	Organismo-teste	92
16.2	Preparação das frações solúveis em água (FSA)	92
16.3	Exposição aos xenobiontes	93
16.4	Indução hormonal, desova e análises	95
16.5	Índices reprodutivos.....	96
16.6	Qualidade da água	98
16.7	Análises estatísticas	98
17	RESULTADOS.....	99
17.1	Xenobiontes.....	99

17.2	Fatores abióticos	100
17.3	Índices reprodutivos.....	103
18	DISCUSSÃO.....	114
19	REFERÊNCIAS	120
20	CONSIDERAÇÕES FINAIS	127
21	ANEXO I	128
22.1.	Preparação das frações solúveis em água (FSA)	128
22.2.	Padrões analíticos, solventes e materiais.....	129
22.3.	Extração e quantificação de BTEX e HPA em fase aquosa	130
22	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132

APRESENTAÇÃO GERAL

O presente trabalho avalia e descreve os efeitos da exposição à fração solúvel do petróleo, da gasolina, do óleo diesel, de dois óleos minerais e de um óleo lubrificante sobre os processos ontogenéticos de embriões, larvas e de pós-larvas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax lacustris*.

A tese é constituída por três capítulos em formato de artigo científico, um apêndice, um anexo e um artigo de divulgação. No capítulo, 1 intitulado de “EFEITOS AGUDOS DO PETRÓLEO E DERIVADOS PARA EMBRIÕES E LARVAS DE *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875)”, determinou-se as concentrações letais (CL₅₀) da fração solúvel em água do petróleo, da gasolina, do óleo diesel, de dois óleos minerais e um óleo lubrificante para embriões e larvas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax lacustris*. Uma vez definida a CL₅₀ de cada um desses compostos, no capítulo 2, intitulado, “EFEITOS SUBLETAIS DA EXPOSIÇÃO DE EMBRIÕES E LARVAS DE *Astyanax lacustris* (PISCES, CHARACIFORMES) ÀS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM ÁGUA DA GASOLINA, DO PETRÓLEO E DE UM ÓLEO MINERAL LUBRIFICANTE”, faz-se a descrição dos processos ontogenéticos de exemplares expostos à condições subletais às fração solúveis em água que se mostraram mais tóxica, menos tóxica e uma intermediária para a espécie de acordo com os dados obtidos no capítulo 1.

No capítulo 3, intitulado de “EFEITOS REPRODUTIVOS DA EXPOSIÇÃO DE *Astyanax lacustris* (PISCES, CHARACIFORMES) À FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÀGUA DO PETRÓLEO, DA GASOLINA E DE UM ÓLEO MINERAL LUBRIFICANTE”, foram estudados alevinos da espécie expostos cronicamente à fração solúvel do petróleo, da gasolina e de um óleo mineral lubrificante, e posteriormente foram mantidos em sistemas sem a presença desses xenobiontes até a completa maturação sexual. As concentrações de cada fração solúvel foram baseadas em estudos prévios de concentração letal (CL₅₀) para juvenis da espécie. Após o período de exposição, os exemplares foram selecionados e submetidos ao procedimento de reprodução hormonal artificial, possibilitando, além do monitoramento de embriões e larvas durante os primeiros dias de ontogenia, a avaliação dos efeitos da exposição nos tecidos reprodutivos dos exemplares contaminados.

Em todos os capítulos, foram avaliados os parâmetros merísticos e morfológicos dos organismos testes, enfatizando a cronologia decorrida na indução

hormonal, na incubação dos ovos, no período embrionários e na maturação sexual. O apêndice abrange aspectos relativos à contaminação ambiental por petróleo e derivados bem como o uso de peixes como bioindicadores dos mais diversos efeitos xenobióticos sobre o meio aquático natural e tem como objetivo a contextualização do tema em questão. O anexo descreve toda a metodologia usada na quantificação dos hidrocarbonetos derivados do petróleo. O artigo de divulgação une todas as informações geradas pelo projeto com uma linguagem mais técnica, e tem como objetivo a divulgação do assunto a diferentes públicos fora do meio acadêmico.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética para o uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná (autorização nº 009/2018) e financiado por Petróleo Brasileiro S.A. (Petrobras). A empresa não exerceu nenhum tipo de influência no design experimental, nas análises dos dados, nos resultados ou na preparação e publicação desta tese e nem dos respectivos manuscritos. O autor agradece também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa ao pesquisador Antonio Ostrensky (Processo: 304633/2017-8).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 009/2018, referente ao projeto “Efeitos de hidrocarbonetos derivados de petróleo sobre a ontogênese de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000)”, sob a responsabilidade de Antonio Ostrensky Neto – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 4 de invasividade, em reunião de 08/06/2018.

Vigência do projeto	Setembro/2018 até Dezembro/2018
Espécie/Linhagem	<i>Astyanax altiparanae</i> (peixe) / Lambari-do-rabo-amarelo
Número de animais	1756
Peso/Idade	0 a > 7 g / 0-5 dias a > 4 meses
Sexo	Não verificado
Origem	Laboratório do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais da Universidade Federal do Paraná (GIA/UFPR) em Curitiba

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 009/2018, regarding the project “Effects of petroleum-derived hydrocarbons on ontogenesis of *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000)” under Antonio Ostrensky Neto supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 4 of invasiveness, in session of 06/08/2018.

Duration of the project	September/2018 until December/2018
Specie/Line	<i>Astyanax altiparanae</i> (fish)
Number of animals	1756
Wheight/Age	0 to > 7 g / 0-5 days to > 4 months
Sex	Not verified
Origin	Laboratory of the Integrated Group of Aquaculture and Environmental Studies of the Federal University of Paraná in Curitiba

Curitiba, 8 de junho de 2018.

Chayane da Rocha

Chayane da Rocha

Coordenadora CEUA-SCA

Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias - UFPR

INTRODUÇÃO GERAL

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Acidentes com petróleo e derivados: um breve histórico da presença desses xenobiontes em meio aquático natural

A intensa exploração de petróleo tem causado diversas polêmicas ambientais, principalmente em relação aos possíveis impactos nos ecossistemas aquáticos (Neff 1985, Dupuis e Ucan-Marin 2015, Azevedo-Santos, Garcia-Ayala et al. 2016, Luz, Silva et al. 2016), e esse tema vem sendo amplamente discutido desde a década de 30, uma vez que o petróleo ainda é consolidado como o principal componente da matriz energética mundial (IEA 2018), o que torna iminente o risco de acidentes envolvendo esse tipo de combustível.

Mas foi a partir de 1970 que o mundo passou a encarar a presença do óleo como um dos grandes problemas ambientais, pois neste momento em diante é que se começou a ter dados relacionadas aos grandes vazamentos de petróleo no mundo (Kirby e Law 2010). Segundo a última estatística lançada pela Federação Internacional de Poluição de Proprietários de Petroleiros (ITPOF 2019), acidentes envolvendo navios petroleiros resultaram em aproximadamente 5,86 milhões de toneladas de petróleo que estão presente no meio aquático.

No entanto, houve uma redução significativa no volume de petróleo derramado ao longo das décadas, o que segundo o mesmo banco de dados, em 2019 acidentes envolvendo esses combustíveis diminuíram cerca de 95% desde o ano de 1970. Em alguns acidentes, inclusive de grandes volumes, pouca ou nenhuma resposta quanto aos impactos foram elucidadas. As informações, segundo a ITPOF (2019), são mantidas em mais de 10.000 eventos envolvendo petróleo e derivados em meio aquático natural (Figura 1).

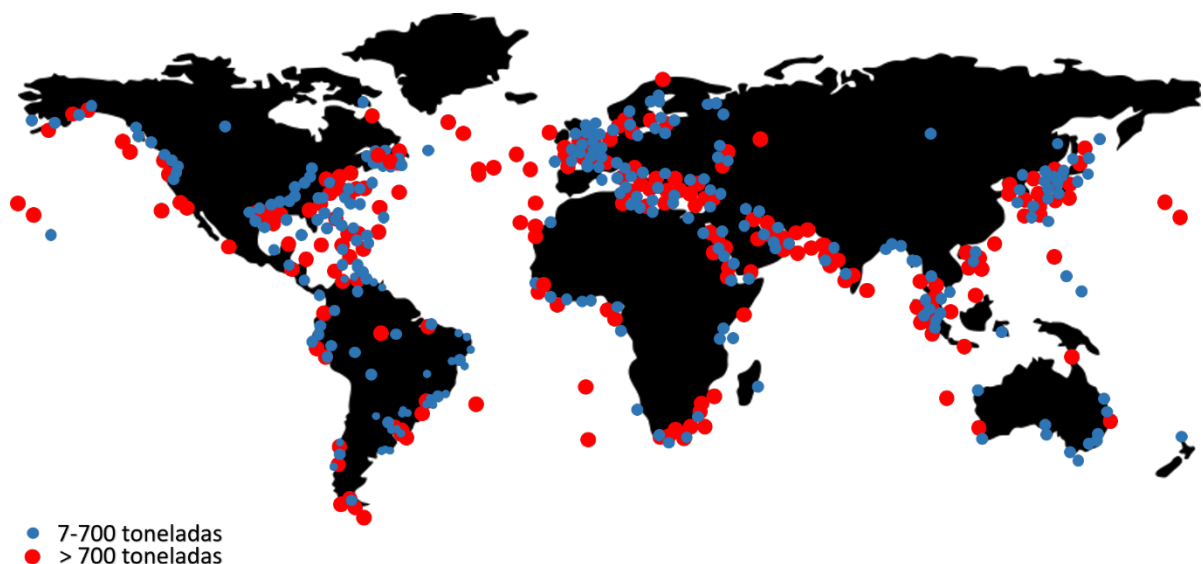


Figura 1. Síntese dos principais acidentes relatados no mundo entre 1970 a 2019.

Não muito diferente do que acontece no mundo, o Brasil também apresenta um extenso histórico de acidentes envolvendo petróleo e derivados. O primeiro episódio ocorreu no final do ano de 1960, quando uma explosão no navio Sinclair Petrolore, resultou no vazamento de aproximadamente 66 mil m³ de petróleo na Costa do Espírito Santo, próximo da Ilha de Trindade (Martinez e Colacios 2016). Pouco tempo depois, em 1974, um acidente com o navio petroleiro Takimyia Maru, acabou liberando 6 mil toneladas de petróleo, que atingem o Canal de São Sebastião, no litoral Norte de São Paulo (Poffo, Nakasaki et al. 1996). No ano seguinte, uma colisão do navio Tarik Ibn Zyud com uma rocha ocasionou em mais de 6 mil m³ de petróleo na Baía de Guanabara (RJ). Poucos anos depois (1978), uma mesma quantidade de petróleo foi liberada no Canal de São Sebastião, após a colisão do navio Brazilian Marina com outra rocha submersa. Eventos como este foram se repetindo ao longo dos anos.

O último evento relatado ocorreu em agosto de 2019 e ficou conhecido como o maior desastre ambiental provocado pela presença de petróleo na história do país em termos de área atingida (Araújo, Ramalho et al. 2020, Pena, Northcross et al. 2020). Foram 133 toneladas de petróleo que se espalhou por 4.334 km em 11 estados do Nordeste e Sudeste do país (IBAMA 2019). Até fevereiro de 2020, mais de 53 grandes eventos envolvendo o petróleo e derivados foram relatados e estão sintetizados na Figura 1. A maioria dos casos ocorreram em regiões portuárias e a presença do petróleo e derivados em meio aquático natural está relacionada, na

maioria dos casos às falhas durante o transporte, como colisões, aterramentos e rupturas das estruturas (ITPOF 2019).

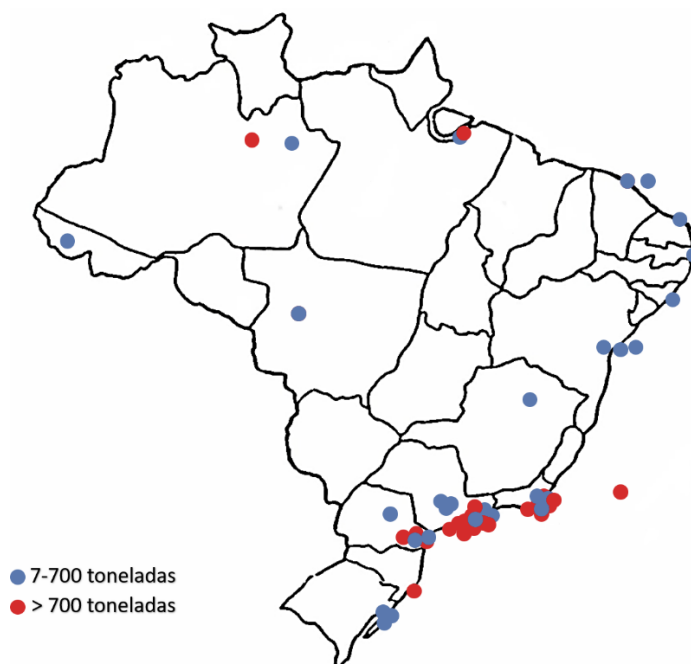


Figura 2. Síntese dos principais acidentes relatados envolvendo petróleo e derivados no Brasil.

1.2 A presença de petróleo e derivados em ambientes dulcícolas brasileiros

Em outubro de 1998, aproximadamente 1,5 mil m³ de óleo combustível atingiram o rio Alambari após uma rachadura, com cerca de um metro, no oleoduto que liga a refinaria de São José dos Campos ao Terminal de Guararema, ambos no estado de São Paulo (Lima 2007). Em agosto do ano seguinte, um rompimento de um cabo de alta tensão ocasionou danos a um oleoduto pertencente a Manaus Energia (REMAN), estimando-se um vazamento de 15 mil litros de óleo combustível de baixo ponto de fluidez (BPF), culminando em danos ao Igarapé do Cururu e o rio Negro, ambos no estado do Amazonas (MPE-AM 1999). Nesse mesmo mês ainda, ocorreu um novo acidente com a mesma empresa, no qual cerca de mil litros de óleo combustível escoaram até o rio Negro. Em novembro do mesmo ano, no município de Carmópolis, em Sergipe, uma falha no campo de produção de uma refinaria da Petrobras provocou o vazamento de óleo no rio Siriri. No ano seguinte, em janeiro de 2000, duzentos litros de diluente vazaram em um outro oleoduto da Petrobras, porém localizado entre Cubatão e São Bernardo do Campo, no estado de São Paulo.

No dia 16 de julho de 2000 ocorreu aquele que é considerado o pior acidente em termos de volume de litros derramados em rios brasileiros. Aproximadamente quatro milhões de litros de petróleo (óleo cru) vazaram do oleoduto OSPAR, dentro da área interna da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), localizada no município de Araucária. Mesmo com a instalação de equipamentos de contenção, o óleo atingiu o rio Barigui, e posteriormente o rio Iguaçu, percorrendo por 45 km distante do local do acidente (Ostrensky, Chaves et al. 2001, Boeger, Guimarães et al. 2003). Ainda nesse ano, três descarrilamentos ferroviários ocasionaram danos ao ambiente. Dois ocorreram ainda no mês de julho, com apenas uma semana de intervalo entre eles, derramando diesel e gasolina em algumas áreas de APP's e córregos próximos a cidade de Ponta Grossa, no Paraná. O terceiro ocorreu no dia 23 de setembro, no município de Morretes, quando trinta vagões descarrilaram, liberando 4 mil litros de combustível no rio Caninana, na Serra do Mar paranaense.

Em fevereiro de 2001, ainda no estado do Paraná, aproximadamente 143 m³ de óleo diesel vazaram do oleoduto OLAPA (Albarello 2012), que liga a Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), em Araucária, ao terminal de Paranaguá. O acidente ocorreu depois de uma forte chuva, que ocasionou em um deslizamento de terra que acabou cedendo parte que sustentava o oleoduto, que acabou se rompendo e liberando óleo em uma região de Mata Atlântica, incluindo as bacias fluviais dos rios do Meio, Sagrado, Neves, Nhundiaquara, até chegar na Baía de Paranaguá.

Em abril do mesmo ano, aproximadamente 30 mil litros de óleo OC-1A (combustível de navio) vazaram de um caminhão após uma colisão com outro caminhão na BR 277, rodovia que liga a cidade de Curitiba a Paranaguá. Ainda nesse mês, na cidade de Araucária/PR, região metropolitana de Curitiba, um vazamento contendo óleo do tipo MS30, uma emulsão asfáltica, atinge o rio Passaúna. Em maio do mesmo ano, um rompimento do oleoduto pertencente a REPLAN, no município de Barueri/SP, causou um vazamento de aproximadamente 200 mil litros de um óleo diesel, atingindo águas dos rios Tietê e Cachoeirinha. Em julho de 2001, aproximadamente 100 mil litros de óleo diesel atingiram o Ribeirão Lindóia, em Londrina, norte do estado, podendo ter atingido os rios Tibagi e Paranapanema (Simonato, Albinati et al. 2004).

Em junho de 2002, na cidade de Pinhais/PR, quando um vazamento durante uma transferência de um tanque de armazenamento para um caminhão, 15 mil litros

de extrato neutro pesado, um derivado de petróleo altamente tóxico atingiu o rio Atuba através das redes de esgoto locais (Koehler 2006). Em Medianeira, em meados de 2007, uma grande mancha de óleo diesel foi observada no rio Alegria (AEN-PR 2007). Outro acidente do mesmo gênero ocorreu no município de Cascavel em 2011, quando uma carga de óleo lubrificante atingiu o rio Cascavel e deixou a cidade sem abastecimento após um acidente rodoviário (Cruz 2011).

Em fevereiro de 2013, na BR 277 próximo a cidade de Morretes/PR, uma carga de caminhão envolvido em um acidente deixou a rodovia com aproximadamente 60 mil litros de óleo OC 1A, desses, estima-se que 45 mil litros foram lixiviados, atingindo córregos próximos, alcançando o rio Canhambora, posteriormente o rio Sagrado, ambos usados na captação de água potável. Em março 2017, cerca de três mil litros de óleo diesel vazaram de um tanque de combustível em Governador Valadares, no estado de Minas Gerais, escorrendo pela tubulação de esgoto local até atingir a rede pluvial, consequentemente o rio Doce.

De fato, acidentes ocorrem e ocorreram ao redor do mundo e, as maiores fontes dessa contaminação nem sempre vieram do rompimento de oleodutos, vazamentos de navios ou de explosões de plataformas petroleiras. Diariamente e indiretamente, nós, seres humanos, descartamos grandes quantidades de subprodutos cuja composição primária é a base de petróleo, gerando um problema crônico ao ambiente (Meniconi, Gabardo et al. 2002, Kirby e Law 2010, Cariello 2012).

Isso tem se intensificado com a lixiviação de resíduos gerados no atrito dos pneus com o asfalto, de óleos de motores que vazam cotidianamente, além da grande quantidade de resíduos gerados pelas ações antrópicas e descartados diretamente na rede de esgoto (Locatelli 2006, Gusmão, de Souza Fraga et al. 2013). Esse quadro se agrava ainda mais quando citamos os produtos de limpeza, fertilizantes, pesticidas e claro, onde há plástico, há petróleo (Brito, Agrawal et al. 2011, Speight 2015).

1.3 O petróleo e o meio aquático natural

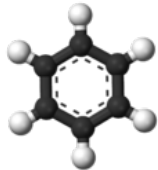
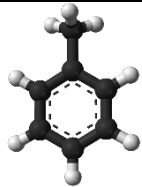
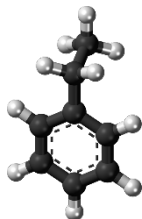
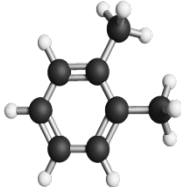
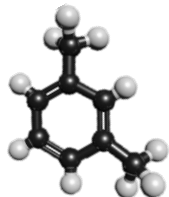
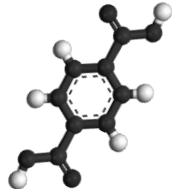
Uma vez presente no ambiente, tanto o petróleo como os derivados, sofrem diversos processos de transformação (Nicodem, Guedes et al. 1997, Pedrozo, Barbosa et al. 2002), como o intemperismo, a volatilização, a hidrólise, a fotólise, a biodegradação física e/ou a dissolução. O petróleo é uma mistura complexa de

centenas de compostos orgânicos, com predominância de hidrocarbonetos (Neff 1979), e tem sua composição química totalmente dependente de sua origem geográfica de extração e do nível de craqueamento do mesmo (Heath 1995), podendo conter ainda, mesmo que em pequenas quantidades, compostos nitrogenados, metálicos, enxofre, níquel e vanádio (Saeed e Al-Mutairi 1999, Akaishi, De Assis et al. 2004, Edema, Okoloko et al. 2007).

Os hidrocarbonetos constituem uma das classes de poluentes mais encontradas nos ambientes aquáticos (Kettrup, Schramm et al. 1999, Nicodem, Guedes et al. 2001). Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos, que contém apenas elementos de carbono e hidrogênio, podendo ser classificados em alifáticos e aromáticos. Segundo a EPA (1999), os impactos ambientais da presença de hidrocarbonetos derivados de petróleo em água doce podem ser ainda mais severos devido à pouca movimentação hidrológica quando comparados a ambientes marinhos. Em ambos os casos, os componentes polares e de baixa massa molar tendem a se solubilizar, formando assim, sua fração solúvel em água (FSA) (Saeed e Al-Mutairi 1999, Rodrigues, Miranda-Filho et al. 2010). Nesse processo, a fração solubilizada se separa do sobrenadante, podendo ser lixiviada e assim, atingir toda biota aquática ao contato.

As FSAs são formadas por hidrocarbonetos contendo anéis aromáticos, alicíclicos e alifáticos, arrançados em isômeros variados (Fouchecourt, Berny et al. 1998, Hylland 2006) e, quando em cadeias curtas (Tabela 1), são ainda mais tóxicas e voláteis ao meio, pois, além de serem visualmente imperceptíveis (Ziulli 2009), tendem a uma maior permanência no ambiente.

Tabela 1. Propriedades físico químicas dos hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX) presentes nos principais derivados do petróleo.

Hidrocarboneto	Fórmula Condensada	Massa Molar (g/mol)	Densidade (g/m ³)	Solubilidade (g L ⁻¹)	Nº CAS ¹	Fórmula
Benzeno	C ₆ H ₆	78,10	0,88	1,70	71-43-2	
Tolueno	C ₇ H ₈	92,10	0,86	0,53	108-88-3	
Etilbenzeno	C ₈ H ₁₀	106,17	0,86	0,17	100-41-4	
o-Xileno	C ₈ H ₁₀	106,17	0,88	0,18	95-47-6	
m-Xileno	C ₈ H ₁₀	106,16	0,86	0,20	108-38-3	
p-Xileno	C ₈ H ₁₀	106,17	0,86	0,15	106-42-3	

¹CAS: Número de identificação do *Chemical Abstract System*.

1.4 A ecotoxicologia

A presença de xenobióticos em um ecossistema aquático não indica, por si só, efeitos prejudiciais aos organismos ali presentes (van der Oost, Beyer et al. 2003). Para avaliar e estabelecer subsídios concretos sobre esses efeitos no ambiente, é preciso elucidar as respostas que cada organismo gera de acordo com os diferentes níveis de exposição ao xenobionte, que geralmente são obtidas em condições controladas (laboratoriais).

Os bioensaios de ecotoxicologia representam valorosas ferramentas na compreensão da sensibilidade dos organismos aquáticos aos mais variados xenobiontes (EPA 2002). Resumidamente, testes de toxicidade são executados de forma aguda e cronicamente, representando a base dos estudos científicos de uma complexa área ambiental, fundamentados no princípio da dose-resposta, possibilitando obter respostas de efeitos a curto, médio ou longo prazo (Scholz, Sela et al. 2013).

Os testes agudos simulam os efeitos tóxicos e letais de um determinado xenobionte sobre um organismo em um curto período de exposição (Costa, Olivi et al. 2008). Neste caso, são determinadas as concentrações de efeito (CE) ou as concentrações letais (CL) dos agentes tóxicos que causam, entre outras, a mortalidade ou imobilidade de 50% dos indivíduos submetidos ao teste durante o período de, geralmente, 96 horas de exposição. Os testes desta natureza, segundo Lombardi (2004) e Costa, Olivi et al. (2008), fornecem informações básicas e cruciais para outro teste mais criterioso, o de toxicidade crônica. Nele, é possível ponderar os efeitos não letais de um xenobionte aos organismos ou em tecidos-alvos a partir de um período de exposição prolongado e em concentrações subletais (Lionetto, Caricato et al. 2016).

A quantificação dos efeitos pode ser obtida durante ou após a conclusão dos testes. Segundo Adams (1995), as respostas obtidas nesses testes são denominadas de *endpoints*, observadas a partir de alterações biológicas dos organismos-teste, por meio de análises específicas, tais como distúrbios fisiológicos, bioquímicos, comportamentais, alterações nos processos ontogênicos ou também na interferência dos mecanismos de reprodução da espécie. Essas informações obtidas pelos testes de toxicidade são importantes ferramentas sobre a qualidade do ambiente, indicando não só os impactos de determinadas substâncias químicas, mas

a vulnerabilidade coletiva ou individual, salientando a resistência que os organismos apresentam quando expostos aos xenobiontes (Lins, Kirschnik et al. 2010).

Os peixes, em geral, são considerados bons indicadores da saúde ambiental (Farombi, Adelowo et al. 2007, Braunbeck, Kais et al. 2015), sendo as espécies nativas fundamentais na projeção de alertas sobre quaisquer mudanças ambientais muito antes que ocorram danos mais severos ao ambiente (Vieira, Almeida et al. 2014). Os estudos envolvendo peixes estão ganhando espaço na avaliação dos efeitos dos mais diversos xenobiontes sobre a qualidade do meio aquático principalmente relacionados às fases iniciais de vida (Meier, Craig Morton et al. 2010, Cherr, Fairbairn et al. 2016), pois nestes estágios de ontogenia, podem ocorrer severas alterações morfológicas (Zambonino Infante e Cahu 2001), mesmo em eventos de curta duração (Ramos, Cabral et al. 2015).

A determinação ainda mais eficaz sobre os efeitos dos agentes xenobióticos e estressores sobre a saúde do meio aquático só pode ser entendida quando compreendemos a dinâmica ocorrida durante os processos de desenvolvimento normal (ou o que seria o esperado) de uma determinada espécie. Ainda existe uma grande lacuna sobre os efeitos dos derivados do petróleo sobre peixes continentais. Uma das razões é que há um número extenso de produtos derivados do petróleo e cada um apresenta um grau de toxicidade diferente. Além disso, grande parte dos trabalhos utilizam peixes exóticos como bioindicadores de impacto, não ressaltando a importância de peixes nativos e presentes nas regiões de impacto, até mesmo para a valoração de danos após acidentes ambientais (Dal Pont, Souza-Bastos et al. 2019).

1.5 O lambari *Astyanax lacustris*

A família Characidae é um grupo bastante diversificado, com muitos gêneros e espécies, podendo ser encontrado ao longo da América do Sul e da América Central. A maioria das espécies pertencente a este grupo é onívora, apresentam grande flexibilidade alimentar, comendo desde insetos até sementes (Bennemann e Shibatta 2002, Porto-Foresti, Castilho-Almeida et al. 2005), podendo também praticar o canibalismo (Stevanato e Ostrensky 2018), além de serem uma importante fonte alimentar para outros peixes carnívoros (Prioli, Prioli et al. 2002).

O lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875), também conhecido como *Astyanax altiparanae*, caracteriza-se por apresentar o corpo

prateado, com a região ventral esbranquiçada e a região dorsal cinzenta (Figura 1). As nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amarelas. Na nadadeira caudal, há ainda, uma faixa mediana escura, que se estende à extremidade dos raios da nadadeira (Garutti e Britski 2000).

É um peixe de pequeno porte e que pode atingir 20 centímetros de comprimento, mas o porte médio dos machos varia entre 10 e 12 cm e de fêmeas de 15 e 17 cm (Porto-Foresti, Castilho-Almeida et al. 2005, Salaro, Campelo et al. 2015). Sua presença é muito comum em águas continentais brasileiras, habitando riachos, rios, brejos e lagoas. É uma espécie muito prolífera e apresenta desova parcelada, podendo desovar quase que o ano inteiro, desde que se tenha temperaturas ideais para a sua reprodução (acima de 23 °C).

Durante o período reprodutivo, algumas diferenças morfológicas ficam nítidas entre machos e fêmeas, sendo que as fêmeas, além de serem maiores e possuírem o corpo mais abaulado, são frequentemente mais precoces no crescimento do que os machos, que por sua vez, apresentam uma estrutura áspera na nadadeira anal denominada de espícula (Porto-Foresti, Castilho-Almeida et al. 2005, Sato, Sampaio et al. 2006, Castilho-Almeida 2014).



Figura 3. Lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875).

Apesar das marcantes características, como esta espécie ocorre numa grande diversidade de microambientes, as populações desse grupo de peixes não são homogêneas quanto à morfologia (Ramsdorf, Vicari et al. 2012). Porém, peixes do gênero *Astyanax* têm sido muito utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental e são fundamentais para tal monitoramento, principalmente por possuírem papel central na cadeia trófica, apresentando tolerância relativamente elevada à

poluição ambiental (Schulz e Martins-Júnior 2001, Vicente 2014, Ostrensky, Pedrazzani et al. 2015).

O lambari-do-rabo-amarelo vem sendo utilizado como espécie modelo no monitoramento ambiental em corpos hídricos brasileiros, como estudado e descrito por Ostrensky, Chaves et al. (2001), Schulz e Martins-Júnior (2001), Ostrensky, Boeger et al. (2003), Pilchowski (2003), Silva, Oliveira Ribeiro et al. (2009), Ramsdorf, Vicari et al. (2012), Brehm e Richter (2013), Ghisi e Oliveira (2013), Maceda, Grisolia et al. (2015); no monitoramento de ambientes contaminados por agrotóxicos e efluentes, observados por Costa-Silva, Nunes et al. (2015), Matozo, Turek et al. (2015); na mitigação dos efeitos de metais pesados relatados por Winkaler, das Graças Silva et al. (2008), Santos Filho, Rezende et al. (2014), Dourado, Rocha et al. (2016); na valoração de danos ocasionados por vazamento de combustíveis e derivados em meio aquático natural por Akaishi, Silva de Assis et al. (2004), Dal Pont (2012), (Horodesky, Abilhoa et al. 2015, Dal Pont, Souza-Bastos et al. 2019) e em ambientes onde há a presença de medicamentos e outras substâncias não classificadas anteriormente como relatado por Galvan (2015), Galvan, Lirola et al. (2016).

1.6 Relevância da Pesquisa

Existem muitos acidentes diários envolvendo petróleo e derivados, mas seguramente existem muitas lacunas no entendimento desses acidentes. Isso é, aonde estamos hoje em termos de pesquisas ambientais e aonde queremos chegar com esse trabalho. Embora exista uma ampla divulgação pela mídia da presença do petróleo e derivados em ambientes naturais, poucos estudos e testes ecotoxicológicos foram realizados, dificultando a compreensão e valoração dos reais danos ocasionados por esses compostos em meio aquático natural.

Com base nos acidentes envolvendo petróleo e derivados que ocorreram no estado do Paraná no ano 2000 dentro da refinaria REPAR com o oleoduto OSPAR e no ano seguinte no oleoduto OLAPA na serra do mar, iniciou-se uma linha de pesquisa do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA-UFPR), em parceria com o Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LAMPE) e com o Laboratório de Química Ambiental e de Análises Ambientais (DQUI/UFPR-PETROBRAS), vinculado ao Grupo de Química Ambiental do Departamento de

Química da UFPR, que visou testar protocolos de ecologia molecular e de ecotoxicidade, estabelecendo subsídios aos estudos de biomonitoramento e que tinha como um dos propósitos, permitir, de forma mais precisa, identificar a interferência aguda e crônica de acidentes com petróleo e derivados, em especial em ambientes aquáticos continentais.

O projeto intitulado de “MARCADORES MOLECULARES E BIOLÓGICOS APLICADOS A INCIDENTES EM AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS” iniciou em um momento chave para a própria sociedade brasileira. Um momento em que se iniciava a exploração do petróleo do pré-sal comitadamente quando se intensificou a produção em áreas já exploradas. Ou seja, em um momento em que a exploração e o transporte de petróleo e de derivados se intensificou, tanto em ambientes marinhos quanto continentais, aumentando os riscos de ocorrência de vazamentos naturais ou acidentais, exigindo respostas científicas adequadas para a compreensão dos efeitos desses eventos sobre a fauna aquática e de formas de remediá-los.

Desta forma, fica clara a inquestionável relevância, não só desta tese, mas como todo o projeto executado para a sociedade como um todo e, de forma mais específica, para o desenvolvimento científico e tecnológico associado ao tema em questão.

2 OBJETIVOS

2.1. Geral

Compreender os processos biológicos associados aos efeitos negativos gerados a partir da exposição de embriões, larvas e juvenis de *Astyanax lacustris* a diferentes produtos derivados do petróleo

2.2. Específicos

- Estabelecer os efeitos agudos da fração solúvel em água dos principais derivados comerciais do petróleo nas fases iniciais de ontogenia do lambari *A. lacustris*;
- Avaliar os efeitos da exposição subletal de *A. lacustris* à fração solúvel em água da gasolina, do petróleo e de um óleo mineral lubrificante;
- Avaliar as possíveis alterações no desenvolvimento gonadal de juvenis do lambari *A. lacustris*, expostos a um óleo mineral lubrificante, a gasolina e ao

petróleo, bem como enfatizar os efeitos sobre os processos de ontogenia inicial de exemplares obtidos de reprodutores expostos cronicamente.

3 HIPÓTESES

A exposição das substâncias testadas nas diferentes fases de vida do lambari *A. lacustris*, acarretam em efeitos subletais, afetando os processos ontogenéticos das fases subsequentes de vida dos peixes, principalmente na reprodução da espécie, podendo trazer consequências ecológicas para as comunidades e populações afetadas.

4 REFERÊNCIAS

Adams, W. (1995). "Aquatic toxicology testing methods." Handbook of ecotoxicology: 25-46.

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

Akaishi, F., H. S. De Assis, S. Jakobi, D. Eiras-Stofella, S. St-Jean, S. Courtenay, E. Lima, A. Wagener, A. Scofield and C. O. Ribeiro (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.

Akaishi, F. M., H. C. Silva de Assis, S. C. G. Jakobi, D. R. Eiras-Stofella, S. D. St-Jean, S. C. Courtenay, E. F. Lima, A. L. R. Wagener, A. L. Scofield and C. A. Oliveira Ribeiro (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.

Albarello, L. C. (2012). "O Vazamento do oleoduto olapa (Morretes, Paraná): avaliação ambiental e reconstituição do comportamento do óleo, da serra do mar ao Complexo Estuarino de Paranaguá."

Araújo, M. E. d., C. W. N. Ramalho and P. W. d. Melo (2020). "Artisanal fishers, consumers and the environment: immediate consequences of the oil spill in Pernambuco, Northeast Brazil %J Cadernos de Saúde Pública." **36**.

Azevedo-Santos, V. M., J. R. Garcia-Ayala, P. M. Fearnside, F. A. Esteves, F. M. Pelicice, W. F. Laurance and R. C. Benine (2016). "Amazon aquatic biodiversity imperiled by oil spills." Biodiversity and Conservation **25**(13): 2831-2834.

Bennemann, S. T. and O. A. Shibatta (2002). Dinâmica de uma assembléia de peixes do rio Tibagi. A Bacia do Rio Tibagi. M. E. Medri, E. Bianchini, O. A. Shibatta and J. A. Pimenta. Londrina/PR, Edição dos Editores.

Boeger, W. A., A. T. B. Guimarães, S. Romão, A. Ostrensky, E. ZAmberlan and F. H. Falkiewicz (2003). Histopatology as an approach to evaluated the effect of an oil spill on fishes of Arroio Saldanha and Rio Iguaçu (Brazil). International oil spill conference. Washington, USA, Amer Petroleum Inst.

Braunbeck, T., B. Kais, E. Lammer, J. Otte, K. Schneider, D. Stengel, R. J. E. S. Strecker and P. Research (2015). "The fish embryo test (FET): origin, applications, and future." **22**(21): 16247-16261.

Brehm, F. d. A. and L. Richter (2013). Avaliação da contaminação dos sedimentos do rio Iguaçu e Barigui por derivados do petróleo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Brito, G., P. Agrawal, E. Araújo and T. Mélo (2011). "Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes." Revista Eletrônica de Materiais e Processos **6**(2): 127-139.

Cariello, M. S. (2012). Efeito do naftaleno na microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*, ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e nos microscustáceos estuarinos *Nitokra sp* e *Leptocheirus plumulosus*, Universidade de São Paulo.

Castilho-Almeida, R. (2014). *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação, Botucatu. 119p. (Doctoral Thesis. Universidade Estadual Paulista-UNESP). Available at: < [http://www. ibb. unesp. br/posgrad/teses/zoologia_do_2007_rodrigo_al meida. pdf](http://www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/zoologia_do_2007_rodrigo_almeida.pdf)> Access on.

Cherr, G. N., E. Fairbairn and A. Whitehead (2016). "Impacts of Petroleum-Derived Pollutants on Fish Development." Annual Review of Animal Biosciences(0).

Costa-Silva, D., M. M. Nunes, G. Wallau, I. Martins, A. P. Zemolin, L. Cruz, N. Rodrigues, A. Lopes, T. Posser and J. Franco (2015). "Oxidative stress markers in fish (*Astyanax sp.* and *Danio rerio*) exposed to urban and agricultural effluents in the Brazilian Pampa biome." Environmental Science and Pollution Research **22**(20): 15526-15535.

Costa, C. R., P. Olivi, C. M. Botta and E. L. Espindola (2008). "Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods." Química Nova **31**(7): 1820-1830.

Cruz, L. C. (2011, 29 de março de 2011). "Jornal Gazeta do Povo: Vazamento de óleo deixa Cascavel sem água por tempo indeterminado." Retrieved 29/05/2011, from <http://www.gazetadopovo.com.br/vidaecidadania/conteudo.phtml?tl=1&id=1099052&tit=Vazamento-de-oleo-deixa-Cascavel-sem-agua-por-tempo-indeterminado>.

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

Dal Pont, G., L. R. Souza-Bastos, M. Giacomini, R. G. Dolatto, L. M. Baika, M. T. Grassi, A. Ostrensky, C. M. J. C. B. Wood, P. P. C. Toxicology and Pharmacology (2019). "Acute exposure to the water-soluble fraction of gasoline (WSFG) affects oxygen consumption, nitrogenous-waste and Mg excretion, and activates anaerobic metabolism in the goldfish *Carassius auratus*." **226**: 108590.

Dourado, P. L. R., M. P. d. Rocha, L. M. Roveda, J. L. Raposo Junior, L. S. Cândido, C. A. L. Cardoso, M. A. M. Morales, K. M. P. d. Oliveira and A. B. Grisolia (2016). "Genotoxic and mutagenic effects of polluted surface water in the midwestern region of Brazil using animal and plant bioassays." Genetics and Molecular Biology(AHEAD): 0-0.

Dupuis, A. and F. Ucan-Marín (2015). "A literature review on the aquatic toxicology of petroleum oil: An overview of oil properties and effects to aquatic biota." Res Doc **7**.

Edema, N. E., E. G. Okoloko and M. O. Agbogidi (2007). "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 **2**(6): 633-638.

EPA (1999). "United States Environmental Protection Agency: Storm Water Technology Fact Sheet: Porous Pavement. EPA 832-F-99-023."

EPA (2002). "United States Environmental Protection Agency: Methods of measuring the acute toxicity of effluents and receiving eaters to freshwater and marine organisms."

Farombi, E., O. Adelowo and Y. Ajimoko (2007). "Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River." International Journal of Environmental Research and Public Health **4**(2): 158-165.

Fouchecourt, M., P. Berny and J. Riviere (1998). "Bioavailability of PCBs to male laboratory rats maintained on litters of contaminated soils: PCB burden and induction of alkoxyresorufin O-dealkylase activities in liver and lung." Archives of environmental contamination and toxicology **35**(4): 680-687.

Galvan, G. L. (2015). "Efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo e gasolina: integrando relevantes organismos e biomarcadores."

Galvan, G. L., J. R. Lirola, K. Felisbino, T. Vicari, C. I. Yamamoto and M. M. Cestari (2016). "Genetic and Hematologic Endpoints in *Astyanax altiparanae*." Bulletin of environmental contamination and toxicology **97**(1): 63-70.

Garutti, V. and H. Britski (2000). "Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia." Comn. Mus. Cienc. Tecnol. **13**: 65-88.

Ghisi, N. C. and E. C. Oliveira (2013). "Evidence of contamination in the main body of the public water supply of Campo Mourão-PR: An analysis from a bioindicator of environmental quality." SaBios-Revista de Saúde e Biologia **8**(2).

Gusmão, J. G. S., M. de Souza Fraga and J. dos Santos Dias (2013). "A Logística Reversa Aplicada aos óleos Lubrificantes Usados ou Contaminados Produzidos nos Postos de Combustíveis da Cidade de Boa Vista-RR." Caderno de Ciências Humanas e Sociais Aplicadas(01).

Heath, A. G. (1995). Water Pollution and Fish Physiology, Lewis Publishers.

Horodesky, A., V. Abilhoa, T. de Oliveira Zeni, R. M. Neto, G. G. Castilho-Westphal and A. Ostrensky (2015). "Ecological analysis of the ichthyofaunal community ten years after a diesel oil spill at Serra do Mar, Paraná state, Brazil." Global Ecology and Conservation **4**: 311-320.

Hylland, K. (2006). "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems." Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A **69**(1-2): 109-123.

- IBAMA (2019). "Localidades afetadas." Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
- IEA, I. E. A.-. (2018). "Key World Energy Statistics." Paris. International Energy Agency.
- ITPOF (2019). "The International Tanker Owners Pollution Federation Limited - Oil tanker spill statistics: 2019."
- 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.
- Kirby, M. F. and R. J. Law (2010). "Accidental spills at sea - Risk, impact, mitigation and the need for co-ordinated post-incident monitoring." *J Marine pollution bulletin* **60**(6): 797-803.
- Koehler, H. S. (2006). Crescimento, nutrição e estrutura do lenho juvenil de três espécies florestais com potencial de fitorremediação em solos contaminados com petróleo, Universidade Federal do Paraná.
- Lima, M. E. A. (2007). "Clinic of Activity contributions to safety at work." *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional* **32**(115): 99-107.
- Lins, J., P. G. Kirschnik, V. Queiroz and S. M. Cirio (2010). "Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático." *Rev. Acad., Agrár. Ambient* **8**: 469-484.
- Lionetto, M. G., R. Caricato, A. Calisi, M. E. Giordano, E. Erroi and T. J. R. L. Schettino (2016). "Biomonitoring of water and soil quality: a case study of ecotoxicological methodology application to the assessment of reclaimed agroindustrial wastewaters used for irrigation." **27**(1): 105-112.
- Locatelli, M. A. F. (2006). "Investigação sobre a emissão e caracterização dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na bacia do rio Atibaia." Mestrado em Química analítica. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas: 86.
- Lombardi, J. (2004). "Fundamentos de toxicologia aquática." RANZANI-PAIVA, MJT; TAKEMOTO, RM; LIZAMA, MAP Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela: 263-272.
- Luz, E. L. P., D. d. S. P. Silva, M. C. de Medeiros, A. P. X. de Gondra Bezerra, E. M. G. Lorena and Í. G. S. dos Santos (2016). "Pollution mitigation for hydrocarbons of petroleum through the bioremediation." *Revista Geama* **7**(1): 28-37.
- Maceda, E. B., A. B. Grisolia, J. O. Vaini and L. S. Candido (2015). "Use of biomarkers for monitoring of waters from the Arara Stream in the city of Rio Brilhante, MS, Brazil." *Revista Ambiente & Água* **10**(1): 117-129.
- Martinez, P. H. and R. D. J. H. A. L. y. C. r. d. I. S. Colacios (2016). "História ambiental do Pré-sal: meio ambiente e mudanças sociais em São Paulo (2007-2016)." **6**(2): 263-277.

Matozo, F., J. A. Turek and R. B. Noletto (2015). "Avaliação dos efeitos genotóxicos do fungicida Ridomil em *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes)." *LUMINÁRIA* **17**(01).

Meier, S., H. Craig Morton, G. Nyhammer, B. E. Grøsvik, V. Makhotin, A. Geffen, S. Boitsov, K. A. Kvestad, A. Böhne-Kjersem, A. Goksøyr, A. Folkvord, J. Klungsøyr and A. Svoldal (2010). "Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water during early life stages: Effects on embryos, larvae, and juvenile fish." *Marine Environmental Research* **70**(5): 383-394.

Meniconi, M. d. F. G., I. T. Gabardo, M. E. R. Carneiro, S. M. Barbanti, G. C. da Silva and C. G. Massone (2002). "Brazilian Oil Spills Chemical Characterization--Case Studies." *Environmental Forensics* **3**(3-4): 303-321.

MPE-AM (1999). "Laudo Pericial referente ao processo nº 010/99 - VMAQA."

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

Neff, J. M. (1985). Polycyclic aromatic hydrocarbons. Fundamentals Aquatic Toxicology. G. M. Rand and S. R. Petrocelli. Bristol, PA, Taylor & Francis: 416-454.

Nicodem, D. E., C. L. Guedes, R. J. Correa and M. C. Z. Fernandes (1997). "Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills." *Biogeochemistry* **39**(2): 121-138.

Nicodem, D. E., C. L. Guedes, M. C. Z. Fernandes, D. Severino, R. J. Correa, M. C. Coutinho and J. Silva (2001). "Photochemistry of petroleum." *Progress in Reaction Kinetics and Mechanism* **26**(2-3): 219-238.

Ostrensky, A., W. A. Boeger, L. F. Duboc, F. X. Wegbecher, R. W. Pilchowski and E. Zamberlan (2003). Effect of The Oil Spill from the Presidente Getúlio Vargas Refinery, Brazil, in July of 2000, on the Populations of Fishes of the Rivers Saldanha, Barigüi, and Iguaçu. International Oil Spill Conference, American Petroleum Institute.

Ostrensky, A., P. Chaves, L. Duboc, A. Guimarães, S. Cruz, F. Wegbecher, R. Pilchowski, U. Teixeira and C. Belz (2001). "Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigüi e Iguaçu." *Un-Repar/Petrobrás* **2**: 32-52.

Ostrensky, A., P. T. C. Chaves, L. F. Duboc, A. T. B. Guimarães, S. R. Z. Cruz, F. X. Wegbecher, R. W. Pilchowski, U. A. Teixeira and C. E. Belz (2001). Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigüi e Iguaçu. 2º Seminário do Rio Iguaçu. Araucária, Paraná, Brasil: 32-52.

Ostrensky, A., A. S. Pedrazzani and A. L. Vicente (2015). "Use of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and propofol (2, 6-diisopropylphenol) as anaesthetics for the tetra *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae)." *Aquaculture Research*.

Pedrozo, M. d. F. M., E. Barbosa, H. Corseuil, M. Schneider and M. Linhares (2002). "Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo." Salvador: NEAMA.

Pena, P. G. L., A. L. Northcross, M. A. G. d. Lima and R. d. C. F. Rêgo (2020). "Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão %J Cadernos de Saúde Pública." **36**.

Pilchowski, R. W. (2003). Avaliação dos impactos de derramamento de óleo sobre a ictiofauna do altíssimo, alto e médio rio Iguaçu, Paraná, Brasil, Universidade Federal do Paraná.

Poffo, I., A. Nakasaki and G. Eysink (1996). "Dinâmica dos vazamentos de óleo no Canal de São Sebastião-São Paulo (1974-1994)." J São Paulo: Cetesb.

Porto-Foresti, F., R. Castilho-Almeida and F. Foresti (2005). "Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*).\" Espécies nativas para piscicultura no Brasil **2**: 101-116.

Prioli, S. M. A. P., A. J. Prioli, H. F. Júlio, C. S. Pavanelli, A. V. Oliveira, H. Carrer, D. M. Carraro and L. M. Prioli (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.

Ramos, S., H. Cabral and M. Elliott (2015). "Do fish larvae have advantages over adults and other components for assessing estuarine ecological quality?" Ecological Indicators **55**(0): 74-85.

Ramsdorf, W. A., T. Vicari, M. I. de Almeida, R. F. Artoni and M. M. Cestari (2012). "Handling of *Astyanax* sp. for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers." Environmental monitoring and assessment **184**(10): 5841-5849.

Rodrigues, R. V., K. C. Miranda-Filho, E. P. Gusmão, C. B. Moreira, L. A. Romano and L. A. Sampaio (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.

Saeed, T. and M. Al-Mutairi (1999). "Chemical composition of the water-soluble fraction of the leaded gasolines in seawater." Environment International **25**(1): 117-129.

Salaro, A., D. Campelo, M. Pontes, J. Zuanon, V. Furuya and W. J. A. n. B. n. p. Furuya (2015). "Avanços na nutrição e produção de lambaris." **2**.

Santos Filho, F. M., K. F. O. Rezende, A. K. Emerenciano, L. M. Moreira, V. B. Vila, R. M. Borges and L. N. Pressinotti (2014). "Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana." Atas de Saúde Ambiental-ASA **2**(1): 09-22.

Sato, Y., E. V. Sampaio, N. Fenerich-Verani and J. R. Verani (2006). "Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil." Revista Brasileira de Zoologia **23**(1): 267-273.

Scholz, S., E. Sela, L. Blaha, T. Braunbeck, M. Galay-Burgos, M. García-Franco, J. Guinea, N. Klüver, K. Schirmer, K. J. R. t. Tanneberger and pharmacology (2013). "A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment." **67**(3): 506-530.

Schulz, U. H. and H. Martins-Júnior (2001). "*Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil." *Brasilian Journal of Biology* **61**(4): 615-622.

Silva, C. A., C. A. Oliveira Ribeiro, A. Katsumiti, M. L. P. Araújo, E. M. Zandoná, G. P. Costa Silva, J. Maschio, H. Roche and H. C. Silva de Assis (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, J. D., A. C. Albinati, C. L. B. Guedes and C. B. R. Martinez (2004). Effects of diesel oil on some morphological and functional parameters of *Prochilodus lineatus* during acute and chronic exposure. International Congress on the Biology of Fish. K. Sloman, C. Wood and D. MacKinlay. Manaus, Brazil.

Speight, J. G. (2015). Handbook of petroleum product analysis, John Wiley & Sons.

Stevanato, D. J. and A. Ostrensky (2018). "Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae)." *Neotropical Ichthyology* **16**(2).

van der Oost, R., J. Beyer and N. P. E. Vermeulen (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**(2): 57-149.

Vicente, A. L. (2014). Uso de óleos essenciais e de compostos sintéticos como agentes anestésicos para o lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000), Universidade Federal do Paraná.

Vieira, C. E. D., M. d. S. Almeida, B. A. Galindo, L. Pereira and C. B. d. R. Martinez (2014). "Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas." *Neotropical Ichthyology* **12**(1): 153-164.

Winkaler, E. U., A. das Graças Silva, H. C. Galindo and C. B. dos Reis Martinez (2008). "Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná." *Acta Scientiarum. Biological Sciences* **23**: 507-514.

Zambonino Infante, J. L. and C. L. Cahu (2001). "Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **130**(4): 477-487.

Ziulli, R. L. (2009). "Aspectos ambientais envolvidos na poluição marinha por petróleo." *Revista Saúde e Ambiente* **3**(2): 32-41.

CAPÍTULO 1. EFEITOS AGUDOS DO PETRÓLEO E DERIVADOS PARA EMBRIÕES E LARVAS DE *Astyanax lacustris* (GARUTTI & BRITSKI, 2000)

Diego Junqueira Stevanato^{1*}, Fabricio Salvador Vidal¹, Rafael Garrett Dolatto², Marco Tadeu Grassi², Antonio Ostrensky³

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba-PR, Brasil.

*Autor correspondente: diegozootecunesp@hotmail.com

²Grupo de Química Ambiental (GQA-UFPR), Universidade Federal do Paraná, Avenida Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 100, Curitiba-PR, Brasil.

³Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA-UFPR), Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba-PR, Brasil.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo definir a concentração letal mediana (CL₅₀) da fração solúvel em água (FSA) de petróleo cru, de óleo diesel e de gasolina comercializada no Brasil, além de um óleo lubrificante e de dois óleos minerais, para embriões e larvas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax lacustris*. Em relação a cada um desses produtos foram realizados dois ensaios em condições controladas de laboratório, um envolvendo embriões e o outro larvas da espécie. Em ambos os casos, os exemplares foram expostos a gradientes de sete concentrações da fração solúvel em água (FSA) desses produtos. Os experimentos foram realizados em placas de cultivo celular de 6 poços, totalizando 30 exemplares para cada concentração-teste. Diariamente, foram mensurados parâmetros físicos e químicos da água, além da concentração de hidrocarbonetos de cada produto testado. A fração solúvel em água da gasolina foi a que apresentou a maior concentração total de hidrocarbonetos (335543,1 µg L⁻¹) e, ao mesmo tempo, foi a que provocou maiores danos, tanto para embriões como para larvas de *A. lacustris*. Os embriões se mostraram muito sensíveis à exposição aos derivados de petróleo aqui testados, mesmo quando expostos a baixas concentrações das FSA desses produtos. Por outro lado, as larvas de *A. lacustris* foram afetadas apenas pela exposição à FSA da gasolina (FSA_G) e do petróleo (FSA_P).

Palavras-chave: exposição, fração solúvel em água, hidrocarbonetos, gasolina.

5 INTRODUÇÃO

O petróleo tem sido a principal fonte mundial de energia nos últimos 50 anos (Zhang, Ji et al. 2015), sendo responsável, em 2017, por 34,21% da oferta de energia primária no planeta (BP 2018). A intensa exploração de petróleo tem sido relacionada a diversas polêmicas ambientais, principalmente em decorrência dos impactos direta ou indiretamente causados aos ecossistemas aquáticos durante as fases de

exploração, refino ou transporte de petróleo e derivados (Neff 1985, Dupuis e Ucan-Marín 2015, Azevedo-Santos, García-Ayala et al. 2016, Luz, Silva et al. 2016).

Os hidrocarbonetos de petróleo constituem uma das classes de xenobiontes mais comumente encontrados nos ambientes aquáticos (Kettrup, Schramm et al. 1999, Nicodem, Guedes et al. 2001). Esses compostos são formados por dois ou mais anéis aromáticos, alicíclicos e alifáticos, arranjados em isômeros variados (Fouchecourt, Berny et al. 1998, Hylland 2006). Quando formados por cadeias curtas, costumam ser visualmente imperceptíveis e mais tóxicos (Zioli 2009), podendo apresentar distintos graus de mobilidade e persistência no ambiente (Neff 1979, Kettrup, Schramm et al. 1999).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA 1999), os impactos ocasionados pela presença de hidrocarbonetos de petróleo podem ser especialmente potencializados em ambientes aquáticos de baixa hidrodinâmica. Nesses ambientes, os componentes polares e de baixa massa molar dos derivados de petróleo tendem a se dissolver, formando assim a fração solúvel em água (FSA) (Saeed e Al-Mutairi 1999, Rodrigues, Miranda-Filho et al. 2010). A FSA se separa então do sobrenadante, podendo ser lixiviada e assim atingir toda biota aquática. Em comum, os compostos da FSA são formados por dois ou mais anéis aromáticos, alicíclicos e alifáticos, arranjados em isômeros variados (Fouchecourt, Berny et al. 1998, Hylland 2006) e, quando em cadeias curtas, costumam ser ainda mais tóxicos e voláteis, além de serem visualmente imperceptíveis (Zioli 2009). Esses compostos tendem a apresentar uma maior persistência ambiental.

Uma maneira reconhecidamente eficiente de se estudar efeitos dos xenobiontes sobre diferentes espécies e ecossistemas aquáticos envolve o uso de ensaios laboratoriais (van der Oost, Beyer et al. 2003, Paiva Magalhaes e Ferrao-Filho 2008, Silva, Pires Junior et al. 2010, Pamplona, Oba et al. 2011, Walker, Sibly et al. 2012, Mela, Guiloski et al. 2013, Galvan 2015). Testes de toxicidade aguda e crônica representam a base dos estudos científicos de uma complexa área ambiental, e são fundamentados pelo princípio da dose-resposta, que possibilita a obtenção de respostas de efeitos de curto, médio ou longo prazo (EPA 2002, Lombardi 2004, Costa, Olivi et al. 2008).

Peixes do gênero *Astyanax* têm sido cada vez mais utilizados em testes de toxicidade como bioindicadores de poluição ambiental (Schulz e Martins-Júnior 2001, Nogueira, Castro et al. 2009), sendo utilizados principalmente na avaliação dos efeitos de pesticidas e inseticidas na água (Matozo, Turek et al. 2015). O lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875), tem se destacado tanto por seu significativo valor comercial quanto ecológico (Vicente 2014, Galvan 2015), sendo amplamente usado como espécie modelo em ensaios laboratoriais diversos (Maceda, Grisolia et al. 2015, Ostrensky, Pedrazzani et al. 2015, Osório 2016, Stevanato e Ostrensky 2018), inclusive como espécie bioindicadora de danos ambientais relacionados a acidentes envolvendo hidrocarbonetos de petróleo (Horodesky, Abilhoa et al. 2015, Bettim, Galvan et al. 2016, Galvan, Lirola et al. 2016, Dal Pont 2018). Apesar do crescente número de estudos na área, ainda são proporcionalmente escassos os conhecimentos sobre os efeitos do petróleo e seus derivados sobre peixes de água doce (Eaton, McKim et al. 1978, Stephens, Alkindi et al. 1997, Luckenbach, Kilian et al. 2001, Silva 2013, Hodson 2017). O presente trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade da fração solúvel em água (FSA) do óleo diesel e da gasolina comercializada em Curitiba - PR, além do petróleo, de um óleo lubrificante e de dois óleos minerais comerciais, para embriões e larvas do lambari-do-rabo-amarelo *A. lacustris*.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Organismos-teste

Embriões de *A. lacustris* foram obtidos a partir de desovas induzidas realizadas nos laboratórios do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA-UFPR), em Curitiba, Paraná, Brasil. Para isso, foram utilizados 20 machos, com peso de $13,5 \pm 2,7$ g (média $\pm$ desvio padrão), e 10 fêmeas, peso de $19,3 \pm 4,3$ g. Os animais foram selecionados a partir de um plantel de reprodutores de acordo com as seguintes características morfológicas: machos, pela textura áspera na nadadeira anal; fêmeas, pelo ventre abaulado e poro urogenital avermelhado. Após selecionados, os animais receberam uma dose única (1000 UI/kg) de gonadorelina coriônica humana (HCG), 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.

6.2. Produtos testados

Os produtos testados nos bioensaios estão descritos na Tabela 1:

Tabela 2. Óleo cru e derivados usados na exposição aguda (CL₅₀ - 96 horas) de embriões e larvas de *Astyanax lacustris*.

Produtos Testados	Origem	Outras informações
Gasolina (FSA _G)	Posto de combustível	Gasolina comum (com adição de 27% etanol)
Diesel (FSA _D)	Posto de combustível	Composto por 8% de biodiesel, não excedendo 8 ppm de enxofre e classificado em 48 no índice de cetano (NC)
Óleo Cru (FSA _P)	Refinaria Presidente Vargas (REPAR)	Petróleo médio, de origem naftênica, 25.6° API
Óleo Mineral (FSA _{OM1})	Empresa privada	Óleo mineral isolante, com base naftênica
Óleo Mineral (FSA _{OM2})	Empresa privada	Óleo mineral lubrificante usado ou contaminado, processado industrialmente e comercializado como óleo mineral isolante
Óleo Lubrificante (FSA _{OL})	Empresa privada	Óleo mineral lubrificante, com base parafínica

6.3. Testes preliminares de toxicidade

Foram realizados dois testes preliminares, sendo um de exposição de embriões e outro de larvas de *A. lacustris*, de exposição aguda (96 horas), utilizando cada um dos seis produtos estudados. Os ensaios preliminares tiveram como objetivo definir os limites apropriados das concentrações que seriam posteriormente empregadas nos testes definitivos.

Os organismos foram submetidos a concentrações crescentes em escala logarítmica (0,01; 0,1; 1; 10 e 100%) da fração solúvel de cada composto, além de um grupo controle (mantido em água livre de hidrocarbonetos de petróleo). O primeiro ensaio foi realizado com óvulos fertilizados (embriões) e o segundo com larvas recém-eclodidas. Em ambos os experimentos, os organismos-teste foram alojados individualmente em placas de cultivo celular de seis poços modelo K12-006 (Kasvi, China) com volume útil de 15 ml em cada poço, totalizando 12 exemplares para cada concentração testada. As placas foram acondicionadas em uma incubadora do tipo BOD SL-200 (Adamo, Brasil), com fotoperíodo ajustado para 12 h luz e 12 h escuro e temperatura controlada e ajustada a 25 °C. Diariamente, foram contabilizadas as mortalidades. A cada 24 h era também realizada a troca total do volume da solução-teste.

6.4. Testes definitivos de toxicidade

Com base na identificação dos limites de concentrações que apresentavam entre 0 a 100% de letalidade dos organismos utilizados nos testes preliminares, foram definidas as concentrações de exposição nos testes definitivos. Foram testadas sete concentrações de cada produto, conforme apresentado na Tabela 2, além de um grupo controle positivo (composto por uma solução de 1,75% de etanol PA 98,9%), e um grupo controle negativo (no qual os organismos-teste eram mantidos em água livre de hidrocarbonetos de petróleo), conforme preconizam as normas nacionais e internacionais de testes de exposição (OECD 1994, ABNT 2011, ABNT 2016), com modificações.

Tabela 3. Concentrações das frações solúveis em água (FSA) do óleo diesel (FSA_D), da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P), de dois óleos minerais comerciais lubrificantes (FSA_{OM1} e FSA_{OM2}) e de um óleo lubrificante (FSA_{OL}) usados na exposição aguda (CL₁₀ e CL₅₀ – 96 horas) de embriões e larvas de *Astyanax lacustris*.

Tratamento	Concentração (% FSA)						
FSA _D	40	50	60	70	80	90	100
FSA _G	0,05	0,10	0,50	1	2	4	16
FSA _P	40	50	60	70	80	90	100
FSA _{OM1}	40	50	60	70	80	90	100
FSA _{OM2}	40	50	60	70	80	90	100
FSA _{OL}	40	50	60	70	80	90	100

Foram realizados dois testes de exposição aguda de 96 h de duração para cada produto. O primeiro consistiu na exposição de ovos fertilizados e o segundo na exposição de larvas recém-eclodidas. Em ambos os testes, os organismos foram alojados individualmente em placas de cultivo celular de seis poços K12-006 (Kasvi, China) de volume útil de 15 ml em cada poço, totalizando 30 exemplares para cada concentração testada. Em seguida, as placas foram acondicionadas em uma incubadora do tipo BOD SL-200 (Adamo, Brasil), com fotoperíodo ajustado para 12 h luz e 12 h escuro e temperatura ajustada em 25 °C. As taxas de sobrevivência foram avaliadas a cada 24 h, analisando-se as placas com auxílio de um microscópio estereoscópico Discovery V8 (Zeiss, Alemanha).

6.5. Qualidade da água

Os seguintes parâmetros foram determinados diariamente na água durante os experimentos: pH, através de pHmetro digital (AZ-86505, Taiwan); oxigênio dissolvido (OD – mg L⁻¹) e percentual de saturação de oxigênio (OD - %), por meio de oxímetro digital Pro20 (YSI, EUA); alcalinidade, mensurada por titulometria com ácido sulfúrico 0,02N (APHA 2005); concentração de nitrogênio na forma de amônia total [N-AT= NH₃+NH₄⁺], obtida pelo método do indofenol (APHA 2005), e nitrito (N-NO₂⁻) (APHA 1995), seguido de leitura das amostras em espectrofotômetro de bancada Spectronic 20 (Genesys, EUA).

6.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados utilizando os *softwares* Excel® e Access® (Microsoft Office Professional Plus 2016). Os dados de qualidade da água e biométricos foram analisados por meio da análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido pelo teste Tukey, após comprovados todos os pressupostos para a distribuição normal dos dados. A sobrevivência foi analisada pela curva de Kaplan-Meier, utilizando-se o *software* Statsoft Statistica^{MR} versão 12.0®. A concentração letal mediana (CL₅₀) e demais parâmetros toxicológicos indicados na Tabela 3 foram estimados através do *software* “Risk Assessment Tools Software and User's Guide” (Mayer, Ellersieck et al. 2010).

Tabela 4. Parâmetros toxicológicos usados na expressão dos resultados obtidos da exposição de embriões e larvas de *Astyanax lacustris* com petróleo e derivados.

Parâmetro	Definição / Obtenção	Referência
CL ₁₀	Concentração da substância testada que causa 10% de mortalidade durante o período de exposição de 96 horas.	OECD (1994)
CL ₅₀	Concentração da substância testada que causa 50% de mortalidade durante o período de exposição de 96 horas.	OECD (1994)
EC ₀	Principal concentração da amostra em que não se observa efeitos agudos nos organismos durante o período de exposição.	ABNT (2011)

7 RESULTADOS

As concentrações de hidrocarbonetos mensuradas nas FSA_D, FSA_G, FSA_P, FSA_{OM1}, FSA_{OM2} e FSA_{OL} estão apresentadas na Tabela 4. O produto testado que apresentou maior concentração de hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foi a FSA_G, com um total de 335.500 µg L⁻¹ de BTEX, sendo esses constituídos principalmente por tolueno e benzeno. A concentração total de HPAs detectada nessa amostra foi de 43 µg L⁻¹. Os hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos na amostra da FSA_{OM2} ficaram abaixo do

limite de quantificação do método utilizado, apresentando apenas concentrações quantificáveis de HPAs totais ($0,33 \mu\text{g L}^{-1}$).

As concentrações de m-xileno+p-xileno (m,p-xileno) e o-xileno da FSA_{OM2} ficou abaixo do limite de detecção analítica. Houve uma grande diferença das características químicas da FSA_{OM1} e da FSA_{OM2}. Na análise de HPA, a FSA_{OM1} apresentou concentrações detectáveis apenas de acenafteno, enquanto a FSA_{OM2} apresentou apenas dibenz[ah]antraceno. Os óleos minerais se destacaram como aqueles produtos com as menores concentrações de hidrocarbonetos entre os produtos testados.

Tabela 5. Concentração média ($\mu\text{g L}^{-1}$) de hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX) e policíclicos aromáticos (HPA) obtidos das frações solúveis em água (FSA) do óleo diesel (FSA_D), da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P), de dois óleos minerais comerciais (FSA_{OM1} e FSA_{OM2}) e de um óleo lubrificante (FSA_{OL}) e usados na toxicidade aguda de embriões e larvas de *Astyanax lacustris*.

Hidrocarboneto	FSA _D	FSA _G	FSA _P	FSA _{OM1}	FSA _{OM2}	FSA _{OL}
Hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX)						
Benzeno	470	133.500	6.100	15	<5	15
Tolueno	1.075	153.500	4.100	25	Nd	16
Etilbenzeno	193	11.900	380	7	Nd	21
m,p-Xileno	281	19.300	589	23	Nd	21
o-Xileno	301	17.300	500	14	Nd	23
Σ BTEX	2.320	335.500	11.669	84	<5	96
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH)						
Naftaleno	<0,25	<0,25	9,20	<0,25	<0,25	<0,25
Acenaftaleno	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Acenafteno	<0,25	<0,25	<0,25	0,36	<0,25	<0,25
Fluoreno	1,20	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Fenantreno	3,10	<0,25	7,20	<0,25	<0,25	<0,25
Antraceno	<0,25	<0,25	7,10	<0,25	<0,25	<0,25
Fenantreno	<0,25	1,50	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Pireno	<0,25	1,80	1,00	<0,25	<0,25	<0,25
Benz[a]anthraceno	<0,25	3,80	0,70	<0,25	<0,25	<0,25
Criseno	<0,25	4,60	0,60	<0,25	<0,25	<0,25
Benzo[b]fluoranteno	<0,25	5,50	1,30	<0,25	<0,25	0,33
Benzo[k]fluoranteno	<0,25	5,60	1,10	<0,25	<0,25	<0,25
Benzo[a]pireno	<0,25	4,20	1,00	<0,25	<0,25	<0,25
Indeno[1,2,3-cd]pireno	<0,25	5,40	1,20	<0,25	<0,25	0,29
Dibenz[ah]antraceno	<0,25	5,30	1,20	<0,25	0,33	0,36
Benzo[ghi]perylene	<0,25	5,40	1,10	<0,25	<0,25	0,28
Σ HPA	4,3	43,1	32,6	0,36	0,33	1,26

*Limite de quantificação (LOQ) BTEX = 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; LOQ PAH = 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Os resultados das análises físicas e químicas realizadas na água nas unidades experimentais estão discriminados na Tabela 5. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) ao final de nenhum dos experimentos realizados, entre a água utilizada na reposição e a água presente nas unidades experimentais após 24 h de exposição em relação ao nitrito e à alcalinidade. Por outro lado, observou-se uma tendência de queda nos valores de pH, nas concentrações de amônia total e de oxigênio dissolvido ao longo dos testes com embriões e com larvas. O pH foi o parâmetro que mais sofreu variação, apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a água de renovação e a água das unidades experimentais após os períodos de 24 horas de exposição. Essa diferença aconteceu tanto ao longo dos testes com embriões, como quando da comparação dos valores de pH entre os experimentos com embriões e com larvas de *A. lacustris*.

Tabela 6. Parâmetros de qualidade de água analisados durante os testes de toxicidade aguda em embriões e larvas de *Astyanax lacustris* expostos às frações solúveis em água (FSA) do óleo diesel (FSA_D), da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P), de dois óleos minerais comerciais (FSA_{OM1} e FSA_{OM2}), de um óleo lubrificante (FSA_{OL}), de um controle negativo e controle positivo (etanol).

Tratamento	Estágio	Parâmetro					
		pH	Alcalinidade (mg L ⁻¹)	N-AT (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	OD (%)
Renovação	Embriões	7,35 ^{aB} *	36,00	0,01 ^a	0,01	8,19 ^a	106,84 ^a
		(7,25-7,42)	(26,80-38,20)	(0,01-0,02)	(0,01-0,03)	(8,12-8,46)	(105,90-109,20)
Renovação	Larvas	7,56 ^{xA}	37,50	0,01 ^x	0,01	7,37 ^x	106,50 ^x
		(7,46-7,76)	(33,10-38,80)	(0,01-0,02)	(0,01-0,02)	(7,23-7,66)	(104,80-107,40)
FSA _D	Embriões	6,75 ^{bC}	39,40	0,04 ^{ab}	0,01	6,51 ^b	82,60 ^b
		(6,70-6,83)	(37,40-44,00)	(0,01-0,06)	(0,01-0,09)	(6,02-6,92)	(72,10-90,50)
FSA _D	Larvas	6,71 ^{yC}	41,17	0,01 ^x	0,01	6,70 ^y	80,00 ^y
		(6,56-6,75)	(32,80-41,70)	(0,01-0,02)	(0,01-0,02)	(6,42-7,38)	(76,10-83,90)
FSA _G	Embriões	6,71 ^{bC}	38,00	0,03 ^{ab}	0,02	6,60 ^b	81,60 ^b
		(6,64-6,83)	(30,80-39,00)	(0,02-0,06)	(0,01-0,03)	(6,18-6,79)	(75,20-84,90)
FSA _G	Larvas	6,75 ^{yC}	39,00	0,04 ^y	0,02	6,66 ^y	77,75 ^y
		(6,51-6,82)	(30,70-41,50)	(0,03-0,04)	(0,01-0,03)	(6,25-7,46)	(77,50-83,80)
FSA _P	Embriões	6,61 ^{bC}	31,60	0,04 ^{ab}	0,02	6,51 ^b	83,70 ^b
		(6,21-6,68)	(27,30-44,00)	(0,02-0,08)	(0,01-0,02)	(6,02-6,88)	(72,90-86,20)
FSA _P	Larvas	6,60 ^{yC}	33,75	0,02 ^x	0,01	6,69 ^y	81,25 ^y
		(6,55-6,82)	(29,05-45,25)	(0,01-0,03)	(0,01-0,02)	(6,10-7,22)	(77,40-86,20)
FSA _{OM1}	Embriões	6,68 ^{bC}	33,40	0,03 ^{ab}	0,02	6,53 ^b	79,20 ^b
		(6,45-6,82)	(27,80-46,50)	(0,02-0,08)	(0,01-0,02)	(6,33-6,87)	(71,70-88,20)
FSA _{OM1}	Larvas	6,66 ^{yC}	37,65	0,03 ^y	0,02	6,93 ^y	80,95 ^y
		(6,45-6,78)	(30,90-47,55)	(0,03-0,04)	(0,01-0,02)	(6,25-7,49)	(75,90-83,00)
FSA _{OM2}	Embriões	6,73 ^{bC}	45,20	0,04 ^b	0,02	6,55 ^b	86,40 ^b

		(6,62-6,83)	(25,80-50,20)	(0,03-0,06)	(0,01-0,04)	(6,21-6,66)	(83,60-88,20)
FSA _{OM2}	Larvas	6,56 ^{yC}	42,20	0,02 ^x	0,01	6,46 ^y	85,25 ^y
		(6,50-6,69)	(32,00-46,30)	(0,02-0,03)	(0,01-0,02)	(6,31-6,57)	(82,40-87,70)
FSA _{OL}	Embriões	6,76 ^{bC}	40,00	0,04 ^b	0,01	6,44 ^b	85,05 ^b
		(6,63-6,84)	(30,60-44,00)	(0,03-0,06)	(0,01-0,04)	(6,25-6,90)	(77,60-86,60)
FSA _{OL}	Larvas	6,59 ^{yC}	44,70	0,03 ^x	0,01	6,43 ^y	84,50 ^y
		(6,52-6,70)	(34,20-42,25)	(0,02-0,04)	(0,01-0,02)	(6,30-6,69)	(74,70-86,20)
Etanol	Embriões	6,72 ^{bC}	40,30	0,03 ^{ab}	0,02	6,55 ^b	84,40
		(6,52-7,71)	(38,20-45,25)	(0,01-0,05)	(0,01-0,03)	(6,21-6,66)	(48,20-87,20)
Etanol	Larvas	6,77 ^{yC}	43,70	0,01 ^x	0,01	6,49 ^y	85,90 ^y
		(6,72-6,90)	(33,10-50,20)	(0,01-0,03)	(0,01-0,02)	(6,21-6,79)	(77,60-88,40)
Controle Negativo	Embriões	6,73 ^{bC}	38,60	0,01 ^a	0,02	6,70 ^b	84,75 ^b
		(6,68-6,77)	(27,80-42,30)	(0,01-0,01)	(0,01-0,02)	(6,56-6,89)	(77,90-88,10)
Controle Negativo	Larvas	6,63 ^{yC}	35,82	0,01 ^x	0,01	6,48 ^y	82,95 ^y
		(6,48-6,71)	(27,50-40,90)	(0,01-0,01)	(0,01-0,01)	(6,21-6,81)	(79,50-86,50)

*Os valores são expressos em medianas e intervalos (mínimo-máximo). Letras minúsculas (a, b) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) dos parâmetros de qualidade da água entre o tratamento e a água da renovação do embrião (isto é, medido antes e depois da renovação da água) para embriões. Letras minúsculas (x, y) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os parâmetros de qualidade da água do tratamento e a água da substituição do experimento por larvas. Letras maiúsculas (sobrescrito - A, B) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os parâmetros medidos na água de reposição e o experimento entre os diferentes estágios da ontogenia (embriões e larvas).

Nenhum embrião do grupo controle negativo morreu durante o período experimental. Já nos tratamentos contendo hidrocarbonetos de petróleo, a mortalidade embrionária variou conforme o tipo de produto testado. A FSA_G, mesmo em baixas concentrações (0,01 %), provocou taxas significativas de mortalidade. A CL₅₀ 96 h da FSA_G foi de 3,35 %. Nas primeiras 24 h, a CL₅₀ da FSA_G foi 1/10 do valor da CL₅₀ da FSA_P (13,13% e 133,30 %, respectivamente). A FSA_D, a FSA_P e FSA_{OM1} apresentaram toxicidade semelhante entre si. A FSA_{OM2} e a FSA_{OL} foram as que apresentaram menor toxicidade para embriões, tanto no período de 24 quanto de 96 horas de exposição (Figura 2).

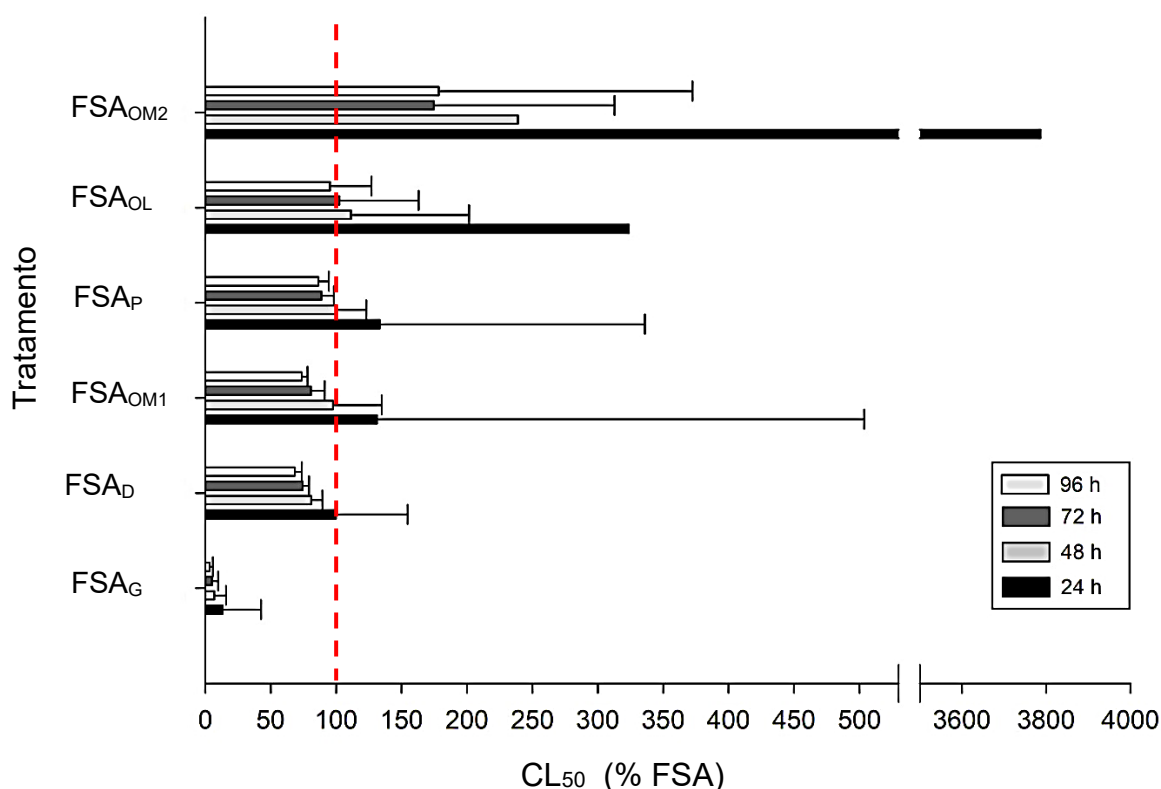


Figura 4. Concentração letal (CL₅₀ – 96 horas) do petróleo (FSA_P), diesel (FSA_D), gasolina (FSA_G), de dois óleos minerais comerciais (FSA_{OM1} e FSA_{OM2}) e óleo lubrificante (FSA_{OL}) para embriões de *Astyanax lacustris*. As barras representam os valores médios observados de CL₅₀ e os respectivos limites superiores estimados. Linha pontilhada representa o valor máximo da fração solúvel (100%).

A exposição aos derivados de petróleo teve influência direta no desenvolvimento embrionário, que envolve o período compreendido entre a fecundação e a eclosão dos embriões (que ocorreu quando os exemplares

completaram aproximadamente 24 horas de exposição). Durante esse desenvolvimento, observou-se a formação de coágulos nos embriões (Figura 3) que, consequentemente, resultaram em malformações e influenciaram na mortalidade embrionária. A exposição à FSA_{OM2} resultou em 16,36% de embriões mortos (24 horas), sendo 11,82% dessa mortalidade ocasionada pela coagulação de ovos. A FSA_G foi a que mais afetou no desenvolvimento embrionário, sendo que, dos 58,78% embriões mortos durante o período de 24 horas de exposição, 53,93% apresentaram morte por coagulação (embrião malformado). A exposição ao etanol (controle positivo) apresentou a segunda maior taxa de coagulação de ovos, o que correspondeu a 40% da mortalidade embrionária. Os demais compostos não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre si quanto à taxa de mortalidade de embriões por coagulação.

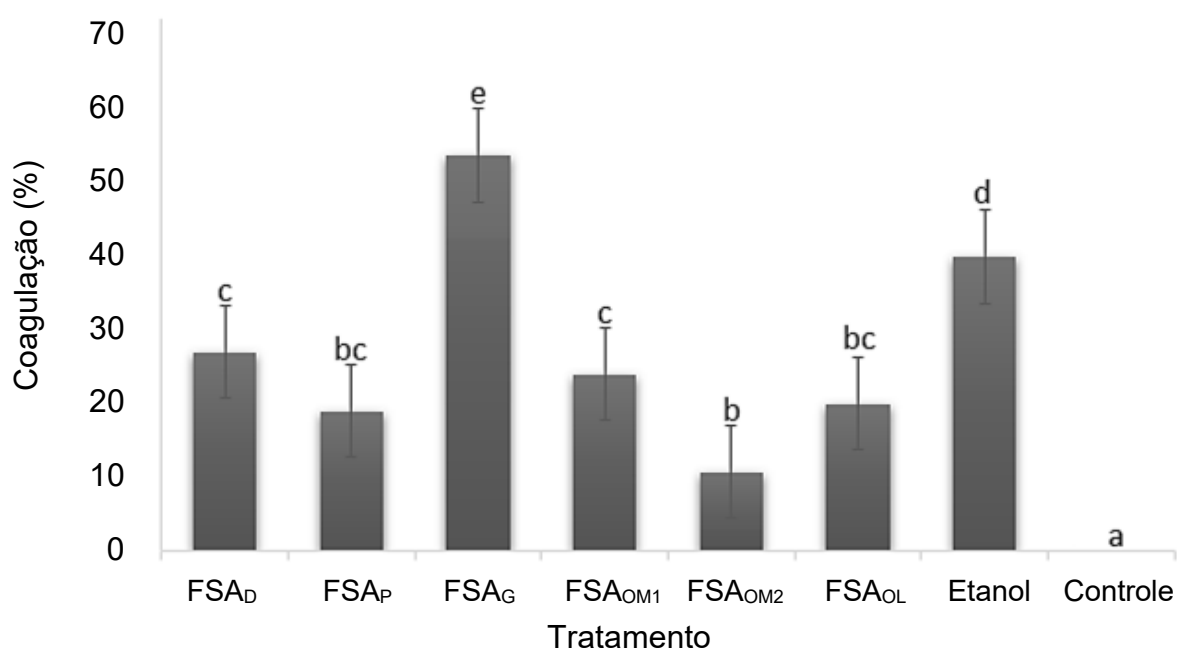


Figura 5. Taxa de coagulação de ovos de *Astyanax lacustris* expostos à fração solúvel em água de petróleo e derivados: óleo diesel (FSA_D), gasolina (FSA_G), óleo mineral isolante (FSA_{OM1} e FSA_{OM2}), óleo lubrificante (FSA_{OL}), controle positivo (etanol) e controle negativo (controle). Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras (sobrescritas) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

As larvas se mostraram muito mais tolerantes que os embriões aos compostos testados. Somente a exposição à FSA_P e à FSA_G ocasionou a morte de organismos. As CL₅₀ 96 h foi calculada em 19,65% para a FSA_G estimada em 100% para a FSA_P.

(Figura 4). Nos demais casos, não houve morte registrada no período de 96 horas, nem mesmo nas concentrações contendo 100% da FSA.

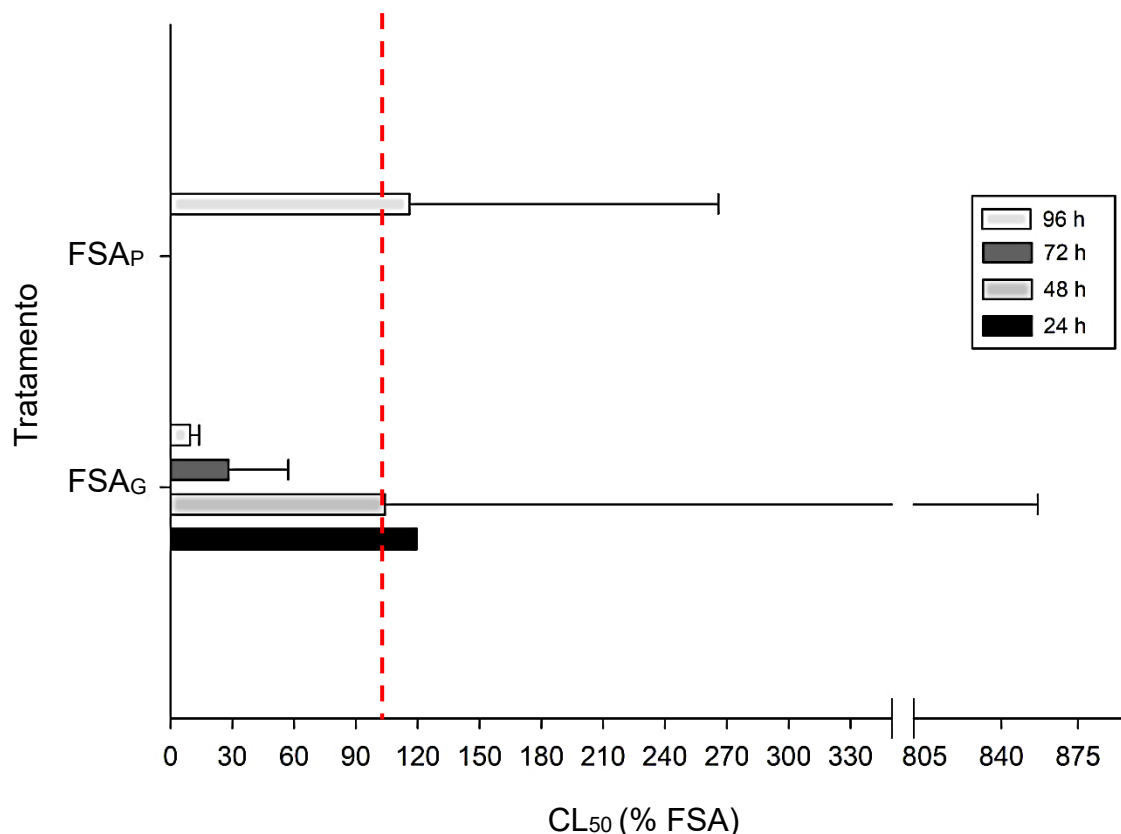


Figura 6. Concentração letal (CL_{50} – 96 horas) da fração solúvel em água do petróleo (FSA_P) e da gasolina (FSA_G), de larvas de *Astyanax lacustris*. Barras representam o valor de CL_{50} observado e seus respectivos limites obtidos. Linha pontilhada representa o valor máximo da fração solúvel (100%).

Os indicadores de toxicidade observados por meio da exposição aguda (96 h) de embriões e larvas de *A. lacustris* estão apresentados na Tabela 6. Concentrações superiores a 0,01 e a 0,08% de FSA_G foram suficientes para ocasionar a morte de embriões e larvas, respectivamente.

A FSA_{OM2} foi a que apresentou o valor mais elevado em relação à CE_0 (22,75%) quando comparada às demais frações avaliadas na exposição dos embriões. Por outro lado, o FSA_{OM2} foi o segundo composto mais tóxico pela análise de CL_{10} , ficando acima apenas da FSA_G, que para a fase embrionária, foi o composto mais tóxico entre os derivados testados. Já na análise de CL_{50} , a FSA_{OM2} foi o tratamento menos tóxico para os embriões, nem com 100% da fração foi possível observar mortalidade.

A concentração da FSA_P em que não foi observado efeito agudo em 96 h para as larvas da espécie foi de 68,57%. Para a FSA_D, FSA_{OM1}, FSA_{OM2} e FSA_{OL}, não foi possível realizar essa análise devido à baixa toxicidade (nenhuma morte registrada entre o período de 0 a 96 h de exposição).

Tabela 7. Concentração letal (CL₁₀ e CL₅₀) e Concentração de efeito (CE₀) obtidos da exposição ao petróleo e derivados durante a exposição aguda (96 horas) às respectivas frações solúvel em água – FSA sobre os embriões e larvas de *Astyanax lacustris*.

Tratamento	Estágio	CE ₀	LC ₁₀	LC ₅₀
FSA _D	Embrio-larval	11,93	44,57	73,68
	Larval	>100	>100	>100
FSA _P	Embrio-larval	14,08	50,88	86,44
	Larval	68,57	95,52	120,8
FSA _G	Embrio-larval	0,01	0,04	3,35
	Larval	0,08	0,80	19,65
FSA _{OM1}	Embrio-larval	13,41	34,79	68,38
	Larval	>100	>100	>100
FSA _{OM2}	Embrio-larval	22,75	31,61	178,3
	Larval	>100	>100	>100
FSA _{OL}	Embrio-larval	15,24	34,33	95,33
	Larval	>100	>100	>100

8 DISCUSSÃO

A metodologia empregada nos experimentos procurou atender a todos os protocolos exigidos para testes em sistemas semi-estáticos brasileiros, descritos na NBR 15088 (ABNT 2011, ABNT 2016) e aos protocolos internacionais mais usados para testes de letalidade aguda em peixes (OECD 1994, EPA 1996, EPA 2002), com adaptações, já que esses testes são descritos e definidos para o peixe-zebra (*Danio rerio*) e aqui avaliamos o *A. lacustris*, além da redução do número de concentrações, que visa otimizar e reduzir o número de exemplares utilizados no teste de toxicidade.

Os hidrocarbonetos monoaromáticos, comumente conhecidos como BTEX, são os compostos que possuem maior solubilidade em água e, conseqüentemente, os que tendem a apresentar maior toxicidade aos organismos expostos (Corseuil 1992, Chapelle 2001). Porém, neste trabalho, o óleo mineral 1, que foi um dos produtos cuja

FSA continha a menor concentração total de hidrocarbonetos monoaromáticos, apresentou toxicidade semelhante à apresentada pela FSA_D e pela FSA_P, que continham pelo menos 25% a mais de BTEX. Possivelmente, outros componentes podem ter influenciado na toxicidade desses produtos testados, como sugerido por Hodson (2017), aqueles associados ao uso de aditivos. Tais produtos são incorporados para reduzir impactos ambientais ou para melhorar a eficiência do processo de queima (Goldemberg 2007, Corseuil, Gomez et al. 2015, Rama, Ramos et al. 2019), tornaram o entendimento da toxicidade dos produtos derivados do petróleo ainda mais complexo (Corseuil, Hunt et al. 1998, Kaipper 2003, McLeod, Roy et al. 2018)

Um exemplo é o caso da gasolina comercial brasileira que, por imposição legal da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) – Resolução ANP nº 40 de 25 de outubro de 2013, é misturada a 27 % de etanol. Estudos revelam que concentrações acima de 10% de etanol podem exercer um efeito ainda maior na solubilidade dos compostos orgânicos, incluindo prioritariamente os hidrocarbonetos monoaromáticos (Groves 1988, Corseuil 1992, Heermann e Powers 1998, Corseuil, Kaipper et al. 2004). A solubilidade explica a maior toxicidade dos produtos que apresentaram maiores concentrações de BTEX. E como já era se esperado, a fração solúvel da gasolina apresentou as maiores concentrações de BTEX em relação aos demais produtos testados, o que corrobora o fato de a mesma ter sido a mais tóxica tanto para os embriões como para as larvas da espécie.

O que surpreendeu foi aparecer HPAs na fração solúvel da gasolina, fato este que não deveria acontecer. Essa quantificação também foi observada no estudo realizado por Dal Pont, Souza-Bastos et al. (2019). Possivelmente isso pode ser resultado do inevitável contato de resíduos de outros derivados durante o transporte desses combustíveis nos oleodutos ou em tanques de caminhões.

Neste estudo, os dois óleos minerais comerciais (OM1 e OM2) são destinados ao mesmo fim (isolamento térmico de transformadores elétricos), mas o que os diferenciam é o fato de que o óleo mineral 2 (OM2) passa por um processo de rerrefino, que é a transformação de um óleo lubrificante, usado ou contaminado, em um novo óleo mineral básico. Esse processo é uma alternativa prevista no Brasil pela Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº362, de junho de

2005, e pelas Portarias da ANP nº 125/99 a 128/99 e 130/99 que, em teoria, deveria manter as características químicas semelhantes às obtidas no primeiro refino.

Nota-se que mesmo com esse processo de rerrefino, a FSA_{OM2} mostrou-se quimicamente diferente tanto do óleo mineral 1 (sendo que ambos são utilizados para o mesmo propósito, ou seja, isolamento térmico), quanto do óleo lubrificante (FSA_{OL}), que é um óleo que pode ser usado para a obtenção do FSA_{OM2}, através do processo de rerrefino. Ressalta-se ainda que na FSA_{OM2} não foi possível quantificar nenhum BTEX, enquanto que nos demais produtos testados foi possível quantificar todos os hidrocarbonetos monoaromáticos analisados. Este fato poderia, em teoria, explicar a baixa toxicidade da FSA_{OM2} tanto para os embriões como para as larvas de *A. lacustris* em relação à apresentada pela FSA dos demais produtos.

Neste estudo, a sensibilidade dos organismos expostos às frações solúveis dos derivados do petróleo foi afetada pelo estágio de desenvolvimento ontogenético em que se encontravam no momento de exposição. A fase embrionária é frequentemente considerada crítica para a sobrevivência dos peixes, como já havia sido descrito por Santos (2017) e por Stevanato e Ostrensky (2018). Diversos autores já haviam concluído que os embriões foram menos tolerantes à exposição a hidrocarbonetos de petróleo que as demais fases do desenvolvimento ontogenético de peixes (McKim 1977, Meier, Craig Morton et al. 2010, Cherr, Fairbairn et al. 2016, Perrichon, Le Menach et al. 2016). Em parte, isso pode ser explicado pela imaturidade fisiológica dos embriões, pois eles são desprovidos de enzimas necessárias para a desintoxicação (Zambonino Infante e Cahu 2001, Pauka 2007). Além disso, durante o período embrionário ocorre um acentuado gasto energético relacionado aos processos naturais de biotransformação (Brown e Núñez 1994, Hallare, Nagel et al. 2006), que podem implicar em gastos extras de energia para contornar os efeitos ocasionados pela exposição aos xenobiontes.

Os valores obtidos no presente estudo mostraram que a fase larval foi a menos sensível aos efeitos da FSA_G em relação às demais fases de vida da espécie. Galvan, Lirola et al. (2016), estimaram em 1,50% da FSA_G a CL₅₀ 96h para juvenis de *A. lacustris*, valor significativamente menor ao aqui encontrado para os embriões (3,35%) e muito menor que calculado aqui para as larvas (19,65%). Trabalhando com indivíduos adultos de *A. lacustris*, Rodrigues, Miranda-Filho et al. (2010) obtiveram CL₅₀ 96 h equivalente a 5,48% da FSA_G, valor duas vezes maior que o estimado por

Dal Pont (2018), para indivíduos adultos da mesma espécie (CL₅₀ 96 h de 2,65% da FSA_G).

O fato é que comparar diretamente resultados de experimentos toxicológicos com peixes expostos a hidrocarbonetos de petróleo, nem sempre é uma tarefa fácil, pois há diversos fatores que interagem e que podem alterar os resultados finais. Por exemplo, existe uma ampla variação na composição química do próprio petróleo (Neff 1979, Gauto, de Melo Apoluceno et al. 2016), consequentemente, a composição de seus derivados também será afetada. Há também uma grande variedade de produtos comerciais contendo hidrocarbonetos de petróleo (Heath 1995, Neff, Ostazeski et al. 2000), cada um com suas peculiaridades e especificidades. Os métodos de extração da fração solúvel em água podem variar, ainda que se adotem os mesmos protocolos de extração. Neste caso, a própria velocidade de agitação da água dificilmente será exatamente a mesma em diferentes estudos, o que, consequentemente, poderia contribuir para uma maior ou menor concentração de hidrocarbonetos solubilizados. Há também diferentes métodos para a própria determinação dos HPA e BTEX (Saeed e Al-Mutairi 1999, Singer, Aurand et al. 2000). A origem e as características físicas e químicas da água utilizada nas soluções-teste serão sempre específicas do local onde os experimentos são realizados.

Há que se considerar também que cada espécie animal pode apresentar graus de tolerância distintos em relação aos produtos derivados de petróleo (Ramachandran, Swezey et al. 2006, Rodrigues, Miranda-Filho et al. 2010). Há ainda diferenças na origem, no grau de sanidade e de estresse dos peixes utilizados em cada teste, por cada autor. Os pesquisadores citados ao longo deste trabalho e que empregaram *A. lacustris* em seus estudos geralmente utilizaram indivíduos juvenis e adultos oriundos de centros comerciais, que passam por um processo de transporte, aclimação e restrição alimentar, o que pode ter ocasionado diferentes graus de estresse nos animais ter tipo alguma influência nos resultados. No presente caso, os exemplares utilizados nos experimentos foram obtidos de reprodutores já aclimatados por vários meses ao laboratório. Além disso, trabalhou-se aqui com fases iniciais do ciclo ontogenético dos peixes, que se desenvolveram, eclodiram e permaneceram dentro das próprias unidades experimentais, não sofrendo as interferências acima relatadas.

Os resultados aqui obtidos demonstraram a elevada toxicidade para embriões e larvas de *A. lacustris* da FSA da gasolina em relação à fração solúvel dos demais produtos testados. Demonstraram ainda que eventuais acidentes ambientais envolvendo esses produtos, mesmo que em baixas concentrações, apresentam um maior potencial de causar danos aos ovos embrionados que porventura tiverem contato com a FSA desses produtos que as larvas.

9 REFERÊNCIAS

ABNT (2016). NBR 15088:2016 Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae).

ABNT, A. B. d. N. T. (2011). "Aquatic ecotoxicology, acute toxicity, test with fish." NBR 15088: 22.

Anderson, J., J. Neff, B. Cox, H. Tatem and G. Hightower (1974). "Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish." Marine Biology **27**(1): 75-88.

APHA (1995). American Public Health Association: Standard methods for the examination of water and wastewater: 4500-NH3 Método fenol de determinação de Amonia 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**.

Azevedo-Santos, V. M., J. R. Garcia-Ayala, P. M. Fearnside, F. A. Esteves, F. M. Pelicice, W. F. Laurance and R. C. Benine (2016). "Amazon aquatic biodiversity imperiled by oil spills." Biodiversity and Conservation **25**(13): 2831-2834.

Bettim, F. L., G. L. Galvan, M. M. Cestari, C. I. Yamamoto and H. C. S. de Assis (2016). "Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline." Chemosphere **144**: 1467-1474.

BP. (2018). "Statistical Review of World Energy – June 2018, ." Retrieved 07/04/2019, 2019.

Brown, C. L. and J. Núñez (1994). Hormone actions and applications in embryogenesis, Sea Grant College Program, University of Hawaii.

Chapelle, F. (2001). Ground-water microbiology and geochemistry, John Wiley & Sons.

Cherr, G. N., E. Fairbairn and A. Whitehead (2016). "Impacts of Petroleum-Derived Pollutants on Fish Development." Annual Review of Animal Biosciences(0).

Corseuil, H. X. (1992). Enhanced degradation of monoaromatic hydrocarbons in sandy aquifer materials by microbial inoculation using biologically active carbon reactors.

Corseuil, H. X., D. E. Gomez, C. M. Schambeck, D. T. Ramos and P. J. J. Alvarez (2015). "Nitrate addition to groundwater impacted by ethanol-blended fuel accelerates ethanol removal and mitigates the associated metabolic flux dilution and inhibition of BTEX biodegradation." Journal of Contaminant Hydrology **174**: 1-9.

Corseuil, H. X., C. S. Hunt, R. C. F. Dos Santos and P. J. J. W. R. Alvarez (1998). "The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation." **32**(7): 2065-2072.

Corseuil, H. X., B. I. Kaipper and M. J. W. R. Fernandes (2004). "Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol." **38**(6): 1449-1456.

Costa, C. R., P. Olivi, C. M. Botta and E. L. Espindola (2008). "Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods." Química Nova **31**(7): 1820-1830.

Dal Pont, G. (2018). "Effects of petroleum hydrocarbons to tropical and temperate fish species: a toxicity and multibiomarker approach for the assessment of environmental contamination."

Dupuis, A. and F. Ucan-Marin (2015). "A literature review on the aquatic toxicology of petroleum oil: An overview of oil properties and effects to aquatic biota." Res Doc **7**.

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). United States Environmental Protection Agency: Method 5021: Volatile organic compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis: 1-13.

EPA (1999). "United States Environmental Protection Agency: Storm Water Technology Fact Sheet: Porous Pavement. EPA 832-F-99-023."

EPA (2002). "United States Environmental Protection Agency: Methods of measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms."

Fouchecourt, M., P. Berny and J. Riviere (1998). "Bioavailability of PCBs to male laboratory rats maintained on litters of contaminated soils: PCB burden and induction of alkoxyresorufin O-dealkylase activities in liver and lung." Archives of environmental contamination and toxicology **35**(4): 680-687.

Galvan, G. L. (2015). "Efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo e gasolina: integrando relevantes organismos e biomarcadores."

Galvan, G. L., J. R. Lirola, K. Felisbino, T. Vicari, C. I. Yamamoto and M. M. Cestari (2016). "Genetic and Hematologic Endpoints in *Astyanax altiparanae*." Bulletin of environmental contamination and toxicology **97**(1): 63-70.

Garutti, V. and H. Britski (2000). "Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia." Comn. Mus. Cienc. Tecnol. **13**: 65-88.

Gauto, M. A., D. de Melo Apoluceno, M. C. Amaral and P. C. Auríquio (2016). Petróleo e gás: princípios de exploração, produção e refino, Bookman Editora.

Goldemberg, J. J. s. (2007). "Ethanol for a sustainable energy future." **315**(5813): 808-810.

Groves, F. R. J. E. s. and technology (1988). "Effect of cosolvents on the solubility of hydrocarbons in water." **22**(3): 282-286.

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

Heath, A. G. (1995). Water Pollution and Fish Physiology, Lewis Publishers.

Heermann, S. E. and S. E. J. J. o. C. H. Powers (1998). "Modeling the partitioning of BTEX in water-reformulated gasoline systems containing ethanol." **34**(4): 315-341.

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.

Horodesky, A., V. Abilhoa, T. de Oliveira Zeni, R. M. Neto, G. G. Castilho-Westphal and A. Ostrensky (2015). "Ecological analysis of the ichthyofaunal community ten years after a diesel oil spill at Serra do Mar, Paraná state, Brazil." Global Ecology and Conservation **4**: 311-320.

Hylland, K. (2006). "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems." Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A **69**(1-2): 109-123.

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.

Kaipper, B. I. A. (2003). "Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel."

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

Lombardi, J. (2004). "Fundamentos de toxicologia aquática." RANZANI-PAIVA, MJT; TAKEMOTO, RM; LIZAMA, MAP Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela: 263-272.

Luckenbach, T., M. Kilian, R. Triebkorn and A. Oberemm (2001). "Fish early life stage tests as a tool to assess embryotoxic potentials in small streams." Journal of aquatic ecosystem stress and recovery **8**(3-4): 355-370.

Luz, E. L. P., D. d. S. P. Silva, M. C. de Medeiros, A. P. X. de Gondra Bezerra, E. M. G. Lorena and Í. G. S. dos Santos (2016). "Pollution mitigation for hydrocarbons of petroleum through the bioremediation." Revista Geama **7**(1): 28-37.

Maceda, E. B., A. B. Grisolia, J. O. Vaini and L. S. Candido (2015). "Use of biomarkers for monitoring of waters from the Arara Stream in the city of Rio Brilhante, MS, Brazil." Revista Ambiente & Água **10**(1): 117-129.

Matozo, F., J. A. Turek and R. B. Noletto (2015). "Avaliação dos efeitos genotóxicos do fungicida Ridomil em *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes)." LUMINÁRIA **17**(01).

Mayer, F. L., M. R. Ellersieck and A. Asfaw (2010). Risk assessment tools: software and user's guide, SETAC Press.

McKim, J. M. (1977). "Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity." Journal of the Fisheries Board of Canada **34**(8): 1148-1154.

McLeod, H. C., J. W. Roy, G. F. Slater and J. E. J. J. o. c. h. Smith (2018). "Anaerobic biodegradation of dissolved ethanol in a pilot-scale sand aquifer: Variability in plume (redox) biogeochemistry." **208**: 35-45.

Meier, S., H. Craig Morton, G. Nyhammer, B. E. Grøsvik, V. Makhotin, A. Geffen, S. Boitsov, K. A. Kvestad, A. Böhne-Kjersem, A. Goksøyr, A. Folkvord, J. Klungsøyr and A. Svoldal (2010). "Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water during early life stages: Effects on embryos, larvae, and juvenile fish." Marine Environmental Research **70**(5): 383-394.

Mela, M., I. Guiloski, H. Doria, M. Randi, C. de Oliveira Ribeiro, L. Pereira, A. Maraschi, V. Prodocimo, C. Freire and H. S. de Assis (2013). "Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*)." Ecotoxicology and environmental safety **93**: 13-21.

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

Neff, J. M. (1985). Polycyclic aromatic hydrocarbons. Fundamentals Aquatic Toxicology. G. M. Rand and S. R. Petrocelli. Bristol, PA, Taylor & Francis: 416-454.

Neff, J. M., S. Ostazeski, W. Gardiner and I. Stejskal (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.

Nicodem, D. E., C. L. Guedes, M. C. Z. Fernandes, D. Severino, R. J. Correa, M. C. Coutinho and J. Silva (2001). "Photochemistry of petroleum." Progress in Reaction Kinetics and Mechanism **26**(2-3): 219-238.

Nogueira, D. J., S. C. d. Castro and O. R. d. Sá (2009). Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas – MG. Revista Brasileira de Zoociências. Juiz de Fora, MG, Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. **11 (3)**: 237-232.

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

Osório, F. H. T. (2016). "Validação do gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) como bioindicador de testes ecotoxicológicos."

Ostrensky, A., A. S. Pedrazzani and A. L. Vicente (2015). "Use of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and propofol (2, 6-diisopropylphenol) as anaesthetics for the tetra *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae)." Aquaculture Research.

Paiva Magalhaes, D. and A. Ferrao-Filho (2008). "A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos." Oecologia brasiliensis **12(3)**: 3.

Pamplona, J., E. Oba, T. Da Silva, L. Ramos, W. Ramsdorf, M. Cestari, C. O. Ribeiro, A. Zamprônio and H. S. de Assis (2011). "Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*." Ecotoxicology and environmental safety **74(3)**: 342-349.

Pauka, L. M. (2007). "Avaliação dos efeitos embriotóxicos e da biotransformação da fração solúvel do petróleo em água em peixe zebra (*Danio rerio*-Hamilton, 1822)."

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.

Rama, F., D. T. Ramos, J. B. Müller, H. X. Corseuil and K. J. J. o. c. h. Miotliński (2019). "Flow field dynamics and high ethanol content in gasohol blends enhance BTEX migration and biodegradation in groundwater."

Ramachandran, S. D., M. J. Sweezey, P. V. Hodson, M. Boudreau, S. C. Courtenay, K. Lee, T. King and J. A. Dixon (2006). "Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil." Marine pollution bulletin **52(10)**: 1182-1189.

Rodrigues, R. V., K. C. Miranda-Filho, E. P. Gusmão, C. B. Moreira, L. A. Romano and L. A. Sampaio (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.

Rodrigues, R. V., K. C. Miranda-Filho, E. P. Gusmão, C. B. Moreira, L. A. Romano and L. A. Sampaio (2010). "Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae." Science of The Total Environment **408(9)**: 2054-2059.

Saeed, T. and M. Al-Mutairi (1999). "Chemical composition of the water-soluble fraction of the leaded gasolines in seawater." Environment International **25**(1): 117-129.

Santos, M. P. d. (2017). "Androgênese em *Astyanax altiparanae*: ferramenta de reconstituição em peixes."

Schulz, U. H. and H. Martins-Júnior (2001). "*Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil." Brasilian Journal of Biology **61**(4): 615-622.

Silva, R. R. P. d., O. R. Pires Junior and C. K. Grisolia (2010). "Toxicity and genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) induced by microcystins from a bloom of *Microcystis* spp." Genetics and molecular biology **33**(4): 750-755.

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

Singer, M., D. Aurand, G. Bragin, J. Clark, G. Coelho, M. Sowby and R. Tjeerdema (2000). "Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing." Marine Pollution Bulletin **40**(11): 1007-1016.

Stephens, S., A. Alkindi, C. Waring and J. Brown (1997). "Corticosteroid and thyroid responses of larval and juvenile turbot exposed to the water-soluble fraction of crude oil." Journal of fish Biology **50**(5): 953-964.

Stevanato, D. J. and A. Ostrensky (2018). "Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae)." Neotropical Ichthyology **16**.

Van der Oost, R., J. Beyer and N. P. E. Vermeulen (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." Environmental Toxicology and Pharmacology **13**(2): 57-149.

Vicente, A. L. (2014). Uso de óleos essenciais e de compostos sintéticos como agentes anestésicos para o lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000), Universidade Federal do Paraná.

Walker, C. H., R. Sibly, S. Hopkin and D. B. Peakall (2012). Principles of ecotoxicology, CRC press.

Zambonino Infante, J. L. and C. L. Cahu (2001). "Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **130**(4): 477-487.

Zhang, H.-Y., Q. Ji and Y. Fan (2015). "What drives the formation of global oil trade patterns?" Energy Economics **49**: 639-648.

Ziulli, R. L. (2009). "Aspectos ambientais envolvidos na poluição marinha por petróleo." Revista Saúde e Ambiente **3**(2): 32-41.

CAPÍTULO 2. EFEITOS SUBLETAIS DA EXPOSIÇÃO DE EMBRIÕES E LARVAS DE *Astyanax lacustris* (PISCES, CHARACIFORMES) ÀS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM ÁGUA DA GASOLINA, DO PETRÓLEO E DE UM ÓLEO MINERAL LUBRIFICANTE

Antonio Ostrensky¹, Marco Tadeu Grassi², Fernanda Thaline³, Raphaela Toniolo³, Rafael Garrett Dolatto², Diego Junqueira Stevanato^{4*}

¹Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA-UFPR), Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba-PR, Brasil.

²Grupo de Química Ambiental (GQA-UFPR), Universidade Federal do Paraná, Avenida Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 100, Curitiba-PR, Brasil.

³Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba-PR, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba-PR, Brasil.

*Autor correspondente: diegozootecunesp@hotmail.com.

RESUMO

Embora existam muitos estudos descrevendo os efeitos de hidrocarbonetos derivados do petróleo em peixes, pouco se sabe sobre as consequências da presença desses compostos nos ecossistemas continentais e os seus efeitos sobre espécies neotropicais. O presente trabalho avaliou os efeitos subletais no desenvolvimento ontogenético inicial do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax lacustris* após exposição às frações solúveis em água (FSA) da gasolina, petróleo e óleo lubrificante inibido. Foram realizados dois ensaios em condições laboratoriais controladas, sendo um envolvendo embriões e o outro larvas de *A. lacustris*. Em ambos os casos, os exemplares foram expostos a 0,04% da fração solúvel em água da gasolina (FSA_G), 34,79% do óleo mineral (FSA_{OM}) e 50,88% do petróleo (FSA_P). Os organismos-teste foram mantidos individualmente em placas de cultivo celular de 6 poços, totalizando 60 exemplares em cada concentração-teste, além de 12 exemplares no grupo controle. A temperatura da água foi ajustada em 25°C. Diariamente, foram mensurados os parâmetros de qualidade da água e realizadas análises morfométricas e merísticas dos exemplares, além do registro de *endpoints*. A exposição ao petróleo e derivados, mesmo quando em baixas concentrações, ocasionou efeitos subletais e letais aos embriões e larvas. A FSA_G foi a que apresentou maiores concentrações de hidrocarbonetos e também a que provocou maiores danos aos organismos testados. Entre as alterações mais frequentes estão lesões nas nadadeiras e edemas cardíacos, que foram registrados em 36,7% dos exemplares expostos. A FSA do petróleo ocasionou efeitos semelhantes aos da gasolina e a FSA do óleo mineral foi a que apresentou menores efeitos. Ainda assim, este produto provocou a mortalidade de 15,8% dos embriões a ele expostos. O estudo identificou a ocorrência de efeitos específicos, causados por cada um dos produtos testados nos dois estágios de desenvolvimento ontogenético da espécie estudada.

Palavras-chave: *endpoints*, hidrocarbonetos, qualidade da água, mortalidade

10 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, ecossistemas aquáticos vêm progressivamente sofrendo impactos decorrentes de ações antrópicas, dentre eles, os aportes de hidrocarbonetos associados aos mais diversos tipos de acidentes ambientais envolvendo a cadeia produtiva do petróleo e derivados (Pedrozo, Barbosa et al. 2002, Incardona, Collier et al. 2004, Silva 2013, Dupuis e Ucan-Marin 2015, Azevedo-Santos, Garcia-Ayala et al. 2016, Luz, Silva et al. 2016).

Quando os hidrocarbonetos de petróleo alcançam os corpos d'água, as consequências para a ictiofauna podem ser severas (Nicodem, Guedes et al. 1997, Nicodem, Guedes et al. 2001, Pacheco e Santos 2001, Verlecar, Desai et al. 2006, Boehmer-Christiansen 2008). Tais compostos podem provocar mortalidades (Zhang, Shen et al. 2003, Zhang, Qin et al. 2003, Ingole, Sivadas et al. 2006) ou ocasionar eventos subletais (Meniconi, Gabardo et al. 2002, Cariello 2012, Perrichon, Le Menach et al. 2016), comprometendo tanto o desenvolvimento ontogenético dos organismos afetados (Sibaúba-Tavares 1995, Meier, Craig Morton et al. 2010, Cherr, Fairbairn et al. 2017), como a sua reprodução (Kime 1995, Malins 2013, Galvan, Lirola et al. 2016).

Os efeitos biológicos e toxicológicos dos hidrocarbonetos estão principalmente relacionados à sua disponibilidade no meio aquático (Kettrup, Schramm et al. 1999, Saeed e Al-Mutairi 1999, Nicodem, Guedes et al. 2001, Teas, Kalligeros et al. 2001, Hodson 2017); sua persistência (Neff 1979, Sandrini Neto 2015); sua capacidade de bioacumular nos organismos vivos (Neff, Cox et al. 1976, Pinto 2013), além da intensidade e do tempo de exposição (Sandrini Neto 2015). Mesmo com os avanços científicos vivenciados na área da toxicologia ambiental, ainda é muito difícil prever quanto tempo será necessário para que os processos naturais sejam integralmente reestabelecidos após acidentes envolvendo petróleo e derivados (ITPOF 2012).

Os peixes, em geral, estão sendo cada vez mais usados como organismos indicadores da qualidade ambiental (Chovanec, Hofer et al. 2003, Akaishi 2012, Silva 2013, Cherr, Fairbairn et al. 2017), fornecendo informações necessárias para a compreensão dos efeitos agudos e crônicos de acidentes envolvendo derivados de petróleo em ecossistemas aquáticos (Lins, Kirschnik et al. 2010, Meier, Craig Morton et al. 2010, Cherr, Fairbairn et al. 2017). Estudos na área de ecotoxicologia aquática, principalmente aqueles com foco em espécies nativas neotropicais, têm se tornado

ferramentas importantes para a compreensão desses processos e também servido como ponto de partida para valoração e o estabelecimento de programas de mitigação ambiental pós-acidentes (Dal Pont 2012). Neste contexto, estudos abrangendo as fases ontogenéticas iniciais de vida dos peixes têm ganhado destaque (Incardona, Carls et al. 2015, Cherr, Fairbairn et al. 2016). Isso acontece pela maior suscetibilidade apresentada por esses organismos durante seu desenvolvimento embrionário e larval, quando comparados aos indivíduos juvenis ou adultos (Eaton, McKim et al. 1978, Incardona, Collier et al. 2004, Hallare, Nagel et al. 2006, Alves, da Silva et al. 2016).

Embora existam diversos estudos que discutam as implicações dos efeitos de hidrocarbonetos derivados de petróleo em peixes (Ostrensky, Boeger et al. 2003, Incardona, Swarts et al. 2013, Jung, Hicken et al. 2013, Bettim, Galvan et al. 2016, Perrichon, Le Menach et al. 2016, Berenguer, da Cunha Moraes et al. 2017, Cherr, Fairbairn et al. 2017), pouco se sabe sobre os efeitos subcrônicos desses compostos no desenvolvimento embrio-larval de espécies neotropicais.

O lambari *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875), sinonímia de *A. altiparanae* (Garutti e Britski 2000), apresenta tolerância relativamente elevada à poluição ambiental (Schulz e Martins-Júnior 2001, Vicente 2014). A espécie vem sendo utilizada em bioensaios de monitoramento da toxicidade ambiental (Ghisi e Oliveira 2013, Horodesky, Abilhoa et al. 2015, Maceda, Grisolia et al. 2015); em processos de mitigação de ambientes contaminados por agrotóxicos (Costa-Silva, Nunes et al. 2015, Matozo, Turek et al. 2015) e metais pesados (Winkaler, das Graças Silva et al. 2008, Santos Filho, Rezende et al. 2014, Dourado, Rocha et al. 2016); e na valoração de danos ocasionados por acidentes envolvendo combustíveis e outros derivados de petróleo (Akaishi, De Assis et al. 2004, Horodesky, Abilhoa et al. 2015, Dal Pont 2018).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos subletais da fração solúvel em água (FSA) do petróleo, da gasolina e de um óleo mineral lubrificante, sobre o desenvolvimento ontogenético inicial de embriões e larvas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax lacustris*.

11 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisas 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.

11.1. Produtos testados

Os produtos testados em bioensaios laboratoriais foram: petróleo cru (25,6° API), fornecido pela Refinaria Getúlio Vargas (TQ 4109), Araucária, Brasil; a gasolina comercial brasileira, adquirida em um posto de combustíveis em Curitiba – PR, com etanol (27%); e um óleo mineral lubrificante inibido.

11.2. Preparação das frações solúveis em água (FSA)

A fração solúvel em água (FSA) foi obtida de acordo com a metodologia proposta por Anderson, Neff et al. (1974), com alterações. Cada um dos produtos foi individualmente misturado em água previamente clorada com hipoclorito 10% e neutralizada com tiosulfato de sódio 50% (relação 1:9), em um frasco do tipo Mariotte. Em seguida, a mistura foi lentamente agitada, com auxílio de um agitador magnético (114, Nova Ética), por 22 horas. Após este período, a amostra foi mantida sem agitação por 1 hora, para que assim fosse possível separar a FSA do sobrenadante.

A caracterização geoquímica da fração solúvel em água do petróleo (FSA_P), da gasolina (FSA_G), e do óleo mineral lubrificante (FSA_{OM}), foi realizada no laboratório de Análises Ambientais do Grupo de Química Ambiental da Universidade Federal do Paraná, através da quantificação por extração líquido-líquido (EPA 1996), seguida por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (EPA 1996). Para isso foi utilizado um espectrofotômetro de massa (CG-EM/Focus-PolarisQ), acoplado a um auto amostrador (AS 3000/Thermo Electron Corporation). A identificação de cada composto foi feita por comparação com uma solução padrão, contendo uma mistura de 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (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 monocíclicos aromáticos (BTEX) foi realizada diretamente, via *Head space*, acoplado à cromatografia em fase gasosa (TraceGC ultra), com detecção por fotoionização e ionização em chama. 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.

11.3. Bioensaios

Os bioensaios foram realizados com embriões e larvas de *A. lacustris* obtidos de desovas induzidas realizadas nos laboratórios do GIA. Foram utilizados 17 machos ($13,8 \pm 1,9$ g) e 10 fêmeas ($20,7 \pm 2,8$ g), selecionados 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 (1000 UI/kg) de gonadorelina coriônica humana (HCG) para a indução da ovulação e da espermição. Após a aplicação do hormônio, os indivíduos foram acondicionados em aquários de 25 litros, com água mantida a 25 °C com auxílio de dois aquecedores de 200 watts cada (BOYU, Taiwan), até a liberação dos gametas e fertilização dos óvulos.

Foram realizados dois testes de exposição por 96 h, sendo um com embriões e outro com larvas de *A. lacustris*. As concentrações testadas para os embriões foram: 0,04% da FSA_G, 31,61% da FSA_{OM} e 50,88% da FSA_P. Para as larvas, as concentrações foram: 0,80% da FSA_G, 100% da FSA_{OM} e 95,52% da FSA_P. Além disso, foi utilizado um grupo controle positivo, no qual os animais foram mantidos em água sem nenhum tipo de contaminante. As concentrações das respectivas FSA foram definidas a partir de um estudo prévio¹ que calculou a CL₁₀ e CL₅₀ para larvas e embriões da espécie.

A água de torneira utilizada para diluição das FSA de cada composto foi previamente filtrada em filtro poliéster de 45 µm, clorada e neutralizada com tiosulfato de sódio. Antes de ser usada nos experimentos, a água era mantida em uma incubadora tipo DBO (SL-200, Adamo), até que atingisse a temperatura do experimento (25°C).

Em ambos os experimentos, os organismos-teste foram alojados individualmente em placas de cultivo celular de seis poços (Kasvi®, China), com

¹ Stevanato, D. J., F. S. Vidal, R. G. Dolatto, M. T. Grassi and A. Ostrensky (in preparation). "Acute toxicity of petroleum and derivatives to *Astyanax lacustris* (Pisces, Characidae) at the embryonic and larval stages"

volume útil de 17 ml em cada poço, totalizando 60 exemplares para cada fração testada, além de um grupo controle com 12 exemplares, mantido em placas contendo água limpa. As placas foram acondicionadas em uma incubadora do tipo BOD SL-200 (Adamo, Brasil), com fotoperíodo ajustado para 12 h luz e 12 h escuro, com intensidade luminosa entre 700 a 900 lux controlada por um módulo dimmer rotativo e ajustada com auxílio de um luxímetro digital MLM-1010 (Minipa, Brasil), e temperatura controlada e ajustada a 25 °C.

11.4. Avaliação morfométrica e merística

A identificação dos organismos mortos ou que apresentavam anomalias morfológicas e funcionais foi realizada e registrada diariamente. As anomalias foram classificadas segundo os critérios propostos por Perrichon, Le Menach et al. (2016), com modificações: 1. Edemas (efusão pericárdica, 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.

Diariamente as placas de cultivo eram retiradas individualmente da incubadora e cada poço era sifonado, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, em 15 ml do seu volume, conforme preconiza a NBR 12715 (ABNT 2011), com modificações. Neste momento, aproveitava-se o baixo volume de solução-teste nas placas de cultivo para realização de observações e de análises morfométricas individuais de cada exemplar. As análises eram realizadas com auxílio de estereomicroscópio óptico Discovery V8 (ZEISS, Alemanha), acoplado a uma câmera digital L3CMOS Series C-mount (ToupCam®, China). 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:

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

Ao término das observações, o volume original de água em cada poço era renovado e as placas novamente tampadas, transferidas para a incubadora e mantidas até o período subsequente de observação.

Adicionalmente, foi realizada a contagem de batimentos cardíacos (batimentos por min - bpm) de 12 embriões e 12 larvas de cada tratamento, além dos exemplares do grupo controle. No caso dos embriões, a contagem ocorreu após 48 h de exposição, momento em que, segundo Stevanato e Ostrensky (2018), é possível a visualização das estruturas cardíacas e também quando a pigmentação sanguínea para esta espécie está completa. Neste período, também a cada duas horas, outros 12 embriões eram observados com auxílio de microscópio óptico DMLS (Leica®, Alemanha), para avaliação da taxa de absorção da reserva vitelínica.

11.5. Qualidade da água

Diariamente, a água sifonada dos poços de cada placa de cultivo era transferida para béqueres de vidro de 250 ml, permitindo a obtenção de amostras compostas de cada tratamento. Essas amostras eram então analisadas para quantificação dos seguintes parâmetros físicos e químicos: pH, através de peagâmetro digital LAQUAtwin B-713 (Horiba, Japão); oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e percentual de saturação de oxigênio (%), por meio de oxímetro digital Pro20 (YSI, EUA), alcalinidade, mensurada por titulometria com ácido sulfúrico 0,02N (APHA 2005), amônia total [$\text{N-AT} = \text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$], obtida pelo método do indofenol (APHA 2005) e nitrito (APHA 1995). A leitura das concentrações de amônia e nitrito foi feita em espectrofotômetro de bancada SpectraMax® M5 (Molecular Devices, EUA). Após os procedimentos analíticos, todo material utilizado era submetido ao processo de limpeza seguindo os procedimentos descritos na NBR 15308/2005, na resolução brasileira 393/2007 de legislações ambientais de toxicidade e EPA (2002), com modificações. Para isso, o material era deixado imerso em água de torneira por 15 min; submetido à lavagem dupla com detergente neutro; enxaguado duplamente com água de torneira; deixado em solução de ácido clorídrico 10% por 24 h; submetido a limpeza em ultrassom digital CD-4860 (Kondortech, Brasil) por 45 min; enxaguado duplamente com água de torneira; e submetido a enxague triplo em água destilada.

11.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram armazenados e organizados em planilhas e banco de dados gerados através do uso dos *softwares* Excel® e Access® (Microsoft Office Professional Plus 2016). Os dados de qualidade da água e biométricos foram

analisados através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido pelo teste Tukey. A sobrevivência dos indivíduos nos diferentes tratamentos foi representada pela curva de Kaplan-Meier. As análises foram realizadas utilizando-se o *software* Statsoft Statistica^{MR} versão 12.0[®].

12 RESULTADOS

As concentrações de BTEX e HPA da FSA_G, FSA_P e FSA_{OM} utilizadas nos bioensaios com *A. lacustris* estão apresentadas na Tabela 7. A FSA_G foi a que apresentou maiores concentrações de hidrocarbonetos em sua fração solúvel, totalizando 11.478,20 µg L⁻¹. Essa fração apresentou concentrações de BTEX 5,6 vezes maiores que as quantificadas na FSA_P e 115,5 vezes superiores às da FSA_{OM}. Nenhum dos produtos testados apresentou concentração igual ou superior ao limite mínimo de detecção analítico (<0,25 µg L⁻¹) para o acenafteno, antraceno e para o benzo[a]antraceno. A FSA_G foi a fração que apresentou as maiores concentrações de HPAs e a FSA_{OM} as menores concentrações, sendo que, na fração contendo óleo mineral, foi possível quantificar somente as concentrações de acenaftaleno, benzo[a]fluoranteno e benzo[a]pireno.

Tabela 8. Concentração (µg L⁻¹) de hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX) e policíclicos aromáticos (HPA) da fração solúvel em água da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P) e do óleo mineral (FSA_{OM}), utilizados nos bioensaios com *Astyanax lacustris*.

Hidrocarboneto	FSA _G	FSA _P	FSA _{OM}
Benzeno	5.827	640	15
Etilbenzeno	1.020	690	16
Tolueno	990	510	18
Xileno	1.889	100	27
m+p+xileno	1.711	104	23
Σ BTEX	11.437	2.044	99
Acenaftaleno	<0,25	<0,25	<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	6,00	<0,25
Benzo[a]pireno	<0,25	5,60	<0,25
Benzo[ghi]pirileno	1,50	<0,25	<0,25

Hidrocarboneto	FSA_G	FSA_P	FSA_{OM}
Benzo[k]fluoranteno	1,20	1,60	<0,25
Criseno	3,80	0,30	<0,25
Dibenzo[a,h]antraceno	4,60	0,50	<0,25
Fenantreno	5,50	1,30	0,29
Fluoranteno	4,60	1,10	<0,25
Fluoreno	4,20	1,00	<0,25
Indeno[1,2,3-cd]pireno	5,20	<0,25	0,30
Naftaleno	5,30	1,20	0,32
Pireno	5,30	1,10	0,26
Σ HPA	41,20	19,70	1,17

*Limite de quantificação (LOQ) HPA = 0,25 µg L⁻¹.

Nenhum exemplar do grupo controle morreu durante o período experimental (96 h), tanto no teste com embriões, quanto com larvas. Observou-se mortalidade de embriões já nas primeiras 24 h de exposição à FSA_G (19,5%), FSA_P (14,6%) e FSA_{OM} (3,8%), mas não se observou a morte de nenhuma larva neste período. Após 48 h de exposição, 11% das larvas expostas à FSA_G e 6% à FSA_P morreram. Já as larvas expostas à FSA_{OM} somente começaram a apresentar mortalidade após 72 horas de exposição. A taxa de sobrevivência dos embriões ao final do período experimental (96 h) foi de 34,7 ± 0,1% (média ± erro padrão) para os exemplares expostos à FSA_G, 51,6 ± 0,1% para os animais expostos a FSA_P e, 74,5 ± 0,1% para os expostos a FSA_{OM}. Já para as larvas expostas a FSA_G foi de 61,7 ± 0,1%, para a FSA_P foi de 65,9 ± 0,1% e para a FSA_{OM} foi de 84,2 ± 0,1% (Figura 5).

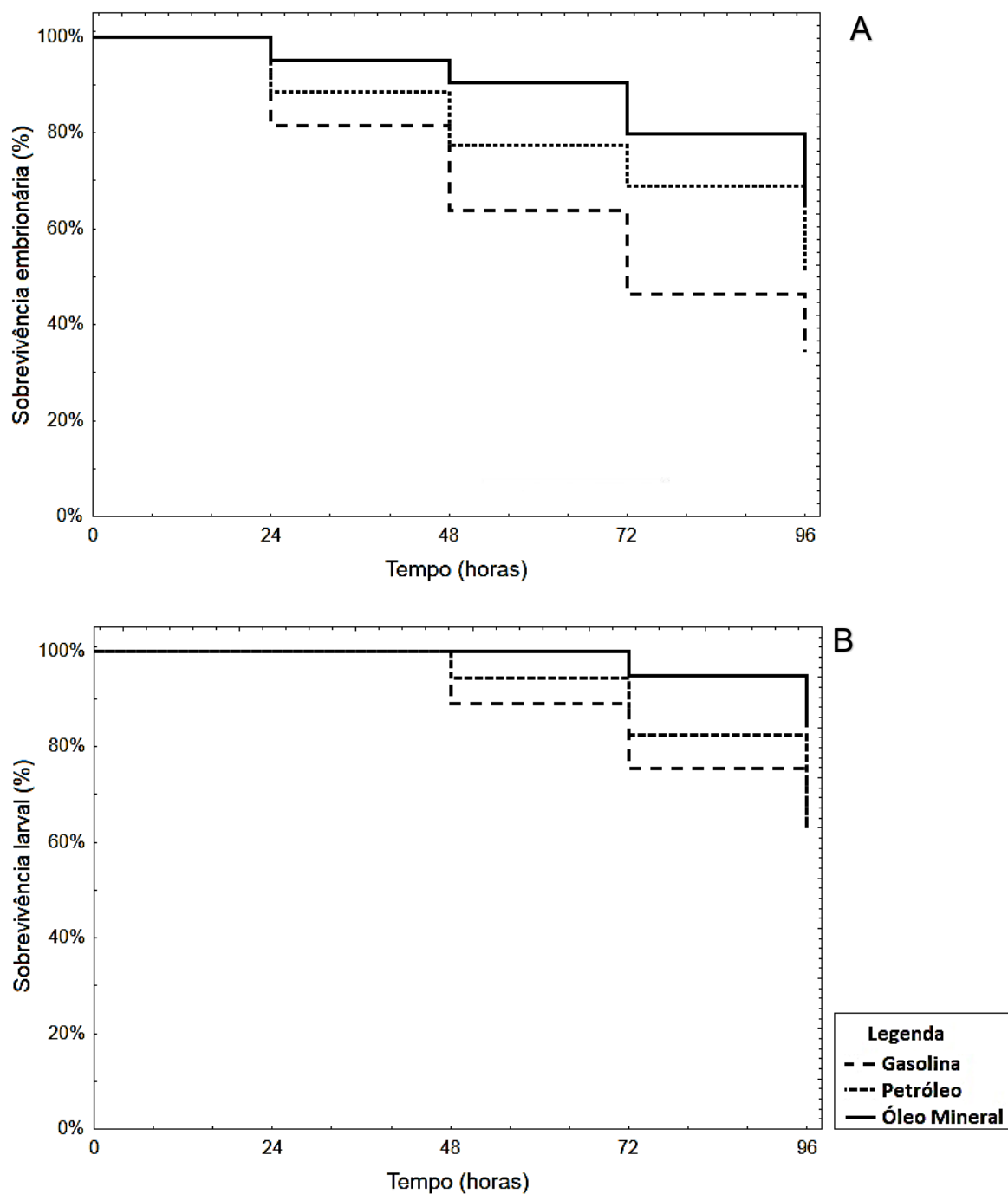


Figura 7. Taxa de sobrevivência (%) de embriões (A) e larvas (B) de *Astyanax lacustris* expostos à fração solúvel em água da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P) e do óleo mineral (FSA_{OM}) durante o período de 96 horas.

A exposição à FSA de cada produto testado gerou mais efeitos negativos em embriões do que em larvas. Os sinais mais evidentes de anomalias foram identificados em relação às deformações nas nadadeiras e no coração, neste último caso, na forma de edemas pericárdicos (Tabela 8). Disfunções no pericárdio foram observadas em

36,6% dos embriões expostos à FSA_G e em 30% dos embriões expostos a FSA_P, não sendo observada em nenhum embrião exposto a FSA_{OM} (Figura 6).

A exposição à FSA_P ocasionou um maior número de deformações na nadadeira caudal dos embriões. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) no tempo de absorção da reserva vitelínica entre os tratamentos. Embriões expostos à FSA_G e à FSA_P absorveram suas reservas mais rapidamente que os animais dos demais tratamentos, além de apresentarem um menor número de batimentos cardíacos. Exemplares expostos à FSA_{OM} não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao número de batimentos cardíacos quantificado no grupo controle.

Tabela 9. Parâmetros mensurados durante a exposição crônica de embriões (n=30) e larvas (n=30) de *Astyanax lacustris* à fração solúvel em água da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P) e do óleo mineral (FSA_{OM}) durante o período de 96 horas.

Parâmetro	Controle	FSA _G		FSA _P		FSA _{OM}	
		Embriões	Larvas	Embriões	Larvas	Embriões	Larvas
Anemia	0	9	4	6	1	0	0
Ausência Nadadeira Caudal	0	16	3	7	4	2	0
Edema no pericárdio	0	11	0	9	0	0	0
Edema no saco vitelínico	0	4	6	5	4	2	0
Malformação nas nadadeiras	0	1	17	13	7	3	1
Malformação anal	0	6	0	7	0	0	0
Malformação da boca	0	2	0	3	0	0	0
Malformação da cabeça	0	2	0	4	0	0	0
Malformação da notocorda	0	8	7	5	4	2	1
Pigmentação do corpo	0	1	0	5	0	0	0
Mortalidade a eclosão	0	8	0	6	0	3	0
Batimentos cardíacos (bpm) ¹	128 ^a (126 - 131)	117 ^b (114 - 119)	128 ^a (126 - 131)	119 ^b (117 - 121)	129 ^a (126 - 131)	128 ^a (126 - 131)	130 ^a (126 - 131)
Comprimento total (mm) ²	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 ^a	0,50 ± 0,04 ^c	0,70 ± 0,11 ^a	0,52 ± 0,10 ^{bc}	0,69 ± 0,09 ^{ab}	0,69 ± 0,08 ^{ab}	0,67 ± 0,12 ^{ab}
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 ³)	0,07 ± 0,02 ^a	0,05 ± 0,01 ^b	0,06 ± 0,02 ^a	0,06 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,02 ^a	0,07 ± 0,02 ^a	0,07 ± 0,02 ^a
Absorção da reserva (horas) ¹	74 ^a (62 - 78)	56 ^b (52 - 60)	60 ^{ab} (54 - 70)	57 ^b (52 - 60)	68 ^{ab} (56 - 70)	65 ^{ab} (58 - 74)	76 ^{ab} (52 - 76)

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



Figura 8. Principais malformações relatadas após a exposição de *Astyanax lacustris* a diferentes derivados de petróleo. Setas indicam a região pericárdica de *A. lacustris*: A) Exemplar do grupo controle apresentando desenvolvimento normal para a espécie; B) exemplar exposto a FSA_P apresentando início de edema cardíaco; C) exemplar exposto à fração solúvel em água da gasolina (FSA_G) apresentando edema cardíaco (a); D) exemplar exposto à fração solúvel em água do petróleo (FSA_P) apresentando malformação na porção final da notocorda e na nadadeira caudal (b); E) exemplar exposto à fração solúvel em água da gasolina (FSA_G) com deformação na cabeça (c) e na nadadeira caudal (d); F) exemplar exposto à fração solúvel em água do petróleo (FSA_P) apresentando deformação na nadadeira caudal (e).

Houve uma tendência, registrada em todos os tratamentos experimentais, de queda nas concentrações absolutas e relativas de oxigênio dissolvido bem como na alcalinidade da água das placas de cultivo, em relação aos valores quantificados na água usada para a reposição diária das concentrações-teste.

Observou-se uma leve tendência de acidificação da água em todos os tratamentos em relação à água de reposição. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas concentrações dos compostos nitrogenados presentes na água dos tratamentos com embriões. Já na água em que foram mantidas as larvas, houve uma tendência de aumento das concentrações de amônia em relação à água de reposição. Não houve diferença estatística entre a água do grupo controle e a água dos tratamentos experimentais (Tabela 9).

Tabela 10. Parâmetros indicativos da qualidade da água monitorados durante a exposição subcrônica de embriões e larvas de *Astyanax lacustris* as frações solúveis em água de gasolina (FSA_G), petróleo (FSA_P) e óleo mineral (FSA_{OM}).

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

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

13 DISCUSSÃO

O fato de todos os indivíduos do grupo controle terem sobrevivido até o final dos experimentos evidencia que, tanto os parâmetros monitorados de qualidade da água, como as condições experimentais, além do inevitável manejo individual dos organismos nas placas de cultivo celular, não foram fatores preponderantes na definição das taxas finais de sobrevivência obtidas nos tratamentos experimentais. A ocorrência de mortalidade seria naturalmente esperada pela própria dinâmica experimental e pelo elevado nível de manipulação dos animais em fases tão frágeis de vida como são as fases embrionárias e larvais de peixes (Ramos, Cabral et al. 2015, Cherr, Fairbairn et al. 2016, Stevanato e Ostrensky 2018).

Por outro lado, a exposição aos derivados de petróleo aqui testados, mesmo que em baixas concentrações, ocasionaram efeitos subletais e letais. A toxicidade de cada fração solúvel foi fortemente associada ao seu perfil químico. Por exemplo, os hidrocarbonetos de maior massa molar, como os principais HPAs aqui quantificados, dificilmente tendem a bioacumular nos tecidos dos organismos após um curto período de exposição (van der Oost, Beyer et al. 2003, Neff, Bence et al. 2006, Liang, Tse et al. 2007, Nesto, Romano et al. 2007, Perugini, Visciano et al. 2007), o que dificilmente aconteceria aqui neste trabalho no qual a exposição foi de 96 horas.

Já os componentes de baixa massa molar, com destaque para o benzeno, são amplamente estudados na ecotoxicologia (Meyerhoff 1975, Vandermeulen e Hrudey 1987, Lockhart, Wagemann et al. 1992, Das e Chandran 2011, Dal Pont, Souza-Bastos et al. 2019). Sabe-se que há uma grande associação entre a sua rápida velocidade de absorção pelos organismos (Valdez Domingos, Oliveira Ribeiro et al. 2011) e um alto poder de bioacumulação (Neff, Cox et al. 1976, Anderson 1979, Pinto 2013). Isso se deve ao fato desses compostos possuírem características lipofílicas e atravessarem com facilidade as membranas biológicas.

A bioacumulação pode ser ainda mais crítica nas fases iniciais da vida dos peixes, pois os hidrocarbonetos podem se acumular em ovos e as consequências podem ser ainda piores após a eclosão dos embriões, que é

quando geralmente notam-se os efeitos mais evidentes da exposição (Goksøyr, Larsen et al. 1991, Goksøyr e Förlin 1992, Meier, Craig Morton et al. 2010, Incardona, Vines et al. 2012, Incardona, Swarts et al. 2013). As fases embrionárias também são reconhecidamente suscetíveis a impactos causados pela exposição a hidrocarbonetos, como documentado por Lema, Schultz et al. (2007), que relataram diversos problemas no desenvolvimento embrionário de *Danio rerio* expostos aos derivados de petróleo, evidenciando, por exemplo, o decréscimo na taxa de crescimento, a ocorrência de teratogenia e principalmente alterações e disfunções cardíacas. Essas mesmas alterações já foram relatadas em outras espécies expostas a derivados do petróleo (Middaugh, Shelton et al. 1998, Vines, Robbins et al. 2000, Cook, Robbins et al. 2003).

Segundo Incardona, Swarts et al. (2013) e Hodson (2017), malformações cardíacas são comuns em indivíduos expostos à xenobiontes, sendo o coração um dos órgãos mais avaliados nos testes de toxicidade com hidrocarbonetos derivados do petróleo. A gravidade e a natureza dos problemas cardíacos no desenvolvimento embrionário variam de acordo com o tipo (Incardona, Collier et al. 2004, Hicken, Linbo et al. 2011, Staudt e Stainier 2012, Jung, Hicken et al. 2013), com a quantidade ou com tempo de exposição aos hidrocarbonetos (Lema, Schultz et al. 2007, Incardona, Linbo et al. 2011, Cherr, Fairbairn et al. 2016). No presente estudo, foi possível observar o surgimento de edemas no saco vitelínico e no pericárdio durante o desenvolvimento embrionário. Destaca-se que a visualização e diferenciação do que é o edema de saco vitelínico e de pericárdio é muito complicado quando se analisa embriões. À medida em que esses mesmos indivíduos se desenvolviam morfológicamente, observava-se um agravamento dessas malformações, possibilitando-se somente na fase subsequente de ontogenia (larval), identificar e quantificar o respectivo edema. Nota-se que neste trabalho, as disfunções no pericárdio foram observadas apenas em exemplares expostos à FSA_G e à FSA_P, e nada foi constatado em exemplares do grupo controle e nem nos exemplares expostos à FSA_{OM}.

Além do crescimento anormal do pericárdio de embriões, anomalias no batimento cardíaco também foram registradas em animais expostos à FSA_P e à FSA_G. Para Lema, Schultz et al. (2007), Incardona, Carls et al. (2008) e Hicken, Linbo et al. (2011), a arritmia cardíaca é a primeira consequência da exposição

de embriões a agentes xenobiontes, uma vez que, morfológicamente, os embriões são limitados e, a região cardíaca é pouca afetada pelas bruscas metamorfoses durante o desenvolvimento ontogenético.

Hicken, Linbo et al. (2011) sugerem que a arritmia cardíaca pode ser classificada como efeito letal e não subletal, pois a insuficiência circulatória pode acarretar em outros impactos muito mais severos, influenciando diretamente na mortalidade larval. Consequências diretas da arritmia cardíaca também foram descritas por Strmac, Oberemm et al. (2002) e Perrichon, Le Menach et al. (2016), que estudaram embriões de *D. rerio* expostos à FSA_P e relataram que, além de aumentar o número de batimentos cardíacos, grande parte dos indivíduos afetados evoluíram para bradicardia, fato este também observado por Magnuson, M. Bautista et al. (2020), o que pode aumentar significativamente as taxas de mortalidade.

Esse fato também foi observado e descrito por Incardona, Vines et al. (2012), que relataram a ocorrência de arritmia em larvas de *D. rerio* durante a exposição à FSA_P e que, após um determinado período, também evoluiu para bradicardia. Esse mesmo efeito foi constatado neste estudo com as larvas que foram expostas durante a fase embrionária. Houve uma redução de 8,6% na taxa de batimentos cardíacos em exemplares expostos à FSA_G e 7,8% em animais expostos à FSA_P, ambos em relação ao grupo controle e ao já relatado para esta espécie em estudo realizado por Stevanato e Ostrensky (2018). Uma alteração na taxa de batimentos cardíacos poderia justificar na diferença encontrada no tempo decorrido para o consumo das reservas vitelínicas observado nos exemplares que apresentaram tal anomalia, embora isso não signifique obrigatoriamente que o maior consumo de vitelo estivesse apenas relacionado às anomalias cardíacas.

Os edemas identificados no saco vitelínico tornaram-se cada vez maiores e mais evidentes após 48 horas de exposição, oprimindo o conteúdo vitelínico, e dificultando a visualização da reserva vitelínica a partir de 60 horas. A absorção completa da reserva vitelínica de *A. lacustris* pode apresentar variações entre 18 horas após a eclosão (hpe) (Castilho-Almeida 2014) a 74 hpe (Stevanato e Ostrensky 2018), mas vale ressaltar que, nas condições laboratoriais, o contato contínuo com o agente xenobiótico certamente influenciou o tempo de absorção,

uma vez que agentes externos agem diretamente no metabolismo, acarretando em uma proporcional variação temporal nesse evento ontogenético em relação aos exemplares do grupo controle.

Embora tenham sido registradas grandes variações individuais, a FSA_G foi a que mais ocasionou efeitos subletais aos embriões e larvas de *A. lacustris*. Essa fração apresentou 5,5 vezes mais de BTEX e HPA em relação à segunda fração mais tóxica testada (FSA_P) e 100,3 vezes mais que a FSA_{OM}. Essa última, por sua vez, mesmo apresentando baixas concentrações de compostos tóxicos, ainda apresentou efeitos subletais, principalmente quanto ao desenvolvimento do coração, da notocorda e das nadadeiras, além de afetar as taxas de eclosão.

Outras estruturas morfológicas, principalmente na porção distal dos peixes, também foram afetadas pela presença desses xenobiontes durante o desenvolvimento ontogenético, caracterizados aqui pela oclusão anal, deformações na porção mediana-final da notocorda e lesões na nadadeira caudal. Nota-se que a exposição a FSA_P ocasionou uma maior quantidade de lesões na nadadeira caudal de *A. lacustris* em relação às demais frações testadas. Porém, deve-se ressaltar que a grande maioria dos exemplares expostos a FSA_G (80%) não apresentavam esta estrutura anatômica ao eclodir, podendo-se afirmar que esse efeito foi efetivamente relacionado à exposição a esse xenobionte durante o desenvolvimento embrionário.

Este estudo contribui para uma melhor compreensão dos efeitos dos derivados de petróleo sobre os processos ontogenéticos de *A. lacustris*. Os resultados aqui obtidos podem ser utilizados como parte do processo de avaliação de risco e de impactos ecológicos, uma vez que, mesmo se utilizando a mesma concentração de trabalho tanto para os embriões como para as larvas da espécie, cada fase de vida reagiu de forma distinta a essa exposição. Os embriões foram mais afetados pela exposição que os exemplares expostos somente após a eclosão, mas de forma geral, a exposição aos derivados mostrou que esses xenobiontes ocasionam efeitos subletais e letais a esta espécie neotropical.

14 REFERÊNCIAS

ABNT, A. B. d. N. T. (2011). "Aquatic ecotoxicology, acute toxicity, test with fish." NBR 15088: 22.

Akaishi, F., H. S. De Assis, S. Jakobi, D. Eiras-Stofella, S. St-Jean, S. Courtenay, E. Lima, A. Wagener, A. Scofield and C. O. Ribeiro (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.

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.

Anderson, J., J. Neff, B. Cox, H. Tatem and G. Hightower (1974). "Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish." *Marine Biology* 27(1): 75-88.

Anderson, J. J. M. p. f. r. (1979). "An assessment of knowledge concerning the fate and effects of petroleum hydrocarbons in the marine environment." 3-21.

APHA (1995). American Public Health Association: Standard methods for the examination of water and wastewater: 4500-NH3 Método fenol de determinação de Amonia Total. Washington, DC, USA.

APHA (2005). "American Public Health Association: Standard methods for the examination of water and wastewater. Method 4500 F. 4-114." 21.

Azevedo-Santos, V. M., J. R. Garcia-Ayala, P. M. Fearnside, F. A. Esteves, F. M. Pelicice, W. F. Laurance and R. C. Benine (2016). "Amazon aquatic biodiversity imperiled by oil spills." *Biodiversity and Conservation* 25(13): 2831-2834.

Berenguer, J. N., J. da Cunha Moraes, M. M. Oliveira, J. M. Raimundo and M. M. Molisani (2017). "Effects of diesel oil and environmental quality on the enzymatic activities of a tropical estuarine catfish and implications for contamination assessment." *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 12(1): 103-111.

Bettim, F. L., G. L. Galvan, M. M. Cestari, C. I. Yamamoto and H. C. S. de Assis (2016). "Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline." *Chemosphere* 144: 1467-1474.

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.

Cariello, M. S. (2012). Efeito do naftaleno na microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*, ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e nos microscustáceos estuarinos *Nitokra* sp e *Leptocheirus plumulosus*, Universidade de São Paulo.

Castilho-Almeida, R. (2014). *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e

biomanipulação, Botucatu. 119p. (Doctoral Thesis. Universidade Estadual Paulista-UNESP). Available at:< http://www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/zoologia_do_2007_rodrigo_almeida.pdf> Access on.

Cherr, G. N., E. Fairbairn and A. Whitehead (2016). "Impacts of Petroleum-Derived Pollutants on Fish Development." *Annual Review of Animal Biosciences*(0).

Cherr, G. N., E. Fairbairn and A. Whitehead (2017). "Impacts of petroleum-derived pollutants on fish development." *Annual review of animal biosciences* 5: 185-203.

Chovanec, A., R. Hofer and F. Schiemer (2003). Chapter 18 Fish as bioindicators. Trace Metals and other Contaminants in the Environment. A. M. B. B.A. Markert and H. G. Zechmeister, Elsevier. Volume 6: 639-676.

Cook, P. M., J. A. Robbins, D. D. Endicott, K. B. Lodge, P. D. Guiney, M. K. Walker, E. W. Zabel, R. E. J. E. s. Peterson and technology (2003). "Effects of aryl hydrocarbon receptor-mediated early life stage toxicity on lake trout populations in Lake Ontario during the 20th century." 37(17): 3864-3877.

Costa-Silva, D., M. M. Nunes, G. Wallau, I. Martins, A. P. Zemolin, L. Cruz, N. Rodrigues, A. Lopes, T. Posser and J. Franco (2015). "Oxidative stress markers in fish (*Astyanax* sp. and *Danio rerio*) exposed to urban and agricultural effluents in the Brazilian Pampa biome." *Environmental Science and Pollution Research* 22(20): 15526-15535.

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

Dal Pont, G. (2018). "Effects of petroleum hydrocarbons to tropical and temperate fish species: a toxicity and multibiomarker approach for the assessment of environmental contamination."

Dal Pont, G., L. R. Souza-Bastos, M. Giacomini, R. G. Dolatto, L. M. Baika, M. T. Grassi, A. Ostrensky, C. M. J. C. B. Wood, P. P. C. Toxicology and Pharmacology (2019). "Acute exposure to the water-soluble fraction of gasoline (WSFG) affects oxygen consumption, nitrogenous-waste and Mg excretion, and activates anaerobic metabolism in the goldfish *Carassius auratus*." 226: 108590.

Das, N. and P. J. B. r. i. Chandran (2011). "Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview." 2011.

Dourado, P. L. R., M. P. d. Rocha, L. M. Roveda, J. L. Raposo Junior, L. S. Cândido, C. A. L. Cardoso, M. A. M. Morales, K. M. P. d. Oliveira and A. B. Grisolia (2016). "Genotoxic and mutagenic effects of polluted surface water in the midwestern region of Brazil using animal and plant bioassays." *Genetics and Molecular Biology (AHEAD)*: 0-0.

Dupuis, A. and F. Ucan-Marin (2015). "A literature review on the aquatic toxicology of petroleum oil: An overview of oil properties and effects to aquatic biota." Res Doc 7.

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). United States Environmental Protection Agency: Method 3510C: Separatory funnel liquid-liquid extraction: 1-8.

EPA (1996). United States Environmental Protection Agency: Method 8270C: Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (gc/ms): 1-54.

EPA (2002). "United States Environmental Protection Agency: Methods of measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms."

Galvan, G. L., J. R. Lirola, K. Felisbino, T. Vicari, C. I. Yamamoto and M. M. Cestari (2016). "Genetic and Hematologic Endpoints in *Astyanax altiparanae*." Bulletin of environmental contamination and toxicology 97(1): 63-70.

Garutti, V. and H. Britski (2000). "Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia." Comn. Mus. Cienc. Tecnol. 13: 65-88.

Ghisi, N. C. and E. C. Oliveira (2013). "Evidence of contamination in the main body of the public water supply of Campo Mourão-PR: An analysis from a bioindicator of environmental quality." SaBios-Revista de Saúde e Biologia 8(2).

Goksøyr, A. and L. Förlin (1992). "The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring." Aquatic toxicology 22(4): 287-311.

Goksøyr, A., H. E. Larsen and A.-M. Husøy (1991). "Application of a cytochrome P-450 IA1-ELISA in environmental monitoring and toxicological testing of fish." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology 100(1-2): 157-160.

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

Hicken, C. E., T. L. Linbo, D. H. Baldwin, M. L. Willis, M. S. Myers, L. Holland, M. Larsen, M. S. Stekoll, S. D. Rice and T. K. Collier (2011). "Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish." Proceedings of the National Academy of Sciences 108(17): 7086-7090.

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.

Horodesky, A., V. Abilhoa, T. de Oliveira Zeni, R. M. Neto, G. G. Castilho-Westphal and A. Ostrensky (2015). "Ecological analysis of the ichthyofaunal community ten years after a diesel oil spill at Serra do Mar, Paraná state, Brazil." *Global Ecology and Conservation* 4: 311-320.

Incardona, J. P., M. G. Carls, H. L. Day, C. A. Sloan, J. L. Bolton, T. K. Collier and N. L. Scholz (2008). "Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic Pacific herring (*Clupea pallasii*) exposed to crude oil during weathering." *Environmental Science & Technology* 43(1): 201-207.

Incardona, J. P., M. G. Carls, L. Holland, T. L. Linbo, D. H. Baldwin, M. S. Myers, K. A. Peck, M. Tagal, S. D. Rice and N. L. J. S. r. Scholz (2015). "Very low embryonic crude oil exposures cause lasting cardiac defects in salmon and herring." 5: 13499.

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.

Incardona, J. P., C. A. Vines, B. F. Anulacion, D. H. Baldwin, H. L. Day, B. L. French, J. S. Labenia, T. L. Linbo, M. S. Myers and O. P. Olson (2012). "Unexpectedly high mortality in Pacific herring embryos exposed to the 2007 Cosco Busan oil spill in San Francisco Bay." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(2): E51-E58.

Ingole, B., S. Sivadas, R. Goltekar, S. Clemente, M. Nanajkar, R. Sawant, C. D'silva, A. Sarkar and Z. Ansari (2006). "Ecotoxicological effect of grounded MV River Princess on the intertidal benthic organisms off Goa." *Environment International* 32(2): 284-291.

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

Jung, J.-H., C. E. Hicken, D. Boyd, B. F. Anulacion, M. G. Carls, W. J. Shim and J. P. Incardona (2013). "Geologically distinct crude oils cause a common cardiotoxicity syndrome in developing zebrafish." *Chemosphere* 91(8): 1146-1155.

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.

Kime, D. E. (1995). "The effects of pollution on reproduction in fish." *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5(1): 52-95.

Lema, S. C., I. R. Schultz, N. L. Scholz, J. P. Incardona and P. Swanson (2007). "Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47)." *Aquatic Toxicology* 82(4): 296-307.

Liang, Y., M. Tse, L. Young and M. H. J. W. R. Wong (2007). "Distribution patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments and fish at Mai Po Marshes Nature Reserve, Hong Kong." 41(6): 1303-1311.

Lins, J., P. G. Kirschnik, V. Queiroz and S. M. Cirio (2010). "Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático." *Rev. Acad., Agrár. Ambient* 8: 469-484.

Lockhart, W., R. Wagemann, B. Tracey, D. Sutherland and D. J. S. o. t. T. E. Thomas (1992). "Presence and implications of chemical contaminants in the freshwaters of the Canadian Arctic." 122(1-2): 165-243.

Luz, E. L. P., D. d. S. P. Silva, M. C. de Medeiros, A. P. X. de Gondra Bezerra, E. M. G. Lorena and Í. G. S. dos Santos (2016). "Pollution mitigation for hydrocarbons of petroleum through the bioremediation." *Revista Geama* 7(1): 28-37.

Maceda, E. B., A. B. Grisolia, J. O. Vaini and L. S. Candido (2015). "Use of biomarkers for monitoring of waters from the Arara Stream in the city of Rio Brilhante, MS, Brazil." *Revista Ambiente & Água* 10(1): 117-129.

Malins, D. C. (2013). *Biological effects*, Elsevier.

Matozo, F., J. A. Turek and R. B. Noleto (2015). "Avaliação dos efeitos genotóxicos do fungicida Ridomil em *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes)." *LUMINÁRIA* 17(01).

Meier, S., H. Craig Morton, G. Nyhammer, B. E. Grøsvik, V. Makhotin, A. Geffen, S. Boitsov, K. A. Kvestad, A. Bohne-Kjersem, A. Goksøyr, A. Folkvord, J. Klungsøyr and A. Svoldal (2010). "Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water during early life stages: Effects on embryos, larvae, and juvenile fish." *Marine Environmental Research* 70(5): 383-394.

Meniconi, M. d. F. G., I. T. Gabardo, M. E. R. Carneiro, S. M. Barbanti, G. C. da Silva and C. G. Massone (2002). "Brazilian Oil Spills Chemical Characterization-Case Studies." *Environmental Forensics* 3(3-4): 303-321.

Meyerhoff, R. D. J. J. o. t. F. B. o. C. (1975). "Acute toxicity of benzene, a component of crude oil, to juvenile striped bass (*Morone saxatilis*)." 32(10): 1864-1866.

Middaugh, D., M. Shelton, C. McKenney Jr, G. Cherr, P. Chapman, L. J. A. o. e. c. Courtney and toxicology (1998). "Preliminary observations on responses of

embryonic and larval Pacific herring, *Clupea pallasii*, to neutral fraction biodegradation products of weathered Alaska North Slope oil." 34(2): 188-196.

Neff, J., B. Cox, D. Dixit and J. Anderson (1976). "Accumulation and release of petroleum-derived aromatic hydrocarbons by four species of marine animals." *Marine Biology* 38(3): 279-289.

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

Neff, J. M., A. E. Bence, K. R. Parker, D. S. Page, J. S. Brown, P. D. J. E. T. Boehm and C. A. I. Journal (2006). "Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from buried shoreline oil residues thirteen years after the Exxon Valdez oil spill: a multispecies assessment." 25(4): 947-961.

Nesto, N., S. Romano, V. Moschino, M. Mauri and L. J. M. P. B. Da Ros (2007). "Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy." 55(10-12): 469-484.

Nicodem, D. E., C. L. Guedes, R. J. Correa and M. C. Z. Fernandes (1997). "Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills." *Biogeochemistry* 39(2): 121-138.

Nicodem, D. E., C. L. Guedes, M. C. Z. Fernandes, D. Severino, R. J. Correa, M. C. Coutinho and J. Silva (2001). "Photochemistry of petroleum." *Progress in Reaction Kinetics and Mechanism* 26(2-3): 219-238.

Ostrensky, A., W. A. Boeger, L. F. Duboc, F. X. Wegbecher, R. W. Pilchowski and E. Zamberlan (2003). Effect of The Oil Spill from the Presidente Getúlio Vargas Refinery, Brazil, in July of 2000, on the Populations of Fishes of the Rivers Saldanha, Barigüi, and Iguaçu. International Oil Spill Conference, American Petroleum Institute.

Pacheco, M. and M. A. Santos (2001). "Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49(1): 64-75.

Pedrozo, M. d. F. M., E. Barbosa, H. Corseuil, M. Schneider and M. Linhares (2002). "Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo." Salvador: NEAMA.

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.

Perugini, M., P. Visciano, A. Giammarino, M. Manera, W. Di Nardo and M. J. C. Amorena (2007). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Adriatic Sea, Italy." 66(10): 1904-1910.

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

Ramos, S., H. Cabral and M. Elliott (2015). "Do fish larvae have advantages over adults and other components for assessing estuarine ecological quality?" *Ecological Indicators* 55(0): 74-85.

Saeed, T. and M. Al-Mutairi (1999). "Chemical composition of the water-soluble fraction of the leaded gasolines in seawater." *Environment International* 25(1): 117-129.

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

Santos Filho, F. M., K. F. O. Rezende, A. K. Emerenciano, L. M. Moreira, V. B. Vila, R. M. Borges and L. N. Pressinotti (2014). "Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana." *Atas de Saúde Ambiental-ASA* 2(1): 09-22.

Schulz, U. H. and H. Martins-Júnior (2001). "Astyanax fasciatus as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil." *Brasilian Journal of Biology* 61(4): 615-622.

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*)."

Staudt, D. and D. Stainier (2012). "Uncovering the molecular and cellular mechanisms of heart development using the zebrafish." *Annual review of genetics* 46: 397-418.

Stevanato, D. J. and A. Ostrensky (2018). "Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae)." *Neotropical Ichthyology* 16.

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.

Valdez Domingos, F., C. Oliveira Ribeiro, E. Pelletier, C. J. E. s. Rouleau and technology (2011). "Tissue distribution and depuration kinetics of waterborne ¹⁴C-labeled light PAHs in mummichog (*Fundulus heteroclitus*)."

Van der Oost, R., J. Beyer and N. P. E. Vermeulen (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(2): 57-149.

Vandermeulen, J. and S. Hrudey (1987). *Oil in freshwater: Chemistry, biology, countermeasure technology*, New York, NY (US); Pergamon Press.

Verlecar, X. N., S. R. Desai, A. Sarkar and S. Dalal (2006). "Biological indicators in relation to coastal pollution along Karnataka coast, India." *Water research* 40(17): 3304-3312.

Vicente, A. L. (2014). *Uso de óleos essenciais e de compostos sintéticos como agentes anestésicos para o lambari Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000), Universidade Federal do Paraná.

Vines, C. A., T. Robbins, F. J. Griffin and G. N. J. A. T. Cherr (2000). "The effects of diffusible creosote-derived compounds on development in Pacific herring (*Clupea pallasii*)." 51(2): 225-239.

Winkaler, E. U., A. das Graças Silva, H. C. Galindo and C. B. dos Reis Martinez (2008). "Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná." *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 23: 507-514.

Zhang, J., H. Shen, T. Xu, X. Wang, W. Li and Y. Gu (2003). "Effects of long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 71(2): 0234-0239.

Zhang, S., C. Qin and S. H. Safe (2003). "Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context." *Environmental health perspectives* 111(16): 1877.

CAPÍTULO 3. EFEITOS REPRODUTIVOS DA EXPOSIÇÃO DE *Astyanax lacustris* (PISCES, CHARACIFORMES) À FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DO PETRÓLEO, DA GASOLINA E DE UM ÓLEO MINERAL LUBRIFICANTE

Diego Junqueira Stevanato^{1*}, Roger Felipe Gonçalves², Rafael Garret Dolatto³, Marco Tadeu Grassi³, Antonio Ostrensky⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba-PR, Brasil. *Autor correspondente: diegozootecunesp@hotmail.com

²Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba-PR, Brasil.

³Grupo de Química Ambiental, GQA-UFPR, Avenida Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 100, Curitiba-PR, Brasil.

⁴Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, GIA-UFPR, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba-PR, Brasil.

Resumo:

A presença de hidrocarbonetos derivados de petróleo em ambientes aquáticos tornou-se um dos grandes problemas ambientais, no Brasil e no mundo nas últimas décadas. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos da exposição, ainda durante a fase juvenil, do lambari *Astyanax lacustris* às frações solúveis em água (FSA) do petróleo (FSA_P), da gasolina (FSA_G) e de um óleo mineral lubrificante (FSA_{OM}). Juvenis da espécie, com peso médio de 3,5±0,2g, foram expostos à 0,5% da FSA_G, 1,76% de FSA_P e à 11,24% de FSA_{OM} por 15 dias. Após este período, os peixes foram transferidos para sistemas de manutenção (sem a presença de xenobiontes), onde foram mantidos por 67 dias. Quando os machos atingiram 7,0±1,0 cm e as fêmeas 9,0±1,0 cm, indivíduos foram capturados ao acaso e submetidos ao processo de indução hormonal. Esse procedimento foi repetido por quatro vezes em um intervalo de 30 dias entre cada evento. Constatou-se que os indicadores reprodutivos do lambari *A. lacustris* foram negativamente influenciados pela exposição dos animais aos hidrocarbonetos de petróleo. A exposição dos juvenis à FSA_G e à FSA_P apresentou maior influência sobre as taxas de sobrevivência das larvas geradas por *A. lacustris*. Já a fração solúvel em água do óleo mineral (FSA_{OM}) se mostrou muito pouco tóxica para a espécie. Quanto menor foi o tempo decorrido entre a exposição e a reprodução, menor foi o número de ovócitos produzidos pelas fêmeas e maior a probabilidade de geração de embriões malformados. Entretanto, com o passar do tempo, essas diferenças foram diminuindo e decorridos 102 dias da exposição, os tratamentos não apresentavam mais diferenças reprodutivas significativas em relação ao grupo controle ou mesmo entre si.

Palavras-chave: Indução hormonal; hidrocarbonetos; xenobiontes

15 INTRODUÇÃO

A intensa exploração, refino e transporte de petróleo e gás natural tem historicamente sido associada à ocorrência de diversos acidentes, impactos e polêmicas ambientais ao longo das últimas décadas (Neff 1985, Dupuis e Ucan-Marin 2015, Azevedo-Santos, Garcia-Ayala et al. 2016, Luz, Silva et al. 2016). Seja por processos naturais ou antropogênicos, os hidrocarbonetos derivados

de petróleo estão entre os poluentes mais frequentemente encontrados nos ambientes aquáticos (Kettrup, Schramm et al. 1999, Nicodem, Guedes et al. 2001). Esses hidrocarbonetos, em sua maioria, são constituídos por misturas complexas de compostos orgânicos voláteis, cujas composições dependem de sua origem (Heath 1995, Fernandes, Gouveia et al. 2014, Akinsanya, Isibor et al. 2019, Rama, Ramos et al. 2019).

Os hidrocarbonetos são fisiologicamente ativos nos organismos aquáticos, podendo provocar disfunções em vários níveis de organização biológica, alterando desde os padrões comportamentais (Kime 1995, Cohen, Nugegoda et al. 2001), fisiológicos e até morfológicos nos indivíduos a eles expostos (Krahn, Myers et al. 1984, Carragher, Sumpter et al. 1989), podendo ainda comprometer os processos reprodutivos (McDonald, Willett et al. 1996, Marty, Freiberg et al. 1998, Blazer 2002, Dufech 2009) e interferir na diferenciação sexual ou no desenvolvimento gonadal dos peixes (Lam 1983, Baroiller e Guiguen 2001, Tolussi, Gomes et al. 2018).

Vários estudos abordam os efeitos de xenobiontes sobre os mecanismos reprodutivos de peixes (Niimi 1983, Kime 1995, Martínez-Sales, García-Ximénez et al. 2016, Vignet, Larcher et al. 2016, Robidoux, Virginie et al. 2018, Dighiesh, Eldanasoury et al. 2019). Sabe-se, por exemplo, que nos peixes que apresentam sazonalidade reprodutiva, a exposição à xenobiontes industriais frequentemente provoca efeitos subletais aos animais (Pacheco e Santos 2001, Zhang, Shen et al. 2003, Simonato, Albinati et al. 2006, Simonato, Guedes et al. 2008, Hicken, Linbo et al. 2011). Entretanto, ainda existem muitas lacunas em relação aos efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo no desenvolvimento gonadal e na reprodução desses organismos.

Astyanax lacustris (Lütken, 1875), sinonímia de *Astyanax altiparanae*, vem sendo amplamente empregada como espécie modelo em diversos estudos toxicológicos (Costa-Silva, Nunes et al. 2015, Disner, Calado et al. 2017, Dal Pont 2018, Tolussi, Gomes et al. 2018, Dal Pont, Souza-Bastos et al. 2019), uma vez que ela apresenta características morfológicas favoráveis ao manejo em laboratório, como pequeno tamanho, ciclo de vida curto, podendo atingir maturidade sexual em cerca de quatro meses de idade (Garutti e Britski 2000, Nakatani, Agostinho et al. 2001); tem importante papel na cadeia trófica de

ambientes neotropicais; e relativa tolerância à poluição ambiental (Schulz e Martins-Júnior 2001, Vicente 2014, Stevanato e Ostrensky 2018). O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição subletal de juvenis de *Astyanax lacustris* às frações solúveis em água do petróleo, da gasolina e de um óleo mineral lubrificante sobre os processos reprodutivos da espécie.

16 MATERIAL E MÉTODOS

16.1 Organismo-teste

Juvenis de *A. lacustris* com peso de $3,5 \pm 0,2$ g (média $\pm$ desvio padrão) e comprimento total de $4,5 \pm 1,2$ cm, foram obtidos da Central de Abastecimento do Paraná, em Curitiba, Paraná, Brasil. Os indivíduos foram transportados até o Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos, pertencente ao Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, também localizado em Curitiba. Ao chegarem, passaram por manejo profilático (imersão em solução de sal iodado 6 g/L por duas horas) e, em seguida, foram gradativamente aclimatados às condições experimentais de temperatura e pH.

16.2 Preparação das frações solúveis em água (FSA)

Foram avaliados os efeitos da exposição de *A. lacustris*: a) ao petróleo cru (25,6° API), obtido da refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), no município de Araucária-PR (TQ 4109), no dia 16 de maio de 2017 ; b) à gasolina, adquirida em um posto comercial de bandeira BR (Petrobras); e c) um óleo mineral lubrificante obtido de uma empresa privada.

A fração solúvel em água (FSA) de cada um desses produtos foi obtida com base na metodologia proposta por Anderson, Neff et al. (1974), com modificações. Amostras de cada um dos óleos testados eram transferidas individualmente para um frasco de Mariotte e misturadas com água, na proporção de 1:9 (óleo/água). O conteúdo do frasco era então lentamente agitado, com auxílio de um agitador magnético (114 Nova Ética, Brasil), por 22 h. Após este período, a amostra permanecia imóvel por 15 minutos, para que assim fosse possível realizar a separação da fração solúvel do sobrenadante.

16.3 Exposição aos xenobiontes

Os juvenis de *A. lacustris* foram aclimatados por cinco dias em tanques de polietileno de 80 L de volume útil, na proporção de 100 animais/tanque, formando três tratamentos e um controle, todos testados em duplicata. Os tanques foram submetidos à aeração constante, gerada por um compressor radial CR6 (IBRAM, Brasil). A temperatura da água foi mantida a 25 °C, com o uso de um aquecedor de 300 watts e controlada por termostato digital (BOYU, Taiwan). No sexto dia, os peixes de cada grupo foram expostos a diferentes concentrações da FSA de cada um dos compostos testados, como representado na Figura 7. As concentrações-teste de cada composto foram definidas com base em testes prévios de CL₅₀ realizados por Dal Pont (2018) para a juvenis e adultos de *A. lacustris*. O grupo controle teve apenas contato com água de torneira, livre de qualquer um dos produtos testados, previamente filtrada em filtro de poliéster 45 µm, clorada (cloro 10%) e neutralizada com tiosulfato de sódio (50%).

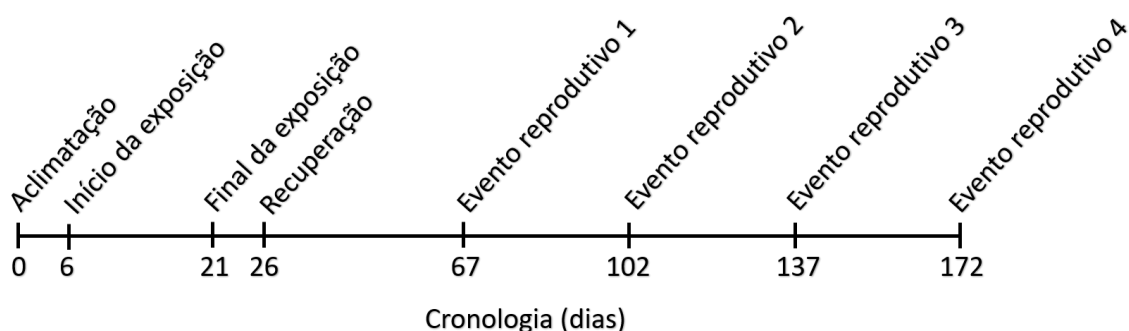


Figura 9. Síntese das etapas do experimento de exposição à fração solúvel em água do petróleo, da gasolina e de um óleo mineral em juvenis de *Astyanax lacustris*.

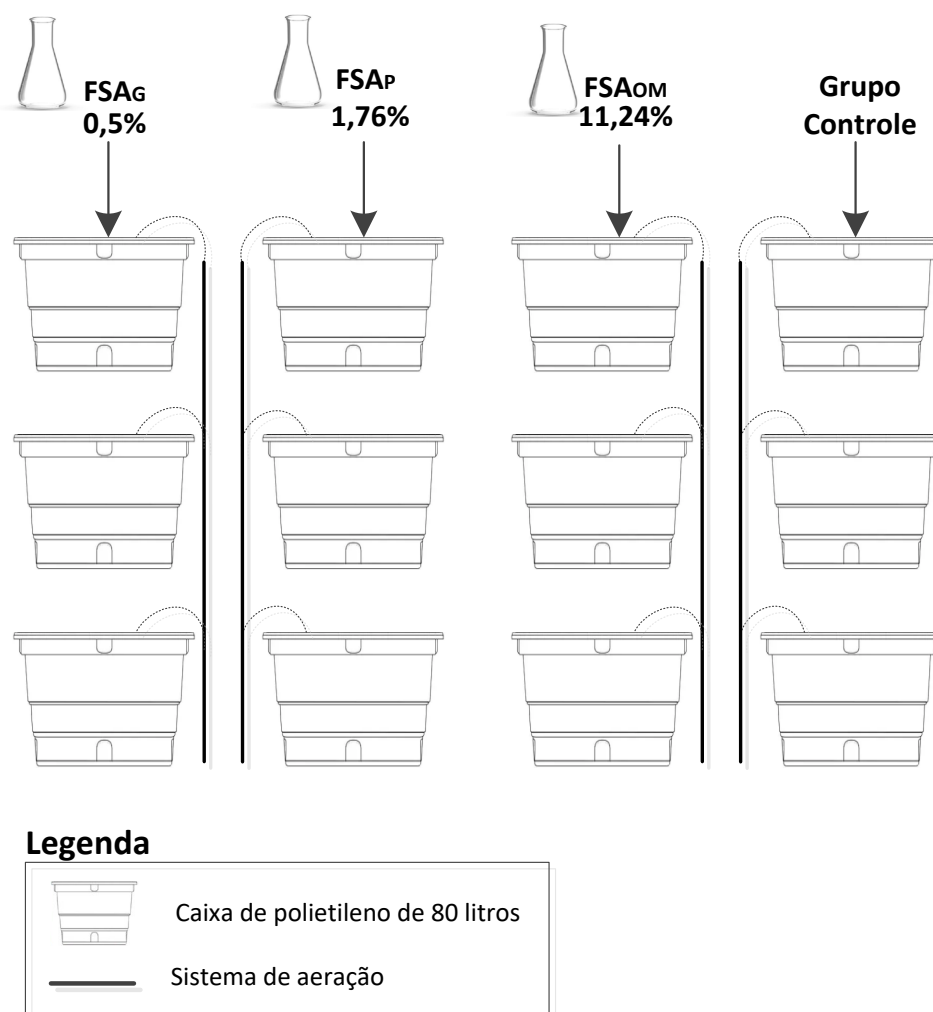


Figura 10. Disposição dos tanques utilizados para exposição de juvenis de *Astyanax lacustris* e respectivas concentrações das frações solúveis em água da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P), do óleo mineral (FSA_{OM}).

Os peixes permaneceram nesses sistemas por 15 dias após a exposição, sendo que diariamente era realizada a renovação de 100% do volume de água (mantendo-se as mesmas condições e concentrações de xenobiontes a cada renovação). Após finalizado o período de exposição, a água presente nos tanques passou a ser renovada diariamente em 100% do volume útil dos tanques, mas já sem a adição de hidrocarbonetos de petróleo. Os animais permaneceram em recuperação nesse sistema com água limpa por cinco dias. Durante o período de exposição e de recuperação, os exemplares foram alimentados com ração comercial extrusada (Kowalski, Brasil), contendo 38% de proteína bruta e 4% de extrato etéreo.

Após o período de recuperação, os peixes foram transferidos para quatro sistemas independentes, instalados em uma estufa agrícola. Cada sistema era composto por três tanques de polietileno de 500 L, ligados entre si por duas bombas submersas SB-2700 (Sarlobetter, Brasil), a filtros mecânicos e biológicos, além de serem submetidos à aeração constante. A temperatura em cada tanque foi mantida em $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com o uso de aquecedores de 300 watts, controlado por termostato digital (BOYU, Taiwan). Nessa configuração foi possível a separação dos grupos de peixes originalmente expostos a cada xenobionte, porém mantendo-se todos os animais sob as mesmas condições abióticas entre si. Além disso, para evitar que os ritmos circadianos pudessem interferir no desenvolvimento dos peixes, lâmpadas foram instaladas a 30 cm da coluna d'água, mantendo-se o fotoperíodo constante em 12 h luz: 12 h escuro.

Os peixes permaneceram nos sistemas de manutenção por 67 dias. Durante todo o período experimental, foram alimentados duas vezes ao dia (08:00 e 16:00 horas), com ração comercial extrusada (Kowalski, Brasil), contendo 38% de proteína bruta e 4% de extrato etéreo. Periodicamente, os sistemas eram completados com água previamente clorada com hipoclorito 6% e neutralizada com tiosulfato de sódio (50%), para reposição das perdas ocorridas por evaporação.

16.4 Indução hormonal, desova e análises

Assim que os machos atingiram $7,0 \pm 1,0$ cm e as fêmeas $9,0 \pm 1,0$ cm (o que aconteceu na quarta quinzena após o fim da exposição aos hidrocarbonetos de petróleo), 4 fêmeas e 8 machos de cada sistema foram coletados, ao acaso, e submetidos ao processo de indução hormonal artificial com Vetecor® 5000UI (Hertape Calier, Brasil). O hormônio foi aplicado, através de injeção com seringa graduada (0,3 mL/cc), na base inferior da nadadeira peitoral, em um ângulo de 45° , em doses únicas de 1,0 mg/kg. O processo foi repetido mais três vezes (com intervalo de 30 dias entre cada evento), totalizando 576 exemplares submetidos ao processo de indução artificial.

Após receberem a aplicação dos hormônios, os reprodutores de cada tanque foram acondicionados em tanques individuais, com dimensões de 25 x 15 x 15 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), confeccionadas

com rede de *nylon* trançada de 3 mm e malha de 1,5 x 1,5 cm. Esses tanques tinham como objetivo evitar que os animais comessem os ovos após a fertilização. Os tanques foram mantidos em tanque individuais de polietileno de 100 L, com temperatura controlada em 25 °C, com o uso de dois aquecedores (Ht-8200, BOYU). Os tanques eram ligados a um sistema de filtração física e biológica externa, de volume útil de 80 L. Os animais foram mantidos nos tanques até a liberação dos gametas sexuais. Após este período, os reprodutores foram sacrificados, após exposição a solução de óleo de cravo 10%, e suas gônadas coletadas para posterior análises de índices reprodutivos.

Imediatamente após a desova, os ovos eram removidos do fundo dos tanques, por sifonagem, retidos em uma peneira de malha de 0,5 mm, e lavados em água corrente do próprio sistema. Em seguida, eram transferidos para uma peneira de malha de poliamida (100% nylon), de 65 µm e depois para uma placa de Petri, com auxílio de uma pipeta Pasteur. O número de ovos liberados a cada desova foi estimado por volumetria. Para isso, os ovos eram transferidos para uma proveta graduada de 10 mL, previamente preenchida com um volume conhecido de água, e estimado o volume total de ovos presentes. A água da proveta era então drenada e os ovos pesados em balança digital de precisão 0,0001g (Shimadzu, Brasil) para se obter seu peso úmido. Uma amostra era coletada com uma pipeta de Pasteur e analisada sob microscópio óptico DMLS (Leica®, Alemanha) adaptado com câmera digital L3CMOS Series C-mount (ToupCam®, China). Os ovos eram então transferidos individualmente para 141 placas de cultivo celular K12-006 (Kasvi®, China) de 12 poços cada, com tampa e volume unitário de 17 ml, perfazendo uma placa para cada fêmea desovada. As placas eram mantidas em incubadora vertical tipo BOD SL-200 (ADAMO, Brasil), com fotoperíodo ajustado para 12 h luz: 12 h escuro e mantidas a 25 °C por 5 dias, tempo suficiente para avaliação e mensuração das taxas de fecundação, eclosão e de sobrevivência (96 h pós-eclosão), além da identificação de edemas e malformações.

16.5 Índices reprodutivos

Os índices gonadosossomático (IGS%), hepatossomático (IHS%) e fator de condição gonadal (K), foram calculados através das seguintes fórmulas:

$$\text{IGS (\%)} = \left(\frac{\text{Peso dos ovários (g)}}{\text{Peso corporal (g)}} \right) \times 100$$

$$\text{IHS (\%)} = \left(\frac{\text{Peso fígado (g)}}{\text{Peso corporal (g)}} \right) \times 100$$

$$K = \left(\frac{\text{Peso (g)} - \text{peso gônadas (g)}}{\text{Comprimento padrão}^3 (\text{cm})} \right) \times 100$$

Foram estimadas a fertilidade inicial (FI) e fertilidade inicial relativa (FIR). Para o cálculo da FI foi pesado 0,1 g de ovos liberados por cada fêmea. Para o cálculo do FIR, foi utilizado o número de ovócitos liberados dividido pelo peso da fêmea. As análises foram realizadas com auxílio de estereomicroscópio óptico Discovery V8 (ZEISS, Alemanha), acoplado a uma câmera digital L3CMOS Series C-mount (ToupCam®, China). Além disso, foram calculados o índice de desova (ID), a taxa de fertilização (TF), a fertilidade final (FF), a fertilidade final relativa (FFR), a taxa de eclosão (TE) e a taxa de sobrevivência larval (TS), obtidas pelas seguintes fórmulas:

$$\text{FI} = \frac{\text{número de ovos (n)}}{\text{fêmea (n)}}$$

$$\text{FIR} = \frac{\text{número de ovos (n)}}{\text{peso da fêmea (g)}}$$

$$\text{ID (\%)} = \frac{\text{peso desova (g)}}{\text{peso da fêmea (g)}} \times 100$$

$$\text{TF (\%)} = \frac{\text{número de ovos viáveis (n)}}{\text{número total de ovos (n)}} \times 100$$

$$\text{FF} = \frac{\text{número de ovos viáveis (n)}}{\text{fêmea (n)}}$$

$$\text{FFR} = \frac{\text{número de ovos viáveis (n)}}{\text{peso da fêmea (g)}}$$

$$TE (\%) = \frac{\text{número de ovos eclodidos (n)}}{\text{número total de ovos férteis (n)}} \times 100$$

$$TS (\%) = \frac{\text{Número de exemplares vivos}}{\text{Número de ovos fertilizados}} \times 100$$

16.6 Qualidade da água

Diariamente, 250 ml de água era coletada de cada tanque e usada para análise dos seguintes parâmetros físicos e químicos: pH, através de phmetro digital LAQUAtwin B-713 (Horiba, Japão); oxigênio dissolvido e percentual de saturação de oxigênio, por meio de oxímetro digital Pro20 (YSI, EUA), alcalinidade, mensurada por titulometria com ácido sulfúrico 0,02N (APHA 2005), nitrogênio na forma de amônia total [N-AT= NH₃+NH₄⁺], obtida pelo método do indofenol (APHA 2005) e nitrito (APHA 1995). A leitura das concentrações de amônia e nitrito foi feita em espectrofotômetro de bancada SpectraMax® M5 (Molecular Devices, EUA). Após os procedimentos analíticos, todo material utilizado era submetido ao processo de limpeza seguindo os procedimentos descritos na NBR 15308/2005, na resolução brasileira 393/2007 de legislações ambientais de toxicidade e EPA (2002), com modificações. Para isso, o material era deixado imerso em água de torneira por 15 min; submetido à lavagem dupla com detergente neutro; enxaguado duplamente com água de torneira; deixado de em solução de ácido clorídrico 10% por 24 h; submetido a limpeza em ultrassom digital CD-4860 (Kondortech, Brasil) por 45 min; enxaguado duplamente com água de torneira; e submetido a enxague triplo em água destilada.

16.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram armazenados e organizados em planilhas e banco de dados gerados através do uso dos *softwares* Excel® (Microsoft Office Professional Plus 2016). Os dados de qualidade da água e biométricos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Quando confirmada a normalidade, os dados eram submetidos ao teste de homogeneidade das variâncias de Chochan C., Hartley & Bartlett e ao teste de homocedasticidade.

Para otimizar as informações coletadas, os dados reprodutivos foram organizados em grupos e subgrupos, através da análise de Cluster. Os índices biométricos e reprodutivos foram comparados por teste *t*, ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* Statsoft Statistica^{MR} versão 12.0[®].

17 RESULTADOS

17.1 Xenobiontes

Na Tabela 10, são apresentados os perfis químicos de cada uma das frações solúveis em água utilizados no experimento. A FSA_G foi a que apresentou a maior concentração de BTEX, com destaque para o benzeno e etilbenzeno, que juntos foram responsáveis por 87,3% dos BTEX quantificados na sua fração solúvel. A mesma tendência foi verificada em relação à FSA_P, porém com concentração relativa de 85,5%. Na FSA_{OM}, os compostos que apresentaram maiores concentrações foram o etilbenzeno e o xileno. A FSA_G foi ainda a que apresentou a maior concentração de HPAs totais e a FSA_{OM} a menor. Compostos como acenaftaleno, acenafteno, fluoreno e fenantreno ficaram abaixo do nível de detecção analítico em todas as amostras analisadas.

Tabela 11. Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) de hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX) e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) presentes na fração solúvel em água (FSA) da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P), e do óleo mineral (FSA_{OM}), utilizados nos bioensaios com juvenis de *Astyanax lacustris*.

Hidrocarbonetos	FSA _G	FSA _P	FSA _{OM}
Hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX)			
Benzeno	6147,5	1335,0	15,8
Tolueno	4098,7	1533,0	25,4
Etilbenzeno	380,4	119,0	7,2
m,p-Xileno	589,9	193,0	23,3
o-Xileno	521,9	173,0	14,0
Σ BTEX	11738,4	3353	85,7
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)			
Naftaleno	<0,25	8,30	<0,25
Acenaftaleno	<0,25	<0,25	<0,25
Acenafteno	<0,25	<0,25	<0,25
Fluoreno	<0,25	<0,25	<0,25

Hidrocarbonetos	FSA_G	FSA_P	FSA_{OM}
Fenantreno	<0,25	6,45	<0,25
Antraceno	<0,25	8,08	<0,25
Fenantreno	<0,25	<0,25	<0,25
Pireno	1,66	1,33	<0,25
Benz[a]antraceno	3,60	<0,25	<0,25
Criseno	4,66	<0,25	<0,25
Benzo[b]fluoranteno	5,50	1,20	0,12
Benzo[k]fluoranteno	5,60	0,98	<0,25
Benzo[a]pireno	3,90	1,00	<0,25
Indeno[1,2,3-cd]pireno	5,60	1,10	0,33
Dibenzo[ah]antraceno	5,00	1,00	0,28
Benzo[ghi]perileno	5,20	0,96	0,30
Σ HPA	40,72	32.60	1,03

*Limite de detecção analítica: BTEX = 5.0 µg L⁻¹; HPA = 0.25 µg L⁻¹.

17.2 Fatores abióticos

Os indicadores físicos e químicos da qualidade da água mensurados durante cada fase do experimento estão discriminados na Tabela 11. Em geral, a água de reposição apresentou condições consideradas mais adequadas aos animais que a água dos tratamentos ao final de cada ciclo de 24 h. Destaca-se que as concentrações de oxigênio dissolvido e o percentual de saturação de oxigênio das placas de cultivo usadas na avaliação da desova foram as mais baixas em relação às demais fases experimentais (exposição, manutenção e reprodução).

Durante o período de exposição aos derivados de petróleo, observou-se uma tendência de redução do pH e da alcalinidade e de um ligeiro aumento das concentrações de amônia e nitrito quando comparada à água presente nos tratamentos ao final de cada ciclo de 24 h. Na fase de manutenção, não foram observadas diferenças entre os valores quantificados na água antes e após a renovação. No período de reprodução, observou-se uma tendência de redução do pH e da alcalinidade e um ligeiro aumento das concentrações de amônia na água dos tratamentos, sempre em comparação com a água de reposição. Durante a fase de desenvolvimento ontogenético, somente as concentrações de amônia não apresentaram diferenças significativas quando foi realizada a comparação entre a água dos tratamentos e de reposição.

Tabela 12. Parâmetros indicativos da qualidade da água durante as diferentes etapas do experimento de exposição de *Astyanax lacustris* à fração solúvel em água da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P), e do óleo mineral lubrificante (FSA_{OM})

Tratamento	Fase	Parâmetros monitorados					
		pH	Alcalinidade (mg L ⁻¹)	N-AT (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ - (mg L ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	OD (%)
Reposição diária	Exposição	7,45 ^{aX*} (7,19-7,67)	22,00 ^{aY} (17,10-26,00)	0,00 ^{aX} (0,00-0,00)	0,00 ^{aX} (0,00-0,00)	6,70 ^{XY} (6,08-7,43)	86,95 ^{XY} (83,00-102,90)
FSA _G	Exposição	6,91 ^{abXY} (6,54-7,35)	16,44 ^{abY} (12,00-18,30)	0,01 ^{bY} (0,01-0,02)	0,01 ^{bY} (0,01-0,04)	6,28 ^Y (5,18-6,74)	80,10 ^Y (73,20-86,40)
FSA _P	Exposição	6,80 ^{abXY} (6,49-7,26)	17,50 ^{abY} (16,00-20,00)	0,01 ^{abXY} (0,00-0,02)	0,00 ^{abY} (0,00-0,01)	5,76 ^Y (5,02-6,42)	80,66 ^{XY} (72,70-93,10)
FSA _{OM}	Exposição	6,93 ^{abXY} (6,67-7,51)	16,31 ^{abY} (12,00-18,10)	0,01 ^{abXY} (0,00-0,02)	0,01 ^{bY} (0,01-0,03)	5,92 ^Y (4,52-6,74)	79,22 ^{XY} (70,20-91,50)
Controle	Exposição	6,92 ^{abXY} (6,54-7,54)	16,07 ^{abY} (12,00-18,00)	0,01 ^{bY} (0,01-0,01)	0,01 ^{bY} (0,01-0,04)	6,45 ^Y (5,36-6,89)	80,18 ^{XY} (72,80-92,20)
Água inicial	Manutenção	6,98 ^X (6,54-7,70)	37,21 ^X (26,50-48,20)	0,00 ^X (0,00-0,01)	0,00 ^X (0,00-0,01)	6,55 ^Y (6,11-8,45)	86,36 ^X (72,80-101,20)
FSA _G	Manutenção	6,84 ^{XY} (6,44-7,41)	37,40 ^X (28,00-48,00)	0,00 ^X (0,00-0,02)	0,00 ^X (0,00-0,01)	6,44 ^Y (5,49-6,79)	83,19 ^X (72,80-97,00)
FSA _P	Manutenção	6,78 ^{XY} (6,33-7,31)	35,00 ^X (28,00-48,00)	0,00 ^X (0,00-0,02)	0,00 ^X (0,00-0,02)	6,43 ^Y (5,60-6,79)	84,05 ^X (74,60-98,30)
FSA _{OM}	Manutenção	6,84 ^{XY} (6,45-7,70)	35,63 ^X (26,80-48,00)	0,00 ^X (0,00-0,02)	0,00 ^X (0,00-0,02)	6,36 ^Y (5,98-6,89)	81,06 ^X (68,40-90,30)
Controle	Manutenção	6,78 ^{XY} (6,44-7,35)	38,30 ^X (30,00-48,00)	0,00 ^X (0,00-0,01)	0,00 ^X (0,00-0,02)	6,41 ^Y (6,03-7,20)	81,36 ^X (72,80-92,40)
Água inicial	Reprodução	7,37 ^{aX} (7,25-7,60)	20,55 ^{aXY} (18,00-25,40)	0,00 ^{aX} (0,00-0,00)	0,00 ^X (0,00-0,00)	6,89 ^{aXY} (6,72-7,45)	88,81 ^{XY} (80,50-98,70)

Tratamento	Fase	Parâmetros monitorados					
		pH	Alcalinidade (mg L ⁻¹)	N-AT (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	OD (%)
FSA _G	Reprodução	6,81 ^{abXY} (6,54-7,00)	16,80 ^{abY} (12,60-19,10)	0,01 ^{bY} (0,01-0,03)	0,00 ^X (0,00-0,02)	6,34 ^Y (6,08-6,81)	80,39 ^{XY} (73,10-85,60)
FSA _P	Reprodução	6,63 ^{abXY} (6,38-7,02)	16,91 ^{bY} (16,00-18,00)	0,01 ^{abXY} (0,00-0,02)	0,00 ^X (0,00-0,01)	6,32 ^Y (5,98-6,75)	77,68 ^{XY} (68,70-88,00)
FSA _{OM}	Reprodução	6,65 ^{abXY} (6,29-7,22)	15,34 ^{bY} (11,30-18,30)	0,01 ^{abXY} (0,00-0,02)	0,00 ^X (0,00-0,02)	6,27 ^{XY} (5,60-7,02)	79,42 ^{XY} (68,70-92,00)
Controle	Reprodução	6,71 ^{abXY} (6,14-7,41)	16,06 ^{abY} (12,00-19,00)	0,01 ^{abXY} (0,00-0,01)	0,00 ^X (0,00-0,01)	6,37 ^{XY} (5,80-6,81)	78,50 ^{XY} (65,80-94,50)
Reposição diária	Ontogenia Inicial	7,49 ^{aX} (7,22-7,98)	28,33 ^{aXY} (22,20-32,00)	0,01 ^{XY} (0,00-0,01)	0,00 ^{aX} (0,00-0,00)	8,05 ^{aX} (7,68-8,43)	96,53 ^{aX} (84,50-105,90)
FSA _G	Ontogenia Inicial	6,80 ^{abXY} (6,22-7,39)	17,55 ^{abY} (14,20-19,70)	0,01 ^{XY} (0,01-0,03)	0,01 ^{abXY} (0,00-0,01)	4,39 ^{bZ} (4,18-4,99)	60,59 ^{bYZ} (57,00-69,40)
FSA _P	Ontogenia Inicial	6,78 ^{abXY} (6,39-7,28)	17,15 ^{abY} (14,60-19,00)	0,01 ^{XY} (0,00-0,02)	0,00 ^{aXY} (0,00-0,01)	4,27 ^{bZ} (4,08-4,47)	60,79 ^{bZ} (58,30-63,10)
FSA _{OM}	Ontogenia Inicial	6,85 ^{abXY} (6,65-7,22)	18,46 ^{abY} (16,10-21,00)	0,01 ^{XY} (0,00-0,02)	0,01 ^{abXY} (0,00-0,03)	4,28 ^{bZ} (4,02-4,73)	59,09 ^{bZ} (56,00-63,50)
Controle	Ontogenia Inicial	6,80 ^{abXY} (6,29-7,17)	17,81 ^{abY} (14,40-22,00)	0,01 ^{XY} (0,00-0,01)	0,01 ^{abXY} (0,00-0,02)	4,42 ^{bZ} (4,11-4,89)	59,15 ^{bZ} (55,80-67,20)

*Valores apresentados como mediana (mínima-máxima). Letras minúsculas (^{a,b}) indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os parâmetros de qualidade de água dos tratamentos e a água da reposição em cada etapa do experimento (vide coluna Etapa). Letras maiúsculas (^{X,Y,Z}) indicam diferenças significativas (p<0,05) entre o mesmo parâmetro mensurado na água em relação às diferentes etapas do experimento.

17.3 Índices reprodutivos

Os índices reprodutivos de *A. lacustris* foram monitorados durante os quatro diferentes eventos de indução hormonal ocorridos, respectivamente, 67, 102, 137 e 172 dias após o final da exposição dos juvenis à FSA_G, FSA_P e à FSA_{OM}.

Na Tabela 12 estão sintetizados os valores obtidos para os índices biométricos (CT, IGS, IHS e K), monitorados tanto para os machos como para as fêmeas, além dos índices reprodutivos (FI, FIR, ID, TF, FF, FFR e FD) obtidos em cada tratamento evento reprodutivo.

Observou-se que a variável “tempo”, aqui definida como o período decorrido entre a transferências dos animais para os tanques de manutenção (pós-exposição) e as respectivas induções hormonais, foi o fator que mais influenciou nos índices analisados. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o IGS no primeiro e no segundo evento reprodutivo quando da comparação de fêmeas expostas à FSA_G e FSA_P em relação ao grupo controle. No terceiro e quarto evento, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos em relação ao grupo controle. Já o IGS mensurado para os machos, apresentou diferença estatística apenas no primeiro evento reprodutivo. Os exemplares expostos à FSA_{OM} foram os que obtiveram os melhores resultados de IGS (%), mas não diferiram dos machos expostos à FSA_P e nem ao grupo controle. A partir do segundo evento reprodutivo, não foram observadas diferenças estatísticas para este índice.

Com base em Análise de Cluster, os dados foram agrupados em quatro grupos (grupo 1: outros; grupo 2: desenvolvimento embrionário; grupo 3: índices reprodutivos; grupo 4: índices biométricos), sintetizados na Figura 8. Ressalta-se que são apresentados e discutidos de forma mais específica apenas aqueles índices para os quais foram registradas diferenças significativas ao longo do experimento.

Tabela 13. Índices biométricos e reprodutivos monitorados durante quatro eventos de indução hormonal ocorridos após a exposição de *Astyanax lacustris* à fração solúvel em água da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P) e de um óleo mineral lubrificante (FSA_{OM}) em diferentes tempos: Reprodução 1: 67 dias; Reprodução 2: 102 dias; Reprodução 3: 137 dias e Reprodução 4: 172 dias após o final da exposição.

Tratamento/ Reprodução	Sexo	Índices monitorados											
		CT*	Peso*	IGS**	IHS**	K	FI	FIR	ID	FF	FFR	TF	FD
		(mm)	(g)	(%)	(%)	-	(n)	(n)	(%)	(n)	(n)	(%)	(%)
FSA _G Reprodução 1	Macho	66 (65-71)	6,3 (5,4-7,8)	1,12±0,33 ^B	0,34±0,07	1,98±0,03	602	435	33,2	285	206	47,3	50
	Fêmea	73 (61-78)	8,3 (7,3-9,2)	12,51±2,52 ^c	0,42±0,14	1,79±0,57							
FSA _P Reprodução 1	Macho	62 (63-73)	6,5 (5,4-8,1)	2,15±0,57 ^{AB}	0,37±0,06	1,37±0,01	628	483	31,8	345	266	54,9	50
	Fêmea	71 (68-79)	7,9 (6,8-8,3)	11,82±3,46 ^c	0,45±0,14	1,93±0,48							
FSA _{OM} Reprodução 1	Macho	61 (59-68)	6,7 (5,1-8,2)	3,13±0,43 ^A	0,38±0,08	2,56±0,06	3.402	3.134	53,6	2.250	2.072	66,1	58
	Fêmea	71 (67-74)	7,6 (6,9-8,1)	19,69±4,88 ^{ab}	0,40±0,11	1,81±0,46							
Controle Reprodução 1	Macho	67 (59-71)	6,7 (5,2-7,9)	2,83±0,29 ^A	0,36±0,05	1,95±0,04	15.688	13.901	58,8	12.803	11.344	81,6	58
	Fêmea	72 (66-76)	7,9 (7,1-9,0)	23,30±3,65 ^a	0,51±0,17	1,49±0,24							
FSA _G Reprodução 2	Macho	78 (76-82)	7,8 (6,9-10,9)	1,89±0,21	0,36±0,04	1,76±0,04	8.913	6.417	49,2	5.966	4.295	66,9	75
	Fêmea	78 (78-87)	12,5 (9,4-14,1)	15,66±6,04 ^b	0,34±0,07	2,13±1,11							

FSA _P Reprodução 2	Macho	75 (72-76)	7,3 (6,3-10,2)	2,20±0,13	0,36±0,05	1,73±0,04	4.126	3.121	47,1	2.914	2.204	70,6	75
	Fêmea	79 (77-87)	12,0 (8,8-13,6)	14,56±4,63 ^b	0,38±0,07	2,26±0,92							
FSA _{OM} Reprodução 2	Macho	74 (71-81)	7,5 (5,9-10,1)	2,11±0,17	0,35 ± 0,05	1,82±0,03	11.009	6.265	53,8	7.061	4.018	64,1	58
	Fêmea	81 (78-88)	12,3 (8,4-14,7)	14,13±5,51 ^b	0,37 ± 0,07	2,29±0,72							
Controle Reprodução 2	Macho	75 (71-83)	7,8 (6,5-10,1)	2,23±0,22	0,31 ± 0,04	1,72±0,03	21.786	17.751	77,3	20.143	16.413	92,5	92
	Fêmea	78 (74-85)	13,5 (9,6-15,3)	20,67±5,56 ^a	0,36 ± 0,06	1,74±0,44							
FSA _G Reprodução 3	Macho	81 (76-86)	9,1 (7,9-11,2)	4,19±0,73	0,35±0,05	1,66±0,03	18.492	12.666	57,3	17.889	12.253	96,7	83
	Fêmea	84 (78-88)	14,6 (10,8-15,6)	18,23±8,02 ^{ab}	0,36±0,05	1,67±0,49							
FSA _P Reprodução 3	Macho	81 (78-83)	8,6 (8,1-10,1)	3,61±0,56	0,31±0,03	1,71±0,02	18.954	12.362	79,2	17.834	11.631	94,1	75
	Fêmea	86 (77-89)	13,8 (10,1-15,1)	19,27±5,42 ^{ab}	0,34±0,03	1,86±0,48							
FSA _{OM} Reprodução 3	Macho	82 (76-83)	8,4 (7,6-10,2)	4,02±1,29	0,36±0,05	1,75±0,02	24.708	17.523	71,7	23.085	16.373	93,4	83
	Fêmea	84 (80-89)	14,1 (10,2-17,1)	23,48±7,99 ^a	0,40±0,07	1,70±0,59							
Controle Reprodução 3	Macho	82 (78-84)	8,9 (7,8-10,6)	3,59±2,09	0,33±0,06	1,80±0,03	49.564	29.155	83,7	48.173	28.337	97,2	75
	Fêmea	85 (79-89)	15,3 (9,8-17,1)	21,78±6,70 ^{ab}	0,32±0,06	1,86±0,59							
	Macho	82	9,1	8,57±0,49	0,35±0,03	1,73±0,02	33.346	15.879	79,0	31.467	14.984	94,4	67

FSA _G Reprodução 4		(76-84)	(8,7-10,1)											
	Fêmea	98 (93-102)	16,9 (15,1-22,7)	23,08±13,23	0,36±0,05	1,25±0,39								
FSA _P Reprodução 4	Macho	83 (80-88)	9 (8,6-9,3-5)	7,99±0,58	0,36±0,05	1,76±0,02	21.513	12.332	72,8	20.496	11.749	95,3	75	
	Fêmea	96 (87-99)	15,6 (13,3-19,8)	23,72±8,31	0,38±0,05	1,49±0,41								
FSA _{OM} Reprodução 4	Macho	85 (76-87)	9,3 (8,3-9,8)	8,13±0,32	0,37±0,07	1,79±0,02	27.363	16.096	90,6	25.869	15.217	94,5	75	
	Fêmea	97 (91-105)	15,3 (14,1-20,6)	24,99±9,31	0,42±0,06	1,31±0,45								
Controle Reprodução 4	Macho	83 (78-87)	8,9 (8,1-10,3)	8,99±0,22	0,37±0,04	1,88±0,09	45.615	33.999	88,5	43.101	32.125	94,5	100	
	Fêmea	97 (90-101)	16,1 (14,3-21,2)	22,24±11,15	0,41±0,05	1,21±0,19								

*Valores apresentados como mediana (mínima-máxima). **Valores apresentados como média ± desvio padrão. Índices monitorados: comprimento total (CT); índice gonadossomático (IGS); índice hepatossomático (IHS); índice de condição corporal (K); fertilidade inicial (FI); fertilidade inicial relativa (FIR); índice de desova (ID); taxa de fertilização (TF); fertilidade final (FF); fertilidade final relativa (FFR); porcentagem de fêmeas desovadas (FD). Letras minúsculas (^{a,b}) indicam diferença estatística (p<0,05) entre as fêmeas dos diferentes tratamentos dentro do mesmo período. Letras maiúsculas (^{A,B}) indicam diferença estatística entre os machos dos diferentes tratamentos dentro do mesmo período.

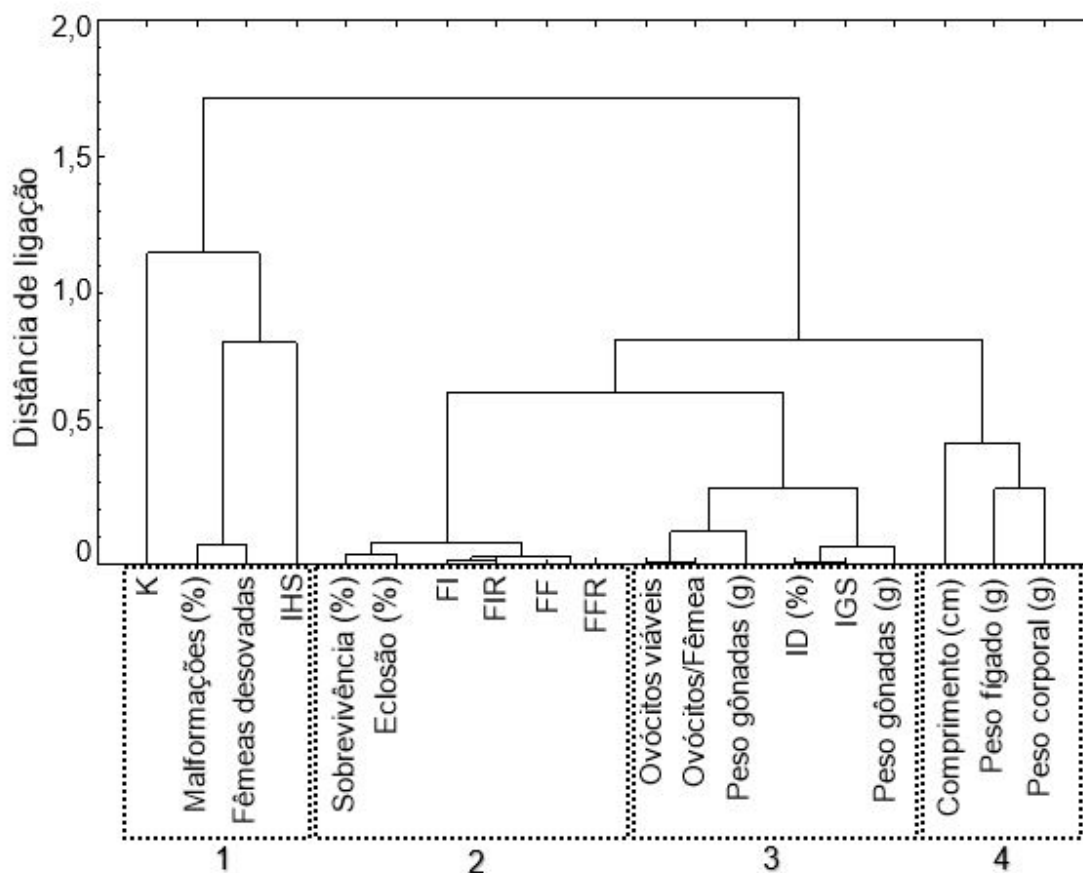


Figura 11. Resultado da Análise de Cluster (pelo método da distância de ligação completa e mensuração por r de Pearson -1) dos dados obtidos a partir da exposição de juvenis de *Astyanax lacustris* à derivados do petróleo. Os grupos formados foram denominados: Grupo 1: Outros; Grupo 2: Desenvolvimento embrionário; Grupo 3: Índices reprodutivos; Grupo 4: Índices biométricos.

Grupo 1:

No grupo 1, apenas a taxa de malformações apresentou diferença entre os tratamentos e o controle e também entre os diferentes eventos reprodutivos (tempo). A exposição à FSA_G gerou a maior taxa de embriões malformados (18,2%), mas não diferiu estatisticamente do grupo exposto à FSA_P (11,8%). Individualmente, as diferenças entre os tratamentos e o grupo controle aconteceram em relação ao primeiro e segundo evento reprodutivo. Exemplares expostos à FSA_{OM} não diferiram estatisticamente do grupo controle, que foi o único que não apresentou nenhuma diferença entre os diferentes eventos reprodutivos.

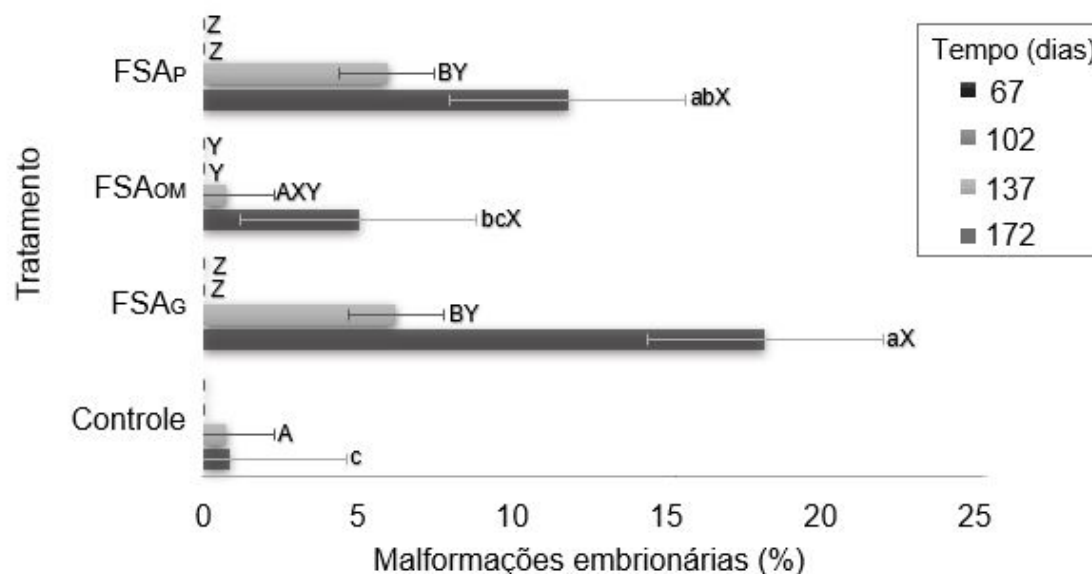


Figura 12. Taxa de malformações embrionárias de *Astyanax lacustris* obtidos de diferentes desovas de reprodutores expostos a fração solúvel em água do petróleo (FSA_P), da gasolina (FSA_G) e de um óleo mineral (FSA_{OM}). Letras minúsculas (a,b,c) indicam diferenças no tempo 67. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferença estatísticas entre os tratamentos no tempo 102. Letras maiúsculas (X,Y,Z) indicam diferença entre os diferentes tempos para cada tratamento.

Grupo 2:

Observou-se uma tendência de aumento linear da taxa de eclosão e da taxa de sobrevivência dos embriões tanto nos tratamentos quanto no controle ao longo do tempo. Porém, os coeficientes angulares de cada curva indicaram que esse processo foi especialmente acentuado para animais submetidos à FSA_P e à FSA_G (Figura 10). Não houve diferença estatística entre o grupo exposto à FSA_{OM} e o grupo controle. O tratamento exposto à FSA_G apresentou a mais baixa taxa de eclosão e a FSA_P a pior taxa de sobrevivência em relação aos demais tratamentos e também ao controle.

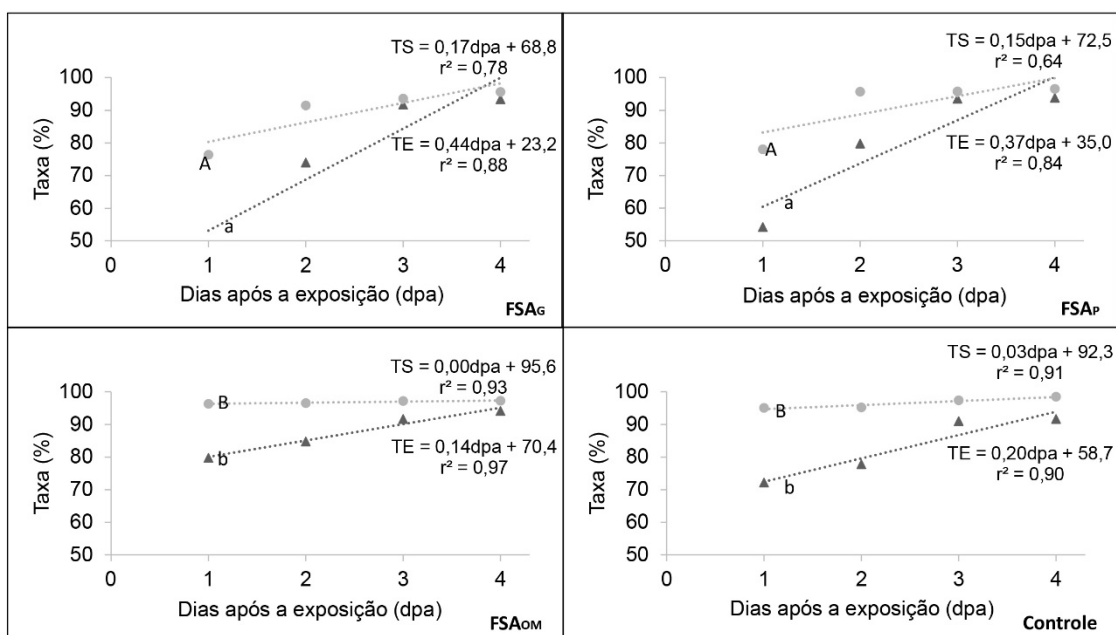


Figura 13. Relação entre as taxas de eclosão (TE) e de sobrevivência (TS) de embriões de *Astyanax lacustris* com o tempo decorrido após a exposição de animais, ainda na fase juvenil, às frações solúveis em água do petróleo (FSA_P), da gasolina (FSA_G) e do óleo mineral (FSA_{OM}). Letras minúsculas (^{a,b}) indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos quanto a taxa de eclosão. Letras minúsculas (^{A,B}) indicam diferença estatística entre os tratamentos quanto a taxa de sobrevivência embrionária (96 h).

Grupo 3:

Analisando os quatro eventos reprodutivos conjuntamente, o número de fêmeas desovadas foi maior no grupo controle (81%) que nos tratamentos (69% em todos os tratamentos). Observou-se ainda uma tendência de aumento no número de fêmeas desovando entre o primeiro e o último evento reprodutivo (Figura 11).

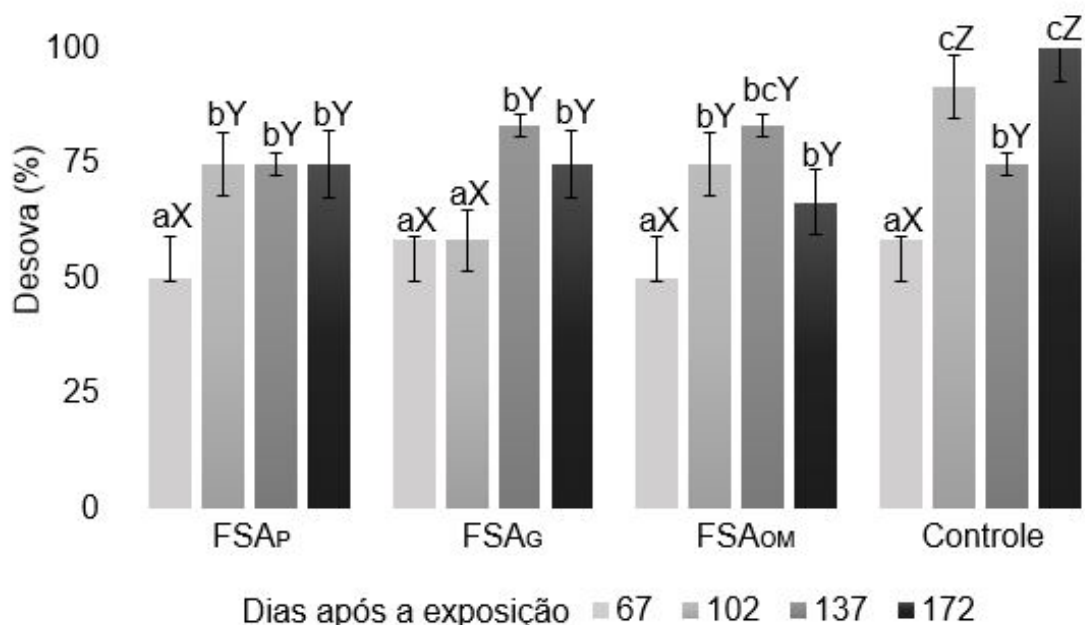


Figura 14. Porcentagem de fêmeas de *Astyanax lacustris* que desovaram durante os quatro diferentes eventos de reprodução artificial ocorridos após a exposição à fração solúvel em água do petróleo (FSA_p), da gasolina (FSA_g) e do óleo mineral (FSA_{om}). Letras minúsculas (a,b,c), indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos para o mesmo tratamento. Letras maiúsculas (X,Y,Z), indicam diferença estatística entre o mesmo tempo, entre os diferentes tratamentos.

Houve também diferença estatística entre os tratamentos e o grupo controle em relação ao ID% (Figura 12). No primeiro evento reprodutivo (ocorrido 67 dias após a exposição), os valores obtidos para os peixes expostos à FSA_g foram semelhantes aos expostos à FSA_p, ambos diferiram dos animais expostos à FSA_{om}, que por sua vez, foram semelhantes aos do grupo controle. Houve uma tendência de aumento do ID% entre o primeiro evento reprodutivo e o último, em todos os tratamentos avaliados e também no controle. Entretanto, o tempo

decorrido após o período de exposição não afetou significativamente os animais do grupo controle.

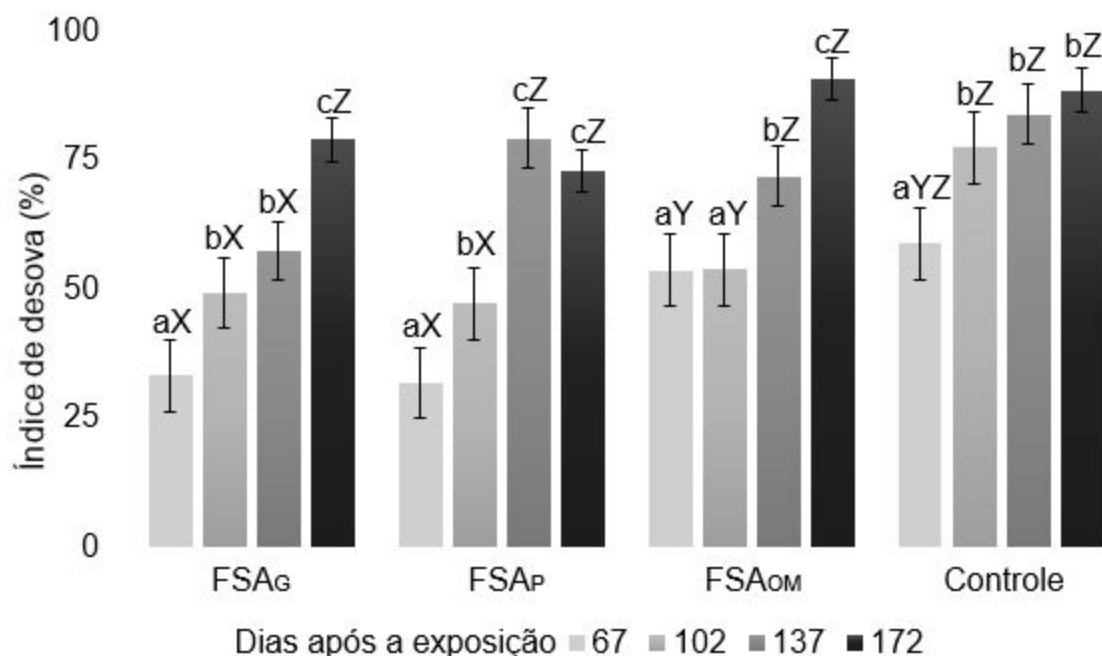


Figura 15. Índice de desova (%) de exemplares de *Astyanax lacustris* expostos à fração solúvel em água da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P) e do óleo mineral (FSA_{OM}) e reproduzidos artificialmente em quatro diferentes tempos após a exposição. Letras minúsculas (a,b,c), indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos para o mesmo tratamento. Letras maiúsculas (X,Y,Z), indicam diferença estatística entre o mesmo tempo, entre os diferentes tratamentos.

O número de ovócitos gerados em relação ao peso corporal das fêmeas foi de 81 a 136% maior no grupo controle que nos tratamentos (mais especificamente, 29.155 ovócitos no grupo controle, contra 12.332 na FSA_G, 12.665 na FSA_P e 16.095 ovócitos no FSA_{OM}, respectivamente). Não houve diferença entre os tratamentos (Figura 13).

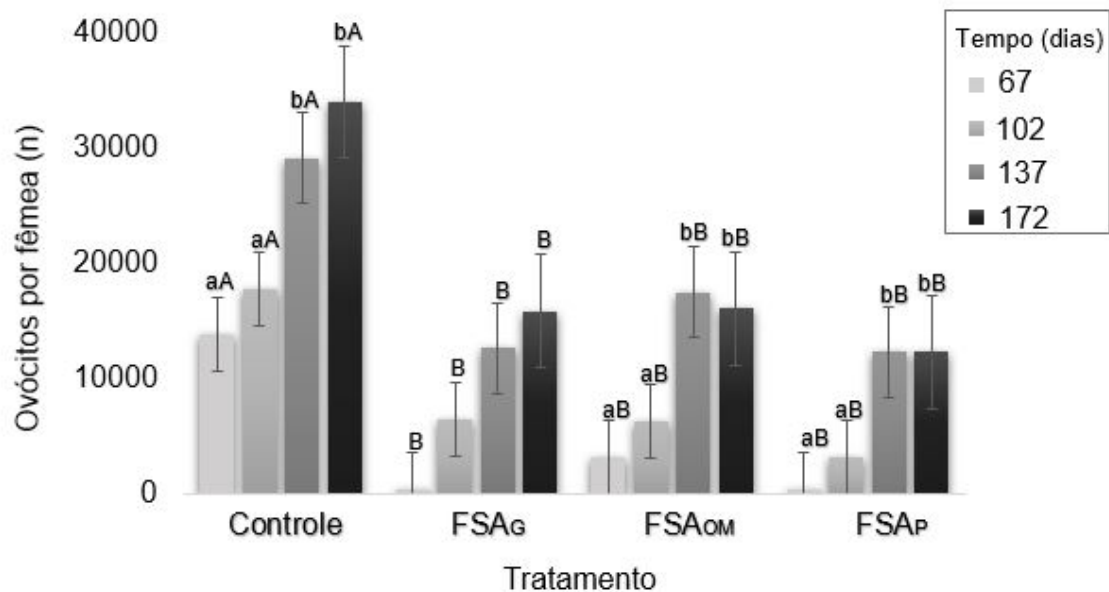


Figura 16. Número de ovócitos obtidos de exemplares de *Astyanax lacustris* induzidos artificialmente à reprodução em tempos diferentes após a exposição crônica às frações solúveis em água da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P), e de um óleo mineral lubrificante (FSA_{OM}). Letras minúsculas (a,b) indicam diferença significativas pelo teste de comparação de médias (ANOVA) seguido de post-teste de Tukey ($p < 0,05$) entre o mesmo tratamento. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferença estatística entre os diferentes tempos.

Grupo 4:

O coeficiente de determinação (r^2) da relação entre o peso médio das fêmeas (g) e o peso dos ovos (g) foi de 0,86, mesmo valor quantificado para a relação entre o peso das gônadas (g) e o comprimento (cm) das mesmas. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$), entre os tratamentos e o grupo controle em relação ao comprimento (cm), ao peso do fígado (g) e nem ao peso corporal (g). Já o peso das gônadas apresentou diferença estatística entre todos os tratamentos em relação ao grupo controle (Figura 14). No terceiro e quarto evento reprodutivo não foi observada diferença estatística entre os exemplares expostos à FSA_G e o grupo controle, e a FSA_{OM} não diferiu dos exemplares expostos à FSA_P. Os exemplares expostos à FSA_G e FSA_P apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos diferentes eventos.

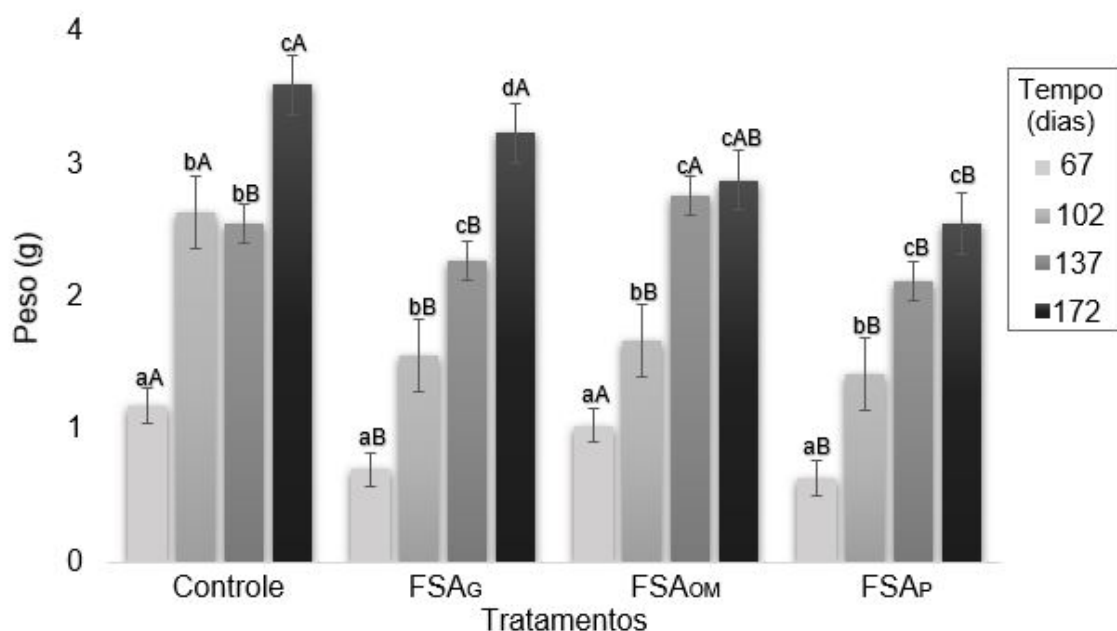


Figura 17. Peso gonadal (g) de fêmeas de *Astyanax lacustris* induzidas artificialmente à reprodução em tempos diferentes após a exposição subletais às frações solúveis em água da gasolina (FSA_G), do óleo mineral (FSA_{OM}) e do petróleo (FSA_P). Letras minúsculas (^{a,b}) indicam diferença significativas pelo teste de comparação de médias (ANOVA) seguido de post-teste de Tukey ($p < 0,05$) entre o mesmo tratamento. Letras maiúsculas (^{A,B}) indicam diferença estatística entre os diferentes tempos.

Síntese de resultados:

Considerando os resultados finais obtidos, fez-se uma síntese de acordo com o tratamento que foi superior estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao outro (Tabela 13).

Tabela 14. Síntese dos resultados obtidos após exposição de juvenis de *Astyanax lacustris* às frações solúveis em água da gasolina (FSA_G), do petróleo (FSA_P) e de um óleo mineral lubrificante (FSA_{OM}).

Tratamentos comparados	Tratamentos com maiores índices ($p < 0,05$)			
	Controle	FSA _G	FSA _P	FSA _{OM}
Controle	-	-	-	-
FSA _G	1, 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	-	18	1, 3, 9, 11, 18, 19
FSA _P	1, 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	19	-	1, 3, 9, 11, 18, 19

Tratamentos comparados	Tratamentos com maiores índices (p < 0,05)			
	Controle	FSA _G	FSA _P	FSA _{OM}
FSA _{OM}	8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17	-	-	-

1- Índice gonadossomático; 2- Índice de condição corporal; 3- Índice de desova; 4- Índice hepatossomático; 5- Comprimento total; 6- Peso corporal; 7- Peso do fígado; 8- n° de fêmeas desovadas; 9- n° de ovócitos por fêmea; 10- Peso das gônadas; 11- Malformações; 12- Fertilidade Inicial; 13- Fertilidade Inicial Relativa; 14- Taxa de fecundação; 15- Fertilidade Final; 16- Fertilidade Final Relativa; 17- n° de ovócitos viáveis; 18- Taxa de eclosão; 19- Taxa de sobrevivência.

18 DISCUSSÃO

Este estudo pode ser dividido em dois diferentes momentos: o primeiro, envolvendo a aclimação e a exposição dos juvenis de *A. lacustris* às frações solúveis em água dos produtos derivados de petróleo e, o segundo, englobando as fases de manutenção desses indivíduos em ambiente sem a presença de xenobiontes e os quatro eventos de indução reprodutiva.

Os peixes passaram a ser induzidos à reprodução artificial assim que constatado, a partir de evidências morfológicas externas (fêmeas com ventre abaulado e por urogenital túrgido e machos com espículas da nadadeira anal ásperas) que todos os indivíduos haviam atingido a idade de primeira maturação. Na literatura, ainda existem lacunas na relação do período reprodutivo de *A. lacustres* e o fator de condição corporal dos indivíduos (Silva, Pessoa et al. 2012). Por isso, índices como IGS e o IHS, foram utilizados neste trabalho como critério de avaliação, uma vez que os mesmos têm sido frequentemente utilizados como indicadores do estado reprodutivo de peixes (Lam 1983, Blazer 2002, Siqueira-Silva, Santos Silva et al. 2015, Tolussi, Gomes et al. 2018, Saleh e Ali 2019).

O IHS está relacionado à mobilização das reservas energéticas para o processo de vitelogênese (Singh, Srivastava et al. 2017, Agostinho, Barbieri et al. 2018, Gonino, Branco et al. 2019, Saleh e Ali 2019). No presente caso, não houve indícios de que a exposição dos animais aos hidrocarbonetos de petróleo tenha apresentado influência sobre o IHS. Já o IGS é indicativo do estado funcional das gônadas dos peixes, pois existe uma relação direta entre o processo de maturação das gônadas com o próprio aumento (volume) gonadal (Zimba, Sussel et al. 2018). Já no caso dos machos, este índice nem sempre é

o mais adequado para representar as condições reprodutivas dos indivíduos (Lam 1983, Vazzoler 1996, Blazer 2002, Zimba, Sussel et al. 2018), uma vez que o aumento do volume dos testículos é muito menos pronunciado que o dos ovários.

O IGS médio aqui encontrado para as fêmeas do grupo controle foi de $22,2 \pm 7,3\%$ e para os machos foi de $4,2 \pm 2,6\%$. Tais valores são inclusive superiores aos descritos também para *A. lacustris* por Zimba, Sussel et al. (2018), que estimaram o IGS em $17,2 \pm 1,1\%$, para fêmeas, e $2,7 \pm 0,2\%$ para os machos. As fêmeas do grupo controle apresentaram IGS 43,5% superior ao das fêmeas da FSA_{OM}, 62,8% maior que as da FSA_G e 72,4% maior que as da FSA_P. Porém, os efeitos da exposição a hidrocarbonetos de petróleo praticamente deixaram de existir 137 dias após a exposição, momento esse em que não foram mais observadas diferenças estatísticas entre os IGS dos animais dos tratamentos e do grupo controle.

O sucesso do processo de indução hormonal à desova de peixes está intrinsecamente ligado ao estágio de desenvolvimento dos ovócitos, principalmente quando da primeira maturação (Felizardo, Murgas et al. 2012) e também à qualidade reprodutiva dos machos (Porto-Foresti, Castilho-Almeida et al. (2005). É possível, portanto, que nos primeiros eventos reprodutivos alguns dos reprodutores estivessem morfologicamente aptos à reprodução, mas fisiologicamente ainda inaptos. Neste caso, com o passar do tempo a situação foi naturalmente se normalizando, o que explicaria, em parte, a menor eficiência quantificada no primeiro evento reprodutivo e a tendência de aumento do número de fêmeas desovando nos eventos seguintes. Segundo Porto-Foresti, Castilho-Almeida et al. (2005) e Zimba, Sussel et al. (2018), em condições "normais" é esperado que aproximadamente 75% das fêmeas induzidas respondam à indução hormonal. Neste trabalho, 69% das fêmeas dos tratamentos responderam à indução hormonal, contra 81% das do grupo controle, uma diferença estatisticamente significativa e que, mais uma vez, evidencia uma provável relação com a exposição dos animais aos hidrocarbonetos de petróleo.

Mais fêmeas desovando, por sua vez, ajuda também a explicar o maior número total de ovócitos produzidos no grupo controle, que foi 2,6 vezes maior que o número de ovócitos gerados pelas fêmeas expostas à FSA_G, 3,3 vezes

maior que os exemplares expostos à FSA_P e 2,2 vezes maior que o grupo exposto à FSA_{OM}. Mas, apenas isso também não explicaria completamente os resultados obtidos, uma vez que o número relativo de ovócitos produzidos (ovócitos/fêmea) também foi maior no controle que nos tratamentos. No grupo controle, foram obtidos 33.163 ovócitos/fêmea, valor 2,1 vezes maior que o obtido em relação aos indivíduos expostos à FSA_G, 2,9 vezes maior que os expostos à FSA_P e 1,9 vezes maior que os exemplares do grupo FSA_{OM}. Além disso, a taxa de fertilização dos ovócitos liberados pelas fêmeas do grupo controle também foi maior que a dos tratamentos.

Não houve interferência da adição das frações solúveis de petróleo e derivados sobre os demais indicadores de qualidade de água monitorados nas unidades experimentais. O que se observou foi a ocorrência de variação desses indicadores em relação às diferentes fases experimentais. Era esperado, e obviamente desejado, que a água utilizada para a renovação nos tanques de manutenção dos indivíduos previamente expostos aos derivados de petróleo, e também no grupo controle, apresentassem indicadores superiores aos da água em que os animais eram mantidos por 24 h. Nos sistemas de exposição, manutenção e reprodução, as concentrações e os níveis de saturação de oxigênio dissolvido não apresentaram nenhuma variação em relação à água de reposição, pois o sistema era mantido sob aeração contínua. Mesmo com os sistemas de manutenção e de reprodução praticamente não tendo sido submetidos a trocas radicais de água, apenas sendo feita a reposição da água perdida por evaporação, os demais indicadores de qualidade de água monitorados pouco variaram.

Por outro lado, nas placas de cultivo celular utilizadas para avaliação do desenvolvimento ontogenético, houve uma expressiva redução das concentrações de oxigênio dissolvido justamente por não haver a possibilidade de introdução de aeração artificial. Entretanto, tal fato ocorreu tanto nos tratamentos quanto no controle e, ainda assim, a renovação diária da água foi suficiente para manter o oxigênio disponível aos embriões e larvas em padrões mínimos recomendáveis para a espécie (Porto-Foresti, Castilho-Almeida et al. 2005, Stevanato e Ostrensky 2018).

Em relação aos resultados obtidos na fase de desenvolvimento embrionário, constatou-se, assim como em relação aos índices reprodutivos já descritos, também uma tendência de aumento dos índices avaliados com o decorrer dos eventos reprodutivos, tanto no controle quanto nos tratamentos. O aumento da taxa de fecundação entre o primeiro e o quarto evento reprodutivo foi de 47,1%, no tratamento exposto à FSA_G, 40,3%, na FSA_P, 28,4%, na FSA_{OM} e de 9,8% no grupo controle. Ou seja, é mais uma vez, evidente que os animais expostos aos hidrocarbonetos de petróleo foram negativamente afetados. Por outro lado, esse impacto ocorreu basicamente em relação ao primeiro evento reprodutivo. No grupo induzido à reprodução, 102 dias após a exposição, quase não se observou mais diferenças entre os tratamentos e o grupo controle.

Bagenal (1969), Sato, Sampaio et al. (2006) e Murray, Adams et al. (2018) afirmaram que espécies com pequenos ovócitos, como é o caso do lambari *A. lacustris*, tendem a apresentar elevados índices de fecundidade, uma estratégia reprodutiva para compensar as menores taxas de sobrevivência embrionária. Neste trabalho, o maior número de ovócitos viáveis foi quantificado nas fêmeas do grupo controle (31.054 ovócitos/fêmea). Esse valor é totalmente compatível com os já reportados para a espécie, que variam desde números mais altos que os aqui observados, como os 85.459 ovócitos/fêmea, descritos por Orbolato (2006), e também mais baixos, como os 11.085 ovócitos/fêmea, descritos por Sato, Sampaio et al. (2006); 4.978 ovócito por fêmea, reportados por Gennari Filho e Braga (1996); e até 740 ovócitos/fêmea em estudo conduzido por Nomura (1985)). Dessa forma, por um lado, mesmo considerando os valores obtidos nos tratamentos expostos aos hidrocarbonetos de petróleo (10.397 ovócitos/fêmea para os exemplares expostos à FSA_P; 13.901 ovócitos/fêmea no grupo exposto à FSA_G e 14.566 ovócitos/fêmea nos animais expostos à FSA_{OM}), os valores obtidos estão dentro dos limites já relatados. Por outro, não há como desprezar as diferenças obtidas entre os tratamentos e o grupo controle, demonstrando novamente efeitos negativos da exposição dos animais aos produtos testados.

Quanto mais ovócitos viáveis foram sendo gerados pelos reprodutores dos tratamentos, maior também foi o número de embriões que passaram a eclodir e a sobreviver. A taxa de eclosão dos embriões obtidos a partir de indivíduos expostos à FSA_G foi de 76,5%, de um total de 13.902 ovócitos

fertilizados. A taxa de sobrevivência desses exemplares foi de 89,3%, ou seja, ao final de 177 dias, 9.497 embriões eclodiram e conseguiram sobreviver. Resultados não muito diferentes foram obtidos para a FSA_P (7.639 embriões) e para a FSA_{OM} (12.352). Porém, esses números se mostram inferiores quando comparados ao grupo controle, que gerou 24.933 embriões saudáveis, que é 2,01 vezes maior que o número de embriões obtidos pelo grupo com FSA_{OM}, 3,26 vezes maior que a FSA_P e 2,62 vezes o grupo exposto à FSA_G.

Tanto a taxa de eclosão como a taxa de sobrevivência são fundamentais para a compreensão dos parâmetros reprodutivos dos peixes (Solis-Murgas, Felizardo et al. 2011, Vignet, Larcher et al. 2016) e conforme o aumento do número de embriões eclodidos, observou-se uma redução nas malformações embrionárias. Exemplares expostos à FSA_G e FSA_P foram os que apresentaram as maiores taxas de malformações na progênie (24,4% e 17,7%), respectivamente. Larvas malformadas também foram observadas, mesmo que em pequena quantidade, no grupo exposto à FSA_{OM} (5,7%) e no grupo controle (1,6%). Vale ressaltar que nenhuma malformação foi detectada em embriões obtidos após os eventos reprodutivos ocorridos 137 dias após a exposição ao petróleo e derivados.

Dos 19 índices reprodutivos e embrionários avaliados neste trabalho, até 73,6% desses índices foram afetados pela exposição dos animais aos hidrocarbonetos de petróleo. O grupo controle foi o que apresentou os melhores resultados, porém, foi estatisticamente semelhante ao grupo exposto à FSA_{OM} em 10 (52,6%) e em 4 índices (26,3%) em animais expostos à FSA_P e à FSA_G. Apenas em relação a um índice (número de ovócitos/fêmea), todos os tratamentos diferiram do grupo controle e também entre si, sendo o melhor resultado obtido no grupo controle, seguido pelo grupo exposto à FSA_{OM}, à FSA_G e o pior, o grupo exposto à FSA_P. Em relação a apenas dois índices houveram diferenças estatísticas entre os resultados obtidos entre animais expostos à FSA_G e à FSA_P. O grupo exposto à FSA_G, apresentou maior taxa de eclosão em relação a FSA_P, e o oposto foi observado em relação à taxa de sobrevivência embrionária.

Chama a atenção a baixa toxicidade da FSA_{OM} para *A. lacustris*, uma vez que, na maioria dos índices analisados, foi semelhante ou ligeiramente inferior

aos gerados por animais do grupo controle. Quase também não houve diferenças entre os resultados obtidos dos reprodutores expostos à FSA_P e à FSA_G, resultado bem diferente à maioria dos trabalhos na literatura, em que a fração solúvel do petróleo tem sido reportada como menos tóxica que a fração solúvel da gasolina (Galvan 2015, Cherr, Fairbairn et al. 2017, Dal Pont 2018, Dighiesh, Eldanasoury et al. 2019).

A concentração nominal da FSA_G (0,5%) foi a menor entre todas as frações testadas (FSA_P = 1,7% e FSA_{OM} = 11,24%). Mesmo assim, foi a que apresentou a maior concentração de hidrocarbonetos. A gasolina tem sua composição predominantemente formada por moléculas de menores cadeias carbônicas (geralmente entre 5 a 10 átomos de carbono), constituída principalmente por hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX), como é o caso do benzeno (Barker, Hubbard et al. 1990, Corseuil e Fernandes 1999, Fernandes 2002, Fernandes, Gouveia et al. 2014) e que são consideradas as mais tóxicas para os organismos aquáticos (Corseuil, Hunt et al. 1998, Finotti, Caicedo et al. 2001, Powers, Hunt et al. 2001, Leite, da Cruz et al. 2015, Bettim, Galvan et al. 2016, Rama, Ramos et al. 2019).

Além disso, a toxicidade dos hidrocarbonetos de petróleo tende a se elevar quando há adição de pelo menos 10% de etanol (Corseuil, Kaipper et al. 2004, Lee 2008), uma vez que o álcool aumenta a solubilidade do BTEX em água (Corseuil e Fernandes 1999, Powers, Hunt et al. 2001, Tiburtius, Peralta-Zamora et al. 2009), o que pode ajudar a explicar a alta concentração de benzeno e tolueno na FSA_G, que continha ao menos, 3,5 vezes a mais desses compostos em sua composição em relação à FSA_P e 136,9 vezes a mais que a FSA_{OM}.

Há robustas evidências para se afirmar que a exposição a hidrocarbonetos de petróleo ainda na fase juvenil e em concentrações subletais, afeta significativa e negativamente o processo reprodutivo e o desenvolvimento embrionário de *A. lacustris*. Os impactos identificados tendem, porém, a ser diluídos e até desaparecer com o tempo. Quanto menor o período decorrido entre a exposição dos animais e o evento reprodutivo, maiores os impactos e vice-versa.

Entre os produtos testados, a FSA_{OM} apresentou uma baixa toxicidade, apresentando resultados muito similares aos resultados obtidos por animais do

grupo controle. Já a FSA_P e a FSA_G foram mais tóxicas, ocasionando efeitos negativos nos reprodutores e nas progênies. Nota-se também que não há diferenças significativas entre os resultados obtidos da exposição à FSA_P e à FSA_G.

Os resultados aqui obtidos contribuem para melhor compreensão dos efeitos da exposição da fração solúvel em água da gasolina, do petróleo e de um óleo mineral lubrificante na reprodução de *A. lacustris*, e pode servir como base para a compreensão desses efeitos em outras espécies de peixes neotropicais.

19 REFERÊNCIAS

Agostinho, A. A., G. Barbieri, J. Verani and N. Hahn (2018). "Variação do fator de condição e do índice hepatossomático e suas relações com o ciclo reprodutivo em *Rhinelepis aspera* (Agassiz, 1829)(Osteichthyes, Loricariidae) no rio Paranapanema, Porecatu, PR."

Akinsanya, B., P. O. Isibor, M. P. Kuton, E. O. Dada, J. K. J. T. J. o. B. Saliu and A. Zoology (2019). "Comparative partition coefficients of BTEX and OCPs between host *Synodontis clarias* and parasite *Wenyonia acuminata*." **80**(1): 38.

Anderson, J., J. Neff, B. Cox, H. Tatem and G. Hightower (1974). "Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish." Marine Biology **27**(1): 75-88.

APHA (1995). American Public Health Association: Standard methods for the examination of water and wastewater: 4500-NH₃ Método fenol de determinação de Amonia Total. Washington, DC, USA.

APHA (2005). "American Public Health Association: Standard methods for the examination of water and wastewater. Method 4500 F. 4-114." **21**.

Azevedo-Santos, V. M., J. R. Garcia-Ayala, P. M. Fearnside, F. A. Esteves, F. M. Pelicice, W. F. Laurance and R. C. Benine (2016). "Amazon aquatic biodiversity imperiled by oil spills." Biodiversity and Conservation **25**(13): 2831-2834.

Bagenal, T. J. J. o. F. B. (1969). "The relationship between food supply and fecundity in brown trout *Salmo trutta* L." **1**(2): 167-182.

Barker, J., E. Hubbard, L. J. P. o. P. H. Lemon, D. Organic Chemicals in Groundwater Prevention and Restoration (1990). "The influence of methanol and MTBE on the fate of persistence of monoaromatic hydrocarbons in groundwater." 113-127.

Baroiller, J.-F. and Y. Guiguen (2001). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in gonochoristic fish. Genes and Mechanisms in Vertebrate

Sex Determination. G. Scherer and M. Schmid. Basel, Birkhäuser Basel: 177-201.

Bettim, F. L., G. L. Galvan, M. M. Cestari, C. I. Yamamoto and H. C. S. de Assis (2016). "Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline." Chemosphere **144**: 1467-1474.

Blazer, V. (2002). "Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes." Fish Physiology and Biochemistry **26**(1): 85-101.

Carragher, J., J. Sumpter, T. Pottinger and A. Pickering (1989). "The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson." General and comparative endocrinology **76**(2): 310-321.

Cohen, A., D. Nugegoda and M. M. Gagnon (2001). "Metabolic responses of fish following exposure to two different oil spill remediation techniques." Ecotoxicology and Environmental Safety **48**(3): 306-310.

Corseuil, H. X. and M. J. R. e. s. e. a. Fernandes (1999). "Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira." **4**(1): 71-75.

Corseuil, H. X., C. S. Hunt, R. C. F. Dos Santos and P. J. J. W. R. Alvarez (1998). "The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation." **32**(7): 2065-2072.

Corseuil, H. X., B. I. Kaipper and M. J. W. R. Fernandes (2004). "Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol." **38**(6): 1449-1456.

Costa-Silva, D., M. M. Nunes, G. Wallau, I. Martins, A. P. Zemolin, L. Cruz, N. Rodrigues, A. Lopes, T. Posser and J. Franco (2015). "Oxidative stress markers in fish (*Astyanax* sp. and *Danio rerio*) exposed to urban and agricultural effluents in the Brazilian Pampa biome." Environmental Science and Pollution Research **22**(20): 15526-15535.

Dal Pont, G. (2018). "Effects of petroleum hydrocarbons to tropical and temperate fish species: a toxicity and multibiomarker approach for the assessment of environmental contamination."

Dal Pont, G., L. R. Souza-Bastos, M. Giacomini, R. G. Dolatto, L. M. Baika, M. T. Grassi, A. Ostrensky, C. M. J. C. B. Wood, P. P. C. Toxicology and Pharmacology (2019). "Acute exposure to the water-soluble fraction of gasoline (WSFG) affects oxygen consumption, nitrogenous-waste and Mg excretion, and activates anaerobic metabolism in the goldfish *Carassius auratus*." **226**: 108590.

Dighiesh, H. S., M. A. Eldanasoury, S. A. Kamel and S. M. Sharaf (2019). "Toxicity of Water Soluble Fractions of Petroleum Crude Oil and its Histopathological Alterations Effects on Red Tilapia Fish."

Disner, G. R., S. L. M. Calado, H. C. S. Assis and M. M. J. E.-C. e. B. Cestari (2017). "Toxicity of naphthalene in the Neotropical Fish *Astyanax Lacustris* (Characiformes: Characidae) and *Geophagus Brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae)." **17**(1): 7-22.

Dufech, A. P. S. (2009). "Uso de assembleias de peixes como indicadores de degradação ambiental nos ecossistemas aquáticos do Delta do Rio Jacuí, RS."

Dupuis, A. and F. Ucan-Marin (2015). "A literature review on the aquatic toxicology of petroleum oil: An overview of oil properties and effects to aquatic biota." Res Doc **7**.

EPA (2002). "United States Environmental Protection Agency: Methods of measuring the acute toxicity of effluents and receiving eaters to freshwater and marine organisms."

Felizardo, V., L. Murgas, E. Andrade, P. López, R. Freitas and M. J. T. Ferreira (2012). "Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*)." **77**(8): 1570-1574.

Fernandes, A. N., C. D. Gouveia, M. T. Grassi, J. da Silva Crespo, M. J. B. o. e. c. Giovanela and toxicology (2014). "Determination of monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in surface waters from a Brazilian subtropical hydrographic basin." **92**(4): 455-459.

Fernandes, M. (2002). "Atenuação natural da contaminação de aquífero submetido a derramamento de gasolina."

Finotti, A. R., N. O. L. Caicedo and M. T. R. J. R. B. d. R. H. Rodriguez (2001). "Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados de petróleo: toxicidade e a legislação brasileira." **6**(2): 29-46.

Garutti, V. and H. Britski (2000). "Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia." Comn. Mus. Cienc. Tecnol. **13**: 65-88.

Gennari Filho, O. and F. d. S. J. U. Braga, Maringá (1996). "Fecundidade e desova de *Astyanax bimaculatus* e *A. schubarti* (Characidae, Tetragonopterinae) na represa de Barra Bonita, rio Piracicaba (SP)." **18**(2): 241-254.

Gonino, G., P. Branco, E. Benedito, M. T. Ferreira and J. M. J. S. o. T. T. E. Santos (2019). "Short-term effects of wildfire ash exposure on behaviour and hepatosomatic condition of a potamodromous cyprinid fish, the Iberian barbel *Luciobarbus bocagei* (Steindachner, 1864)." **665**: 226-234.

Heath, A. G. (1995). Water Pollution and Fish Physiology, Lewis Publishers.

Hicken, C. E., T. L. Linbo, D. H. Baldwin, M. L. Willis, M. S. Myers, L. Holland, M. Larsen, M. S. Stekoll, S. D. Rice and T. K. Collier (2011). "Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces

aerobic capacity in adult fish." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(17): 7086-7090.

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.

Kime, D. E. (1995). "The effects of pollution on reproduction in fish." Reviews in Fish Biology and Fisheries **5**(1): 52-95.

Krahn, M. M., M. S. Myers, D. Burrows and D. C. Malins (1984). "Determination of metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways." Xenobiotica **14**(8): 633-646.

Lam, T. (1983). 2 Environmental Influences on Gonadal Activity in Fish. Fish physiology, Elsevier. **9**: 65-116.

Lee, K. Y. J. E. P. (2008). "Phase partitioning modeling of ethanol, isopropanol, and methanol with BTEX compounds in water." **154**(2): 320-329.

Leite, M. B. N. L., A. L. da Cruz, L. E. A. Rodrigues, S. R. Yamashita, C. R. G. Carqueija, I. A. J. B. o. e. c. Nascimento and toxicology (2015). "Comparing the toxicity of water-soluble fractions of biodiesel, diesel and 5% biodiesel/diesel blend on oreochromis niloticus using histological biomarkers." **95**(5): 574-581.

Luz, E. L. P., D. d. S. P. Silva, M. C. de Medeiros, A. P. X. de Gondra Bezerra, E. M. G. Lorena and Í. G. S. dos Santos (2016). "Pollution mitigation for hydrocarbons of petroleum through the bioremediation." Revista Geama **7**(1): 28-37.

Martínez-Sales, M., F. García-Ximénez and F. J. Z. Espinós (2016). "Discrimination of the effects on zebrafish reproduction from pollutants in drinking water via female, via male and/or via fecundation water." **24**(4): 563-567.

Marty, G. D., E. F. Freiberg, T. R. Meyers, J. Wilcock, T. B. Farver and D. E. Hinton (1998). "Viral hemorrhagic septicemia virus, Ichthyophonus hoferi, and other causes of morbidity in Pacific herring Clupea pallasii spawning in Prince William Sound, Alaska, USA." Diseases of Aquatic Organisms **32**(1): 15-40.

Mcdonald, S. J., K. L. Willett, S. H. Safe, K. B. Beatty, M. Steinberg, P. Mayor and M. C. Kennicutt (1996). "Validation of bioassays for assessing the contamination of marine environments."

Murray, D., C. Adams, K. McDade, S. Solomon and M. J. A. R. Bain (2018). "Effect of broodstock holding environment on egg quality in farmed brown trout (Salmo trutta)." **13**(4): 743-749.

Nakatani, K., A. A. Agostinho, G. Baumgartner, A. Bialetzki, P. V. Sanches, M. C. Makrakis and C. S. Pavanelli (2001). Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá/PR - Brasil, Editora da Universidade Estadual de Maringá.

Neff, J. M. (1985). Polycyclic aromatic hydrocarbons. Fundamentals Aquatic Toxicology. G. M. Rand and S. R. Petrocelli. Bristol, PA, Taylor & Francis: 416-454.

Nicodem, D. E., C. L. Guedes, M. C. Z. Fernandes, D. Severino, R. J. Correa, M. C. Coutinho and J. Silva (2001). "Photochemistry of petroleum." Progress in Reaction Kinetics and Mechanism **26**(2-3): 219-238.

Niimi, A. J. C. J. o. F. and A. Sciences (1983). "Biological and toxicological effects of environmental contaminants in fish and their eggs." **40**(3): 306-312.

Nomura, H. (1985). "Dicionário dos peixes do Brasil."

Orbolato, T. S. G., L.; Aquino-Silva, M.R.; Fiorini, M.P. (2006). "Reprodução induzida do lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758)."

Pacheco, M. and M. A. Santos (2001). "Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters." Ecotoxicology and Environmental Safety **49**(1): 64-75.

Porto-Foresti, F., R. Castilho-Almeida and F. Foresti (2005). "Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*)."

Espécies nativas para piscicultura no Brasil **2**: 101-116.

Powers, S. E., C. S. Hunt, S. E. Heermann, H. X. Corseuil, D. Rice, P. J. J. C. R. i. E. S. Alvarez and Technology (2001). "The transport and fate of ethanol and BTEX in groundwater contaminated by gasohol." **31**(1): 79-123.

Rama, F., D. T. Ramos, J. B. Müller, H. X. Corseuil and K. J. J. o. c. h. Miotliński (2019). "Flow field dynamics and high ethanol content in gasohol blends enhance BTEX migration and biodegradation in groundwater."

Robidoux, P. Y., B. Virginie, L. Judith, D. J. E. Marc and e. safety (2018). "Assessment of acute and chronic toxicity of unweathered and weathered diluted bitumen to freshwater fish and invertebrates." **164**: 331-343.

Saleh, H. M. and R. A. J. E.-I. J. o. A. S. Ali (2019). "Gonadosomatic Index (GSI) Hepatosomatic Index (HSI), Condition Factor (K) and Length-weight Relationship (LWR) in *Epinephelus guaza* inhabiting Susa Coast, EL-Gabal AL-Akhadar, Libya." **1**(1): 317-326.

Sato, Y., E. V. Sampaio, N. Fenerich-Verani and J. R. Verani (2006). "Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Char odução induzida de duas espécies de Char odução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichth (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil." Revista Brasileira de Zoologia **23**(1): 267-273.

Schulz, U. H. and H. Martins-Júnior (2001). "*Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil." Brasilian Journal of Biology **61**(4): 615-622.

Silva, D. A., E. K. R. Pessoa, S. A. G. L. da Costa, N. T. Chellappa and S. J. B. A. Chellappa (2012). "Ecologia alimentar de *Astyanax lacustris* (Osteichthyes: Characidae) na Lagoa do Piató, Assu, Rio Grande do Norte, Brasil." **2**(1): 74-82.

Simonato, J., A. Albinati and C. Martinez (2006). "Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes." Bulletin of environmental contamination and toxicology **76**(3): 505-511.

Simonato, J. D., C. L. B. Guedes and C. B. R. Martinez (2008). "Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil." Ecotoxicology and Environmental Safety **69**(1): 112-120.

Singh, S., A. J. J. o. E. Srivastava and O. Health (2017). "Variations in Hepatosomatic Index (HSI) and Gonadosomatic Index (GSI) in Fish *Heteropneustes fossilis* Exposed to Higher Sub-Lethal Concentration to Arsenic and Copper." **15**(3-4): 89-93.

Siqueira-Silva, D. H., A. P. Santos Silva, A. Ninhaus-Silveira and R. Veríssimo-Silveira (2015). "The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis." Theriogenology **84**(6): 1033-1042.

Solis-Murgas, L., V. Felizardo, M. Ferreira, E. Andrade and G. J. R. B. d. R. A. Veras (2011). "Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos." **35**(2): 186-191.

Stevanato, D. J. and A. Ostrensky (2018). "Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae)." Neotropical Ichthyology **16**.

Tiburtius, E. R. L., P. Peralta-Zamora and A. J. Q. N. Emmel (2009). "Degradation of benzene, toluene and xlenes in gasoline-contaminated waters by photo-Fenton processes." **32**(8): 2058-2063.

Tolussi, C. E., A. D. O. Gomes, A. Kumar, C. S. Ribeiro, F. L. L. Nostro, P. A. Bain, G. B. de Souza, R. Da Cuña, R. M. Honji and R. G. Moreira (2018). "Environmental pollution affects molecular and biochemical responses during gonadal maturation of *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes: Characidae)." Ecotoxicology and environmental safety **147**: 926-934.

Vazzoler, A. J. M. E. (1996). "Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática." **169**.

Vicente, A. L. (2014). Uso de óleos essenciais e de compostos sintéticos como agentes anestésicos para o lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000), Universidade Federal do Paraná.

Vignet, C., T. Larcher, B. Davail, L. Joassard, K. Le Menach, T. Guionnet, L. Lyphout, M. Ledevin, M. Goubeau and H. J. T. Budzinski (2016). "Fish

reproduction is disrupted upon lifelong exposure to environmental PAHs fractions revealing different modes of action." **4**(4): 26.

Zhang, J., H. Shen, T. Xu, X. Wang, W. Li and Y. Gu (2003). "Effects of long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish." Bulletin of environmental contamination and toxicology **71**(2): 0234-0239.

Zimba, R. D., F. R. Sussel, K. R. B. de OLIVEIRA, J. G. Segura and E. M. M. J. B. d. I. d. P. VIEGAS (2018). "Desempenho reprodutivo de lambaris alimentados com grãos secos de destilaria." **43**(1): 20-34.

20 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui obtidos demonstraram a elevada toxicidade para embriões e larvas de *A. lacustris* da fração solúvel da gasolina em relação aos demais derivados testados. Demonstrou ainda que eventuais acidentes ambientais envolvendo esses produtos, mesmo que em baixas concentrações, apresentam grande potencial de causar danos à ovos fertilizados que porventura tenham contato físico com a FSA desses produtos.

Quando o contato ocorre com exemplares maiores, como foi o caso da exposição aos juvenis, pode-se afirmar que, mesmo em concentrações subletais, afeta negativamente o processo reprodutivo e contribui assim com um efeito negativo no desenvolvimento embrionário de *A. lacustris*, mesmo quando esses embriões não são expostos fisicamente aos derivados. Os impactos identificados tendem, porém, a ser diluídos e até desaparecer com o tempo.

Dentre os produtos testados, a FSA_{OM} apresentou a menor toxicidade, tanto para os embriões como para os reprodutores, apresentando resultados muito similares aos resultados obtidos por animais do grupo controle. Já a FSA_P e a FSA_G foram as mais tóxicas, ocasionando efeitos negativos nos reprodutores e nas progênies. Nota-se também que não há diferenças entre os resultados obtidos da exposição à FSA_P e à FSA_G. Os demais óleos minerais e o óleo diesel avaliados neste estudo foram mais tóxicos que o óleo mineral inerte, afetando o desenvolvimento embrionário, mas não ao ponto de serem comparados ao petróleo ou à gasolina.

Os resultados aqui obtidos podem ser utilizados como parte do processo de avaliação de risco e de impactos ecológicos, uma vez que, mesmo se utilizando a mesma concentração de trabalho tanto para os embriões como para as larvas da espécie, cada fase de vida reagiu de forma distinta a essa exposição. Os embriões foram mais afetados pela exposição que os exemplares expostos somente após a eclosão, mas de forma geral, a exposição aos derivados mostrou que esses xenobiontes ocasionam efeitos subletais e letais a esta espécie neotropical.

21 ANEXO I

22.1. Preparação das frações solúveis em água (FSA)

A obtenção da fração solúvel em água (FSA) foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Anderson, Neff et al. (1974), que consiste na agitação lenta do composto-teste em água (1:9), com auxílio de um agitador magnético (114 Nova Ética, Brasil), por 22 horas, usando um frasco de vidro do tipo Mariotte. Após este período, a amostra era mantida imóvel por 2 horas, para que fosse possível realizar a separação da FSA do sobrenadante. A água de torneira utilizada nos testes era previamente filtrada em filtros de poliéster (de 45 μm), clorada e neutralizada com tiosulfato de sódio. Antes de ser usada, a água era ainda transferida para uma incubadora tipo DBO (SL-200, Brasil), para que atingisse a temperatura do respectivo tratamento experimental.



Figura 18. Extração da fração solúvel em água da gasolina com auxílio de um frasco tipo Mariotte.

A caracterização geoquímica da fração solúvel em água do petróleo (FSA_P), da gasolina (FSA_G), do óleo diesel (FSA_D), de dois óleos minerais comerciais (FSA_{OM1} e FSA_{OM2}) e de um óleo lubrificante (FSA_{OL}) foi realizada no Laboratório de Análises Ambientais, pertencente ao Grupo de Química Ambiental da Universidade Federal do Paraná (GQA-UFPR), Brasil. Amostras dessas FSA usadas para a determinação dos hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) e dos 16 HPA considerados principais [Naftaleno (Naf); Acenaftileno (Aci); Acenafteno (Ace); Fluoreno (Flu); Fenantreno (Fen); Antraceno (Ant); Fluoranteno (Fla); Pireno (Pir); Benzo(a)antraceno (BaA); Criseno (Cris); Benzo(b)fluoranteno (BbF); Benzo(k)fluoranteno (BkF); Benzo(a)pireno (BaP); Indeno (1,2,3-cd)pireno (Ind); Dibenzo(a,h)antraceno (Dib); Benzo(g,h,i)perileno (Ben)], a segunda contendo 5 HPA deuterados [Naftaleno (Naf D8); Acenafteno (Ace D10); Fenantreno (Fen D10); Criseno (Cris D12) e Perileno (Per D12)].

22.2. Padrões analíticos, solventes e materiais

Os hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) e os policíclicos aromáticos (HPA) foram determinados separadamente, a partir de padrões analíticos de alta pureza da marca Accustandard (Connecticut, EUA), todos em ampolas de 1 mL em concentração de 2000 mg L⁻¹. A solução “mix” dos BTEX era composta por benzeno, tolueno, etilbenzeno, o-xileno, m-xileno e p-xileno. Para a determinação de HPA foram utilizados três padrões, sendo o primeiro contendo os 16 HPA prioritários, o segundo contendo 5 HPA deuterados [Naftaleno (Naf D8); Acenafteno (Ace D10); Fenantreno (Fen D10); Criseno (Cris D12) e Perileno (Per D12)] definidos como padrões internos e o terceiro referente p-terfenil deuterado (p-terf D14) usado como padrão subrogado.

Foram utilizados como solventes acetona, clorofórmio, hexano e metanol, todos com grau cromatográfico (JT Baker, Sigma-Aldrich ou Panreac). A água empregada nos experimentos foi tratada em sistema de osmose reversa equipado com lâmpada UV (RO0510, Permution). Além disso, foi purificada em purificador Simplicity (Merck Millipore, Alemanha), resultando em água ultrapura e com condutividade elétrica inferior a 1.3 µS cm⁻¹.

A descontaminação das vidrarias e outros materiais foi realizada de modo sequencial, em banho ultrassônico Usc 1400 (Unique, Brasil). Cada lavagem foi

feita inicialmente através da circulação, por 10 min, de água de torneira, seguida pelo mesmo procedimento substituindo a água da torneira por água destilada e, finalmente, por água ultrapura. Após essas etapas, os materiais compostos de vidro não volumétricos foram secos em estufa e calcinados a 400 °C por 4 h. As vidrarias foram secas em capela de fluxo laminar e rinsadas com três aliquotas de acetona HPLC. Após a limpeza, todos os materiais foram armazenados em local protegido de poeira e umidade.

22.3. Extração e quantificação de BTEX e HPA em fase aquosa

As análises foram feitas em cromatógrafo GC 2010 (Shimadzu, Japão) equipado com coluna capilar DB-5ms (Agilent, Estados Unidos) (30 m × 0.25 µm × 0.25 mm), acoplado a espectrômetro de massas Tandem TQ 8040, operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) e auto amostrador Palm AOC-5000 (Shimadzu, Japão). A identificação e confirmação dos analitos foi feita por comparação com padrões analíticos e seus espectros de massas ou razões massa/carga (m/z) armazenadas na biblioteca do software do próprio equipamento (NIST 2014).

O método *Headspace* foi aplicado à determinação de BTEX, baseado em adaptações do trabalho de Fernandes et al., 2014. Para isso, utilizou-se volume de amostra de 5,00 mL em um vial de 10 mL que foi lacrado hermeticamente com septo em silicone/PTFE. Na sequência, o frasco foi incubado a 60 °C por 10 min, sob agitação de 250 rpm. Após essa etapa, com auxílio de uma seringa aquecida a 60 °C, uma alíquota de 500 µL da fase gasosa foi injetada no sistema cromatográfico. As concentrações dos BTEX foram determinadas empregando-se as áreas dos picos cromatográficos correlacionados às concentrações por meio de uma curva preparada, sempre em triplicata, a partir dos padrões analíticos, em cinco níveis de concentração na faixa de 5.0 a 1000.0 µg L⁻¹. O cromatógrafo foi operado em modo *fullscan* com injetor a 180 °C, com temperatura inicial de 30 °C, mantido por 2 min e elevação até 100 °C a 15 °C min⁻¹, seguido por aumento até 230 °C a 30 °C min⁻¹ mantido por 3 min e totalizando corrida de 15 min. Outras condições empregadas foram injeção em modo *splitless*, fonte de íons, linha de transferência e detector a 250 °C e vazão do gás de arraste (He, 99,9998 %) a 1,0 mL min⁻¹.

Em relação à extração de HPA em fase aquosa, utilizou-se o método de micro extração líquido-líquido dispersiva assistido por vórtex (VA-DLLME), adaptado da metodologia da EPA (1996). O método consistiu na extração dos HPA em 5,0 mL de amostra aquosa em tubo cônico de vidro de 12 mL, através da injeção rápida de uma solução contendo 75 µL de solvente extrator clorofórmio e 925 µL do solvente dispersor acetona. Na sequência, o tubo foi agitado em vórtex durante 30 s a 300 rpm, centrifugado a 2800 rpm por 5 min. Em seguida, 50 µL da fase orgânica sedimentada foi transferida para um *insert* de 200 µL contendo alíquota 10 µL dos padrões internos deuterados, proporcionando concentração de 102,4 µg L⁻¹. A quantificação foi realizada via padronização externa com curva analítica construída em triplicata empregando o método VA-DLLME, em 5 níveis de concentração, na faixa de concentração de 0,25 a 4,0 µg L⁻¹, utilizando como padrão interno uma solução contendo 5 HPA deuterados em concentração de 102,4 µg L⁻¹ e um padrão subrogado p-terfenil-*d*14.

O cromatógrafo que foi operado em modo SIM, com vazão de “He” a 1,2 mL min⁻¹. O método cromatográfico consistiu na injeção de 1,0 µL em modo *splitless*, sendo mantida a 270 °C a temperatura do injetor, linha de transferência e fonte de íons e o detector a 300 °C. A programação de temperatura inicial foi de 40 °C mantida por 5 min com aumento a 5 °C min⁻¹ até 230 °C. Na sequência, foi realizada a elevação de temperatura para 250 °C a 2 °C min⁻¹, seguida por aumento em 5 °C min⁻¹ até 300 °C mantidos por 8 min, totalizando 39 minutos de corrida. Os íons selecionados para quantificação foram: Scan 1 (7 min): (m/z 128, 136, 152, 154, 162, 164, 166, 178); Scan 2 (15 min): Scan 2 (m/z 178, 202, 228, 244) e Scan 3 (22 min): (m/z 228, 236 240, 252, 260, 264, 276, 277, 278, 279).

O controle e garantia de qualidade (QA/QC) dos métodos analíticos foram conduzidos mediante estudos de recuperação que avaliaram a precisão e exatidão. Para isso, foram preparados padrões aquosos em três níveis de concentração e em triplicatas, empregando a mesma matriz aquosa utilizada nos experimentos, porém sem contaminação por hidrocarbonetos. Os níveis de concentração avaliados para BTEX foram 8; 150 e 700 µg L⁻¹. Nesses níveis a exatidão observada variou entre 78 a 122 %, com precisão de 12 %. Em relação

aos HPA também foram avaliados três níveis: 0,30; 1,20 e 2,50 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo verificadas exatidões entre 67 a 132 %, com precisão de 19 %. Esses valores sugerem que ambos os métodos de extração apresentaram desempenho adequado e confiabilidade analítica para determinação dos analitos nas matrizes avaliadas. Além disso, o desempenho de cada extração dos HPA foi monitorado com a adição do padrão subrogado deuterado em todas as amostras, sendo verificado recuperação média de 78 %, com variação máxima de 14 % em termos de RSD.

22 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (2016). NBR 15088:2016 Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae).

ABNT, A. B. d. N. T. (2011). "Aquatic ecotoxicology, acute toxicity, test with fish." NBR 15088: 22.

Adams, W. (1995). "Aquatic toxicology testing methods." Handbook of ecotoxicology: 25-46.

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

Agostinho, A. A., G. Barbieri, J. Verani and N. Hahn (2018). "Variação do fator de condição e do índice hepatossomático e suas relações com o ciclo reprodutivo em *Rhinelepis aspera* (Agassiz, 1829)(Osteichthyes, Loricariidae) no rio Paranapanema, Porecatu, PR."

Akaishi, F., H. S. De Assis, S. Jakobi, D. Eiras-Stofella, S. St-Jean, S. Courtenay, E. Lima, A. Wagener, A. Scofield and C. O. Ribeiro (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.

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

Akaishi, F. M., H. C. Silva de Assis, S. C. G. Jakobi, D. R. Eiras-Stofella, S. D. St-Jean, S. C. Courtenay, E. F. Lima, A. L. R. Wagener, A. L. Scofield and C. A. Oliveira Ribeiro (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.

Akinsanya, B., P. O. Isibor, M. P. Kuton, E. O. Dada, J. K. J. T. J. o. B. Saliu and A. Zoology (2019). "Comparative partition coefficients of BTEX and OCPs between host *Synodontis clarias* and parasite *Wenyonia acuminata*." 80(1): 38.

Albarelo, L. C. (2012). "O Vazamento do oleoduto olapa (Morretes, Paraná): avaliação ambiental e reconstituição do comportamento do óleo, da serra do mar ao Complexo Estuarino de Paranaguá."

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.

Anderson, J. (1979). "An assessment of knowledge concerning the fate and effects of petroleum hydrocarbons in the marine environment." *J Marine pollution: functional responses*: 3-21.

Anderson, J., J. Neff, B. Cox, H. Tatem and G. Hightower (1974). "Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish." *Marine Biology* 27(1): 75-88.

APHA (1995). American Public Health Association: Standard methods for the examination of water and wastewater: 4500-NH3 Método fenol de determinação de Amonia Total. Washington, DC, USA.

APHA (2005). "American Public Health Association: Standard methods for the examination of water and wastewater. Method 4500 F. 4-114." 21.

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

Araújo, M. E. d., C. W. N. Ramalho and P. W. d. Melo (2020). "Artisanal fishers, consumers and the environment: immediate consequences of the oil spill in Pernambuco, Northeast Brazil %J *Cadernos de Saúde Pública*." 36.

Azevedo-Santos, V. M., J. R. Garcia-Ayala, P. M. Fearnside, F. A. Esteves, F. M. Pelicice, W. F. Laurance and R. C. Benine (2016). "Amazon aquatic biodiversity imperiled by oil spills." *Biodiversity and Conservation* 25(13): 2831-2834.

Bagenal, T. J. J. o. F. B. (1969). "The relationship between food supply and fecundity in brown trout *Salmo trutta* L." 1(2): 167-182.

Barker, J., E. Hubbard and L. Lemon (1990). "The influence of methanol and MTBE on the fate of persistence of monoaromatic hydrocarbons in groundwater." *J Proceedings of Petroleum Hydrocarbons Organic Chemicals in Groundwater Prevention, Detection, Restoration*: 113-127.

Baroiller, J.-F. and Y. Guiguen (2001). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in gonochoristic fish. *Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*. G. Scherer and M. Schmid. Basel, Birkhäuser Basel: 177-201.

Bennemann, S. T. and O. A. Shibatta (2002). Dinâmica de uma assembléia de peixes do rio Tibagi. A Bacia do Rio Tibagi. M. E. Medri, E. Bianchini, O. A. Shibatta and J. A. Pimenta. Londrina/PR, Edição dos Editores.

Berenguer, J. N., J. da Cunha Moraes, M. M. Oliveira, J. M. Raimundo and M. M. Molisani (2017). "Effects of diesel oil and environmental quality on the enzymatic activities of a tropical estuarine catfish and implications for contamination assessment." *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 12(1): 103-111.

Bettim, F. L., G. L. Galvan, M. M. Cestari, C. I. Yamamoto and H. C. S. de Assis (2016). "Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline." *Chemosphere* 144: 1467-1474.

Blazer, V. (2002). "Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes." *Fish Physiology and Biochemistry* 26(1): 85-101.

Boeger, W. A., A. T. B. Guimarães, S. Romão, A. Ostrensky, E. ZAmberlan and F. H. Falkiewicz (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. Washington, USA, Amer Petroleum Inst.

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.

BP. (2018). "Statistical Review of World Energy – June 2018, ." Retrieved 07/04/2019, 2019.

Braunbeck, T., B. Kais, E. Lammer, J. Otte, K. Schneider, D. Stengel, R. J. E. S. Strecker and P. Research (2015). "The fish embryo test (FET): origin, applications, and future." 22(21): 16247-16261.

Brehm, F. d. A. and L. Richter (2013). Avaliação da contaminação dos sedimentos do rio Iguaçu e Barigui por derivados do petróleo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Brito, G., P. Agrawal, E. Araújo and T. Mélo (2011). "Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes." *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* 6(2): 127-139.

Brown, C. L. and J. Núñez (1994). Hormone actions and applications in embryogenesis, Sea Grant College Program, University of Hawaii.

Cariello, M. S. (2012). Efeito do naftaleno na microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*, ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e nos microscustáceos estuarinos *Nitokra sp* e *Leptocheirus plumulosus*, Universidade de São Paulo.

Carragher, J., J. Sumpter, T. Pottinger and A. Pickering (1989). "The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson." *General and comparative endocrinology* 76(2): 310-321.

Castilho-Almeida, R. (2014). *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação, Botucatu. 119p.(Doctoral Thesis. Universidade Estadual Paulista-UNESP). Available at:< http://www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/zoologia_do_2007_rodrigo_almeida.pdf> Access on.

Chapelle, F. (2001). *Ground-water microbiology and geochemistry*, John Wiley & Sons.

Cherr, G. N., E. Fairbairn and A. Whitehead (2016). "Impacts of Petroleum-Derived Pollutants on Fish Development." *Annual Review of Animal Biosciences*(0).

Cherr, G. N., E. Fairbairn and A. Whitehead (2017). "Impacts of petroleum-derived pollutants on fish development." *Annual review of animal biosciences* 5: 185-203.

Chovanec, A., R. Hofer and F. Schiemer (2003). Chapter 18 Fish as bioindicators. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*. A. M. B. B.A. Markert and H. G. Zechmeister, Elsevier. Volume 6: 639-676.

Cohen, A., D. Nugegoda and M. M. Gagnon (2001). "Metabolic responses of fish following exposure to two different oil spill remediation techniques." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48(3): 306-310.

Cook, P. M., J. A. Robbins, D. D. Endicott, K. B. Lodge, P. D. Guiney, M. K. Walker, E. W. Zabel, R. E. J. E. s. Peterson and technology (2003). "Effects of aryl hydrocarbon receptor-mediated early life stage toxicity on lake trout populations in Lake Ontario during the 20th century." 37(17): 3864-3877.

Corseuil, H. X. (1992). Enhanced degradation of monoaromatic hydrocarbons in sandy aquifer materials by microbial inoculation using biologically active carbon reactors.

Corseuil, H. X. and M. Fernandes (1999). "Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira." *J Revista engenharia sanitária e ambiental* 4(1): 71-75.

Corseuil, H. X., D. E. Gomez, C. M. Schambeck, D. T. Ramos and P. J. J. Alvarez (2015). "Nitrate addition to groundwater impacted by ethanol-blended fuel accelerates ethanol removal and mitigates the associated metabolic flux dilution and inhibition of BTEX biodegradation." *Journal of Contaminant Hydrology* 174: 1-9.

Corseuil, H. X., C. S. Hunt, R. C. F. Dos Santos and P. J. J. W. R. Alvarez (1998). "The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation." 32(7): 2065-2072.

Corseuil, H. X., B. I. Kaipper and M. J. W. R. Fernandes (2004). "Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol." 38(6): 1449-1456.

Costa-Silva, D., M. M. Nunes, G. Wallau, I. Martins, A. P. Zemolin, L. Cruz, N. Rodrigues, A. Lopes, T. Posser and J. Franco (2015). "Oxidative stress markers in fish (*Astyanax* sp. and *Danio rerio*) exposed to urban and agricultural effluents in the Brazilian Pampa biome." *Environmental Science and Pollution Research* 22(20): 15526-15535.

Costa, C. R., P. Olivi, C. M. Botta and E. L. Espindola (2008). "Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods." *Química Nova* 31(7): 1820-1830.

Cruz, L. C. (2011, 29 de março de 2011). "Jornal Gazeta do Povo: Vazamento de óleo deixa Cascavel sem água por tempo indeterminado." Retrieved 29/05/2011, from <http://www.gazetadopovo.com.br/vidaecidadania/conteudo.phtml?tl=1&id=1099052&tit=Vazamento-de-oleo-deixa-Cascavel-sem-agua-por-tempo-indeterminado>.

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

Dal Pont, G. (2018). "Effects of petroleum hydrocarbons to tropical and temperate fish species: a toxicity and multibiomarker approach for the assessment of environmental contamination."

Dal Pont, G., L. R. Souza-Bastos, M. Giacomini, R. G. Dolatto, L. M. Baika, M. T. Grassi, A. Ostrensky, C. M. J. C. B. Wood, P. P. C. Toxicology and Pharmacology (2019). "Acute exposure to the water-soluble fraction of gasoline (WSFG) affects oxygen consumption, nitrogenous-waste and Mg excretion, and activates anaerobic metabolism in the goldfish *Carassius auratus*." 226: 108590.

Das, N. and P. Chandran (2011). "Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview." *J Biotechnology research international* 2011.

Dighiesh, H. S., M. A. Eldanasoury, S. A. Kamel and S. M. Sharaf (2019). "Toxicity of Water Soluble Fractions of Petroleum Crude Oil and its Histopathological Alterations Effects on Red Tilapia Fish."

Disner, G. R., S. L. M. Calado, H. C. S. Assis and M. M. J. E.-C. e. B. Cestari (2017). "Toxicity of naphthalene in the Neotropical Fish *Astyanax Lacustris* (Characiformes: Characidae) and *Geophagus Brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae)." 17(1): 7-22.

Dourado, P. L. R., M. P. d. Rocha, L. M. Roveda, J. L. Raposo Junior, L. S. Cândido, C. A. L. Cardoso, M. A. M. Morales, K. M. P. d. Oliveira and A. B. Grisolia (2016). "Genotoxic and mutagenic effects of polluted surface water in the midwestern region of Brazil using animal and plant bioassays." *Genetics and Molecular Biology(AHEAD)*: 0-0.

Dufech, A. P. S. (2009). "Uso de assembleias de peixes como indicadores de degradação ambiental nos ecossistemas aquáticos do Delta do Rio Jacuí, RS."

Dupuis, A. and F. Ucan-Marin (2015). "A literature review on the aquatic toxicology of petroleum oil: An overview of oil properties and effects to aquatic biota." Res Doc 7.

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.

Edema, N. E., E. G. Okoloko and M. O. Agbogidi (2007). "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 2(6): 633-638.

EPA (1996). United States Environmental Protection Agency: Method 3510C: Separatory funnel liquid-liquid extraction: 1-8.

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

EPA (1996). United States Environmental Protection Agency: Method 8270C: Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (gc/ms): 1-54.

EPA (1999). "United States Environmental Protection Agency: Storm Water Technology Fact Sheet: Porous Pavement. EPA 832-F-99-023."

EPA (2002). "United States Environmental Protection Agency: Methods of measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms."

Farombi, E., O. Adelowo and Y. Ajimoko (2007). "Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River." International Journal of Environmental Research and Public Health 4(2): 158-165.

Felizardo, V., L. Murgas, E. Andrade, P. López, R. Freitas and M. J. T. Ferreira (2012). "Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*)." 77(8): 1570-1574.

Fernandes, A. N., C. D. Gouveia, M. T. Grassi, J. da Silva Crespo, M. J. B. o. e. c. Giovanela and toxicology (2014). "Determination of monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in surface waters from a Brazilian subtropical hydrographic basin." 92(4): 455-459.

Fernandes, M. (2002). "Atenuação natural da contaminação de aquífero submetido a derramamento de gasolina."

Finotti, A. R., N. O. L. Caicedo and M. T. R. J. R. B. d. R. H. Rodriguez (2001). "Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados de petróleo: toxicidade e a legislação brasileira." 6(2): 29-46.

Fouchecourt, M., P. Berny and J. Riviere (1998). "Bioavailability of PCBs to male laboratory rats maintained on litters of contaminated soils: PCB burden and induction of alkoxyresorufin O-dealkylase activities in liver and lung." Archives of environmental contamination and toxicology 35(4): 680-687.

Galvan, G. L. (2015). "Efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo e gasolina: integrando relevantes organismos e biomarcadores."

Galvan, G. L., J. R. Lirola, K. Felisbino, T. Vicari, C. I. Yamamoto and M. M. Cestari (2016). "Genetic and Hematologic Endpoints in *Astyanax altiparanae*." Bulletin of environmental contamination and toxicology 97(1): 63-70.

Garutti, V. and H. Britski (2000). "Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia." Comn. Mus. Cienc. Tecnol. 13: 65-88.

Gauto, M. A., D. de Melo Apoluceno, M. C. Amaral and P. C. Auríquio (2016). Petróleo e gás: princípios de exploração, produção e refino, Bookman Editora.

Gennari Filho, O. and F. d. S. Braga (1996). "Fecundidade e desova de *Astyanax bimaculatus* e *A. schubarti* (Characidae, Tetragonopterinae) na represa de Barra Bonita, rio Piracicaba (SP)." J UNIMAR, Maringá 18(2): 241-254.

Ghisi, N. C. and E. C. Oliveira (2013). "Evidence of contamination in the main body of the public water supply of Campo Mourão-PR: An analysis from a bioindicator of environmental quality." SaBios-Revista de Saúde e Biologia 8(2).

Goksøyr, A. and L. Förlin (1992). "The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring." Aquatic toxicology 22(4): 287-311.

Goksøyr, A., H. E. Larsen and A.-M. Husøy (1991). "Application of a cytochrome P-450 IA1-ELISA in environmental monitoring and toxicological testing of fish." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology 100(1-2): 157-160.

Goldemberg, J. (2007). "Ethanol for a sustainable energy future." J science 315(5813): 808-810.

Gonino, G., P. Branco, E. Benedito, M. T. Ferreira and J. M. J. S. o. T. T. E. Santos (2019). "Short-term effects of wildfire ash exposure on behaviour and hepatosomatic condition of a potamodromous cyprinid fish, the Iberian barbel *Luciobarbus bocagei* (Steindachner, 1864)." 665: 226-234.

Groves, F. R. (1988). "Effect of cosolvents on the solubility of hydrocarbons in water." J Environmental Science Technology

22(3): 282-286.

Gusmão, J. G. S., M. de Souza Fraga and J. dos Santos Dias (2013). "A Logística Reversa Aplicada aos óleos Lubrificantes Usados ou Contaminados Produzidos nos Postos de Combustíveis da Cidade de Boa Vista-RR." *Caderno de Ciências Humanas e Sociais Aplicadas*(01).

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

Heath, A. G. (1995). *Water Pollution and Fish Physiology*, Lewis Publishers.

Heermann, S. E. and S. E. J. J. o. C. H. Powers (1998). "Modeling the partitioning of BTEX in water-reformulated gasoline systems containing ethanol." 34(4): 315-341.

Hicken, C. E., T. L. Linbo, D. H. Baldwin, M. L. Willis, M. S. Myers, L. Holland, M. Larsen, M. S. Stekoll, S. D. Rice and T. K. Collier (2011). "Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(17): 7086-7090.

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.

Horodesky, A., V. Abilhoa, T. de Oliveira Zeni, R. M. Neto, G. G. Castilho-Westphal and A. Ostrensky (2015). "Ecological analysis of the ichthyofaunal community ten years after a diesel oil spill at Serra do Mar, Paraná state, Brazil." *Global Ecology and Conservation* 4: 311-320.

Hylland, K. (2006). "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 69(1-2): 109-123.

IBAMA (2019). "Localidades afetadas." Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

IEA, I. E. A.-. (2018). "Key World Energy Statistics." Paris. International Energy Agency.

Incardona, J. P., M. G. Carls, H. L. Day, C. A. Sloan, J. L. Bolton, T. K. Collier and N. L. Scholz (2008). "Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic Pacific herring (*Clupea pallasii*) exposed to crude oil during weathering." *Environmental Science & Technology* 43(1): 201-207.

Incardona, J. P., M. G. Carls, L. Holland, T. L. Linbo, D. H. Baldwin, M. S. Myers, K. A. Peck, M. Tagal, S. D. Rice and N. L. J. S. r. Scholz (2015). "Very low embryonic crude oil exposures cause lasting cardiac defects in salmon and herring." 5: 13499.

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.

Incardona, J. P., C. A. Vines, B. F. Anulacion, D. H. Baldwin, H. L. Day, B. L. French, J. S. Labenia, T. L. Linbo, M. S. Myers and O. P. Olson (2012). "Unexpectedly high mortality in Pacific herring embryos exposed to the 2007 Cosco Busan oil spill in San Francisco Bay." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(2): E51-E58.

Ingole, B., S. Sivadas, R. Goltekar, S. Clemente, M. Nanajkar, R. Sawant, C. D'silva, A. Sarkar and Z. Ansari (2006). "Ecotoxicological effect of grounded MV River Princess on the intertidal benthic organisms off Goa." *Environment International* 32(2): 284-291.

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

ITPOF (2019). "The International Tanker Owners Pollution Federation Limited - Oil tanker spill statistics: 2019."

Jung, J.-H., C. E. Hicken, D. Boyd, B. F. Anulacion, M. G. Carls, W. J. Shim and J. P. Incardona (2013). "Geologically distinct crude oils cause a common cardiotoxicity syndrome in developing zebrafish." *Chemosphere* 91(8): 1146-1155.

Kaipper, B. I. A. (2003). "Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel."

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.

Kime, D. E. (1995). "The effects of pollution on reproduction in fish." *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5(1): 52-95.

Kirby, M. F. and R. J. Law (2010). "Accidental spills at sea - Risk, impact, mitigation and the need for co-ordinated post-incident monitoring." *J Marine pollution bulletin* 60(6): 797-803.

Koehler, H. S. (2006). Crescimento, nutrição e estrutura do lenho juvenil de três espécies florestais com potencial de fitorremediação em solos contaminados com petróleo, Universidade Federal do Paraná.

Krahn, M. M., M. S. Myers, D. Burrows and D. C. Malins (1984). "Determination of metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways." *Xenobiotica* 14(8): 633-646.

Lam, T. (1983). 2 Environmental Influences on Gonadal Activity in Fish. *Fish physiology*, Elsevier. 9: 65-116.

Lee, K. Y. J. E. P. (2008). "Phase partitioning modeling of ethanol, isopropanol, and methanol with BTEX compounds in water." 154(2): 320-329.

Leite, M. B. N. L., A. L. da Cruz, L. E. A. Rodrigues, S. R. Yamashita, C. R. G. Carqueija, I. A. J. B. o. e. c. Nascimento and toxicology (2015). "Comparing the toxicity of water-soluble fractions of biodiesel, diesel and 5% biodiesel/diesel blend on oreochromis niloticus using histological biomarkers." 95(5): 574-581.

Lema, S. C., I. R. Schultz, N. L. Scholz, J. P. Incardona and P. Swanson (2007). "Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47)." *Aquatic Toxicology* 82(4): 296-307.

Liang, Y., M. Tse, L. Young and M. H. J. W. R. Wong (2007). "Distribution patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments and fish at Mai Po Marshes Nature Reserve, Hong Kong." 41(6): 1303-1311.

Lima, M. E. A. (2007). "Clinic of Activity contributions to safety at work." *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional* 32(115): 99-107.

Lins, J., P. G. Kirschnik, V. Queiroz and S. M. Cirio (2010). "Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático." *Rev. Acad., Agrár. Ambient* 8: 469-484.

Lionetto, M. G., R. Caricato, A. Calisi, M. E. Giordano, E. Erroi and T. J. R. L. Schettino (2016). "Biomonitoring of water and soil quality: a case study of ecotoxicological methodology application to the assessment of reclaimed agroindustrial wastewaters used for irrigation." 27(1): 105-112.

Locatelli, M. A. F. (2006). "Investigação sobre a emissão e caracterização dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na bacia do rio Atibaia." *Mestrado em Química analítica*. Instituto de Química. Universidade Estadual de campinas, Campinas: 86.

Lockhart, W., R. Wagemann, B. Tracey, D. Sutherland and D. J. S. o. t. T. E. Thomas (1992). "Presence and implications of chemical contaminants in the freshwaters of the Canadian Arctic." 122(1-2): 165-243.

Lombardi, J. (2004). "Fundamentos de toxicologia aquática." RANZANI-PAIVA, MJT; TAKEMOTO, RM; LIZAMA, MAP Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela: 263-272.

Luckenbach, T., M. Kilian, R. Triebkorn and A. Oberemm (2001). "Fish early life stage tests as a tool to assess embryotoxic potentials in small streams." *Journal of aquatic ecosystem stress and recovery* 8(3-4): 355-370.

Luz, E. L. P., D. d. S. P. Silva, M. C. de Medeiros, A. P. X. de Gondra Bezerra, E. M. G. Lorena and Í. G. S. dos Santos (2016). "Pollution mitigation for hydrocarbons of petroleum through the bioremediation." *Revista Geama* 7(1): 28-37.

Maceda, E. B., A. B. Grisolia, J. O. Vaini and L. S. Candido (2015). "Use of biomarkers for monitoring of waters from the Arara Stream in the city of Rio Brilhante, MS, Brazil." *Revista Ambiente & Água* 10(1): 117-129.

Magnuson, J., N. M. Bautista, J. Lucero, A. Lund, E. G. Xu, D. Schlenk, W. Burggren and A. Roberts (2020). "Exposure to Crude Oil Induces Retinal Apoptosis and Impairs Visual Function in Fish." *Environmental Science & Technology* XXXX.

Malins, D. C. (2013). *Biological effects*, Elsevier.

Martínez-Sales, M., F. García-Ximénez and F. J. Z. Espinós (2016). "Discrimination of the effects on zebrafish reproduction from pollutants in drinking water via female, via male and/or via fecundation water." 24(4): 563-567.

Martinez, P. H. and R. D. J. H. A. L. y. C. r. d. I. S. Colacios (2016). "História ambiental do Pré-sal: meio ambiente e mudanças sociais em São Paulo (2007-2016)." 6(2): 263-277.

Marty, G. D., E. F. Freiberg, T. R. Meyers, J. Wilcock, T. B. Farver and D. E. Hinton (1998). "Viral hemorrhagic septicemia virus, *Ichthyophonus hoferi*, and other causes of morbidity in Pacific herring *Clupea pallasii* spawning in Prince William Sound, Alaska, USA." *Diseases of Aquatic Organisms* 32(1): 15-40.

Matozo, F., J. A. Turek and R. B. Noleto (2015). "Avaliação dos efeitos genotóxicos do fungicida Ridomil em *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes)." *LUMINÁRIA* 17(01).

Mayer, F. L., M. R. Ellersieck and A. Asfaw (2010). *Risk assessment tools: software and user's guide*, SETAC Press.

Mcdonald, S. J., K. L. Willett, S. H. Safe, K. B. Beatty, M. Steinberg, P. Mayor and M. C. Kennicutt (1996). "Validation of bioassays for assessing the contamination of marine environments."

McKim, J. M. (1977). "Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity." *Journal of the Fisheries Board of Canada* 34(8): 1148-1154.

McLeod, H. C., J. W. Roy, G. F. Slater and J. E. J. J. o. c. h. Smith (2018). "Anaerobic biodegradation of dissolved ethanol in a pilot-scale sand aquifer: Variability in plume (redox) biogeochemistry." 208: 35-45.

Meier, S., H. Craig Morton, G. Nyhammer, B. E. Grøsvik, V. Makhotin, A. Geffen, S. Boitsov, K. A. Kvestad, A. Bohne-Kjersem, A. Goksøyr, A. Folkvord, J. Klungsøyr and A. Svoldal (2010). "Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water during early life stages: Effects on embryos, larvae, and juvenile fish." *Marine Environmental Research* 70(5): 383-394.

Mela, M., I. Guiloski, H. Doria, M. Randi, C. de Oliveira Ribeiro, L. Pereira, A. Maraschi, V. Prodocimo, C. Freire and H. S. de Assis (2013). "Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*)." *Ecotoxicology and environmental safety* 93: 13-21.

Meniconi, M. d. F. G., I. T. Gabardo, M. E. R. Carneiro, S. M. Barbanti, G. C. da Silva and C. G. Massone (2002). "Brazilian Oil Spills Chemical Characterization-Case Studies." *Environmental Forensics* 3(3-4): 303-321.

Meyerhoff, R. D. J. J. o. t. F. B. o. C. (1975). "Acute toxicity of benzene, a component of crude oil, to juvenile striped bass (*Morone saxatilis*)." 32(10): 1864-1866.

Middaugh, D., M. Shelton, C. McKenney Jr, G. Cherr, P. Chapman, L. J. A. o. e. c. Courtney and toxicology (1998). "Preliminary observations on responses of embryonic and larval Pacific herring, *Clupea pallasii*, to neutral fraction biodegradation products of weathered Alaska North Slope oil." 34(2): 188-196.

MPE-AM (1999). "Laudo Pericial referente ao processo nº 010/99 - VMAQA."

Murray, D., C. Adams, K. McDade, S. Solomon and M. J. A. R. Bain (2018). "Effect of broodstock holding environment on egg quality in farmed brown trout (*Salmo trutta*)." 13(4): 743-749.

Nakatani, K., A. A. Agostinho, G. Baumgartner, A. Bialetzki, P. V. Sanches, M. C. Makrakis and C. S. Pavanelli (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá/PR - Brasil, Editora da Universidade Estadual de Maringá.

Neff, J., B. Cox, D. Dixit and J. Anderson (1976). "Accumulation and release of petroleum-derived aromatic hydrocarbons by four species of marine animals." *Marine Biology* 38(3): 279-289.

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

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

Neff, J. M. (1985). Polycyclic aromatic hydrocarbons. Fundamentals Aquatic Toxicology. G. M. Rand and S. R. Petrocelli. Bristol, PA, Taylor & Francis: 416-454.

Neff, J. M., A. E. Bence, K. R. Parker, D. S. Page, J. S. Brown, P. D. J. E. T. Boehm and C. A. I. Journal (2006). "Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from buried shoreline oil residues thirteen years after the Exxon Valdez oil spill: a multispecies assessment." 25(4): 947-961.

Neff, J. M., S. Ostazeski, W. Gardiner and I. Stejskal (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.

Nesto, N., S. Romano, V. Moschino, M. Mauri and L. J. M. P. B. Da Ros (2007). "Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy." 55(10-12): 469-484.

Nicodem, D. E., C. L. Guedes, R. J. Correa and M. C. Z. Fernandes (1997). "Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills." Biogeochemistry 39(2): 121-138.

Nicodem, D. E., C. L. Guedes, M. C. Z. Fernandes, D. Severino, R. J. Correa, M. C. Coutinho and J. Silva (2001). "Photochemistry of petroleum." Progress in Reaction Kinetics and Mechanism 26(2-3): 219-238.

Niimi, A. (1983). "Biological and toxicological effects of environmental contaminants in fish and their eggs." J Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences 40(3): 306-312.

Nogueira, D. J., S. C. d. Castro and O. R. d. Sá (2009). Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas – MG. Revista Brasileira de Zootecias. Juiz de Fora, MG, Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. 11 (3): 237-232.

Nomura, H. (1985). "Dicionário dos peixes do Brasil."

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

Orbolato, T. S. G., L.; Aquino-Silva, M.R.; Fiorini, M.P. (2006). "Reprodução induzida do lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758)."

Osório, F. H. T. (2016). "Validação do gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) como bioindicador de testes ecotoxicológicos."

Ostrensky, A., W. A. Boeger, L. F. Duboc, F. X. Wegbecher, R. W. Pilchowski and E. Zamberlan (2003). Effect of The Oil Spill from the Presidente Getúlio Vargas Refinery, Brazil, in July of 2000, on the Populations of Fishes of the Rivers

Saldanha, Barigüi, and Iguaçu. International Oil Spill Conference, American Petroleum Institute.

Ostrensky, A., P. Chaves, L. Duboc, A. Guimarães, S. Cruz, F. Wegbecher, R. Pilchowski, U. Teixeira and C. Belz (2001). "Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigüi e Iguaçu." *Un-Repar/Petrobrás* 2: 32-52.

Ostrensky, A., P. T. C. Chaves, L. F. Duboc, A. T. B. Guimarães, S. R. Z. Cruz, F. X. Wegbecher, R. W. Pilchowski, U. A. Teixeira and C. E. Belz (2001). Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigüi e Iguaçu. 2º Seminário do Rio Iguaçu. Araucária, Paraná, Brasil: 32-52.

Ostrensky, A., A. S. Pedrazzani and A. L. Vicente (2015). "Use of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and propofol (2, 6-diisopropylphenol) as anaesthetics for the tetra *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae)." *Aquaculture Research*.

Pacheco, M. and M. A. Santos (2001). "Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49(1): 64-75.

Paiva Magalhaes, D. and A. Ferrao-Filho (2008). "A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos." *Oecologia brasiliensis* 12(3): 3.

Pamplona, J., E. Oba, T. Da Silva, L. Ramos, W. Ramsdorf, M. Cestari, C. O. Ribeiro, A. Zampronio and H. S. de Assis (2011). "Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*." *Ecotoxicology and environmental safety* 74(3): 342-349.

Pauka, L. M. (2007). "Avaliação dos efeitos embriotóxicos e da biotransformação da fração solúvel do petróleo em água em peixe zebra (*Danio rerio*-Hamilton, 1822)."

Pedrozo, M. d. F. M., E. Barbosa, H. Corseuil, M. Schneider and M. Linhares (2002). "Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo." Salvador: NEAMA.

Pena, P. G. L., A. L. Northcross, M. A. G. d. Lima and R. d. C. F. Rêgo (2020). "Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão %J *Cadernos de Saúde Pública*." 36.

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.

Perugini, M., P. Visciano, A. Giammarino, M. Manera, W. Di Nardo and M. J. C. Amorena (2007). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Adriatic Sea, Italy." 66(10): 1904-1910.

Pilchowski, R. W. (2003). Avaliação dos impactos de derramamento de óleo sobre a ictiofauna do altíssimo, alto e médio rio Iguaçu, Paraná, Brasil, Universidade Federal do Paraná.

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

Poffo, I., A. Nakasaki and G. Eysink (1996). "Dinâmica dos vazamentos de óleo no Canal de São Sebastião-São Paulo (1974-1994)." J São Paulo: Cetesb.

Porto-Foresti, F., R. Castilho-Almeida and F. Foresti (2005). "Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*).\" Espécies nativas para piscicultura no Brasil 2: 101-116.

Powers, S. E., C. S. Hunt, S. E. Heermann, H. X. Corseuil, D. Rice, P. J. J. C. R. i. E. S. Alvarez and Technology (2001). "The transport and fate of ethanol and BTEX in groundwater contaminated by gasohol." 31(1): 79-123.

Prioli, S. M. A. P., A. J. Prioli, H. F. Júlio, C. S. Pavanelli, A. V. Oliveira, H. Carrer, D. M. Carraro and L. M. Prioli (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.

Rama, F., D. T. Ramos, J. B. Müller, H. X. Corseuil and K. J. J. o. c. h. Miotliński (2019). "Flow field dynamics and high ethanol content in gasohol blends enhance BTEX migration and biodegradation in groundwater."

Ramachandran, S. D., M. J. Swezey, P. V. Hodson, M. Boudreau, S. C. Courtenay, K. Lee, T. King and J. A. Dixon (2006). "Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil." Marine pollution bulletin 52(10): 1182-1189.

Ramos, S., H. Cabral and M. Elliott (2015). "Do fish larvae have advantages over adults and other components for assessing estuarine ecological quality?" Ecological Indicators 55(0): 74-85.

Ramsdorf, W. A., T. Vicari, M. I. de Almeida, R. F. Artoni and M. M. Cestari (2012). "Handling of *Astyanax* sp. for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers." Environmental monitoring and assessment 184(10): 5841-5849.

Robidoux, P. Y., B. Virginie, L. Judith, D. J. E. Marc and e. safety (2018). "Assessment of acute and chronic toxicity of unweathered and weathered diluted bitumen to freshwater fish and invertebrates." 164: 331-343.

Rodrigues, R. V., K. C. Miranda-Filho, E. P. Gusmão, C. B. Moreira, L. A. Romano and L. A. Sampaio (2010). "Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae." Science of The Total Environment 408(9): 2054-2059.

Rodrigues, R. V., K. C. Miranda-Filho, E. P. Gusmão, C. B. Moreira, L. A. Romano and L. A. Sampaio (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.

Saeed, T. and M. Al-Mutairi (1999). "Chemical composition of the water-soluble fraction of the leaded gasolines in seawater." Environment International 25(1): 117-129.

Salaro, A., D. Campelo, M. Pontes, J. Zuanon, V. Furuya and W. J. A. n. B. n. p. Furuya (2015). "Avanços na nutrição e produção de lambaris." 2.

Saleh, H. M. and R. A. Ali (2019). "Gonadosomatic Index (GSI) Hepatosomatic Index (HSI), Condition Factor (K) and Length-weight Relationship (LWR) in *Epinephelus guaza* inhabiting Susa Coast, EL-Gabal AL-Akhadar, Libya." International Journal of Applied Science 1(1): 317-326.

Saleh, H. M. and R. A. J. E.-I. J. o. A. S. Ali (2019). "Gonadosomatic Index (GSI) Hepatosomatic Index (HSI), Condition Factor (K) and Length-weight Relationship (LWR) in *Epinephelus guaza* inhabiting Susa Coast, EL-Gabal AL-Akhadar, Libya." 1(1): 317-326.

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

Santos Filho, F. M., K. F. O. Rezende, A. K. Emerenciano, L. M. Moreira, V. B. Vila, R. M. Borges and L. N. Pressinotti (2014). "Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana." Atas de Saúde Ambiental-ASA 2(1): 09-22.

Santos, M. P. d. (2017). "Androgênese em *Astyanax altiparanae*: ferramenta de reconstituição em peixes."

Sato, Y., E. V. Sampaio, N. Fenerich-Verani and J. R. Verani (2006). "Biologia r Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Char odução induzida de duas espécies de Char odução induzida de duas espécies de Characidae (*Osteichth* (*Osteichthyes*, *Characiformes*) da bacia do São F mes) da bacia do São Francisco, Minas Ger Minas Ger Minas Gerais, Brasil." Revista Brasileira de Zoologia 23(1): 267-273.

Scholz, S., E. Sela, L. Blaha, T. Braunbeck, M. Galay-Burgos, M. García-Franco, J. Guinea, N. Klüver, K. Schirmer, K. J. R. t. Tanneberger and pharmacology (2013). "A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment." 67(3): 506-530.

Schulz, U. H. and H. Martins-Júnior (2001). "*Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil." Brazilian Journal of Biology 61(4): 615-622.

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

- Silva, C. A., C. A. Oliveira Ribeiro, A. Katsumiti, M. L. P. Araújo, E. M. Zandoná, G. P. Costa Silva, J. Maschio, H. Roche and H. C. Silva de Assis (2009). "Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(2): 400-409.
- Silva, D. A., E. K. R. Pessoa, S. A. G. L. da Costa, N. T. Chellappa and S. J. B. A. Chellappa (2012). "Ecologia alimentar de *Astyanax lacustris* (Osteichthyes: Characidae) na Lagoa do Piató, Assu, Rio Grande do Norte, Brasil." 2(1): 74-82.
- Silva, R. R. P. d., O. R. Pires Junior and C. K. Grisolia (2010). "Toxicity and genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) induced by microcystins from a bloom of *Microcystis* spp." *Genetics and molecular biology* 33(4): 750-755.
- Silva, S. C. F. (2013). "Sensibilidade ambiental ao derrame de biocombustível e óleo: uma análise da estrutura genética populacional do Curimba (*Prochilodus lineatus*)."
- Simonato, J., A. Albinati and C. Martinez (2006). "Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 76(3): 505-511.
- Simonato, J. D., A. C. Albinati, C. L. B. Guedes and C. B. R. Martinez (2004). Effects of diesel oil on some morphological and functional parameters of *Prochilodus lineatus* during acute and chronic exposure. International Congress on the Biology of Fish. K. Sloman, C. Wood and D. MacKinlay. Manaus, Brazil.
- Simonato, J. D., C. L. B. Guedes and C. B. R. Martinez (2008). "Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69(1): 112-120.
- Singer, M., D. Aurand, G. Bragin, J. Clark, G. Coelho, M. Sowby and R. Tjeerdema (2000). "Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing." *Marine Pollution Bulletin* 40(11): 1007-1016.
- Singh, S., A. J. J. o. E. Srivastava and O. Health (2017). "Variations in Hepatosomatic Index (HSI) and Gonadosomatic Index (GSI) in Fish *Heteropneustes fossilis* Exposed to Higher Sub-Lethal Concentration to Arsenic and Copper." 15(3-4): 89-93.
- Siqueira-Silva, D. H., A. P. Santos Silva, A. Ninhaus-Silveira and R. Veríssimo-Silveira (2015). "The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis." *Theriogenology* 84(6): 1033-1042.
- Solis-Murgas, L., V. Felizardo, M. Ferreira, E. Andrade and G. J. R. B. d. R. A. Veras (2011). "Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos." 35(2): 186-191.

Speight, J. G. (2015). Handbook of petroleum product analysis, John Wiley & Sons.

Staudt, D. and D. Stainier (2012). "Uncovering the molecular and cellular mechanisms of heart development using the zebrafish." Annual review of genetics 46: 397-418.

Stephens, S., A. Alkindi, C. Waring and J. Brown (1997). "Corticosteroid and thyroid responses of larval and juvenile turbot exposed to the water-soluble fraction of crude oil." Journal of fish Biology 50(5): 953-964.

Stevanato, D. J. and A. Ostrensky (2018). "Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae)." Neotropical Ichthyology 16.

Stevanato, D. J. and A. Ostrensky (2018). "Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae)." Neotropical Ichthyology 16(2).

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. Zankos, 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.

Tiburtius, E. R. L., P. Peralta-Zamora and A. J. Q. N. Emmel (2009). "Degradation of benzene, toluene and xlenes in gasoline-contaminated waters by photo-Fenton processes." 32(8): 2058-2063.

Tolussi, C. E., A. D. O. Gomes, A. Kumar, C. S. Ribeiro, F. L. L. Nostro, P. A. Bain, G. B. de Souza, R. Da Cuña, R. M. Honji and R. G. Moreira (2018). "Environmental pollution affects molecular and biochemical responses during gonadal maturation of *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes: Characidae)." Ecotoxicology and environmental safety 147: 926-934.

Valdez Domingos, F., C. Oliveira Ribeiro, E. Pelletier, C. J. E. s. Rouleau and technology (2011). "Tissue distribution and depuration kinetics of waterborne 14C-labeled light PAHs in mummichog (*Fundulus heteroclitus*)." 45(7): 2684-2690.

Van der Oost, R., J. Beyer and N. P. E. Vermeulen (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." Environmental Toxicology and Pharmacology 13(2): 57-149.

Vandermeulen, J. and S. Hrudey (1987). Oil in freshwater: Chemistry, biology, countermeasure technology, New York, NY (US); Pergamon Press.

Vazzoler, A. J. M. E. (1996). "Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática." 169.

Verlecar, X. N., S. R. Desai, A. Sarkar and S. Dalal (2006). "Biological indicators in relation to coastal pollution along Karnataka coast, India." *Water research* 40(17): 3304-3312.

Vicente, A. L. (2014). *Uso de óleos essenciais e de compostos sintéticos como agentes anestésicos para o lambari Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000), Universidade Federal do Paraná.

Vieira, C. E. D., M. d. S. Almeida, B. A. Galindo, L. Pereira and C. B. d. R. Martinez (2014). "Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas." *Neotropical Ichthyology* 12(1): 153-164.

Vignet, C., T. Larcher, B. Davail, L. Joassard, K. Le Menach, T. Guionnet, L. Lyphout, M. Ledevin, M. Goubeau and H. J. T. Budzinski (2016). "Fish reproduction is disrupted upon lifelong exposure to environmental PAHs fractions revealing different modes of action." 4(4): 26.

Vines, C. A., T. Robbins, F. J. Griffin and G. N. J. A. T. Cherr (2000). "The effects of diffusible creosote-derived compounds on development in Pacific herring (*Clupea pallasii*)." 51(2): 225-239.

Walker, C. H., R. Sibly, S. Hopkin and D. B. Peakall (2012). *Principles of ecotoxicology*, CRC press.

Winkaler, E. U., A. das Graças Silva, H. C. Galindo and C. B. dos Reis Martinez (2008). "Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná." *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 23: 507-514.

Zambonino Infante, J. L. and C. L. Cahu (2001). "Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130(4): 477-487.

Zhang, H.-Y., Q. Ji and Y. Fan (2015). "What drives the formation of global oil trade patterns?" *Energy Economics* 49: 639-648.

Zhang, J., H. Shen, T. Xu, X. Wang, W. Li and Y. Gu (2003). "Effects of long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 71(2): 0234-0239.

Zhang, S., C. Qin and S. H. Safe (2003). "Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context." *Environmental health perspectives* 111(16): 1877.

Zimba, R. D., F. R. Sussel, K. R. B. de OLIVEIRA, J. G. Segura and E. M. M. J. B. d. I. d. P. VIEGAS (2018). "Desempenho reprodutivo de lambaris alimentados com grãos secos de destilaria." 43(1): 20-34.

Ziulli, R. L. (2009). "Aspectos ambientais envolvidos na poluição marinha por petróleo." *Revista Saúde e Ambiente* 3(2): 32-41.