



RELATÓRIO TÉCNICO FINAL DE PROJETO

MARCADORES MOLECULARES E BIOLÓGICOS APLICADOS A INCIDENTES EM AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

PROCESSO 2012/00201-3

PT-133.01.10471

SAP: 4600442904

Número Jurídico: 0050.0088308.14.9

Período: 07/07/2014 a 25/02/2019

Coordenador pela ICT: Dr. Antonio Ostrensky

Março de 2019



I IDENTIFICAÇÃO

I.1 Relatório Técnico Final de Projeto

Marcadores Moleculares e Biológicos Aplicados a Incidentes em Ambientes Aquáticos Continentais

I.2 Período de atividades

08/11/2016 a 25/02/2019

I.3 Identificação legal

Nº Termo de Cooperação: 0050.0088308.14.9

Nº do Processo na UFPR: 23075.020227/2012-45 - Vigência: 07/07/2014 à 29/08/2018

Nº: 0050.0088308.14.9

I.4 Realização

I.4.1 Interveniente

Fundação da Universidade Federal do Paraná para o Desenvolvimento da Ciência, da Tecnologia e da Cultura – FUNPAR - CNPJ/MF 78.350.188/0001-95 - Rua João Negrão, 280 - Centro, CEP 80010-200, Curitiba, Paraná - Telefone 41 3360-7400; Fax 41 3323-1633

I.4.2 Executor

Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA) - Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Rua dos Funcionários, 1.540, CEP 80035-050, Curitiba, Paraná

Telefone e Fax: 41 3350-5634 - www.gia.org.br

I.5 Coordenação Geral

Dr. Antonio Ostrensky Neto

I.6 Coordenadores de Áreas

Genética: PhD. Márcio Roberto Pie

Química: Dr. Marco Tadeu Grassi

Ecotoxicologia: Dr. Antonio Ostrensky Neto

2 SUMÁRIO

1	Identificação.....	2
1.1	Relatório Técnico Final de Projeto.....	2
1.2	Período de atividades.....	2
1.3	Identificação legal	2
1.4	Realização.....	2
1.4.1	Interveniente.....	2
1.4.2	Executor	2
1.5	Coordenação Geral.....	2
1.6	Coordenadores de Áreas	2
2	Sumário.....	3
3	Esclarecimentos	5
4	Introdução.....	7
5	Objetivos Gerais do Projeto	8
5.1	Genética Ambiental:.....	8
5.2	Química:	8
5.3	Ecotoxicologia:.....	8
6	Metodologia.....	9
6.1	Genética Ambiental.....	9
6.1.1	Procedimentos laboratoriais e análises	9
6.2	Química	9
6.2.1	Contratação de bolsista de Iniciação Científica	10
6.2.2	Aquisição de materiais, padrões analíticos e gases para cromatografia e espectrometria.....	10
6.2.3	Métodos analíticos cromatográficos para determinação de HPA.....	11
6.2.4	Métodos analíticos cromatográficos para determinação de BTEX.....	12
6.2.5	Curvas analíticas para determinação de BTEX via método headspace-GC-MS/MS	14
6.2.6	Extração e determinação de HPA em água.....	14
6.2.7	Curvas Analíticas para determinação de HPA via VA-DLLME.....	15
6.2.8	Determinação de espécies metálicas em amostras aquosas	16
6.3	Ecotoxicologia.....	17
6.3.1	Exposição à FSA da gasolina em associação a condições de alterações abióticas ..	26
6.3.2	Avaliação dos efeitos da FSA da gasolina sobre a capacidade de excreção de compostos nitrogenados em <i>Carassius auratus</i>	31
7	Resultados e discussões.....	40
7.1	Genética Ambiental.....	40
7.2	Química	40

7.2.1	Processamento dos dados cromatográficos HPA e BTEX.....	40
7.2.2	Determinação de espécies metálicas em matriz fração solúvel em água de gasolina 44	
7.2.3	Desenvolvimento de método analítico voltado a extração de HPA em tecidos de peixes 45	
7.3	Ecotoxicologia.....	46
7.3.1	Efeitos fisiológicos e bioquímicos em <i>Astyanax altiparanae</i> expostos à fração solúvel em água da gasolina	46
7.3.2	Avaliação de embriões e larvas de <i>Astyanax altiparanae</i> expostos à fração solúvel de produtos derivados de petróleo	54
8	Benefícios Acadêmicos parciais Alcançados ao longo do projeto.....	58
9	Dificuldades encontradas.....	61
	ANEXO I.....	62
	ANEXO II.....	70
10	Bibliografia	81

3 ESCLARECIMENTOS

Elaboramos originalmente o presente relatório como o 4º Relatório Técnico, previsto originalmente para ser entregue no mês de agosto de 2018, conforme previa o sistema de monitoramento de relatórios do próprio SIGITEC. Ocorre que o projeto foi aditado até fevereiro de 2019. Dessa forma, o quarto relatório não seria mais o relatório final do projeto. Tentamos, por várias oportunidades, enviar esse relatório como parcial, mas o documento foi sistematicamente não habilitado para esse fim pelo SIGITEC. Abaixo uma das justificativas para a não habilitação:

Pessoa: Raphael da Cunha Oliveira Data: 27/11/2018

FAVOR ATENDER AS SOLICITAÇÕES ABAIXO PARA QUE A HABILITAÇÃO SEJA CONCLUÍDA COM SUCESSO:

SOBRE O RELATÓRIO:

*Este é o último Relatório Técnico cadastrado no SIGITEC para entrega. **Se este não for o Relatório Final, é necessário que seja criado um novo compromisso de entrega de Relatório Técnico, para que ele possa abranger todo o período de existência do convênio.** Portanto é imperativo que se entre em contato com o interlocutor técnico para que crie a nova entrega acima mencionada. .*

Todas as informações necessárias para que o interlocutor técnico consiga efetuar esta tarefa estão no manual do SIGITEC, item "12. Atualizar Previsão de Produtos/Relatórios.

Solicitamos só realizar nova submissão deste relatório quando ao menos uma nova entrega de relatório técnico vier a ser programada no SIGITEC.

Se este for o Relatório Final, solicitamos que o conteúdo e forma deste relatório seja adequado a um Relatório Técnico Final.

Pessoa: Fernando Rosário Dias Data: 10/09/2018

- Por se tratar do último relatório técnico a ser entregue, deve ser INTITULADO como "RELATÓRIO TÉCNICO FINAL".

- O período de vigência em relatório técnicos FINAIS deve ser idêntico ao cadastrado no sigitec.

ATENÇÃO: Caso este não seja o último relatório técnico a ser enviado faz-se necessária a criação de novos compromissos de entrega no Sigtec.

Dúvidas ligar para (21) 2162-4865

Apesar de nossos esforços, essas alterações não estavam ao nosso alcance e acabaram não sendo efetuadas, de modo que o sistema não aceitou o relatório. Por esse motivo, estamos encaminhando neste momento o relatório como produto final do projeto.

Por fim, esclarecemos também que, apesar do projeto ter se encerrado, uma das teses e uma das dissertações associadas continuam sendo desenvolvidas. Dessa forma, mais resultados derivados do projeto ainda serão produzidos, bem como outros artigos científicos deverão ser publicados. Ainda assim, os resultados apresentados neste documento servem como um indicador dos trabalhos realizados e dos resultados já alcançados.

4 INTRODUÇÃO

A intensificação das atividades humanas, tanto urbanas quanto industriais, vem aumentando os aportes dos mais diferentes tipos de produtos químicos nos rios. Nesse contexto, os hidrocarbonetos de petróleo e poluentes orgânicos são exemplos de substâncias que podem afetar os corpos de água e, dessa forma, prejudicar o funcionamento desses ecossistemas (Barron, Podrabsky et al. 1999). Acidentes ambientais, como derramamentos de petróleo, agravam este problema e geram uma demanda por estudos de biomonitoramento, com o objetivo avaliar os efeitos negativos sobre a biota. A poluição, resultante da liberação de óleo para o ambiente aquático, devido acidentes recentes, tornou-se uma preocupação mundial por consequência de seus efeitos sobre os ecossistemas aquáticos (Silva, Ribeiro et al. 2009).

Em julho de 2000 aproximadamente quatro milhões de litros, ou cerca 25 mil barris de óleo cru, vazaram do oleoduto OSPAR, proveniente da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR) localizada no município de Araucária, Paraná (Boeger, Guimarães et al. 2003). Mesmo com o uso de contenção, para evitar a dispersão, o óleo alcançou 45 km, a jusante do arroio Saldanha, contaminando o Rio Barigui e o Rio Iguaçu. Alguns meses após o acidente no oleoduto OSPAR, em fevereiro de 2001, ocorreu o rompimento do poliduto OLAPA, liberando derivados leves de petróleo na Serra do Mar Paranaense.

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a capacidade adaptativa de populações de peixes que habitam ambientes contaminados por petróleo na bacia do altíssimo Iguaçu e na Serra do Mar (Ostrensky, Chaves et al. 2001, Boeger, Guimarães et al. 2003, Ostrensky, Boeger et al. 2003, Silva, Ribeiro et al. 2009, Pilchowski 2012). Nesse sentido, pesquisas que associem o uso de biomarcadores moleculares, e que ainda forneçam dados consistentes para o diagnóstico de riscos ambientais, frente a novas exposições do ambiente ao petróleo, não foram praticadas.

Neste contexto, esse projeto, objetiva testar protocolos de ecologia molecular e ecotoxicologia aquática visando estabelecer subsídios aos estudos de biomonitoramento, que permitam identificar de forma mais precisa a interferência aguda e crônica de incidentes com petróleo, em especial em ambientes aquáticos continentais. Adicionalmente o presente estudo visa estabelecer procedimentos metodológicos utilizando-se marcadores moleculares como ferramentas para a resolução de problemas associados a incidentes ambientais recentes. Esses procedimentos estão sendo aplicados na reconstrução da história demográfica recente e no planejamento de ações mitigadoras de populações de peixes diretamente expostas ao incidente do OLAPA em 2001. Esse estudo deverá servir de modelo para estudos semelhantes, como forma de prever e/ou reconstruir danos populacionais a acidentes agudos ou crônicos em ambientes fluviais neotropicais.

5 OBJETIVOS GERAIS DO PROJETO

O presente estudo tem como objetivo principal testar protocolos de ecologia molecular e de ecotoxicologia estabelecendo subsídios aos estudos de biomonitoramento que permitirão identificar de forma mais precisa a interferência aguda e crônica de incidentes com petróleo, em especial em ambientes aquáticos continentais. Para que esse objetivo seja alcançado, o presente projeto tem como objetivos intermediários:

5.1 Genética Ambiental:

- Definir a identidade específica dos peixes estudados;
- Caracterizar a diversidade genética comparada de três espécies de peixes dos rios impactados e de rios da mesma microbacia;
- Avaliar a eficiência do uso de marcadores moleculares de peixes na detecção de mudanças demográficas recentes e avaliar seu vínculo com o acidente de 2001.

5.2 Química:

- Microextração líquido-líquido dispersiva de frações do petróleo;
- Miniaturização no fracionamento dos hidrocarbonetos de petróleo;
- Determinação de hidrocarbonetos de petróleo em amostras de tecidos de peixes;
- Caracterização geoquímica do óleo aplicado nos testes toxicológicos.

5.3 Ecotoxicologia:

- Determinar a CL_{50} de derivados leves de petróleo para peixes;
- Determinar respostas bioquímicas, e histopatológicas dos espécimes frente à exposição aguda e subcrônica aos derivados leve de petróleo e a sua fração solúvel em água;
- Avaliar as concentrações de hidrocarbonetos de petróleo no tecido de peixes expostos aguda e cronicamente ao óleo.

Apesar do início das atividades do projeto já estarem adiantadas os objetivos das subáreas de genética, química e ecotoxicologia alcançaram os objetivos somente parcialmente. Isso é devido às análises de dados obtidos, no período de abrangência do presente relatório, que ainda estão em andamento.

6 METODOLOGIA

6.1 Genética Ambiental

6.1.1 Procedimentos laboratoriais e análises

Todos os procedimentos de laboratoriais de análise referentes às atividades da genética ambiental foram finalizadas em fevereiro de 2017. Após esse período, o artigo intitulado “*Is There Detectable Long-term Depletion of Genetic Variation in Freshwater Fish Species Affected by an Oil Spill?*” foi elaborado e publicado na revista “*Water, Air, & Soil Pollution*” (Fator de impacto 1.769). O artigo na íntegra pode ser visualizado no ANEXO I.

6.2 Química

Abaixo são descritas as atividades voltadas ao desenvolvimento de métodos analíticos para atender os objetivos dos estudos químicos previstos no Projeto Marcadores Moleculares e Ecotoxicológicos. Dentre esses objetivos, têm-se a determinação de hidrocarbonetos de petróleo, ou mais especificamente de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), o total de hidrocarbonetos de petróleo (THP) e hidrocarbonetos mononucleares benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), em amostras de água submetidas a simulações de vazamento de óleos leves. Além disso, estão previstas outras duas etapas, voltadas a determinação de HPA, BTEX e n-alcanos em tecidos de peixes e a miniaturização do protocolo para o fracionamento de hidrocarbonetos de petróleo em frações de óleos leves utilizados em ensaios toxicológicos.

Para cumprir estas etapas, dois estudos vêm sendo executados em paralelo utilizando padrões aquosos, separadamente, fortificados com os analitos (HPA e BTEX). O primeiro método voltado à miniaturização do procedimento de extração de HPA de matrizes aquosas empregando o método de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) seguida por quantificação via cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). O segundo procedimento direcionado ao estabelecimento do protocolo analítico cromatográfico para a determinação de BTEX em amostras de águas de aquários (ensaios toxicológicos) utilizando método de extração por *headspace* e quantificação por GC-MS/MS.

Além dos estudos para a determinação de HPA e BTEX em matriz aquosa, também está sendo desenvolvido, método analítico voltado à extração de HPA, ou seus metabólitos, em tecidos de peixes.

6.2.1 Contratação de bolsista de Iniciação Científica

Em março de 2017 foi realizada a contratação da aluna UFPR, graduanda em Química Morgana de Souza Camargo na categoria de bolsista de iniciação científica (20 h semanais). A aluna atuou na avaliação e desenvolvimento de métodos analíticos voltados a extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em tecidos de peixes (*Astyanax altiparanae*) e quantificação por GC-MS. Ao final do mês de agosto do mesmo ano o contrato foi encerrado, em vista de sua aprovação como mestranda do programa de pós-graduação em química da UFPR com projeto intitulado “Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em amostras de tecidos de peixe empregando dispersão de matriz em fase sólida (MSPD)” sob a orientação do Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi e co-orientação de Rafael Garrett Dolatto. Este projeto de pesquisa tem por finalidade desenvolver um método miniaturizado de extração de HPA em amostras de tecido de peixe, baseado na dispersão da matriz em fase sólida, utilizando-se argilominerais como a montmorilonita e a vermiculita modificados como material sorvente. Cabe ressaltar que esse estudo visa contribuir com informações relevantes aos objetivos iniciais do projeto Marcadores Moleculares.

6.2.2 Aquisição de materiais, padrões analíticos e gases para cromatografia e espectrometria

No período relativo a este relatório até a data da sua entrega foram realizadas aquisições complementares de materiais, padrões analíticos para cromatografia, solventes e gases para cromatografia e espectrometria. Dentre os materiais de aquisição, podem ser citados itens consumíveis para cromatografia como septos, vials, colunas capilares para GC-MS, microseringas, anilhas e filamentos para o sistema Thermo GC Focus Polaris Q (GC-MS). Em relação a padrões analíticos de hidrocarbonetos foram comprados os padrões monoaromáticos (mix) representados por benzeno, tolueno, etilbenzeno, o-xileno, m-xileno e p-xileno (BTEx) e os 16 HPA prioritários (U.S.EPA 2001): [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 (Bghi)], 5 padrões internos deuterados [Naftaleno (Naf-d8); Acenafteno (Aced-10); Fenantreno (Fend-10); Criseno (Crisd-12) e Perileno (Perd-12)] e 1 padrão subrogado p-terfenil (p-terfd-14). Além disso, outros itens como solventes com grau HPLC, reagentes e materiais básicos e necessários para manter os estudos também foram solicitados.

6.2.3 Métodos analíticos cromatográficos para determinação de HPA

Para quantificação dos HPA foi empregado o método analítico cromatográfico desenvolvido no âmbito do GQA/UFPR, sendo obtida separação dos 16 HPA prioritários (U.S. EPA): [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)], 5 padrões internos deuterados [Naftaleno (NafD8); Acenafteno (AceD10); Fenantreno (FenD10); Criseno (CrisD12) e Perileno (PerD12)] e 1 padrão subrogado p-terfenil (p-terf). Na Tabela 1 são apresentadas as condições cromatográficas utilizadas separação e identificação dos analitos.

Tabela 1. Parâmetros operacionais usados para a determinação de HPA.

Equipamento	GC-MS (Thermo Electron Corporation) modelo Focus GC Polaris Q, acoplado a um auto-amostrador AS3000 (Thermo Electron Corporation)
Coluna	DB5-ms (Agilent) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Gases	Arraste: He 5.0 analítico @ 1,2 mL min ⁻¹ (vazão constante)
Injetor	Splitless, volume de injeção de 1 µL.
Temperatura	Coluna: 40°C (5 min), rampa 1: 5 °C min ⁻¹ até 230 °C; rampa 2: 2 °C min ⁻¹ até 250 °C; rampa 3: 5 °C min ⁻¹ até 300 °C (8 min) Detector: 300 °C; Injetor: 270 °C Linha de transferência: 270 °C Fonte de íons: 270 °C
Modo SIM*	Scan 1 (5 min): (m/z 128, 136, 152, 154, 162, 164, 166, 178) Scan 2 (30 min): (m/z 178, 202, 228, 244) Scan 3 (47 min): (m/z 228, 236 240, 252, 260, 264, 276, 277, 278, 279)

*modo de monitoração seletiva de íons.

De acordo com as condições apresentadas na Tabela 1 foram realizadas injeções de soluções mistas dos analitos (HPA) e um dos cromatogramas obtido é apresentado na Figura 1.

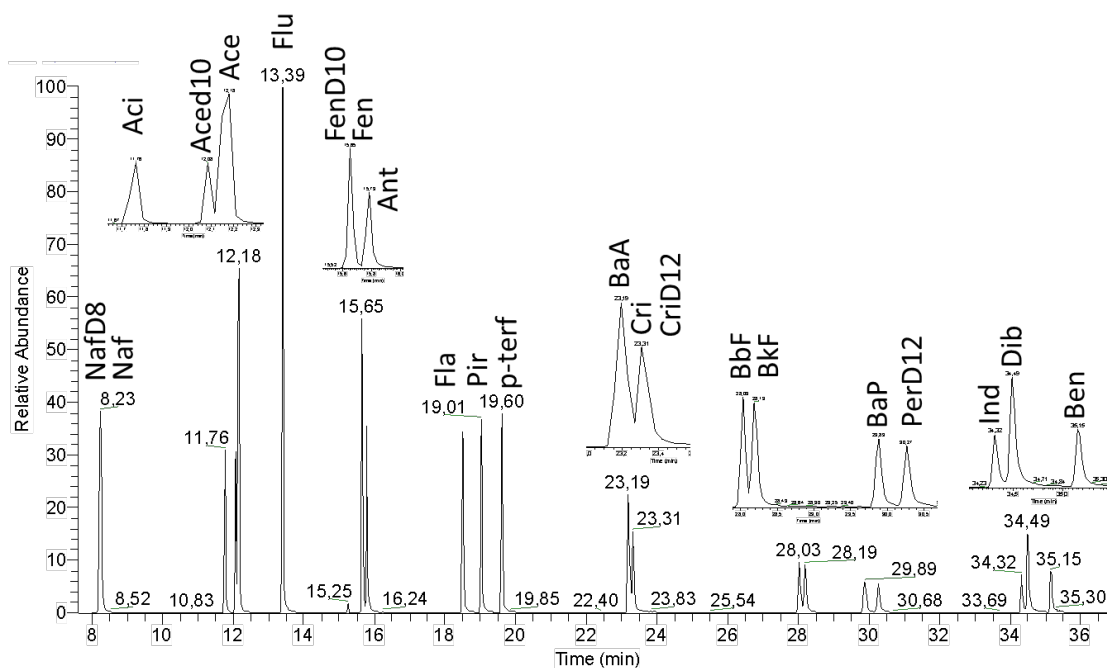


Figura 1. **Cromatograma obtido via GC-MS (Thermo®) em modo SIM (monitoramento seletivo de íons) a partir de uma solução mista de padrões contendo 16 HPA prioritários e 1 padrão subrogado (p-terfenil-D14) ambos em concentração de 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5 padrões internos deuterados em concentração de 102,4 $\mu\text{g L}^{-1}$.**

De acordo com a Figura 1, foi possível verificar a separação adequada de todos os analitos empregando o equipamento Thermo® GC-MS nas condições citadas. O modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) proporcionou a identificação de analitos, mesmo nas situações de co-eluição, e também mostrou-se mais sensível e seletivo frente ao modo de varredura ou *fullscan*. Com base nisso, o método SIM foi selecionado para todas as determinações envolvendo os HPA aqui relatadas.

6.2.4 Métodos analíticos cromatográficos para determinação de BTEX

Para determinação dos hidrocarbonetos monoaromáticos [Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos (BTEX)] foi empregado método previamente desenvolvido no GQA/UFPR (Fernandes, Gouveia et al. 2014). O procedimento utilizado baseou-se na extração dos analitos via método *headspace*, no qual uma alíquota de uma amostra aquosa (5,00 mL) contendo os analitos de interesse foi colocada em um frasco especial tipo *vial* (20 mL), que foi lacrado com

septo de silicone/PTFE. Na Tabela 2 são apresentadas as condições cromatográficas instrumentais e para as determinações dos BTEX via GC-MS/MS.

Tabela 2. Parâmetros operacionais usados para a determinação de BTEX.

Equipamento	GC-MS/MS (Shimadzu® Corporation) modelo TQ8040, acoplado a um auto-amostrador Palm Headspace
Coluna	SH-Rtx-5ms (Shimadzu) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Gases	Arraste: He 5.0 analítico @ 1,02 mL min ⁻¹ (vazão constante)
Injetor <i>headspace</i>	Volume de injeção de 100 µL.
Temperatura	Coluna: 35 °C (4 min), rampa 1: 10 °C min ⁻¹ até 100 °C; rampa 2: 30 °C min ⁻¹ até 200 °C; Detector: 250 °C; Injetor: 180 °C Linha de transferência: 250 °C Fonte de íons: 250 °C Scan (m/z): 78; 91 e 106;
Modo SIM*	

*modo de monitoração seletiva de íons.

De acordo com essas condições foi realizada análise em padrão aquoso fortificado com BTEX em concentrações de 50,0 µg L⁻¹, obtendo-se o cromatograma apresentado na Figura 2.

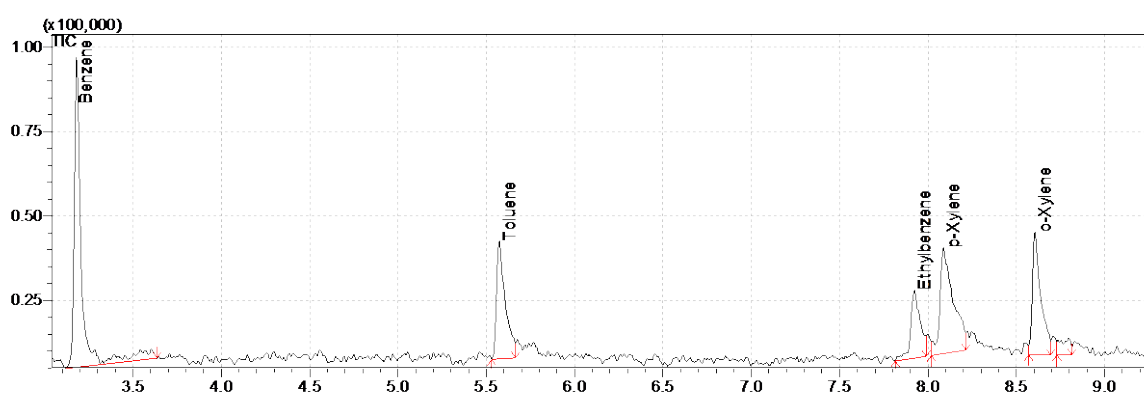


Figura 2. Cromatograma obtido via GC-MS/MS em modo SIM (monitoramento seletivo de íons) a partir de uma solução aquosa mista de padrões contendo BTEX em concentrações de 50,0 µg L⁻¹.

De acordo com a Figura 2 constata-se separação adequada de todos os analitos, exceto os isômeros *m*-xileno e *p*-xileno (Tr = 8,25 min). Esse método analítico cromatográfico em

conjunto a extração via headspace, foi empregado nas próximas etapas do trabalho para obtenção de curvas analíticas e determinação dos analitos em fase aquosa.

6.2.5 Curvas analíticas para determinação de BTEX via método headspace-GC-MS/MS

Para o preparo das curvas analíticas empregadas na quantificação de BTEX em fase aquosa, utilizou-se o procedimento via headspace. Para tal foram preparados padrões, em triplicata e em meio aquoso para 5 níveis de concentração variando entre 5 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados obtidos indicaram linearidade na faixa de concentração escolhida, constatados pelos valores de coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99.

6.2.6 Extração e determinação de HPA em água

Os HPA foram extraídos empregando procedimento via microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex (VA-DLLME) (Rezaee, Assadi et al. 2006, Zhang and Lee 2012). Na Figura 3 é apresentado um diagrama esquemático das condições experimentais utilizadas.

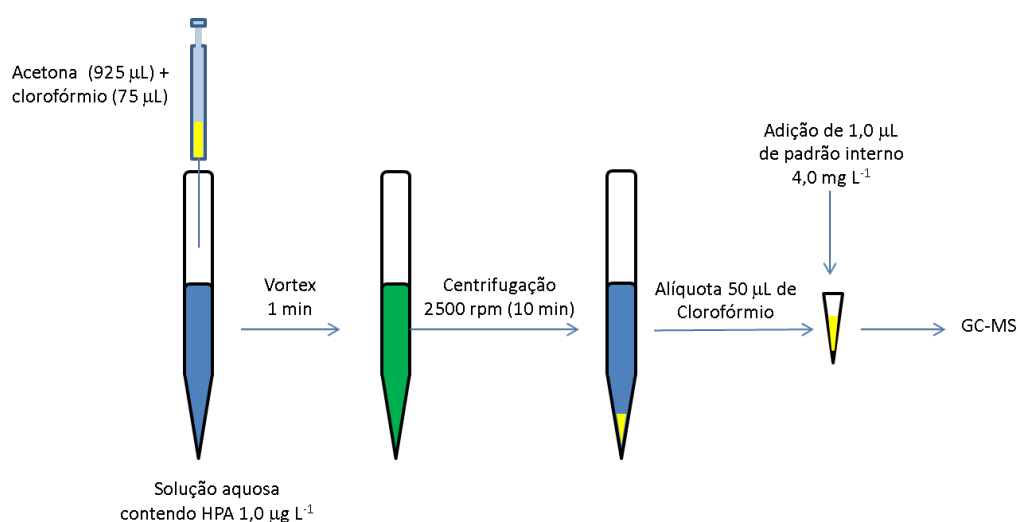


Figura 3. Diagrama esquemático do procedimento empregando microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex (VA-DLLME).

Conforme ilustrado na Figura 3 na DLLME são empregados tubos cônicos para centrifugação, onde é transferida uma alíquota de 5,00 mL de solução padrão ou amostra

contendo os HPA. A essa solução é feita injeção rápida, por meio de micropipeta, de 1,00 mL de solução de clorofórmio ou extrator (75 µL) solubilizado em meio de acetona ou solvente dispersor (925 µL). A injeção rápida propicia a formação de microgotas de clorofórmio no meio, imiscíveis com a fase aquosa. Na sequência, para aumentar a eficiência de extração, é realizada agitação do tudo em vórtex durante 1,00 min, posterior centrifugação por 10 min, favorecendo a formação de uma fase sedimentada (gota), a qual é removida, quantitativamente (50 µL) e por fim transferida a um *insert* cromatográfico contendo 1 µL solução mix de padrões internos de HPA deuterados e posteriormente quantificada por GC-MS.

6.2.7 Curvas Analíticas para determinação de HPA via VA-DLLME

As curvas analíticas para quantificação dos HPA foram preparadas em triplicata em meio aquoso em 5 níveis de concentração variando entre 0,25 a 5,00 µg L⁻¹. Além disso, a obtenção das curvas foi realizada nas mesmas condições de extração das amostras usando a VA-DLLME. Na Tabela 3 são apresentadas alguns parâmetros de desempenho.

Tabela 3. Parâmetros de desempenho para as curvas analíticas dos HPA via VA-DLLME.

HPA	Faixa linear (µg L ⁻¹)	^b R ²
Naftaleno	0,25 a 5,00	0,9981
Acenaftileno	0,25 a 5,00	0,9973
Acenafteno	0,25 a 5,00	0,9951
Fluoreno	0,25 a 5,00	0,9975
Fenantreno	0,25 a 5,00	0,9968
Antraceno	0,25 a 5,00	0,9974
Pireno	0,25 a 5,00	0,9964
Fluoranteno	0,25 a 5,00	0,9962
Benzo(a)antraceno	0,25 a 5,00	0,9930
Criseno	0,25 a 5,00	0,9920
Benzo(b)fluoranteno	0,25 a 3,00	0,9917
Benzo(k)fluoranteno	0,25 a 3,00	0,9868
Benzo(a)pireno	0,25 a 2,50	0,9941
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,25 a 2,50	0,9386
Dibenzo(a,h)antraceno	0,25 a 2,50	0,9947
Benzo[g,h,i]perileno	0,25 a 2,50	0,9930

^aEquação representa as médias para três curvas analíticas para $n=3$; ^bcoeficiente de determinação (R^2).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, é possível notar valores de coeficiente de determinação adequados ou superiores a 0,99 para todas as curvas realizadas, indicativo da linearidade das curvas preparadas utilizando o método.

6.2.8 Determinação de espécies metálicas em amostras aquosas

Como suporte ao trabalho desenvolvido em Vancouver, pelo doutorando Giorgi Dal Pont, foram realizadas análises em amostras de fração solúvel em água de gasolina (100%). A mensuração foi realizada por meio de espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado (ICP-OES). Foi utilizado espectrômetro Thermo Scientific® (ICAP 6500) operando com visão axial. As condições de operação do equipamento são apresentadas na Tabela 4. Gás argônio de alto grau de pureza (99.996%) foi utilizado como combustível.

Tabela 4. Parâmetros operacionais utilizados para a determinação de metais na fração solúvel em água da gasolina (WSFG) usando ICP-OES - Thermo Scientific®, ICAP 650).

ICP-OES Operating Parameters	
Radiofrequency	40 MHz
Radiofrequency power	1150 W
Plasma gas flow rate	12.0 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	1.0 L min ⁻¹
Carrier gas flow rate	0.7 L min ⁻¹
Replicate read time	3 s
Time for stability	25 s
Replicates/sample	3
Torch	Quartz for axial view
Spectral lines	Ag: 328.068 (I)
	Al: 396.152 (I)
	Ba: 455.403 (II)
	Cd: 226.502 (II)
	Co: 230.786 (II)
	Cr: 267.716 (II)
	Cu: 327.395 (I)
	Fe: 238.204 (II)
	Mn: 257.610 (II)
	Ni: 231.604 (II)
	P: 213.618 (I)
	Pb: 220.253 (II)
	Sr: 407.771 (II)
	Zn: 213.856 (I)

(I) Linha atômica; (II) Linha iônica.

6.3 Ecotoxicologia

Após a definição da espécie *Astyanax altiparanae* (Figura 4A) como modelo para os testes de toxicidade aguda e realização de experimentos para a determinação da CL₅₀-96h e CL₁₀-96h de cinco produtos derivados de petróleo (gasolina, óleo diesel, óleo mineral isolante (OMI) produzido pela Petrobras, óleo mineral isolante (OMI) de outra marca comercial e óleo lubrificante comercial) foram realizados experimentos para avaliação das respostas bioquímicas, fisiológicas e histopatológicas de adultos de *Astyanax altiparanae* expostos à fração solúvel em água da gasolina (derivado considerado mais tóxico nos experimentos realizados no âmbito do presente projeto e descritos no relatório anterior) em associação à alterações de parâmetros abióticos (temperatura e pH da água). O objetivo dos experimentos é investigar o comportamento de biomarcadores tradicionalmente utilizados em cenários de contaminação com derivados de petróleo e determinar a influência dos parâmetros abióticos nas suas respostas.

Além dos experimentos executados com adultos de *Astyanax altiparanae* nas dependências do GIA, no Brasil, experimentos com o objetivo de avaliar os efeitos da exposição aguda (4h) à fração solúvel em água da gasolina sobre os mecanismos de excreção de nitrogênio e captação de oxigênio em peixes [a espécie *Carassius auratus* (Figura 4B) foi utilizada como bioindicador] foram realizados na Universidade da Colúmbia Britânica (UBC), no laboratório do renomado professor Chris M. Wood. Tanto os experimentos que avaliaram os efeitos da interação da exposição à derivados de petróleo associados à alterações de condições abióticas quanto os experimentos realizados na UBC, foram realizados no contexto da tese de doutorado do aluno Giorgi Dal Pont, junto ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFPR.

Também foram executados experimentos com o objetivo de avaliar os efeitos da fração solúvel de derivados de petróleo sobre características de desenvolvimento de embriões e larvas da espécie *Astyanax altiparanae* e sobre características reprodutivas da mesma espécie. Tal linha de pesquisa iniciou-se durante a realização do curso de mestrado do aluno Diego Junqueira Stevanato, que se estendeu para as atividades do curso de doutorado do mesmo aluno (2017 até o presente). Aqui, vale ressaltar que após a finalização das atividades do mestrado, os resultados obtidos foram publicados na revista *Neotropical Ichthyology* (fator de impacto 1,203), sob o título “*Ontogenetic development of tetra Astyanax lacustris (Characiformes: Characidae)*” (



Is There Detectable Long-term Depletion of Genetic Variation in Freshwater Fish Species Affected by an Oil Spill?

André O. Agostinis · Giorgi Dal Pont ·
Aline Horodesky · Marcio R. Pie  ·
Antonio Ostrensky

Received: 19 January 2017 / Accepted: 8 June 2017 / Published online: 26 June 2017
© Springer International Publishing AG 2017

Abstract Oil spills might lead to severe environmental impacts to the affected fauna, disrupting local food webs, and causing mass mortality in many species. However, little is known about long-term impacts of oil spills, or even if such impacts can be detectable after several generations. In this study, we investigate the genetic variability of three freshwater species—*Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Characidae), *Scleromystax barbatus* (Siluriformes: Callichthyidae), and *Phalloceros harpagos* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)—in rivers that were affected by a large oil spill in the state of Paraná, southern Brazil, on February of 2001. Samples were obtained from nine different locations, such that rivers that were directly affected by the oil spill could be compared with similar rivers in the same region that were unaffected. A fragment of the cytochrome C oxidase subunit I mitochondrial gene was sequenced from each specimen, and the level of genetic variability was assessed. Based on estimates

of haplotype and nucleotide diversity, no impact of the oil spill could be detected in impacted rivers. These results suggest that fish populations in the region showed resilience to the pollutant, such that immigration from other locations was able to reestablish levels of genetic variability comparable to those of unimpacted rivers.

Keywords Genetic variability · *Mimagoniates microlepis* · *Scleromystax barbatus* · *Phalloceros harpagos* · Environmental impact

1 Introduction

Oil spills in natural habitats can lead to severe environmental impacts, depending on the structure of the habitat and the type and volume of oil being released (Etkin 2004; Peterson et al. 2003). During an oil spill in water bodies, fishes are also exposed, but to a lesser extent than other groups, such as marine mammals, birds, and sessile mollusks (Teal and Howarth 1984). Even so, many studies have explored acute impacts of such exposures, such as the effects on animal development (Carls et al. 1999; Incardona et al. 2004, 2012), direct DNA damage (Bolognesi et al. 2006; Vanzella et al. 2007), and sublethal histopathologies (Hose et al. 1996). However, little is known about long-term potential impacts of oil spills, particularly in freshwater environments and in terms of the genetic variability of impacted populations.

tamento de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná,
Curitiba, PR 80035-050, Brazil

Two major oil spills have occurred and impacted different and important aquatic environments in the state of Paraná, southern Brazil. On July of 2000, approximately four million liters (≈ 25 thousand barrels) of crude oil (density = 0.9427, 18° API, viscosity (20 °C) = 5000) were spilled from the OSPAR pipeline into the Iguaçu River (Boeger et al. 2003; Ostrensky et al. 2001). In the following year, nearly 52 thousand liters of light fuel oil (density = 0.8164, 41° API, viscosity (20 °C) = 3716 cP, total monoaromatic hydrocarbons (BTX) = 41.8 mg/g, and total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) = 16 mg/g) spilled from the OLAPA pipeline, which connects the Presidente Getúlio Vargas refinery (REPAR), in the municipality of Araucária, state of Paraná, to the corresponding terminal in the Paranaguá port. This accident occurred in a remote and difficult access area at Serra do Mar mountain range. Containment barriers were installed to reduce oil dispersion and to allow for its removal, but some of the oil reached local rivers and streams, eventually reaching the Paranaguá Bay (Gabardo et al. 2011). After the accident, a monitoring program was established with an initial focus on water and sediment chemistry and benthic community. One year later, benthic community was also evaluated. Results suggested rapid reduction on total PAH concentrations (1416.0 to 1.6 $\mu\text{g/L}$) has minor effect on bird and benthic community (Faria et al. 2005). Ten years after, Albarello (2012), Ostrensky et al. (2015), and Horodesky et al. (2015) evaluated the environmental quality of the affected area through the analysis of long-term oil presence, fish population structure, and fish community, respectively. They found high concentrations of total petroleum hydrocarbons (TPH), including benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene, and indeno(123-cd)pyrene, in eight locations. On the other hand, no alterations in ichthyofaunal community and structure were detected. Thus, as TPH are still recorded at high concentrations at the studied area and no ichthyofaunal analysis was performed in order to identify chronic and long-term genetic alterations that could have occurred, we hypothesize that fish populations thriving in the affected area could potentially present long-term genetic alterations.

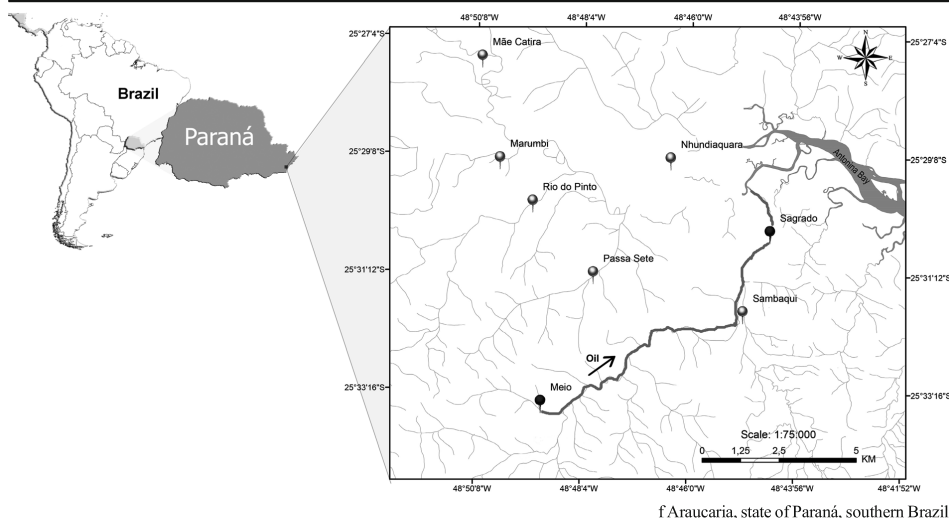
In this study, we assessed the level of genetic variability in three species of fish found in the original areas

impacted by the OLAPA pipeline oil spill in relation to similar, non-impacted locations (rivers in the same region) to determine if there was evidence for long-term genetic depletion.

2 Materials and Methods

Fish specimens were obtained in eight rivers of the Nhundiaquara River watershed (Fig. 1), during six consecutive sampling days, in the summer season (February) of 2015 (14 years after the spill of the OLAPA pipeline). Each river was categorized as either “impacted,” if it was directly affected by the oil spills (Meio and Sagrado Rivers), or “control,” rivers from the same watershed as the impacted rivers, with similar physiographic characteristics, but that had no record of impact (Sambaqui, Nhundiaquara, Passa Sete, Rio do Pinto, Mãe Catira, and Marumbi). Previous studies on the physico-chemical features of these locations were similar (Horodesky et al. 2015) so that they would be expected to represent comparable sampling sites. Based on the previous ichthyological surveys in the region (Horodesky et al. 2015; Ostrensky et al. 2015), three fish species were selected for this study: *Scleromystax barbatus* (Siluriformes: Callichthyidae), *Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Characidae), and *Phalloceros harpagos* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). These species were chosen due to their local abundance, their presence in all sampled rivers, as well as their occupation of different compartments in the water column (benthic in the case of *S. barbatus*, limnetic in the other two species). Specimens were collected using a combination of electrofishing, casting, and/or seine nets (see Ostrensky et al. (2015) for details on the collection protocols), and a piece of the caudal fin of each specimen was preserved in absolute ethanol and maintained at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until being processed for molecular work. Voucher specimens were deposited in the Ichthyological Collection of the Museu de História Natural do Capão da Imbuia, Curitiba, state of Paraná, Brazil.

Total DNA was extracted using DNeasy Blood & Tissue Spin-Column Kit (Qiagen®—Germany) from 25 mg of fin tissue, following manufacturer’s protocol. Concentration was estimated using NanoDrop 2000 (ThermoFisher®—USA). Amplifications were



f Araucaria, state of Paraná, southern Brazil

performed in a final volume of 25 μL , using up to 30 ng of DNA (extracts ranging from 8 to 130 ng/ μL). The chosen marker was cytochrome C oxidase subunit I (COI), using LCO1490 and HCO2198 primers, which amplify a segment of 658 bp. The mixture contained 1 U of PlatinumTM Taq DNA Polymerase (Invitrogen®—USA), 2.5 μL of the enzyme reaction buffer (10 $\times$), 3 mM of MgCl_2 , 0.5 mM of total dNTP mixture, 1 pM of each primer, and 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ bovine serum albumin (BSA). Temperature cycling consisted of an initial step of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, followed by 32 cycles of 40 s at 94 $^{\circ}\text{C}$, 45 s at 44–46 $^{\circ}\text{C}$, and 1 min at 72 $^{\circ}\text{C}$, followed by a final elongation at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min. PCR products were purified using a precipitation-based protocol with polyethylene glycol (PEG 8000 20% NaCl 2.5 M). Sequencing reactions were performed in a final volume of 10 μL , using 40 ng of amplified DNA. Each mixture contained 0.5 μL of BigDye[®] Terminator, 1 μL of sequencing buffer (5 $\times$), and 3.2 pM of the respective primer.

Nucleotide sequences were obtained using a 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®—USA), basecalled using Gap4, as implemented in the Staden Package (v2) (Staden et al. 1998), aligned using ClustalW2 (Larkin et al. 2007), as implemented in the BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999), and adjusted manually. Haplotype and nucleotide diversity were calculated using DnaSp5 (Librado and Rozas

2009). Haplotype networks were computed and drawn in R 3.3.1 (R Core Team 2016), using packages *pegas* (Paradis 2010), *plyr* (Wickham 2011), and *reshape* (Wickham 2007).

3 Results

Figure 2 depicts the inferred haplotype networks for each of the studied species. The circles in this type of diagram represent a particular DNA sequence, whereas the size of each circle corresponds to their relative frequency. The edges between circles represent difference among a given pair of sequences, such that one edge would indicate the existence of a single nucleotide difference and two edges would represent two nucleotide mismatches. The observed pattern of genetic variability shows that many different sites often share the same haplotypes, which is consistent with a scenario of high gene flow (i.e., exchange of migrants among populations leading to genetic homogenization among sites) and demographic connections among populations on each site, which is not unexpected given the small geographical distances among them. However, if the oil spill had produced a sufficiently severe population bottleneck, one would expect that all populations would tend to be genetically homogeneous, with little to no evidence of rare haplotypes, for instance. However, the

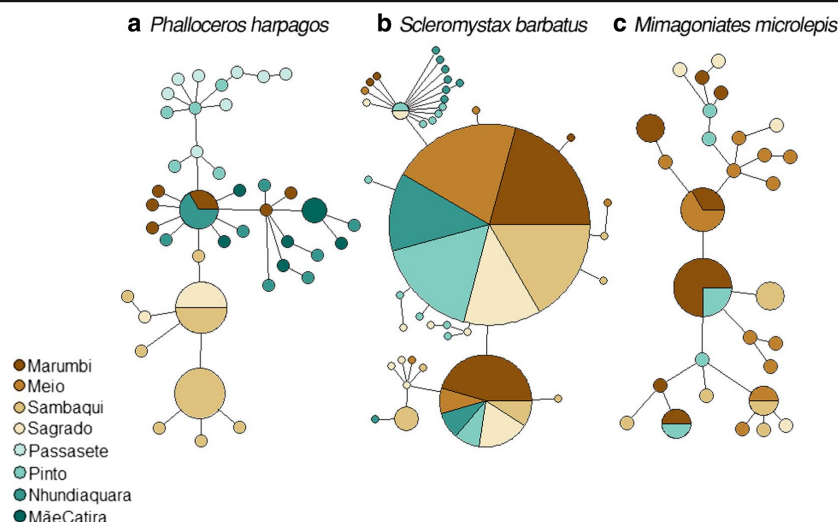


Fig. 2 Haplotype networks of the fragment of the COI gene for the three studied fish species. **a** *Phalloceros harpagos*. **b** *Scleromystax barbatus*. **c** *Mimagoniates microlepis*. Haplotype

size scales with frequency. Distance between haplotypes does not represent actual computed distance values

substantial variability that was detected indicates that any potential population bottleneck was not sufficiently severe to cause detectable depletions in genetic variability in exposed populations, possibly due to emigration from neighboring regions. This inference is corroborated by direct estimates of haplotype and nucleotide diversity (Table 1), with the obtained estimates being similar among sites and without any consistent genetic depletion in the sites directly affected by the oil spill of January 2001.

4 Discussion

The results of the present study were not able to detect a lasting depletion of genetic variability in any of the three fish species examined in areas impacted by the light fuel oil spill at Serra do Mar, in the state of Paraná, in 2001. This is consistent with some other studies on the long-term impacts of oil spills. For instance, in a study on the impact of the Exxon Valdez oil spill, Barber et al. (1995) showed that 2 years after the accident, fish populations

Table 1 Haplotype and nucleotide diversity of the corresponding species and populations.

River	<i>Phalloceros harpagos</i>			<i>Mimagoniates microlepis</i>			<i>Scleromystax barbatus</i>		
	Hd	Nd	N	Hd	Nd	N	Hd	Nd	N
Marumbi	0.952	0.00701	7	0.867	0.04915	10	0	0	13
Meio	—	—	—	0.833	0.00704	13	0.378	0.00268	10
Sambaqui	0.864	0.0032	12	0.933	0.00851	12	0.455	0.00199	12
Sagrado	0.667	0.00112	3	1	0.13173	4	0.808	0.00568	13
Passa Sete	1	0.01607	8	—	—	—	—	—	—
Pinto	1	0.01225	5	1	0.00686	5	0.371	0.00089	15
Nhundiaquara	1	0.01088	9	—	—	—	0.455	0.00219	12
Mãe Catira	0.929	0.00397	8	—	—	—	—	—	—

Hd haplotype diversity, Nd nucleotide diversity, N number of sequenced specimens in that location

were largely recovered. While studying the same event, Lancot et al. (1999) found that recolonization via emigration of populations of the harlequin duck from non-affected areas could recover impacted populations, although this effect might only take place in the long term. It is important to note that our results do not necessarily mean that no acute impacts took place at the time of the accident. For instance, it is known that some polycyclic aromatic hydrocarbon components of oil are acutely toxic (Barron et al. 1999) and potentially mutagenic (Eisler 1987; Harvey 1991; Srogi 2007). However, according to Cronin and Bickham (1998), if lethal mutations are introduced, the rapidly ensuing mortality would lead to strong selection and consequently the elimination of such mutations on the affected populations, particularly over the first few generations. These authors explain that although crude oil may be mutagenic in laboratory experiments or chronically-polluted sites, oil spills probably would not exhibit the same effects for two reasons: concentrations of mutagenic fractions may be lower in an oil spill, and exposure to oil typically occurs over a limited period of time. However, the extent to which those factors are true is likely to depend on the specific oil type and circumstances of the spill, including the degree of weathering prior to exposure. Miller et al. (1994) and Collier et al. (1996) concluded that the absence of DNA adducts or other DNA damage in teleost fish following oil spills suggests that such short-term exposure to oil does not result in somatic mutagenesis. These results are also consistent with another study in the study region that did not detect faunal differences between impacted and non-impacted locations (Ostrensky et al. 2015). Bickham et al. (2000) also anticipates that reduction in genetic variability will be the prevalent effect, leading to compounding effects of continuous erosion of fitness, but only if there is long-term exposure.

Our results are in contrast with another study on major oil spill in the state of Paraná, but this time in the Iguaçu River (Katsumiti et al. 2013). In that study, two fish species (*Hyphessobrycon reticulatus* [Characidae] and *Phalloceros caudimaculatus* [Poeciliidae]) were collected 5 years after the oil spill and used in biochemical, histopathological, and genotoxic studies. Although some evidence of disturbance was detected in specimens from the impacted site, the frequency of such impacts was determined in comparison with control populations that were obtained from other locations, including fish farms. Therefore, it

is not possible to determine if those anomalies were caused by the oil spill in question, or if they were caused by background pollution or other sources of variation that were already (and potentially still are) found in the region.

There are several factors that might have contributed to the resilience of the fish populations investigated in this study. First, although the spills were severe, they represented a short-term disturbance that disproportionately affected the fishes that were living in the affected rivers at the moment of the accident. This probably allowed for recolonization of fish from populations in other watersheds, which resupplied genetic variability to the populations in the affected locations. Second, the spatial structure of watersheds, as well as the unidirectional, continuous flow of water in the non-estuarine portion of the affected region, possibly accelerated the removal of the low molecular weight petroleum hydrocarbons (BTEX and the majority of PAH) from the region, thus accelerating recovery, compared to analogous situations in lakes or estuaries.

Acknowledgments The authors thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq) for providing a productivity in research grant to Antonio Ostrensky. We also thank the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES) for providing PhD grant to Giorgi Dal Pont and Aline Horodesky.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest This study was funded by Petrobras (grant). However, the source of type of funding was categorized explicitly as a research project, and there was no influence or oversight from the funders on the analyses, results, and writing of this manuscript.

References

- Albarelo, L.C. (2012). O vazamento do oleoduto OLAPA (Morretes, Paraná): Avaliação ambiental e reconstituição do óleo, da Serra do Mar ao complexo estuarino de Paranaguá. Pós-Graduação em Geociência, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 188 pp. Available at: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/56326/000860241.pdf?sequence=1>.
- Barber, W. E., McDonald, L. L., Erickson, W. P., & Vallarino, M. (1995). Effect of the Exxon Valdez oil spill on intertidal fish:

- a field study. *Transactions of the American Fisheries Society*, 124, 461–476.
- Barron, M. G., Podrabsky, T., Ogle, S., & Ricker, R. W. (1999). Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? *Aquatic Toxicology*, 46, 253–268.
- Bickham, J. W., Sandhu, S., Hebert, P. D. N., Chikhi, L., & Athwal R. (2000). Effects of chemicals contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research/ Reviews in Mutation Research*, 463(1): 33–51.
- Boeger, W.A., Guimarães, A.T.B., Romão, S., Ostrensky, A., Zamberlan, E., & Falkiewicz, F.H. 2003. Histopathology as an approach to evaluated the effect of an oil spill on fishes of Arroio Saldanha and Rio Iguaçu (Brazil), International oil spill conference, Amer Petroleum Inst, Washington, USA.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggeri, P., & Sciutto, A. (2006). Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of oil spill: haven case study. *Marine Environmental Research*, 62(Supplement 1), S287–S291.
- Carls, M. G., Rice, S. D., & Hose, J. E. (1999). Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 481–493.
- Collier, T.K., Krone, C.A., Krahn, M.M., Stein, J.E., Chan, S.L. & Varanasi, U. 1996. Petroleum exposure and associated biochemical effects in subtidal fish after the Exxon Valdez oil spill American Fisheries Society Symposium, pp. 671–683. Available on.
- Cronin, M. A., & Bickham, J. W. (1998). A population genetic analysis of the potential for a crude oil spill to induce heritable mutations and impact natural populations. *Ecotoxicology*, 7, 259–278.
- Eisler, R. (1987). Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *US fish and wildlife service biological report*, 85, 81.
- Etkin, D.S. 2004 Modeling oil spill response and damage costs Proceedings of the Fifth Biennial Freshwater Spills Symposium, p. 16. Available at: https://archive.epa.gov/emergencies/content/fss/web/pdf/etkin2_04.pdf.
- Faria, B.M.D., Timmerman, M.C., Platte, E.B. & Rosário, M.D. (2005). Environmental effects in a subtropical brazilian river after an oil spill International Oil Spill Conference Proceedings, pp. 701–702. Available at: <http://www.ioscproceedings.org/doi/abs/10.7901/2169-3358-2005-1-701>.
- Gabardo, I.T., Meniconi, M.F., Faria, B.M., Silva, T.A., Cavalcanti, T.R., Silva, G.C., Gallotta, F.D., N., A.S., Paes, J.E., Bentz, C.M., Lima, S.O.F., Rosário, M.D., Soriano, A.U., Baessa, M.P.M., Mendes, L.G., Dirceu C, Silveira, J., Bilhalva, M.M., Politano, A.T., Freitas, L.R.D., Parkinson, R., Lima, J.A.M., Guimarães, P.P., Medeiros, J. & Santos, A.F. 2011. Lessons learned on oil spill environment impact assessment: 10 years of petrobras experience review. International Oil Spill Conference Proceedings, p. abs426. Available at: <http://www.ioscproceedings.org/doi/abs/10.7901/2169-3358-2011-1-426>.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Harvey, R. G. (1991). *Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry and carcinogenicity* (p. 396). Cambridge: Cambridge University Press.
- Horodesky, A., Abilhoa, V., Zeni, T. D. O., Montanhini Neto, R., Castilho-Westphal, G. G., & Ostrensky, A. (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.
- Hose, J. E., McGurk, M. D., Marty, G. D., Hinton, D. E., Brown, E. D., & Baker, T. T. (1996). Sublethal effects of the (Exxon Valdez) oil spill on herring embryos and larvae: morphological, cytogenetic, and histopathological assessments, 1989–1991. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53, 2355–2365.
- Incardona, J. P., Collier, T. K., & Scholz, N. L. (2004). Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196, 191–205.
- Incardona, J. P., Vines, C. A., Linbo, T. L., Myers, M. S., Sloan, C. A., Anulacion, B. F., Boyd, D., Collier, T. K., Morgan, S., Cherr, G. N., & Scholz, N. L. (2012). Potent phototoxicity of marine bunker oil to translucent herring embryos after prolonged weathering. *PloS One*, 7, 30116.
- Katsumiti, A., França, P. P., Costa, G. P. S., Zandoná, E. M., Benincá, C., Assis, H. C. S. D., Cestari, M. M., Maschchio, J., Randi, M. A. F., Silva, C. A., Rochecheche, H., & Ribeiro, C. A. O. (2013). Evaluation five years after a refinery oil spill in freshwater wetland—Paraná State, Southern of Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8, 77–87.
- Lancot, R., Goatcher, B., Kim, S., Talbot, S., Pierson, B., Daniel, E., & Zwiefelhofer, D. (1999). Harlequin duck recovery from the Exxon Valdez oil spill: a population genetics perspective. *The Auk*, 116, 781–791.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947–2948.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Miller, G. D., Seeb, J. E., Bue, B. G., & Sharr, S. (1994). Saltwater exposure at fertilization induces ploidy alterations. Including mosaicism, in salmonid. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 42–49.
- Ostrensky, A., Chaves, P.T.C., Duboc, L.F., Guimarães, A.T.B., Cruz, S.R.Z., Wegbecher, F.X., Pilchowski, R.W., Teixeira, U.A. & Belz, C.E. (2001). Monitoramento icteofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigui e Iguaçu, 2º Seminário do Rio Iguaçu, Araucária, Paraná, Brasil, pp. 32–52.
- Ostrensky, A., Neto, R. M., Castilho-Westphal, G. G., Zeni, T. O., Abilhoa, V., & Horodesky, A. (2015). Population structure of fish from the Serra do Mar, Paraná, Brazil: a comparative analysis of environments affected and by oil spills and unaffected areas. *Journal of Ecology and The Natural Environment*, 1, 54–62.
- Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26, 419–420.

- Peterson, C. H., Rice, S. D., Short, J. W., Esler, D., Bodkin, J. L., Ballachey, B. E., & Irons, D. B. (2003). Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science*, 302, 2082–2086.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Accessed 19 January 2017.
- Srog, K. (2007). Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 5, 169–195.
- Staden, R., Beal, K. F. & Bonfield, J. K. (1998). The staden package. Computer methods in molecular biology, bioinformatics methods and protocols. In S. Misener & S. A. Krawetz (Eds), *The Humana Press Inc., Totowa, NJ 07512*, 132, 15–130.
- Teal, J. M., & Howarth, R. W. (1984). Oil spill studies: a review of ecological effects. *Environmental Management*, 8, 27–43.
- Vanzella, T. P., Martinez, C. B. R., & Cólus, I. M. S. (2007). Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 631, 36–43.
- Wickham, H. (2007). Reshaping data with the reshape package. *Journal of Statistical Software*, 21, 20.
- Wickham, H. (2011). The split-apply-combine strategy for data analysis. *Journal of Statistical Software*, 40, 29.

ANEXO II). A espécie *Astyanax lacustres* é sinonímia de *Astyanax altiparanae*, que passou recentemente por alteração da sua nomenclatura zoológica.

Abaixo, são apresentados uma breve descrição metodológica dos experimentos e análises desenvolvidas dentro da área de “ecotoxicologia”.



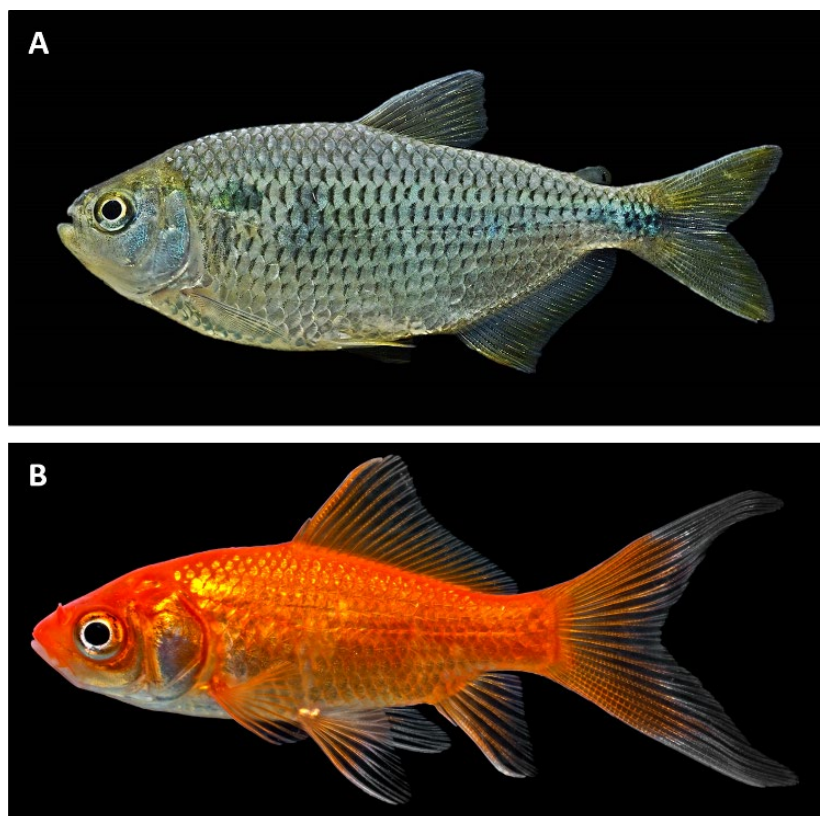


Figura 4. Exemplos de (A) *Astyanax altiparanae* e (B) *Carassius auratus* utilizadas nos procedimentos experimentais para avaliação ecotoxicológica. Foto (A) por Diogo Barbalho Hungria e foto (B) obtida no site www.ncfishes.com.

6.3.1 Exposição à FSA da gasolina em associação a condições de alterações abióticas

O IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) divulgou em 2013 dados projetando o cenário climático esperado para o mundo em 50 anos. Nessa previsão, espera-se aumento de aproximadamente 6 °C na temperatura do planeta. Considerando tal projeção de aumento da temperatura, e consequentemente de outros parâmetros de qualidade de água associados, três experimentos foram delineados e executados com o objetivo de avaliar os efeitos bioquímicos, fisiológicos e hematológicos da associação de alterações climáticas frente à exposição a hidrocarbonetos de petróleo.

No primeiro experimento, delineado para ser considerado como controle das condições experimentais, exemplares de *A. altiparanae* foram expostos à 0,5 % da FSA da gasolina (valor da CL₁₀-96h calculado a partir do experimento agudo) em sob temperatura controlada de 25 °C e pH neutro ($\approx 7,0$). No segundo experimento, a temperatura foi aumentada para 30 °C e o pH mantido neutro. O terceiro experimento consistiu na redução do pH da água para 4,0 e manutenção da temperatura em 25 °C.

6.3.1.1 Manutenção e Aclimação dos Animais

Exemplares adultos de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) ($n=200$; peso= $18,95 \pm 3,36$ g; comprimento total= $10,56 \pm 0,74$ cm; comprimento padrão= $8,88 \pm 0,66$ cm) foram adquiridos em distribuidor comercialmente (Peixes e Peixes Ltda, Curitiba - PR, Brasil) e transportados ao laboratório (Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais – GIA/UFPR, Curitiba - PR, Brasil). Após a chegada, foram submetidos a tratamentos profiláticos (2 horas em 6 g de NaCl/L) e, posteriormente, mantidos em tanques (1000 L) equipados com sistema fechado de filtragem física e biológica, aeração constante e temperatura controlada por aproximadamente um mês (Figura 5).

Durante esse período a ocorrência de mortalidade foi de aproximadamente 2%. A alimentação foi realizada diariamente, *ad libitum*, com ração comercial (Kowalski®, Proteína bruta= 47%).



Figura 5. Tanques de manutenção de exemplares de *Astyanax altiparanae* nas dependências do Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos (LAPOA) do GIA. Anexo ao tanque pode ser visualizado o filtro biológico contendo macrófitas. A utilização desse sistema de filtragem auxilia no processo de fixação de nitrogênio gerado nos sistemas devido aos mecanismos de decomposição de matéria orgânica.

6.3.1.2 Obtenção da Fração Solúvel em Água da Gasolina

Os testes foram realizados com a fração solúvel em água (FSA) de gasolina comum, vendida comercialmente. O preparo da FSA foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Anderson et al. (1974). Uma parte de óleo foi cuidadosamente adicionada a nove partes de água (1:9) e as duas substâncias foram agitadas vagarosamente, com auxílio de agitador

magnético, observando-se a formação de um vórtex com cerca de 1/3 da altura do recipiente. O preparo foi realizado em frasco Mariotte, com capacidade para 15 L, coberto com papel alumínio para evitar incidência luminosa (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Após 23 h sob agitação em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) o agitador foi desligado e a solução foi mantida imóvel por aproximadamente 15 min. A FSA foi obtida por gravidade e imediatamente adicionada às unidades experimentais. A concentração da FSA_G utilizada nos experimentos (0,5% - v/v) foi baseada na CL₁₀-96h calculada previamente para a espécie.

6.3.1.3 Teste de exposição e recuperação à FSA_G em 25 °C e 30°C

Uma vez que o controle da temperatura era primordial, o experimento foi realizado em banho-maria à 25 °C. Dois banhos-maria foram confeccionados em madeira e impermeabilizados para evitar vazamento de água e consequente variação do volume. Quarenta aquários redondos de vidro (n=20/banho-maria) foram acondicionados nos banhos-maria e preenchidos com 4 L de água limpa declorada. Exemplares de *Astyanax altiparanae* foram previamente separados do tanque de manutenção e acondicionados individualmente nos aquários de vidro. A aclimação às condições laboratoriais foi realizada por 96h.

Astyanax altiparanae (n=20) foram expostos à 0,5 % (v/v) da FSA_G por 96 h e, ao final desse período, 10 exemplares foram submetidos à eutanásia (grupo FSA_G-96h). Para os 10 peixes restantes a adição diária da FSA_G foi interrompida para manutenção em condição de recuperação por 96 h (FSAG-192h). Grupos controle (n= 20) foram mantidos em água limpa sem adição da FSAG por 96 (Controle-96h) e 192 h (Controle-192h). O experimento foi conduzido em sistema semi-estático, com renovação diária de 80 % do volume de água durante todo o período experimental (192 h).

Ao final do período de exposição (96 h) e recuperação (192 h) os peixes foram anestesiados com MS-222 (Ostrensky, Pedrazzani et al. 2015) e tiveram sangue coletado por punção da veia caudal (seringas heparinizadas). Cerca de 100 µL do sangue foi imediatamente utilizado para as avaliações hematológicas (hemograma e micro hematócrito) e o restante centrifugado para obtenção do plasma. O plasma obtido foi congelado (-20 °C) para posterior determinação das concentrações de glicose, cortisol, Na⁺, K⁺, e Cl⁻. Em seguida, os peixes foram eutanasiados (secção medular) para coleta de tecidos (fígado, rim, brânquia, músculo e cérebro). Imediatamente após a coleta todos os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 C para posterior determinação dos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e histopatológicos (vide metodologia abaixo).

6.3.1.4 Teste de exposição e recuperação à FSA_G em 30 °C

Antes do início da aclimação às condições experimentais, *Astyanax altiparanae* (n=40) foram acondicionados em tanques de 100 L para aclimação à temperatura de 30 °C. Nessa condição, a temperatura foi aumentada, de 25 até 30 °C, gradativamente durante um período de 72 horas. Ao final desse período, os animais foram acondicionados nos aquários de vidro contendo 4 L de água por 48 h. Todos os procedimentos realizados a partir desse momento foram os mesmos descritos no experimento conduzido à 25 °C. Ao final das 192 h de exposição os peixes dos grupos FSA_G-96 e FSA_G-192h, e de seus respectivos controles (controle-96h e controle-192h), foram anestesiados para coleta de sangue e eutanaziados para coleta de tecidos.

6.3.1.5 Teste de exposição e recuperação à FSA_G em pH 4,0

Antes do início da aclimação às condições experimentais, *Astyanax altiparanae* (n=40) foram acondicionados em tanques de 100 L para aclimação ao pH 4,0. Nessa condição, o pH foi reduzido de 7,0 até 4,0 gradativamente, durante um período de 72 horas. Ao final desse período, os animais foram acondicionados nos aquários de vidro contendo 4 L de água por 48 h. Todos os procedimentos realizados a partir desse momento foram os mesmos descritos no experimento conduzido à 25 °C. Ao final das 192 h de exposição os peixes dos grupos FSA_G-96 e FSA_G-192h, e de seus respectivos controles (controle-96h e controle-192h), foram anestesiados para coleta de sangue e eutanaziados para coleta de tecidos.

Abaixo, na Tabela I, podem ser visualizadas todas as análises que serão realizadas para avaliação bioquímica, fisiológica e hematológica dos exemplares de *A. altiparanae* expostos à diferentes condições laboratoriais descritas nos itens 5.3.1.3, 5.3.1.4 e 5.3.1.5.

Tabela I. Descrição das análises e do andamento de execução das análises em diferentes matrizes/tecidos em cada um dos experimentos de exposição de *Astyanax altiparanae*

(temperatura 25 °C [controle], temperatura 30 °C e pH 4,0) à FSA_C por 92 horas e recuperação por 96 horas.

Matriz/ Tecido	Análise	Método	Andamento		
			Experimento 25 °C	Experimento 30 °C	Experimento pH 4,0
Água	Temperatura	YSI® - Pro20	Finalizado	Finalizado	Finalizado
	O ₂ dissolvido	YSI® - Pro20	Finalizado	Finalizado	Finalizado
	O ₂ Saturação	YSI® - Pro20	Finalizado	Finalizado	Finalizado
	pH	Horiba® – B-713	Finalizado	Finalizado	Finalizado
	Amônia total	(Verdouw, Van Echteld et al. 1978)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Amônia não-ionizada	(Ostrensky and Wasielesky 1995)	Aguardando cálculo	Aguardando dados	Aguardando dados
	Cloreto	(Clarke 1950)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	HPA	(U.S.EPA 1996)	Amostras coletadas	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	BETX	(U.S.EPA 1996)	Amostras coletadas	Amostras coletadas	Amostras coletadas
Brânquia	Atividade Catalase (CAT)	(Machado, Wood et al. 2014)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Atividade Glutadiona-S-transferase (GST)	(Keen, Habig et al. 1976)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Atividade Na/K ATPase	(McCormick and Bern 1989)	Amostras coletadas	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Atividade H/ATPase	(McCormick and Bern 1989)	Amostras coletadas	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Atividade Total ATPase	(McCormick and Bern 1989)	Amostras coletadas	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Atividade Anidrase Carbônica	(Henry 1991)	Amostras coletadas	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Proteína total	(Bradford 1976)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Teor Hídrico	(Souza-Bastos 2011)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Histopatologia	(Bernet, Schmidt et al. 1999)	Em análise	Amostras coletadas	Amostras coletadas
Fígado	Atividade Catalase (CAT)	(Machado, Wood et al. 2014)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Atividade Glutadiona-S-transferase (GST)	(Keen, Habig et al. 1976)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Atividade 7-etoxioresufina-O-deetilase (ERDO)	(Braz-Mota, Sadauskas-Henrique et al. 2015)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Proteína total	(Bradford 1976)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Proteínas Carboniladas	(Levine, Williams et al. 1994)	Amostras coletadas	Amostras coletadas	Amostras coletadas
Músculo	Atividade Acetilcolinesterase (Ache)	(Ellman, Courtney et al. 1961)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Proteína total	(Bradford 1976)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Glicogênio	(Bidinoto, Souza et al. 1997)	Amostras coletadas	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Cortisol	ELISA – Kit DBC®	Amostras coletadas	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Proteínas Carboniladas	(Levine, Williams et al. 1994)	Amostras coletadas	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Teor Hídrico	(Souza-Bastos 2011)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
Cérebro	Atividade Acetilcolinesterase (Ache)	(Ellman, Courtney et al. 1961)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Proteína total	(Bradford 1976)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
Plasma	Glicose	Espectofotometria - Kit Labtest®	Amostras coletadas	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Cloreto	(Clarke 1950)	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Sódio	Fotometria chama	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas

Matriz/ Tecido	Análise	Método	Andamento		
			Experimento 25 °C	Experimento 30 °C	Experimento pH 4,0
	Potássio	Fotometria chama	Finalizado	Amostras coletadas	Amostras coletadas
	Proteína Plasmática total	Refratometria	Finalizado	Finalizado	Finalizado
Sangue	Microhematócrito	(Galvan, Lirola et al. 2016)	Em análise	Em análise	Em análise
	Contagem diferencial de leucócitos (esfregaço sanguíneo)	(Galvan, Lirola et al. 2016)	Em análise	Em análise	Em análise
	Contagem de leucócitos e volume globular médio	(Galvan, Lirola et al. 2016)	Em análise	Em análise	Em análise

6.3.2 Avaliação dos efeitos da FSA da gasolina sobre a capacidade de excreção de compostos nitrogenados em *Carassius auratus*

Espécimes de goldfish (N = 100; peso = $3,49 \pm 1,19$ g) foram adquiridos em loja especializada, em Vancouver, British Columbia, Canadá. No laboratório, os peixes foram mantidos em tanques de 200 L com água da rede de abastecimento de Vancouver declorada (pH = 7,23; $[Na^+] = 97,30 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[K^+] = 4,85 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[Ca^{2+}] = 161,19 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[Mg^{2+}] = 7,30 \mu\text{mol L}^{-1}$) sob condições de fluxo ($O_2 \geq 75,0\%$ saturação; temperatura ambiente = $20,0 \pm 0,5$ °C; fotoperíodo controlado = 12h claro: 12h escuro) por duas semanas antes da experimentação. Flocos comerciais de alimentos seco (45% de proteína bruta) foram oferecidos uma vez por dia e suspensos 24 h antes do início e durante os experimentos.

6.3.2.1 Procedimento para a extração da FSA da gasolina

Gasolina normal, obtida em um posto de gasolina comercial (Vancouver, British Columbia) e armazenada em uma tampa de garrafa de vidro autoclavável de 2 litros com folha de alumínio. Até o uso (5 dias), ele foi mantido em um segundo recipiente de plástico dentro de um gabinete inflamável selado para aumentar a proteção contra incidência de luz.

A extração da FSG foi realizada de acordo com a metodologia descrita por ANDERSON et al. (1974) à temperatura ambiente ($20,0 \pm 1,0$ °C). Uma parte de gasolina e nove partes de água (proporção de 1: 9) foram adicionadas a uma garrafa de vidro de 1L e agitadas numa placa magnética. Para padronizar o procedimento, a velocidade de agitação foi mantida para formar um vórtice correspondente a 1/3 da altura da coluna de gasolina + água. Após 22 h a agitação foi parada e a solução repousou durante 30 min para permitir a separação apropriada das fases da fração de combustível e WSFG. A WSFG obtida foi imediatamente utilizada.

Amostras da FSGV (100%) foram coletadas para a determinação de BTEX e PAH, metais pesados (Ag, Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, P, Pb, Sr e Zn), compostos nitrogenados (amônia total e uréia) e íons (Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ e Na^+). As amostras para PAH e BTEX foram armazenadas em frasco âmbar descontaminado (60 mL) preparado por três processos em lavador ultrassônico: torneira, bidestilada e água milliQ®; secagem: 24 h a 105; calcinação: 4 h a 400 °C e mantida sob refrigeração (4 °C) para posterior análise cromatográfica. As amostras de água para determinação de compostos metálicos foram armazenadas em frascos âmbar (60 mL) e preservadas com 1% de HNO_3 até a análise.

6.3.2.2 Design experimental

Quarenta peixes foram transferidos do tanque de aclimação principal para recipientes de vidro individuais de 260 ml. Nesta condição de sistema estático, mantido à temperatura ambiente (20.0 ± 1.0 °C) e continuamente abastecido com fluxo de ar, eles foram individualmente aclimatados por 4 h. Após aclimação, 80% do volume de água foi substituído por água doce limpa (controle) ou água doce contendo as quatro concentrações de FSG (0,25, 5, 10 e 25% v/v - N = 8 peixes por tratamento). O período de aclimação, temperatura ambiente, fornecimento de fluxo de ar e concentrações de WSFG foram mantidos os mesmos durante todos os procedimentos experimentais descritos abaixo.

6.3.2.2.1 Procedimento 1: Mensuração dos fluxos de compostos nitrogenados e íons

O principal objetivo deste procedimento foi avaliar a excreção de nitrogênio (amônia e uréia) e, também, a taxa de fluxo de íons (Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ e Na^+) durante a exposição à FSG. No final do período de aclimação de 4 h, os peixes foram expostos durante 6 h a quatro concentrações de FSA da gasolina: 0,25, 5, 10 e 25% v/v. Amostras de água foram coletadas aos 15 min e 6 h após o início da exposição. Temperatura (YSI® 55) e pH (Fisher Scientific® AB15) foram medidos imediatamente e amostras de água para determinação de compostos nitrogenados e íons foram armazenadas a -20 °C até a análise. No final do ensaio experimental, os peixes expostos foram eutanasiados com solução MS222 neutralizada.

6.3.2.2.2 Procedimento 2: Mensuração da Taxa Metabólica Durante a Exposição da FSA da gasolina

O segundo procedimento experimental foi desenhado para avaliar o consumo de oxigênio, os níveis plasmáticos de uréia e Mg^{2+} e Mg^{2+} muscular. Os peixes foram expostos às quatro concentrações de WSFG descritas acima por 6 h. Após a exposição, 80% do volume de água em cada recipiente foi substituído por WSFG e água saturada com oxigênio. A pressão parcial de oxigênio inicial (PO_2) foi medida (YSI® 55) e o recipiente foi selado com uma tampa de látex para evitar a difusão do O_2 do ar atmosférico para a água. A média inicial (média $\pm$ DP) PO_2 foi de $154,38 \pm 1,93$ Torr. Os peixes foram mantidos nesta condição por 60 min, a tampa foi removida e a medida final de PO_2 foi realizada. Para amostragem de sangue e músculo, os peixes foram anestesiados com solução de MS222 tamponada (5 g L^{-1}) adicionada diretamente no recipiente experimental. As amostras de sangue, adquiridas com seringas heparinizadas (heparina de lítio - Sigma Aldrich®), foram centrifugadas por 6 min (6000 rpm) e o plasma obtido foi imediatamente congelado (-80°C) para posterior determinação de uréia e Mg^{2+} . Os peixes foram eutanasiados por secção medular e o tecido muscular foi amostrado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, transferido para freezer a -80°C até a determinação de Mg^{2+} .

6.3.2.2.3 Procedimento 3: Taxa Metabólica Após a Exposição da FSA da gasolina

O procedimento de exposição à FSAG seguiu o mesmo protocolo descrito acima. No entanto, para a medição do consumo de oxigênio, 100% do volume de água + FSAG foi substituído por água doce limpa saturada com oxigênio. O PO_2 inicial foi medido (YSI® 55), o recipiente foi selado e os peixes foram mantidos nesta condição por 60 min. Então, a medida final de PO_2 foi realizada.

6.3.2.3 Exposição aguda de embriões e larvas à FSA dos Derivados de Petróleo

Durante os primeiros ensaios, foram definidos também os protocolos de reprodução artificial da espécie, visto que tanto o manejo como a qualidade da água interferem bruscamente na saúde dos óvulos fertilizados, eliminando-se a presença de fecundação “fantasma”, que são óvulos fecundados sadios até os primeiros estágios de desenvolvimento embrionários, mas que posteriormente morrem. Definiu-se também a temperatura de trabalho, na ocasião foi uma surpresa pois, mesmo dentro da faixa de tolerância da espécie, podemos ter uma enorme variação no desenvolvimento e, a temperatura também pode ocasionar efeitos prejudiciais

semelhantes ao da exposição a agentes químicos, por exemplo. Além disso, os resultados obtidos possibilitaram definir o tempo de trabalho (seguramente até 120 h pós-eclosão) sem que houvesse a interferência do alimento externo na qualidade da água, uma vez que esses alimentos são altamente proteicos e tendem a deteriorar os parâmetros de qualidade de água.

Após definidos os procedimentos para se trabalhar com embriões e larvas da espécie, foram realizados os bioensaios de exposição aguda para a determinação da toxicidade (CL_{10} e CL_{50} -96h) da gasolina, óleo diesel, OMI Petrobras, OMI comercial e óleo lubrificante comercial em dois momentos diferentes. Foram realizados dois testes de exposição aguda, sendo que um consistiu na exposição de embriões, e o segundo teste com embriões recém-eclodidos (larvas), ambos avaliados nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. Cada experimento foi conduzido de acordo com a metodologia de determinação de concentração letal (CL_{50}) (EPA 2002), utilizando dez concentrações das respectivas frações solúveis em água (FSA 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0 e 100,0 %) além de um tratamento controle (peixes + água), controle positivo (solução contendo 1,75% de etanol) e um branco (somente água). Os testes com embriões e larvas foram realizados de forma que se assemelhasse ao máximo aos testes realizados com juvenis e adultos da espécie, possibilitando posteriormente uma comparação de toxicidade entre as fases de ontogenia.

O bioensaio foi realizado com óvulos fertilizados obtidos de desovas artificiais realizadas pelo GIA, que foram posteriormente alojados individualmente em placas de cultivo celular de 06 poços (Kasvi K12-006, Brasil), com volume útil de 15 ml cada poço, totalizando 30 exemplares para cada concentração teste. As placas permaneceram alojadas dentro de uma incubadora do tipo demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) com fotoperíodo ajustado para 12h luz e 12h escuridão e temperatura controlada e ajustada à 25 °C. Para maior controle dos testes, a incubadora permaneceu dentro de uma sala com ventilação e exaustão forçada, além da temperatura também ajustada a 25 °C. A unidade tóxica dos derivados (UT) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$UT = \frac{100}{CL_{50}} \times Volume amostra$$

Quanto maior o valor numérico obtido na UT, maior a toxicidade do composto testado. Para melhor compreensão dos resultados obtidos, outros parâmetros foram mensurados e estão definidos na Tabela 5, adaptado de Galvan, Lirola et al. (2016). O registro dos animais mortos e dos parâmetros de qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, pH, amônia total ($N-AT = NH_3 + NH_4^+$), foram realizados em 0, 24, 48, 72 e 96 h após o início do experimento (CETESB 1990).

Tabela 5 - Parâmetros utilizados para a expressão dos resultados obtidos na exposição de embriões e larvas de *Astyanax altiparanae*.

Parâmetro	Definição/Obtenção	Referência
Concentração Letal Mediana (CL ₁₀)	Concentração da substância teste que causa mortalidade de 10% durante o período de 96 h de exposição.	OECD (1994)
Concentração Letal Mediana (CL ₅₀)	Concentração da substância teste que causa mortalidade de 50% durante o período de 96 h de exposição.	OECD (1994)
Concentração efetiva Zero (CEzero)	Maior concentração da amostra que não se observa efeito agudo nos organismos durante o período de exposição.	ABNT (2011)
Fator de Toxicidade (FT)	Menor concentração da amostra na qual o número de organismos mortos foi menor ou igual a 10%.	Knier e Lopes (2004)
Concentração de efeito não observado (NOEC)	Considera a maior concentração que não causa efeitos deletérios.	US EPA (1996, 2002)
Menor concentração de efeito observado (LOEC)	Menor concentração em que é observado letalidade ou qualquer <i>endpoint</i> .	Cooney (1995)

O monitoramento da temperatura e das concentrações de oxigênio dissolvido foi realizado diretamente nos aquários experimentais com oxímetro digital portátil (YSI® - Pro 20). O pH foi determinado com o auxílio de pHmetro portátil (Horiba Scientific® – B-713). A determinação da N-AT foi realizada de acordo com método colorimétrico de (Verdouw, Van Echteld et al. 1978) e a percentagem de amônia gasosa (N-NH₃) foi calculada a partir dos valores de N-AT, temperatura e pH, de acordo com o método descrito por Ostrensky et al. (1992).

O banco de dados gerado foi organizado 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 foi analisada pela curva de Kaplan-Meier. A concentração letal (CL₅₀) foi estimada

através do *software* Trimmed Spearman-Kärber “LC50 Programs JSpear Test”. As demais análises foram realizadas utilizando-se o *software* Statsoft Statistica^{MR} versão 12.0®.

6.3.2.4 Exposição subletal de embriões e larvas à FSA dos Derivados de Petróleo

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

O bioensaio foi executado segundo as normas internacionais descritas pela OECD (1994): controle negativo (água sem o xenobionte); concentração teste (CT) da gasolina (0,04%), óleo mineral (34,79%) e do petróleo (50,88%). Os valores definidos da concentração-teste para cada composto foram definidos com base nos resultados obtidos na exposição aguda da espécie. A água utilizada nos ensaios era previamente clorada (com hipoclorito 10%); neutralizada (com tiosulfato de sódio 50%), filtrada em filtro bag (50 µm) com carvão ativado e permanecia dentro da incubadora pelo tempo necessário até atingir a temperatura de 25 °C. O tempo de exposição aos compostos foram: 24, 48, 72 e 96 horas.

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

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

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

No período de 48 horas de exposição, foi realizada a contagem de batimentos por minuto (bpm) de 12 exemplares de cada concentração. Neste período também, 06 exemplares foram observados com auxílio de microscópio óptico Leica® DMLS, para avaliação da absorção da reserva vitelínica, caracterizada através de registros realizados a cada duas horas. Ao término das observações, o volume original de água em cada poço foi renovado e as placas foram novamente tampadas, realojadas na incubadora e mantidas até o período subsequente de observação. Os exemplares, tanto embriões como larvas foram monitorados durante o período de 0, 24, 48, 72 e 96 h.

6.3.2.5 Efeitos da exposição na reprodução de *Astyanax altiparanae*

Juvenis de *A. altiparanae*, de mesmo peso e comprimento médio dos indivíduos amostrados anteriormente, foram alojados em quatro sistemas independentes de manutenção de peixes em condições ambientais controladas. Cada sistema era composto por três tanques de polietileno de 70 L cada, ligados entre si por bomba submersa (SB-2000, Sarlobetter, Brasil) e mantidos sob aeração constante, fornecida por um compressor radial CR6 (IBRAM, Brasil), e temperatura de 25°C, mantida por aquecedores de 300 watts, controlado por termostato digital (BOYU, Taiwan). Em cada tanque eram mantidos 120 alevinos.

Anteriormente ao período de exposição, os exemplares permaneceram por cinco dias nesses tanques para aclimação. Após a aclimação, os sistemas foram desligados, tornando cada um dos tanques independentes dos demais, formando assim quatro unidades testes com duas repetições cada. Os peixes de cada sistema foram então expostos a diferentes concentrações da FSA de cada composto testado: i) Sistema 1: 3% da FSA da gasolina; ii) Sistema 2: 10% da FSA do petróleo; iii) Sistema 3: 10% da FSA do óleo mineral lubrificante. No último sistema (Sistema 4) os peixes não foram expostos a nenhum xenobionte (controle negativo). Os animais permaneceram nesses sistemas por 15 dias, sendo realizada a renovação diária de 100% do volume de água (mesmas condições/concentrações de xenobiontes a cada renovação).

Ao final desse período, foram selecionados, ao acaso, de cada um dos tanques, duas fêmeas, com peso médio de $4,06 \pm 1,37$ g (média $\pm$ desvio padrão) e comprimento total de $3,9 \pm 1,0$ cm; e dois machos, com peso médio de $1,20 \pm 0,39$ g e comprimento total médio de $3,4 \pm 0,3$ cm, que foram anestesiados em solução de óleo de cravo (10%), sacrificados e fixados em ALFAC® e posteriormente transferidos para álcool 70%, permanecendo até a realização das análises histológicas do segundo arco branquial, do fígado e das gônadas.

Após este período de exposição, os sistemas foram novamente ligados e os animais permaneceram em recuperação por mais cinco dias, sendo realizada a renovação diária da água, porém sem os xenobiontes. Após o período de recuperação os demais indivíduos foram transferidos para quatro sistemas independentes de manutenção de peixes localizado em uma estufa agrícola. Cada sistema era composto por três tanques de polietileno de 1000 L cada, ligados em si, por uma bomba submersa (SB-2700, Sarlobetter, Brasil) e também a filtros mecânicos e biológicos, para manutenção da qualidade da água, além de aeração constante e temperatura mantida em 25° C, mantida por seis aquecedores de 300 watts, controlado por termostato digital (BOYU, Taiwan).

Os peixes permaneceram nos sistemas de manutenção por 6 meses. Durante todo o período experimental, foram alimentados três vezes ao dia (08:00, 12:00 e 16:00 horas), com ração comercial extrusada (Kowalski, Brasil) contendo 45% de proteína bruta e 4% de extrato etéreo.

Mensalmente eram selecionados ao acaso, de cada um dos tanques, três fêmeas e três machos, que foram imediatamente sacrificados com solução de óleo de cravo (10%) e fixados em solução de ALFAC®, posteriormente transferidos para álcool 70%, até a realização das análises histológicas das brânquias, fígado e gônadas. As alterações histológicas estão em processo final e serão classificadas segundo o cálculo de índice de Alteração Histopatológica (IAH), proposto por Schwaiger, Wanke et al. (1997), posteriormente atribuindo-se um valor numérico conforme o grau de alteração, seguindo a proposta de Poleksić and Mitrović-Tutundžić (1994).

Após o período de seis meses nos tanques de manutenção, os exemplares de cada caixa de manutenção foram capturados, anestesiados e foram submetidos ao processo de indução hormonal, através do uso do produto comercial 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.

Após receberem a aplicação dos hormônios, os reprodutores de cada tratamento foram acondicionados em tanques-rede individuais, com dimensões de 25 x 15 x 15 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), confeccionado com rede de *nylon* trançada de 3 mm e malha de 1,5 x 1,5 cm. Esses tanques-rede, por sua vez, foram mantidos em um tanque de polietileno de 100 L, em temperatura controlada de 25°C, mantida com o uso de um aquecedor de 300 watts (BOYU, Taiwan). Os animais foram mantidos nesse local até a liberação e posterior fertilização dos ovócitos. Imediatamente após a desova, os ovos foram removidos por sifonagem, retidos em uma peneira de malha de 0,5 mm, lavados em água corrente.

Em seguida, foram coletados com uma pipeta de Pasteur e analisados em microscópio óptico Leica® DMLS, adaptados com câmera digital ToupCam® (L3CMOS Series C-mount, China) e transferidos para 60 placas de cultivo celular de 6 poços cada com tampa (KASVI K12-006, China), de volume unitário de 17 ml, sendo acondicionado um ovo fecundado por poço, sendo 15 placas para cada tratamento teste. As placas foram mantidas em incubadora vertical tipo BOD Microprocessada (ADAMO, Brasil), com fotoperíodo ajustado para 12 h luz: 12 h escuro e mantida em 25 °C por 96 h.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 Genética Ambiental

Com os resultados apresentados e discutidos no artigo “*Is There Detectable Long-term Depletion of Genetic Variation in Freshwater Fish Species Affected by an Oil Spill?*” (ANEXO I) foi possível concluir que não ocorreu depleção duradoura da variabilidade genética em nenhuma das três espécies nativas de peixes estudadas (*Phalloceros harpagos*, *Scleromystax barbatus*, *Mimagoniates microlepis*) nas áreas impactadas pelo vazamento de óleo combustível leve na Serra do Mar, no estado do Paraná, em 2001. Tal resultado pode ser atribuído a vários fatores que apresentam influência sobre a resiliência das populações de peixes investigadas neste estudo. Primeiro, embora os vazamentos fossem graves, eles representaram uma perturbação de curto prazo que afetou desproporcionalmente os peixes que viviam nos rios no momento do acidente. Isso provavelmente permitiu a recolonização de peixes de populações de outras bacias hidrográficas, o que reabasteceu a variabilidade genética para as populações nos locais afetados. Em segundo lugar, a estrutura espacial das bacias hidrográficas, bem como o fluxo contínuo unidirecional de água na porção não estuarina da região afetada, possivelmente acelerou a remoção dos hidrocarbonetos de petróleo de baixo peso molecular (BTEX e a maioria dos PAH) da região, acelerando a recuperação, em comparação com situações análogas em lagos ou estuários.

7.2 Química

7.2.1 Processamento dos dados cromatográficos HPA e BTEX

Como descrito nos materiais e métodos, uma série de análises para a determinação de HPA e BTEX foram realizadas em amostras oriundas de experimentos realizados pela equipe da área de estudos em “ecotoxicologia”, coordenada pelo professor Antonio Ostrensky. Utilizando os métodos analíticos de extração e quantificação desenvolvidos durante a execução do presente projeto, são apresentados dados obtidos para capítulos específicos das teses de doutorado dos alunos Giorgi Dal Pont e Diego Stevanato.

No primeiro capítulo da tese do doutorando Giorgi Dal Pont foram analisadas amostras da fração solúvel em água de vários produtos derivados de petróleo. Os as concentrações de HPA e BTEX detectadas são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 6. Concentrações médias de hidrocarbonetos monoaromáticos (BETX) e policíclicos aromáticos (HPA) na fração solúvel em água (FSM) de petróleo e produtos refinados durante testes de toxicidade (LC₁₀ e LC₅₀-96h) para o peixe neotropical *Astyanax altiparanae*.

WSF Parameter	Toxicity Trials					
	Gasoline	Diesel	Petroleum	IMO ^a	IMO ^b	Lubricant
BETX (µg L⁻¹)						
Benzene	44830.00	977.14	2873.00	< 5.0	< 5.0	< 5.0
Toluene	42200.00	679.86	1279.50	< 5.0	< 5.0	< 5.0
Ethylbenzene	15960.00	126.77	118.00	< 5.0	< 5.0	< 5.0
<i>m,p</i> -Xylene	18020.00	151.71	321.00	< 5.0	< 5.0	< 5.0
<i>o</i> -Xylene	16480.00	158.17	341.00	< 5.0	< 5.0	< 5.0
Σ BETX	137490.00	2093.66	4932.50	< 5.0	< 5.0	< 5.0
PAH (µg L⁻¹)						
Naphthalene	3.89	9.19	3.58	ND	ND	ND
Acenaphthylene	< 0.35	ND	ND	ND	ND	ND
Acenaphthene	< 0.35	ND	< 0.35	ND	ND	ND
Fluorene	ND	ND	0.46	< 0.35	ND	ND
Phenanthrene	ND	7.17	ND	ND	ND	ND
Anthracene	ND	7.09	0.59	ND	ND	ND
Fluoranthene	2.90	ND	< 0.35	< 0.35	< 0.35	< 0.35
Pyrene	2.50	1.00	ND	ND	ND	ND
Benz[<i>a</i>]anthracene	3.80	0.65	0.44	0.46	0.41	< 0.35
Chrysene	4.60	0.60	0.38	0.40	0.36	< 0.35
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	5.50	1.26	< 0.35	< 0.35	< 0.35	< 0.35
Benzo[<i>k</i>]fluoranthene	5.60	1.08	3.91	< 0.35	< 0.35	< 0.35
Benzo[<i>a</i>]pyrene	4.20	1.04	< 0.35	< 0.35	< 0.35	< 0.35
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	6.70	1.24	< 0.35	< 0.35	< 0.35	0.46
Dibenz[<i>ah</i>]anthracene	8.90	1.20	0.352	< 0.35	< 0.35	0.43
Benzo[<i>ghi</i>]perylene	6.70	1.10	< 0.35	< 0.35	< 0.35	0.43
Σ PAH	55.29	32.63	9.70	0.86	0.77	1.32
Σ	137545.29	2126.28	4942.20	0.86	0.77	1.32

Além das análises apresentadas acima, também foi realizada a determinação da concentração de HPA e BTEX em amostras da fração solúvel em água de gasolina utilizadas em experimentos para a avaliação dos efeitos do contaminante em associação à alteração de fatores abióticos (temperatura e pH da água) (Tabela 8).

Tabela 7. Concentrações de hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) e policíclicos aromáticos (HPA) em 100% da fração solúvel em água da gasolina (WSFG) utilizada durante os diferentes ensaios de exposição com o peixe de água doce neotropical *Astyanax altiparanae*.

Aromatic Petroleum Hydrocarbons	Experimental Trials		
	25°C+pH7.0	30°C+pH7.0	25°C+pH4.0
<i>BTEX ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>			
Benzene	11996.2	9922.6	10344.7
Toluene	11161.6	9335.2	9472.3
Ethylbenzene	817.5	645.9	686.5
<i>m,p</i> -Xylene	1608.2	1204.7	1339.9
<i>o</i> -Xylene	1487.8	1120.0	1284.1
Σ BTEX	27071.3	22228.4	23127.5
<i>PAH ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>			
Naphthalene	<0.5	<0,5	<0,5
Acenaphthylene	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Acenaphthene	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Fluorene	nd	nd	nd
Phenanthrene	nd	nd	nd
Anthracene	nd	nd	nd
Fluoranthene	1.5	2.1	2.3
Pyrene	1.8	1.9	2.0
Benz[<i>a</i>]anthracene	3.8	1.2	3.4
Chrysene	4.6	2.0	4.1
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	5.5	3.7	4.4
Benzo[<i>k</i>]fluoranthene	5.6	3.9	4.7
Benzo[<i>a</i>]pyrene	4.2	3.4	3.7
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	5.4	2.8	3.7
Dibenz[<i>ah</i>]anthracene	5.3	2.5	3.2
Benzo[<i>ghi</i>]perylene	5.4	4.7	4.3
Σ PAH	43.0	24.2	35.7

Quantification limit = BTEX < 5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and PAH < 0.5 L^{-1} . BTEX= Monoaromatic hydrocarbons.

PAH= Polycyclic aromatic hydrocarbons.

Nesta etapa do trabalho foi realizado o processamento adicional para determinação de HPA e BTEX em amostras de fração solúvel em água de gasolina proveniente de experimentos realizados na Universidade da Columbia Britânica (UBC) – Vancouver, Canadá. Tais experimentos foram executados durante o estágio sanduíche realizado pelo doutorando Giorgi Dal Pont. Um total de nove amostras foram enviadas para análise no GQA e os valores médios das concentrações de HPA e BTEX são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Concentrações de hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) e policíclicos aromáticos (HPA) da fração solúvel em água da gasolina (WSFG) utilizada durante os ensaios de exposição com Goldfish *Carassius auratus*.

BTEX ($\mu\text{g L}^{-1}$)	100% WSFG
Benzene	1336.1
Toluene	5562.6
Ethylbenzene	227.6
m,p-Xylene	429.9
o-Xylene	407.7
$\sum$ BTEX	7963.8
PAH ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
Naphthalene	<0.5
Acenaphthylene	<0.5
Acenaphthene	1.1
Fluorene	0.9
Phenanthrene	<0.5
Anthracene	nd
Fluoranthene	3.1
Pyrene	3.0
Benz[a]anthracene	5.4
Chrysene	7.1
Benzo[b]fluoranthene	8.0
Benzo[k]fluoranthene	8.7
Benzo[a]pyrene	6.0
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	7.9
Dibenz[ah]anthracene	7.9
Benzo[ghi]perylene	8.7
$\sum$ PAH	67.8
$\sum$	8031.58

Quantification limit = BTEX < 5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and PAH < 0.5 L^{-1} . BTEX= monoaromatic hydrocarbons.
PAH= Polycyclic aromatic hydrocarbons.

Em paralelo foram realizadas as análises cromatográficas das amostras obtidas durante a realização dos estudos relacionados ao trabalho de doutorado do aluno Diego Stevanatto, no âmbito do projeto Marcadores Moleculares. Os resultados para determinação de BTEX e HPA em amostras aquosas são apresentados nas Tabela 9 e Tabela 10.

Tabela 9. Determinação de BTEX em frações hidrossolúveis de derivados de petróleo.

Amostra	Lubrificante	OMI	Petróleo	Gasolina	Diesel
conc. determinada	µg L ⁻¹				
Benzeno	<5	17	8	15	1782
Tolueno	ND	9	<5	16	1757
Etilbenzeno	ND	19	18	21	153
m-Xileno+p-Xileno	ND	16	14	21	599
o-Xileno	ND	20	15	23	ND

<5 = menor que o limite de quantificação (5 µg L⁻¹); ND = não detectado;

Tabela 10. Determinação de HPA em frações hidrossolúveis de derivados de petróleo.

HPA	AMOSTRAS				
	Diesel	Gasolina	Petróleo	Lubrificante	OMI
Concentração determinada (µg L ⁻¹)					
Naphthalene	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Acenaphthylene	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Acenaphthene	0,36	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Fluorene	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Phenanthrene	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Anthracene	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Fluoranthene	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Pyrene	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Benz[a]anthracene	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Chrysene	<0,25	<0,25	0,27	<0,25	<0,25
Benzo[b]fluoranthene	<0,25	0,33	0,25	<0,25	<0,25
Benzo[k]fluoranthene	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Benzo[a]pyrene	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	<0,25	0,29	<0,25	<0,25	<0,25
Dibenz[ah]anthracene	<0,25	0,36	0,34	<0,25	0,33
Benzo[ghi]perylene	<0,25	0,28	<0,25	<0,25	<0,25
Σ_{HPA} (µg L⁻¹)	0,36	1,27	0,85	0,00	0,33

<0,25 = menor que o limite de quantificação (0,25 µg L⁻¹); ND = não detectado;

7.2.2 Determinação de espécies metálicas em matriz fração solúvel em água de gasolina

Os resultados da concentração de metais dissolvidos na fração solúvel em água da gasolina utilizada nos experimentos de exposição crônica desenvolvido pelo doutorando Giorgi Dal Pont, em Vancouver – Canada, são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Concentrações de compostos metálicos da fração solúvel em água da gasolina (WSFG) utilizada durante os ensaios de exposição com *Carassius auratus*.

Metallic Compound	100% WSFG (mmol L ⁻¹ x10 ⁻⁴)
Ag	<0.92
Al	7.16
Ba	<0.72
Cd	<0.89
Co	<1.70
Cr	<1.92
Cu	<1.57
Fe	4.12
Mn	<1.82
Ni	<1.70
P	<3.23
Pb	<0.48
Sr	2.13
Zn	3.14

7.2.3 Desenvolvimento de método analítico voltado a extração de HPA em tecidos de peixes

Para a extração dos HPA em tecido de peixes está sendo avaliado o método de dispersão de matriz em fase sólida (MSPD). Este procedimento se baseia na mistura da amostra (tecido *in natura*) juntamente com um material sorvente sólido como octadecilsilano (C₁₈), sílica (SiO₂), alumina (Al₂O₃) e florisil (Mg₂SiO₃). A abrasão do tecido pelo material sólido promove o rompimento das células favorecendo o acesso aos analitos. Na sequência é utilizado um solvente de eluição com polaridade compatível aos compostos alvo, para posterior determinação cromatográfica (Barker, Long et al. 1989, Barker 2007). Essa estratégia se torna atrativa, pois empregando poucas etapas é possível a extração, concentração e *clean-up* dos extratos, com a possibilidade de miniaturização e melhor controle das variáveis envolvidas no processo.

Neste trabalho a MSPD foi avaliada inicialmente empregando tecidos de peixes e um material sorvente alternativo (Montmorilonita modificada com líquido iônico – MMT-LI). O principal objetivo foi verificar se a fase sólida utilizada como sorvente possui a capacidade de extração dos 16 HPAs, mantendo íntegra sua estrutura modificada pela inserção do líquido iônico, sem perdas de material e geração de compostos interferentes. Os resultados obtidos indicam que a MMT-LI é capaz de sorver os compostos em estudo e a extração assistida por vórtex é eficiente para a separação e identificação por GC-MS.

Nas próximas etapas serão avaliados alguns parâmetros relativos ao preparo das amostras empregando o método MSPD: massa de amostra e sorvente; tipo de sorvente; solventes de extração e procedimento de *clean-up*.

7.3 Ecotoxicologia

7.3.1 Efeitos fisiológicos e bioquímicos em *Astyanax altiparanae* expostos à fração solúvel em água da gasolina

Os resultados apresentados abaixo compõem os resultados da tese de doutorado do candidato Giorgi Dal Pont, desenvolvida junto ao programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFPR. A tese foi defendida em março de 2018 e o documento pode ser acessado no repositório de teses e dissertações da UFPR (<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/55165>).

Com base nos resultados dos testes de toxicidade (CL_{10} e CL_{50-96h}) realizados com diferentes produtos derivados de petróleo, descritos no relatório anterior, a gasolina foi o derivado que apresentou maior toxicidade para *A. altiparanae* (CL_{10-96h} = 0,5 % (0,15-0,91); CL_{50-96h} = 2,65 (1,63-4,48)). Essa maior toxicidade já foi descrita para outras espécies e é atribuída a composição e proporção dos hidrocarbonetos presente FSA da gasolina (Barron, Podrabsky et al. 1999, Rodrigues, Miranda-Filho et al. 2010). De fato, a FSA da gasolina apresentou concentrações de hidrocarbonetos, principalmente os monoaromáticos (BTEX), superiores aos demais produtos testados. Por esse motivo, a gasolina foi escolhida como produto-teste nos experimentos para a avaliação da influência da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo em associação a alterações de fatores abióticos (temperatura e pH).

Em geral, fenômenos decorrentes da exposição a um poluente apresentam maior frequência em nível celular do que em níveis de alta organização biológica. Dessa forma, respostas bioquímicas podem ser similares em grande parte dos organismos. Nesse sentido, bons biomarcadores devem ser indicadores sensíveis tanto da biodisponibilidade do poluente no ambiente quanto das respostas biológicas primárias do organismo (van der Oost, Beyer et al. 2003) podendo ser utilizados no diagnóstico do status de saúde do organismo e na obtenção de sinais primários de risco ambiental (Heath 1995). Em peixes, um biomarcador comumente considerado é enzima etoxiresorufina-O-desetilase (EROD). Esse marcador apresenta um aumento na sua atividade quando peixes são expostos a compostos agonistas, como hidrocarbonetos de petróleo (HPA e BTEX). Além de se caracterizar como um dos mais sensíveis marcadores de exposição, a atividade da EROD também pode preceder alterações em diversos níveis de complexidade biológica.

Resultados obtidos após a exposição de exemplares de *A. altiparanae* expostos à FSA_G por 96 h, seguido de recuperação (retirada da contaminação por FSA_G) por 96 h em condições abióticas normais (25 °C e pH 7,0), indicaram um aumento significativo na atividade da EROD hepática nos animais dos tratamentos contaminados (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Esses resultados, indicam que concentrações muito pequenas da FSAG, como a utilizada no presente trabalho (0,5 % v/v), já são suficientes para induzir alterações bioquímicas detectáveis. Apesar da sensibilidade do biomarcador em condições de temperatura e pH normais, a mesma condição de contaminação não promoveu alteração da atividade da EROD quando do aumento da temperatura (de 25 para 30 °C) e redução do pH (de 7,0 para 4,0) (Figura 6). Tais resultados demonstram que a resposta de um dos principais biomarcadores utilizados para a avaliação de contaminação ambiental por hidrocarbonetos de petróleo é diretamente influenciada por parâmetros abióticos que variam sazonalmente no ambiente aquático.

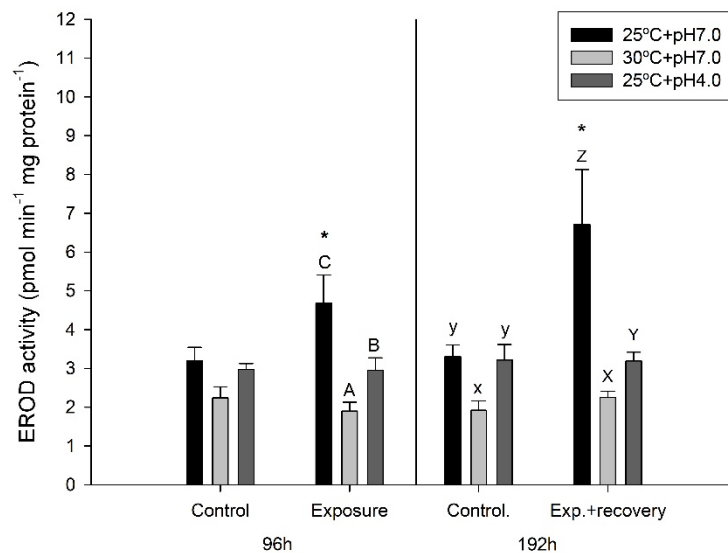


Figura 6. Valores médios $\pm$ S.E.M da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) no fígado de *Astyanax altiparanae* após 96 h de exposição a 0,5% (v/v) da fração solúvel em água da gasolina (WSFG) e após 96 h de recuperação em água doce limpa (192 h). Letras minúsculas indicam diferença nos grupos controle em 96 h (a, b e c) e 192 h (x, y e z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). As letras maiúsculas indicam diferença nos grupos de exposição de 96 h (A, B e C) e recuperação de 192 h (X, Y e Z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). * Indica diferença para o grupo de controle correspondente (teste t, $p < 0,05$). Quando diferenças significativas não foram detectadas ($p > 0,05$), letras e símbolos foram omitidos.

Outro biomarcador bioquímico que apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) durante as 96 h de exposição à FSA_G foi a atividade da glutadiona-S-transferase (GST) no tecido branquial (Figura 7). Durante o período de recuperação foi observada uma redução da atividade em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$). No tecido hepático, por outro lado, somente foi

detectada a redução da atividade nos animais do tratamento durante o período de recuperação ($p < 0,05$) (Figura 8). Assim como os nos resultados obtidos com o ensaio de EROD, a atividade da GST apresentou alteração nos padrões de resposta em consequência da alteração da temperatura e pH da água.

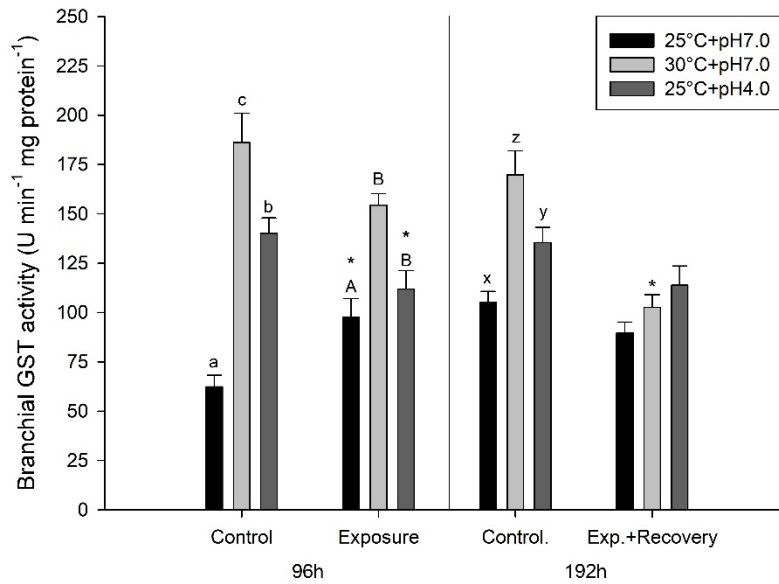


Figura 7. Valores médios $\pm$ SEM da atividade da glutathione-S-transferase (GST) em tecido branquial de *Astyanax altiparanae* após 96 h de exposição a 0,5% da fração solúvel em água da gasolina (WSFG) e após 96 h de recuperação em água doce limpa (192 h). Letras minúsculas indicam diferença nos grupos controle em 96 h (a, b e c) e 192 h (x, y e z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). As letras maiúsculas indicam diferença nos grupos de exposição de 96 h (A, B e C) e recuperação de 192 h (X, Y e Z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). * Indica diferença para o grupo de controle correspondente (teste t, $p < 0,05$). Quando diferenças significativas não foram detectadas ($p > 0,05$), letras e símbolos foram omitidos.

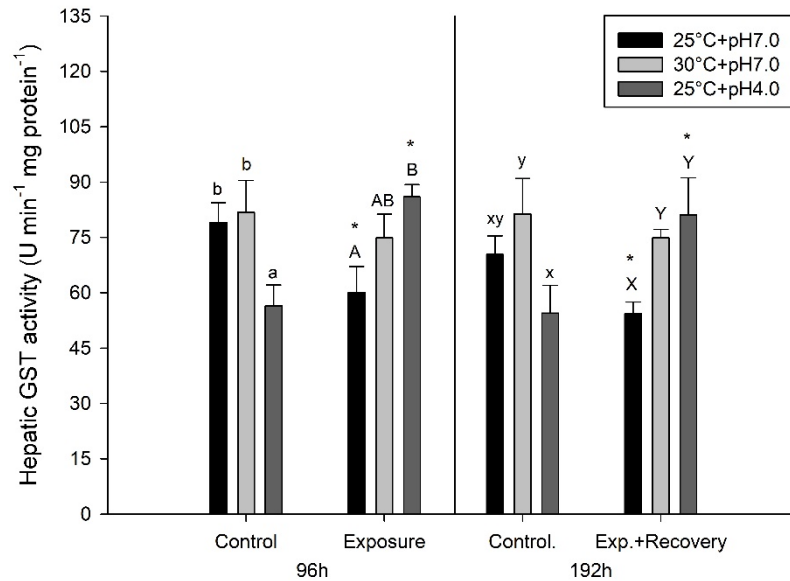


Figura 8. Valores médios $\pm$ SEM da atividade da glutationa-S-transferase (GST) em tecido hepático de *Astyanax altiparanae* após 96 h de exposição a 0,5% da fração solúvel em água da gasolina (WSFG) e após 96 h de recuperação em água doce limpa (192 h). Letras minúsculas indicam diferença nos grupos controle em 96 h (a, b e c) e 192 h (x, y e z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). As letras maiúsculas indicam diferença nos grupos de exposição de 96 h (A, B e C) e recuperação de 192 h (X, Y e Z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). * Indica diferença para o grupo de controle correspondente (teste t, $p < 0,05$). Quando diferenças significativas não foram detectadas ($p > 0,05$), letras e símbolos foram omitidos.

A atividade da catalase (CAT) não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos e respectivos controles no tecido branquial ($p > 0,05$) (Figura 9). No tecido hepático apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade dos animais do tratamento durante o período de recuperação (Figura 10).

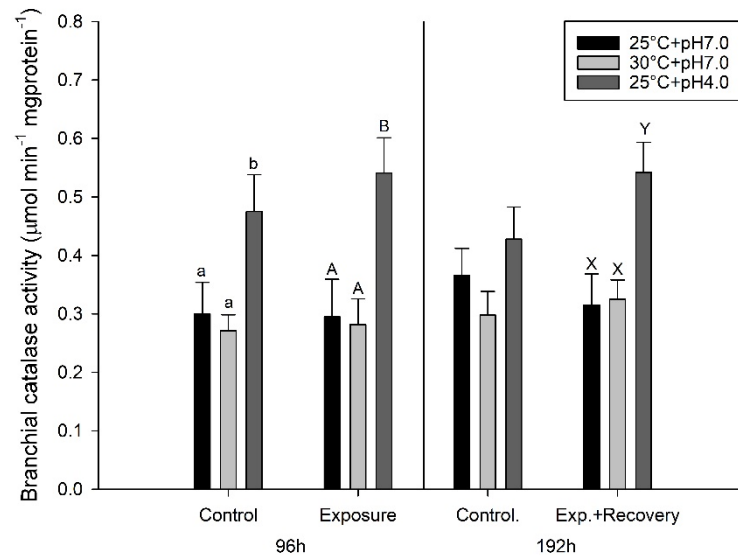


Figura 9. Valores médios $\pm$ SEM da atividade da catalase (CAT) em tecido branquial de *Astyanax altiparanae* após 96 h de exposição a 0,5% da fração solúvel em água da gasolina (WSFG) e após 96 h de recuperação em água doce limpa (192 h). Letras minúsculas indicam diferença nos grupos controle em 96 h (a, b e c) e 192 h (x, y e z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). As letras maiúsculas indicam diferença nos grupos de exposição de 96 h (A, B e C) e recuperação de 192 h (X, Y e Z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). * Indica diferença para o grupo de controle correspondente (teste t, $p < 0,05$). Quando diferenças significativas não foram detectadas ($p > 0,05$), letras e símbolos foram omitidos.

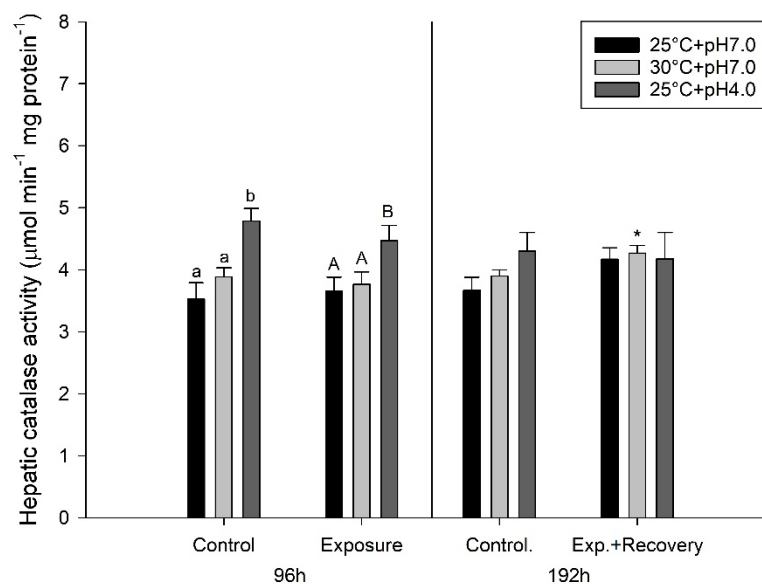


Figura 10. Valores médios $\pm$ SEM da atividade da catalase (CAT) em tecido hepático de *Astyanax altiparanae* após 96 h de exposição a 0,5% da fração solúvel em água da gasolina (WSFG) e após 96 h de recuperação em água doce limpa (192 h). Letras minúsculas indicam diferença nos grupos controle em 96 h (a, b e c) e 192 h (x, y e z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). As letras maiúsculas indicam diferença nos grupos de exposição de 96 h (A, B e C) e recuperação de 192 h (X, Y e Z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). * Indica diferença para o grupo de controle correspondente (teste t, $p < 0,05$). Quando diferenças significativas não foram detectadas ($p > 0,05$), letras e símbolos foram omitidos.

correspondente (teste t, $p < 0,05$). Quando diferenças significativas não foram detectadas ($p > 0,05$), letras e símbolos foram omitidos.

Tanto a atividade da GST quanto da CAT são indicadores de atividade antioxidante do organismo em cenários de estresse químico (van der Oost, Beyer et al. 2003). Nesse contexto o aumento significativo na atividade da GST no tecido branquial, seguido de uma redução também significativa durante o período de recuperação, pode ser resultado de um elevado estresse oxidativo nesse importante tecido de regulação fisiológica. Além disso, os resultados também sugerem uma maior atividade da GST no tecido branquial e maior atividade da CAT no tecido hepático. De fato, esse funcionamento alternado fica bastante claro quando comparamos a atividade da GST e CAT no tecido hepático. Quanto a atividade da GST é inibida a CAT é aumentada durante o mesmo período de recuperação.

A FSA da gasolina causou aumento na atividade da CAT hepática em *A. altiparanae* somente durante o período de recuperação no ensaio de 30 ° C, indicando uma ativação tardia dos mecanismos de estresse oxidativo e produção de ROS (Lushchak 2011). Essa falta de indução de atividade de CAT pelo hidrocarboneto de petróleo, nos tratamentos remanescentes, está de acordo com o estudo realizado por Bettim, Galvan et al. (2016), onde não foram observados aumentos na atividade de CAT para *A. altiparanae* expostos a WSFG. A enzima CAT é responsável pela redução do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (H_2O_2 a O_2 e H_2O). As moléculas de peróxido de hidrogênio derivam, especialmente, da dismutação de ânions superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio e água pela superóxido dismutase (SOD) (van der Oost, Beyer et al. 2003). Essa cascata de reações ocorre na tentativa de neutralizar o grupo oxidativo altamente reativo, como o radical hidroxila (OH), para evitar a oxidação de importantes moléculas biológicas como lipídios, DNA e proteínas. O aumento da concentração de proteínas carbonilas no tecido muscular de *A. altiparanae* (Figura 11) indica que o dano oxidativo foi induzido pela formação de radicais OH sob alta temperatura da água e baixo pH. No presente trabalho, uma vez que a carbonilação protéica foi severamente afetada pela temperatura e pH da água, assumimos que a defesa antioxidante em *A. altiparanae* foi ineficiente para lidar com essas alterações físico-químicas da água, uma vez que esses desafios adicionais prejudicam gravemente *A. altiparanae* quando exposto a FSA da gasolina.

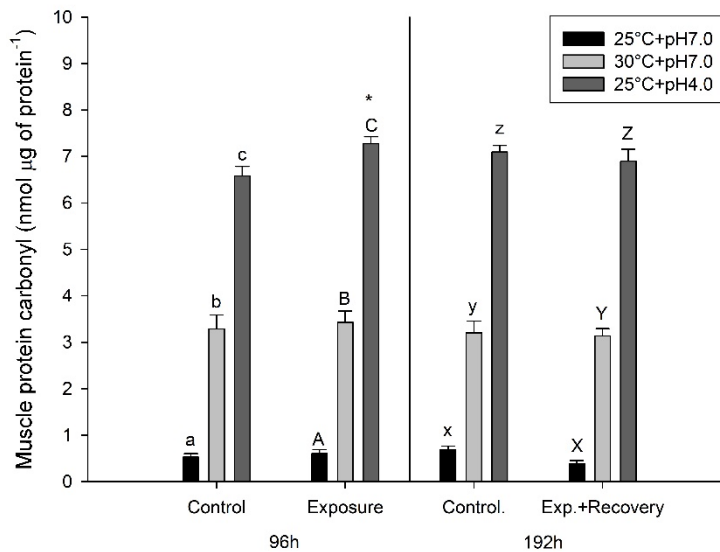


Figura 11. Valores médios $\pm$ SEM da concentração de proteína carboniladas em tecido muscular de *Astyanax altiparanae* após 96 h de exposição a 0,5% da fração solúvel em água da gasolina (WSFG) e após 96 h de recuperação em água doce limpa (192 h). Letras minúsculas indicam diferença nos grupos controle em 96 h (a, b e c) e 192 h (x, y e z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). As letras maiúsculas indicam diferença nos grupos de exposição de 96 h (A, B e C) e recuperação de 192 h (X, Y e Z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). * Indica diferença para o grupo de controle correspondente (teste t, $p < 0,05$). Quando diferenças significativas não foram detectadas ($p > 0,05$), letras e símbolos foram omitidos.

A atividade da acetilcolinesterase (Ache), bioindicador neural envolvido na desativação da acetilcolina nas terminações nervosas que evita o disparo contínuo dos nervos, foi inibida no tecido muscular dos peixes expostos à FSA_G por 96 h (Figura 13**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Essa redução na atividade da Ache pode ser responsável pela letargia apresentada pelos animais no presente experimento. Tal comportamento letárgico já havia sido descrito para *A. altiparanae* durante exposição à fração solúvel em água do óleo diesel (Dal Pont 2012). Do ponto de vista ecológico uma redução na atividade da Ache pode ser associada a redução da mobilidade espacial e redução da capacidade de percepção e fuga de predadores (van der Oost, Beyer et al. 2003).

Apesar dessa redução inicial na atividade da Ache no músculo durante exposição à FSA_G, após o período de recuperação foi observado um aumento significativo na atividade tanto no músculo quanto no tecido cerebral (Figura 12). Apesar desse padrão não ter sido identificado em outros trabalhos já publicados, uma avaliação inicial pode indicar um aumento compensatório da atividade, ou seja, com a retirada do contaminante, a produção da Ache é retomada de maneira aumentada.

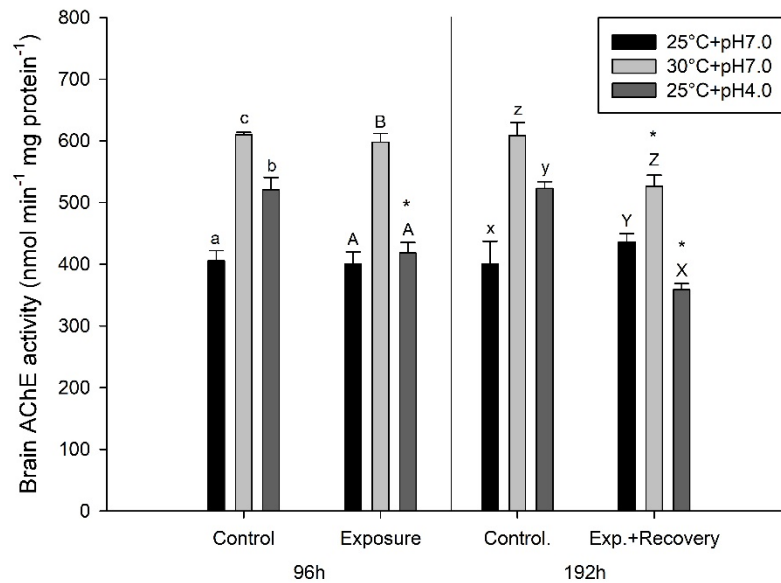


Figura 12. Valores médios $\pm$ SEM da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em tecido cerebral de *Astyanax altiparanae* após 96 h de exposição a 0,5% da fração solúvel em água da gasolina (WSFG) e após 96 h de recuperação em água doce limpa (192 h). Letras minúsculas indicam diferença nos grupos controle em 96 h (a, b e c) e 192 h (x, y e z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). As letras maiúsculas indicam diferença nos grupos de exposição de 96 h (A, B e C) e recuperação de 192 h (X, Y e Z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). * Indica diferença para o grupo de controle correspondente (teste t, $p < 0,05$). Quando diferenças significativas não foram detectadas ($p > 0,05$), letras e símbolos foram omitidos.

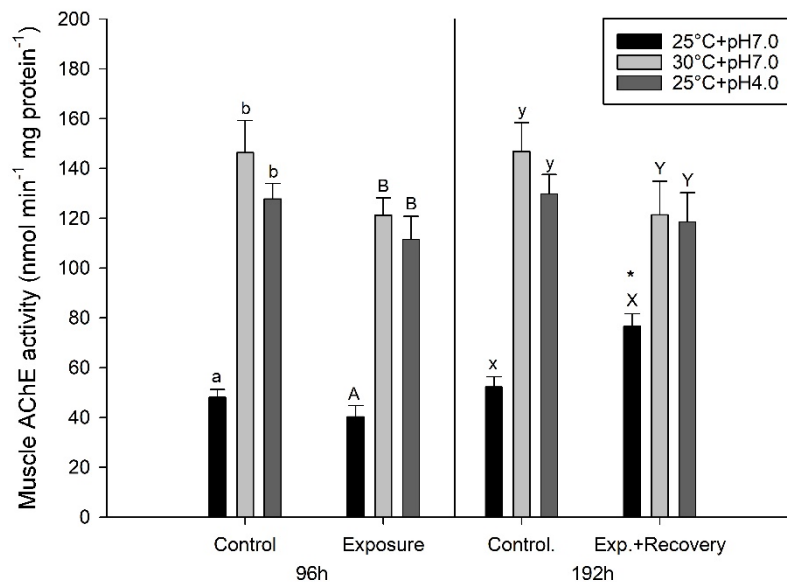


Figura 13. Valores médios $\pm$ SEM da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em tecido muscular de *Astyanax altiparanae* após 96 h de exposição a 0,5% da fração solúvel em água da gasolina (WSFG) e após 96 h de recuperação em água doce limpa (192 h). Letras minúsculas indicam diferença nos grupos controle em 96 h (a, b e c) e 192 h (x, y e z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). As letras maiúsculas indicam diferença nos grupos de exposição de 96 h (A, B e C) e recuperação de 192 h (X, Y e Z) entre os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). * Indica diferença para o grupo de controle correspondente (teste t, $p < 0,05$). Quando diferenças significativas não foram detectadas ($p > 0,05$), letras e símbolos foram omitidos.

os diferentes experimentos (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). * Indica diferença para o grupo de controle correspondente (teste t, $p < 0,05$). Quando diferenças significativas não foram detectadas ($p > 0,05$), letras e símbolos foram omitidos.

Os demais resultados bioquímicos e fisiológicos estão sendo analisados e discutidos e serão apresentados no relatório final de atividades.

7.3.2 Avaliação de embriões e larvas de *Astyanax altiparanae* expostos à fração solúvel de produtos derivados de petróleo

Na exposição aguda de embriões, o valor obtido da CL_{50} da gasolina foi 10 vezes menor do que o valor da CL_{50} do petróleo nas primeiras 24 horas de exposição (Figura 14), apresentando $13,13 \mu\text{g L}^{-1}$ e $133,30 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Após o período de 24 horas, houve uma redução na taxa de mortalidade para todos os compostos teste.

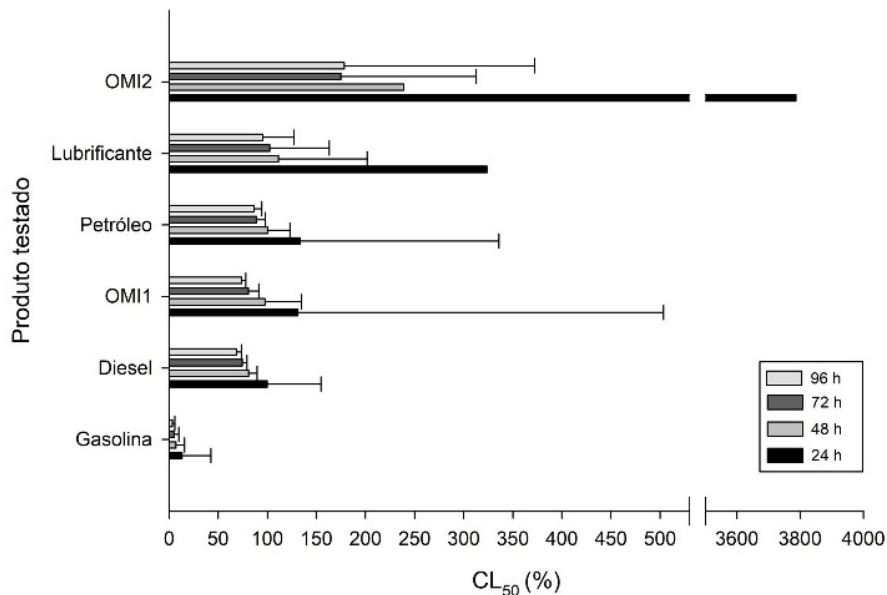


Figura 14 - Valores de CL_{50} para embriões de *Astyanax altiparanae* expostos à FSA do petróleo, diesel, óleo mineral I e II, óleo lubrificante e gasolina durante o período de 24, 48, 72 e 96 horas.

A CL_{50} 96 horas da gasolina foi de 3,35% da FSA para embriões. Para as larvas esse valor foi superior, correspondendo a 19,65% da FSA. Somente a exposição à FSA do petróleo e da gasolina ocasionaram mortalidade para as larvas da espécie (Figura 15). Os demais compostos não ocasionaram mortalidade a nenhuma larva durante o período de 96 h, mesmo em concentrações de 100% da FSA.

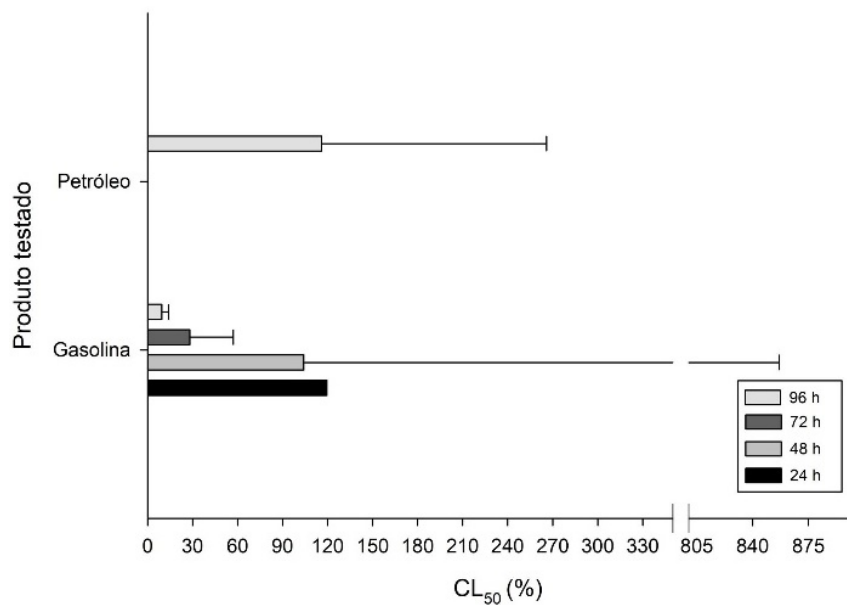


Figura 15 - Valores de CL₅₀ para larvas de *Astyanax altiparanae* expostos à FSA do petróleo e da gasolina durante o período de 24, 48, 72 e 96 horas.

A unidade térmica calculada durante a exposição 96 horas foi: 9,53 (óleo mineral II), 17,83 (óleo lubrificante), 19,67 (petróleo), 23,07 (diesel), 24,86 (óleo mineral I) e 507,46 (gasolina). Os demais parâmetros observados estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12. Expressão dos resultados (mg L⁻¹) de toxicidade dos compostos durante a exposição aguda (96 horas) de embriões e larvas de *Astyanax altiparanae*.

Composto	Estágio	CL ₁₀	CL ₅₀	CEzero	FT	NOEC	LOEC
Óleo Diesel	Embriões	44,57	73,68	21,93	28,54	36,17	20,95
	Larvas	≥100	≥100	≥100	≥100	≥100	≥100
Petróleo	Embriões	50,88	86,44	24,08	31,50	40,25	23,07
	Larvas	95,52	120,8	68,57	68,58	78,87	78,87
Gasolina	Embriões	0,04	3,35	0,00	0,01	0,00	0,00
	Larvas	0,80	19,65	0,08	0,19	0,58	0,00
Óleo Mineral I	Embriões	34,79	68,38	13,41	20,83	28,12	10,06
	Larvas	≥100	≥100	≥100	≥100	≥100	≥100
Óleo Mineral II	Embriões	31,61	178,3	2,75	13,54	23,17	13,53
	Larvas	≥100	≥100	≥100	≥100	≥100	≥100
Óleo Lubrificante	Embriões	34,33	95,33	8,24	17,54	26,14	2,71
	Larvas	≥100	≥100	≥100	≥100	≥100	≥100

Dado a diversidade dos hidrocarbonetos, é incerto dizer que quanto mais BTEX mais tóxico é o composto. Pelo contrário, neste trabalho, o óleo mineral I e o óleo lubrificante apresentaram concentrações muito próximas, porém, a toxicidade do óleo mineral I foi superior

inclusive ao óleo diesel e ao petróleo, que continham pelo menos 60% a mais hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos em suas respectivas frações. Seguramente podemos afirmar que outros componentes, como aditivos por exemplo, podem influenciar drasticamente na toxicidade do composto, como aqui foi observado pelo alto contraste entre a toxicidade da fração solúvel do óleo mineral I e do óleo mineral II.

A sensibilidade dos organismos à fração solúvel do petróleo e derivados foi claramente afetada pelo estágio de desenvolvimento ontogenético em que os organismos estão no momento de exposição. Observou-se uma maior toxicidade sobre embriões quando comparado com animais expostos somente após a sua eclosão. Obviamente que o limite de quantificação dos resultados obtidos nas concentrações letais CL_{10} e CL_{50} é de 100%, porém, os valores aqui apresentados foram estimados estatisticamente, e indicam claramente a baixa toxicidade do óleo mineral II tanto para os embriões como para as larvas de *A. altiparanae*.

O contato com a fração solúvel em água dos compostos, de uma forma geral, gerou muito mais efeitos negativos em embriões do que em larvas. Os sinais mais evidentes de malformações foram identificados nas deformações nas nadadeiras e no coração, como a ocorrência de edemas no pericárdio. Disfunções no pericárdio (Figura 16) foram observadas em 36,66% dos embriões expostos a FSA_G e em 30,00% dos embriões expostos a FSA_P , não sendo relatada a nenhum embrião exposto a FSA_{OM} .

A exposição ao petróleo ocasionou um maior número de deformações na nadadeira caudal dos embriões (Figura 17). Houve uma diferença estatística ($p < 0,05$) no tempo de absorção da reserva vitelínica entre os tratamentos. Observou-se que os embriões expostos a gasolina e ao petróleo absorveram suas reservas mais rápidas que os demais exemplares, além de apresentarem uma menor contagem de batimentos cardíacos.



Figura 16 – Larva de *Astyanax altiparanae* apresentando edema cardíaco (a) após a exposição à fração solúvel da gasolina.

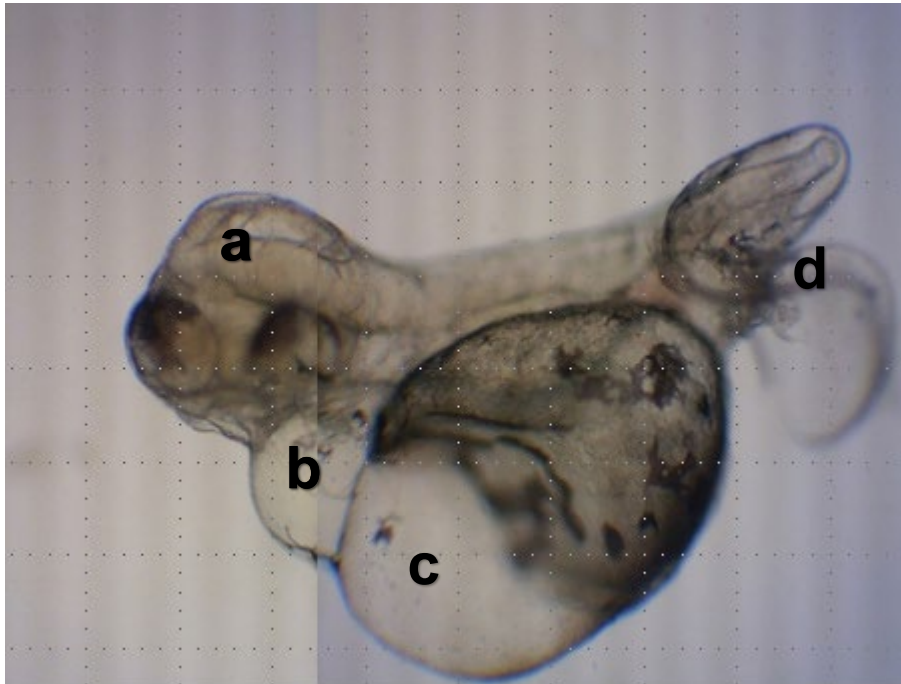


Figura 17 – Exemplar de *Astyanax altiparanae* apresentando má-formação da cabeça (a), edema cardíaco (b), edema de saco vitelínico (c) e má-formação da notocorda (d).

8 BENEFÍCIOS ACADÊMICOS PARCIAIS ALCANÇADOS AO LONGO DO PROJETO

Dentre os benefícios acadêmicos alcançados no período de abrangência deste relatório destacam-se:

- I. Publicação do artigo intitulado “Is there detectable long-term depletion of genetic variation in freshwater fish species affected by an oil spill?” na revista *Water, air & Soil Pollution*.
- II. Publicação do artigo intitulado “Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae)” na revista *Neotropical Ichthyology*.
- III. Finalização das atividades do doutorando Giorgi Dal Pont junto ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia e vinculado ao projeto. Título da tese: “*Effects of petroleum hydrocarbons to tropical and temperate fish species: a toxicity and multibiomarker approach for the assessment of environmental contamination*”.
- IV. Início das atividades do pós-doutorado Giorgi Dal Pont junto ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia e vinculado ao projeto;
- V. Início das atividades da mestranda Morgana S. Camargo junto ao Programa de Pós-Graduação em Química e vinculado ao projeto;
- VI. Finalização das atividades do pós-doutorado Rafael Garrett Dolatto junto ao Programa de Pós-Graduação em Química e vinculado ao projeto;
- VII. Finalização das atividades da pós-doutoranda Luciana Rodrigues de Souza Bastos junto ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e vinculado ao projeto;
- VIII. Publicação do resumo intitulado “Acute exposure to water-soluble fraction of gasoline (WSFG) impairs nitrogen-waste (N-waste) excretion and O₂ uptake in *goldfish Carassius auratus*” no 13th International Congress on the Biology of Fish realizado em Calgary – Canadá.
- IX. Publicação do resumo intitulado “The role of water temperature and pH on physiological parameters of the neotropical yellow-tail tetra (*Astyanax altiparanae*) acutely exposed to water-soluble fraction of gasoline (WSFG)” no 13th International Congress on the Biology of Fish realizado em Calgary – Canadá.
- X. Publicação do resumo intitulado “Does water temperature and pH modify the responses of biotransformation and oxidative stress biomarkers of yellow-tail tetra (*Astyanax*

altiparanae) exposed to gasoline water-soluble fraction (WSFG)?” no 13th International Congress on the Biology of Fish realizado em Calgary – Canadá.

- XI. Publicação do resumo intitulado “The effects of neotropical tetra *Astyanax altiparanae* exposure and recovery to water-soluble fraction of gasoline (WSFG) in aquatic acidosis condition” na 54^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia realizada em Foz do Iguaçu – Brasil.
- XII. Publicação do resumo intitulado “Energetic metabolism of neotropical tetra, *Astyanax altiparanae*, exposure to water-soluble fraction of gasoline (WSF), high temperature and low pH” na 12th SETAC Latin America Biennial Meeting realizada em Santos – Brasil.
- XIII. Publicação do resumo intitulado “Toxicity of water-soluble fraction (WSF) of petroleum and five derivative products to the neotropical tetra, *Astyanax altiparanae*” na 12th SETAC Latin America Biennial Meeting realizada em Santos – Brasil.
- XIV. Publicação do resumo intitulado “Efeito da temperatura durante a exposição de *Astyanax altiparanae* à fração solúvel em água da gasolina (FSAG) sobre a atividade de enzimas de estresse oxidativo” no 25^o Evento Anual de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná realizada em Curitiba – Brasil.
- XV. Publicação do resumo intitulado “Effect of temperature on larval and post-larval ontogenic development of *Astyanax altiparanae* in laboratory conditions” no International Conference & Exposition WAS (World Aquaculture 2017) realizado em Cape Town, África do Sul.
- XVI. Submissão e aprovação do resumo intitulado “The effects water temperature and pH on hematological parameters of *Astyanax altiparanae* acutely exposed to water-soluble fraction of gasoline” no XV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia que será realizado em Aracajú, Brasil.
- XVII. Submissão e aprovação do resumo intitulado “Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) aplicada à determinação de HPA em tecido de peixes” no 19^o Encontro Nacional de Química analítica (ENQA) que será realizado em Caldas Novas, Brasil.
- XVIII. Submissão e aprovação do resumo intitulado “Matrix solid phase dispersion (MSPD) using montorillonite modified with ionic liquid for the determination of PAHs in fish tissue” no XIII Latin American Symposium on Environmental & Analytical Chemistry (LASEAC) que será realizado em La Serena, Chile.

- XIX. Iniciação Científica (Marcelo Pereira de Souza Junior) sob orientação do Dr. Antonio Ostrensky e vinculado ao projeto;
- XX. Estágio Curricular (Felipe Kacham de Carvalho) sob orientação do Dr. Antonio Ostrensky, com o trabalho em andamento intitulado “Efeitos reprodutivos da exposição subletal à fração solúvel em água da gasolina em juvenis de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes)”;
- XXI. Estágio Curricular (Roger Felipe Gonçalves) sob orientação do Dr. Antonio Ostrensky, com o trabalho em andamento intitulado “Efeitos reprodutivos da exposição à fração solúvel do petróleo, do óleo mineral e da gasolina em *Astyanax altiparanae*”;
- XXII. Estágio Curricular (Gabriel Lemos Zoch Matthes) sob orientação do Dr. Antonio Ostrensky;
- XXIII. Trabalho técnico-científico apresentado pela aluna do curso de zootecnia/UFPR Gisha Toresin, na disciplina de piscicultura do 2º semestre de 2016, intitulado “Toxicologia de embriões e larvas de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000)”;
- XXIV. Trabalho técnico-científico apresentado pelas alunas do curso de Zootecnia/UFPR Fernanda Thaline da Silva Martins e Raphaela Toniolo Trauczynski, na disciplina de piscicultura do 1º semestre de 2018, intitulado “Efeitos da exposição à fração solúvel em água da gasolina, do petróleo e do óleo mineral em embriões e larvas de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes)”.

9 DIFICULDADES ENCONTRADAS

As principais dificuldades técnicas enfrentadas no período de abrangência deste relatório foram decorrentes de problemas relacionados à administração financeira e administrativa do projeto, e não dificuldades técnicas.

Por exemplo, a compra de um freezer -80 °C, por motivos variados, levou quase dois anos para ocorrer. Características do sistema de prestação de contas do SIGITEC ocasionaram dificuldades adicionais à FUNPAR e a prestação de contas relativa ao segundo desembolso (de um total de três) atrasou, levando ao atraso no repasse da última parcela. Além disso, cada reformulação financeira realizada levou vários meses para ser autorizada e concretizada...

O fato é que, com todas as dificuldades gerenciais enfrentadas, as atividades técnicas nunca puderam ser realizadas na velocidade e nas condições infraestruturais imaginadas originalmente. No entanto, como mostra o presente relatório, **TODAS** as ações previstas no projeto estão sendo efetivamente realizadas (e superadas) a contento e os resultados obtidos são a maior prova disso.

ANEXO I





Is There Detectable Long-term Depletion of Genetic Variation in Freshwater Fish Species Affected by an Oil Spill?

André O. Agostinis · Giorgi Dal Pont ·
 Aline Horodesky · Marcio R. Pie  ·
 Antonio Ostrensky

Received: 19 January 2017 / Accepted: 8 June 2017 / Published online: 26 June 2017
 © Springer International Publishing AG 2017

Abstract Oil spills might lead to severe environmental impacts to the affected fauna, disrupting local food webs, and causing mass mortality in many species. However, little is known about long-term impacts of oil spills, or even if such impacts can be detectable after several generations. In this study, we investigate the genetic variability of three freshwater species—*Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Characidae), *Scleromystax barbatus* (Siluriformes: Callichthyidae), and *Phalloceros harpagos* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)—in rivers that were affected by a large oil spill in the state of Paraná, southern Brazil, on February of 2001. Samples were obtained from nine different locations, such that rivers that were directly affected by the oil spill could be compared with similar rivers in the same region that were unaffected. A fragment of the cytochrome C oxidase subunit I mitochondrial gene was sequenced from each specimen, and the level of genetic variability was assessed. Based on estimates

of haplotype and nucleotide diversity, no impact of the oil spill could be detected in impacted rivers. These results suggest that fish populations in the region showed resilience to the pollutant, such that immigration from other locations was able to reestablish levels of genetic variability comparable to those of unimpacted rivers.

Keywords Genetic variability · *Mimagoniates microlepis* · *Scleromystax barbatus* · *Phalloceros harpagos* · Environmental impact

1 Introduction

Oil spills in natural habitats can lead to severe environmental impacts, depending on the structure of the habitat and the type and volume of oil being released (Etkin 2004; Peterson et al. 2003). During an oil spill in water bodies, fishes are also exposed, but to a lesser extent than other groups, such as marine mammals, birds, and sessile mollusks (Teal and Howarth 1984). Even so, many studies have explored acute impacts of such exposures, such as the effects on animal development (Carls et al. 1999; Incardona et al. 2004, 2012), direct DNA damage (Bolognesi et al. 2006; Vanzella et al. 2007), and sublethal histopathologies (Hose et al. 1996). However, little is known about long-term potential impacts of oil spills, particularly in freshwater environments and in terms of the genetic variability of impacted populations.

tamento de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR 80035-050, Brazil

Two major oil spills have occurred and impacted different and important aquatic environments in the state of Paraná, southern Brazil. On July of 2000, approximately four million liters (≈ 25 thousand barrels) of crude oil (density = 0.9427, 18° API, viscosity (20 °C) = 5000) were spilled from the OSPAR pipeline into the Iguaçu River (Boeger et al. 2003; Ostrensky et al. 2001). In the following year, nearly 52 thousand liters of light fuel oil (density = 0.8164, 41° API, viscosity (20 °C) = 3716 cP, total monoaromatic hydrocarbons (BTX) = 41.8 mg/g, and total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) = 16 mg/g) spilled from the OLAPA pipeline, which connects the Presidente Getúlio Vargas refinery (REPAR), in the municipality of Araucária, state of Paraná, to the corresponding terminal in the Paranaguá port. This accident occurred in a remote and difficult access area at Serra do Mar mountain range. Containment barriers were installed to reduce oil dispersion and to allow for its removal, but some of the oil reached local rivers and streams, eventually reaching the Paranaguá Bay (Gabardo et al. 2011). After the accident, a monitoring program was established with an initial focus on water and sediment chemistry and birdlife community. One year later, benthic community was also evaluated. Results suggested rapid reduction on total PAH concentrations (1416.0 to 1.6 $\mu\text{g/L}$) has minor effect on bird and benthic community (Faria et al. 2005). Ten years after, Albarello (2012), Ostrensky et al. (2015), and Horodesky et al. (2015) evaluated the environmental quality of the affected area through the analysis of long-term oil presence, fish population structure, and fish community, respectively. They found high concentrations of total petroleum hydrocarbons (TPH), including benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene, and indeno(123-cd)pyrene, in eight locations. On the other hand, no alterations in ichthyofaunal community and structure were detected. Thus, as TPH are still recorded at high concentrations at the studied area and no ichthyofaunal analysis was performed in order to identify chronic and long-term genetic alterations that could have occurred, we hypothesize that fish populations thriving in the affected area could potentially present long-term genetic alterations.

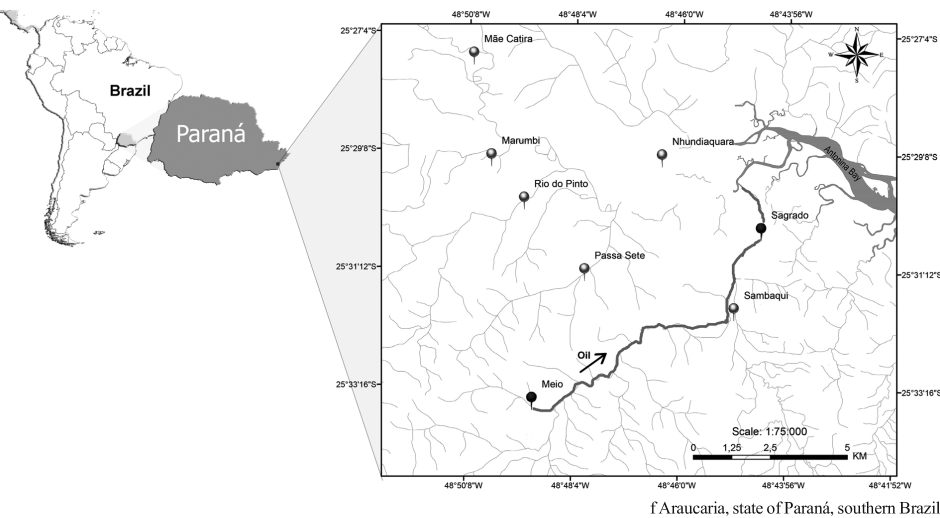
In this study, we assessed the level of genetic variability in three species of fish found in the original areas

impacted by the OLAPA pipeline oil spill in relation to similar, non-impacted locations (rivers in the same region) to determine if there was evidence for long-term genetic depletion.

2 Materials and Methods

Fish specimens were obtained in eight rivers of the Nhundiaquara River watershed (Fig. 1), during six consecutive sampling days, in the summer season (February) of 2015 (14 years after the spill of the OLAPA pipeline). Each river was categorized as either “impacted,” if it was directly affected by the oil spills (Meio and Sagrado Rivers), or “control,” rivers from the same watershed as the impacted rivers, with similar physiographic characteristics, but that had no record of impact (Sambaqui, Nhundiaquara, Passa Sete, Rio do Pinto, Mãe Catira, and Marumbi). Previous studies on the physico-chemical features of these locations were similar (Horodesky et al. 2015) so that they would be expected to represent comparable sampling sites. Based on the previous ichthyological surveys in the region (Horodesky et al. 2015; Ostrensky et al. 2015), three fish species were selected for this study: *Scleromystax barbatus* (Siluriformes: Callichthyidae), *Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Characidae), and *Phallocheros harpagos* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). These species were chosen due to their local abundance, their presence in all sampled rivers, as well as their occupation of different compartments in the water column (benthic in the case of *S. barbatus*, limnetic in the other two species). Specimens were collected using a combination of electrofishing, casting, and/or seine nets (see Ostrensky et al. (2015) for details on the collection protocols), and a piece of the caudal fin of each specimen was preserved in absolute ethanol and maintained at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until being processed for molecular work. Voucher specimens were deposited in the Ichthyological Collection of the Museu de História Natural do Capão da Imbuia, Curitiba, state of Paraná, Brazil.

Total DNA was extracted using DNeasy Blood & Tissue Spin-Column Kit (Qiagen®—Germany) from 25 mg of fin tissue, following manufacturer’s protocol. Concentration was estimated using NanoDrop 2000 (ThermoFisher®—USA). Amplifications were



performed in a final volume of 25 μ L, using up to 30 ng of DNA (extracts ranging from 8 to 130 ng/ μ L). The chosen marker was cytochrome C oxidase subunit I (COI), using LCO1490 and HCO2198 primers, which amplify a segment of 658 bp. The mixture contained 1 U of Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen®—USA), 2.5 μ L of the enzyme reaction buffer (10 $\times$), 3 mM of MgCl₂, 0.5 mM of total dNTP mixture, 1 pM of each primer, and 0.2 μ g/ μ L bovine serum albumin (BSA). Temperature cycling consisted of an initial step of 94 °C for 5 min, followed by 32 cycles of 40 s at 94 °C, 45 s at 44–46 °C, and 1 min at 72 °C, followed by a final elongation at 72 °C for 1 min. PCR products were purified using a precipitation-based protocol with polyethylene glycol (PEG 8000 20% NaCl 2.5 M). Sequencing reactions were performed in a final volume of 10 μ L, using 40 ng of amplified DNA. Each mixture contained 0.5 μ L of BigDye® Terminator, 1 μ L of sequencing buffer (5 $\times$), and 3.2 pM of the respective primer.

Nucleotide sequences were obtained using a 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®—USA), basecalled using Gap4, as implemented in the Staden Package (v2) (Staden et al. 1998), aligned using ClustalW2 (Larkin et al. 2007), as implemented in the BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999), and adjusted manually. Haplotype and nucleotide diversity were calculated using DnaSp5 (Librado and Rozas

2009). Haplotype networks were computed and drawn in R 3.3.1 (R Core Team 2016), using packages *pegas* (Paradis 2010), *plyr* (Wickham 2011), and *reshape* (Wickham 2007).

3 Results

Figure 2 depicts the inferred haplotype networks for each of the studied species. The circles in this type of diagram represent a particular DNA sequence, whereas the size of each circle corresponds to their relative frequency. The edges between circles represent difference among a given pair of sequences, such that one edge would indicate the existence of a single nucleotide difference and two edges would represent two nucleotide mismatches. The observed pattern of genetic variability shows that many different sites often share the same haplotypes, which is consistent with a scenario of high gene flow (i.e., exchange of migrants among populations leading to genetic homogenization among sites) and demographic connections among populations on each site, which is not unexpected given the small geographical distances among them. However, if the oil spill had produced a sufficiently severe population bottleneck, one would expect that all populations would tend to be genetically homogeneous, with little to no evidence of rare haplotypes, for instance. However, the

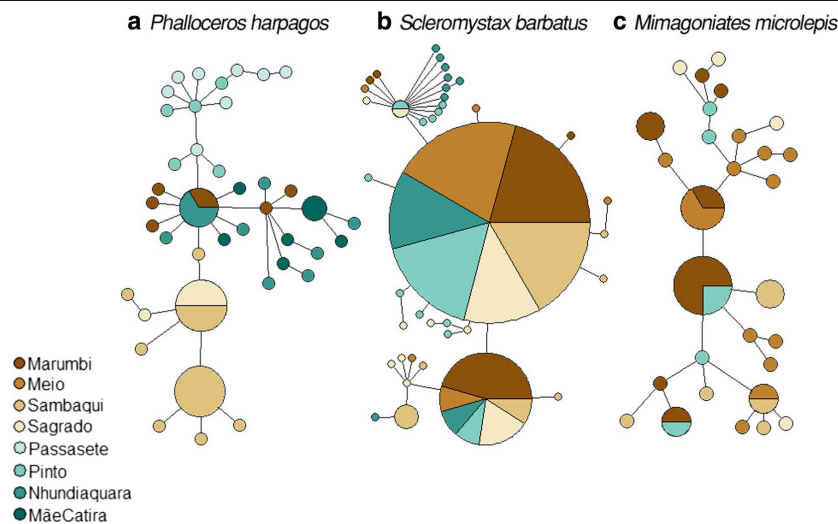


Fig. 2 Haplotype networks of the fragment of the COI gene for the three studied fish species. **a** *Phalloceros harpagos*. **b** *Scleromystax barbatus*. **c** *Mimagoniates microlepis*. Haplotype size scales with frequency. Distance between haplotypes does not represent actual computed distance values

substantial variability that was detected indicates that any potential population bottleneck was not sufficiently severe to cause detectable depletions in genetic variability in exposed populations, possibly due to emigration from neighboring regions. This inference is corroborated by direct estimates of haplotype and nucleotide diversity (Table 1), with the obtained estimates being similar among sites and without any consistent genetic depletion in the sites directly affected by the oil spill of January 2001.

4 Discussion

The results of the present study were not able to detect a lasting depletion of genetic variability in any of the three fish species examined in areas impacted by the light fuel oil spill at Serra do Mar, in the state of Paraná, in 2001. This is consistent with some other studies on the long-term impacts of oil spills. For instance, in a study on the impact of the Exxon Valdez oil spill, Barber et al. (1995) showed that 2 years after the accident, fish populations

Table 1 Haplotype and nucleotide diversity of the corresponding species and populations.

River	<i>Phalloceros harpagos</i>			<i>Mimagoniates microlepis</i>			<i>Scleromystax barbatus</i>		
	Hd	Nd	N	Hd	Nd	N	Hd	Nd	N
Marumbi	0.952	0.00701	7	0.867	0.04915	10	0	0	13
Meio	—	—	—	0.833	0.00704	13	0.378	0.00268	10
Sambaqui	0.864	0.0032	12	0.933	0.00851	12	0.455	0.00199	12
Sagrado	0.667	0.00112	3	1	0.13173	4	0.808	0.00568	13
Passa Sete	1	0.01607	8	—	—	—	—	—	—
Pinto	1	0.01225	5	1	0.00686	5	0.371	0.00089	15
Nhundiaquara	1	0.01088	9	—	—	—	0.455	0.00219	12
Mãe Catira	0.929	0.00397	8	—	—	—	—	—	—

Hd haplotype diversity, Nd nucleotide diversity, N number of sequenced specimens in that location

were largely recovered. While studying the same event, Lancot et al. (1999) found that recolonization via emigration of populations of the harlequin duck from non-affected areas could recover impacted populations, although this effect might only take place in the long term. It is important to note that our results do not necessarily mean that no acute impacts took place at the time of the accident. For instance, it is known that some polycyclic aromatic hydrocarbon components of oil are acutely toxic (Barron et al. 1999) and potentially mutagenic (Eisler 1987; Harvey 1991; Srogi 2007). However, according to Cronin and Bickham (1998), if lethal mutations are introduced, the rapidly ensuing mortality would lead to strong selection and consequently the elimination of such mutations on the affected populations, particularly over the first few generations. These authors explain that although crude oil may be mutagenic in laboratory experiments or chronically-polluted sites, oil spills probably would not exhibit the same effects for two reasons: concentrations of mutagenic fractions may be lower in an oil spill, and exposure to oil typically occurs over a limited period of time. However, the extent to which those factors are true is likely to depend on the specific oil type and circumstances of the spill, including the degree of weathering prior to exposure. Miller et al. (1994) and Collier et al. (1996) concluded that the absence of DNA adducts or other DNA damage in teleost fish following oil spills suggests that such short-term exposure to oil does not result in somatic mutagenesis. These results are also consistent with another study in the study region that did not detect faunal differences between impacted and non-impacted locations (Ostrensky et al. 2015). Bickham et al. (2000) also anticipates that reduction in genetic variability will be the prevalent effect, leading to compounding effects of continuous erosion of fitness, but only if there is long-term exposure.

Our results are in contrast with another study on major oil spill in the state of Paraná, but this time in the Iguaçu River (Katsumiti et al. 2013). In that study, two fish species (*Hyphessobrycon reticulatus* [Characidae] and *Phallocheros caudimaculatus* [Poeciliidae]) were collected 5 years after the oil spill and used in biochemical, histopathological, and genotoxic studies. Although some evidence of disturbance was detected in specimens from the impacted site, the frequency of such impacts was determined in comparison with control populations that were obtained from other locations, including fish farms. Therefore, it

is not possible to determine if those anomalies were caused by the oil spill in question, or if they were caused by background pollution or other sources of variation that were already (and potentially still are) found in the region.

There are several factors that might have contributed to the resilience of the fish populations investigated in this study. First, although the spills were severe, they represented a short-term disturbance that disproportionately affected the fishes that were living in the affected rivers at the moment of the accident. This probably allowed for recolonization of fish from populations in other watersheds, which resupplied genetic variability to the populations in the affected locations. Second, the spatial structure of watersheds, as well as the unidirectional, continuous flow of water in the non-estuarine portion of the affected region, possibly accelerated the removal of the low molecular weight petroleum hydrocarbons (BTEX and the majority of PAH) from the region, thus accelerating recovery, compared to analogous situations in lakes or estuaries.

Acknowledgments The authors thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq) for providing a productivity in research grant to Antonio Ostrensky. We also thank the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES) for providing PhD grant to Giorgi Dal Pont and Aline Horodesky.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest This study was funded by Petrobras (grant). However, the source of type of funding was categorized explicitly as a research project, and there was no influence or oversight from the funders on the analyses, results, and writing of this manuscript.

References

- Albarelo, L.C. (2012). O vazamento do oleoduto OLAPA (Morretes, Paraná): Avaliação ambiental e reconstrução do óleo, da Serra do Mar ao complexo estuarino de Paranaguá. Pós-Graduação em Geociência, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 188 pp. Available at: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/56326/000860241.pdf?sequence=1>.
- Barber, W. E., McDonald, L. L., Erickson, W. P., & Vallarino, M. (1995). Effect of the Exxon Valdez oil spill on intertidal fish:

- a field study. *Transactions of the American Fisheries Society*, 124, 461–476.
- Barron, M. G., Podrabsky, T., Ogle, S., & Ricker, R. W. (1999). Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? *Aquatic Toxicology*, 46, 253–268.
- Bickham, J. W., Sandhu, S., Hebert, P. D. N., Chikhi, L., & Athwal R. (2000). Effects of chemicals contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research/ Reviews in Mutation Research*, 463(1): 33–51.
- Boeger, W.A., Guimarães, A.T.B., Romão, S., Ostrensky, A., Zamberlan, E., & Falkiewicz, F.H. 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, Amer Petroleum Inst, Washington, USA.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggeri, P., & Sciotto, A. (2006). Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of oil spill: haven case study. *Marine Environmental Research*, 62(Supplement 1), S287–S291.
- Carls, M. G., Rice, S. D., & Hose, J. E. (1999). Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 481–493.
- Collier, T.K., Krone, C.A., Krahn, M.M., Stein, J.E., Chan, S.L. & Varanasi, U. 1996. Petroleum exposure and associated biochemical effects in subtidal fish after the Exxon Valdez oil spill American Fisheries Society Symposium, pp. 671–683. Available on.
- Cronin, M. A., & Bickham, J. W. (1998). A population genetic analysis of the potential for a crude oil spill to induce heritable mutations and impact natural populations. *Ecotoxicology*, 7, 259–278.
- Eisler, R. (1987). Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *US fish and wildlife service biological report*, 85, 81.
- Etkin, D.S. 2004 Modeling oil spill response and damage costs Proceedings of the Fifth Biennial Freshwater Spills Symposium, p. 16. Available at: https://archive.epa.gov/emergencies/content/fss/web/pdf/etkin2_04.pdf.
- Faria, B.M.D., Timmerman, M.C., Platte, E.B. & Rosário, M.D. (2005). Environmental effects in a subtropical brazilian river after an oil spill International Oil Spill Conference Proceedings, pp. 701–702. Available at: <http://www.ioscproceedings.org/doi/abs/10.7901/2169-3358-2005-1-701>.
- Gabardo, I.T., Meniconi, M.F., Faria, B.M., Silva, T.A., Cavalcanti, T.R., Silva, G.C., Gallotta, F.D., N., A.S., Paes, J.E., Bentz, C.M., Lima, S.O.F., Rosário, M.D., Soriano, A.U., Baessa, M.P.M., Mendes, L.G., Dirceu C, Silveira, J., Bilhalva, M.M., Politano, A.T., Freitas, L.R.D., Parkinson, R., Lima, J.A.M., Guimarães, P.P., Medeiros, J. & Santos, A.F. 2011. Lessons learned on oil spill environment impact assessment: 10 years of petrobras experience review. International Oil Spill Conference Proceedings, p. abs426. Available at: <http://www.ioscproceedings.org/doi/abs/10.7901/2169-3358-2011-1-426>.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Harvey, R. G. (1991). *Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry and carcinogenicity* (p. 396). Cambridge: Cambridge University Press.
- Horodesky, A., Abilhoa, V., Zeni, T. D. O., Montanhini Neto, R., Castilho-Westphal, G. G., & Ostrensky, A. (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.
- Hose, J. E., McGurk, M. D., Marty, G. D., Hinton, D. E., Brown, E. D., & Baker, T. T. (1996). Sublethal effects of the (Exxon Valdez) oil spill on herring embryos and larvae: morphological, cytogenetic, and histopathological assessments, 1989–1991. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53, 2355–2365.
- Incardona, J. P., Collier, T. K., & Scholz, N. L. (2004). Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196, 191–205.
- Incardona, J. P., Vines, C. A., Linbo, T. L., Myers, M. S., Sloan, C. A., Anulacion, B. F., Boyd, D., Collier, T. K., Morgan, S., Cherr, G. N., & Scholz, N. L. (2012). Potent phototoxicity of marine bunker oil to translucent herring embryos after prolonged weathering. *PLoS One*, 7, 30116.
- Katsumiti, A., França, P. P., Costa, G. P. S., Zandoná, E. M., Benincá, C., Assis, H. C. S. D., Cestari, M. M., Maschchio, J., Randi, M. A. F., Silva, C. A., Rochecheche, H., & Ribebeiro, C. A. O. (2013). Evaluation five years after a refinery oil spill in freshwater wetland—Paraná State, Southern of Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8, 77–87.
- Lancot, R., Goatcher, B., Kim, S., Talbot, S., Pierson, B., Daniel, E., & Zwiefelhofer, D. (1999). Harlequin duck recovery from the Exxon Valdez oil spill: a population genetics perspective. *The Auk*, 116, 781–791.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947–2948.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Miller, G. D., Seeb, J. E., Bue, B. G., & Sharr, S. (1994). Saltwater exposure at fertilization induces ploidy alterations. Including mosaicism, in salmonid. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 42–49.
- Ostrensky, A., Chaves, P.T.C., Duboc, L.F., Guimarães, A.T.B., Cruz, S.R.Z., Wegbecher, F.X., Pilchowski, R.W., Teixeira, U.A. & Belz, C.E. (2001). Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigui e Iguaçu, 2º Seminário do Rio Iguaçu, Araucária, Paraná, Brasil, pp. 32–52.
- Ostrensky, A., Neto, R. M., Castilho-Westphal, G. G., Zeni, T. O., Abilhoa, V., & Horodesky, A. (2015). Population structure of fish from the Serra do Mar, Paraná, Brazil: a comparative analysis of environments affected and by oil spills and unaffected areas. *Journal of Ecology and The Natural Environment*, 1, 54–62.
- Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26, 419–420.

- Peterson, C. H., Rice, S. D., Short, J. W., Esler, D., Bodkin, J. L., Ballachey, B. E., & Irons, D. B. (2003). Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science*, 302, 2082–2086.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Accessed 19 January 2017.
- Srogi, K. (2007). Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 5, 169–195.
- Staden, R., Beal, K. F. & Bonfield, J. K. (1998). The staden package. Computer methods in molecular biology, bioinformatics methods and protocols. In S. Misener & S. A. Krawetz (Eds), *The Humana Press Inc., Totowa, NJ 07512*, 132, 15–130.
- Teal, J. M., & Howarth, R. W. (1984). Oil spill studies: a review of ecological effects. *Environmental Management*, 8, 27–43.
- Vanzella, T. P., Martinez, C. B. R., & Cólus, I. M. S. (2007). Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 631, 36–43.
- Wickham, H. (2007). Reshaping data with the reshape package. *Journal of Statistical Software*, 21, 20.
- Wickham, H. (2011). The split-apply-combine strategy for data analysis. *Journal of Statistical Software*, 40, 29.

ANEXO II

Original article

Ontogenetic development of tetra *Asyanax lacustris* (Characiformes: Characidae)

Diego J. Stevanato¹ and Antonio Ostrensky²

Ontogenetic development of the tetra *Asyanax lacustris* was studied under laboratory conditions. Larvae obtained by induced reproduction were maintained individually in tissue-culture plates, at 25°C. Daily observations and morphometric measurements were performed. Larvae hatched with a total length (TL) of 3.02 ± 0.34 mm (average $\pm$ standard deviation) without pigmentation and 0.06 ± 0.02 mm³ of yolk reserves. The yolk-sac larval period lasted 26 h post-hatching (hph). During this period, eye pigmentation started, the digestive tract emerged, the anus opened, and the animals began to show steady movements. Inflation of the swimming bladder initiates the preflexion stage, which extended until 230 hph. During this stage, the transition from endogenous to exogenous feeding was observed, with the yolk reserve being completely absorbed after 74 hph (TL: 4.17 ± 0.36 mm). Up to 86 hph it was possible to observe the first food ingested within the digestive tract. This period was followed by the flexion stage, with the folding of the notochord tip and development of the caudal fin (11–13 days post-hatching). Finally, during the last larval developmental stage (postflexion), the segmentation of the fin rays was completed, and the emergence of scales was observed (TL: 5.97 ± 0.65 mm). The larval ontogenetic development of *A. lacustris* was completed after 22 post-hatching days (dph).

Keywords: *Asyanax lacustris*, Larval morphometry, Notochord, Ontogeny, Swim bladder.

O desenvolvimento ontogenético do lambari *Asyanax lacustris* foi estudado em condições ambientais controladas. Larvas obtidas através de reprodução induzida, foram mantidas individualmente em placas de cultivo celular, a 25°C. Diariamente foram realizadas observações e medições morfológicas. As larvas eclodiram com $3,02 \pm 0,34$ mm (média $\pm$ desvio padrão) de comprimento total (CT); sem pigmentação e com $0,06 \pm 0,02$ mm³ de reserva vitelínica. O período larval vitelínico estendeu-se durante as primeiras 26 horas pós-eclosão (hpe) e durante este período teve início o processo de pigmentação dos olhos, o surgimento do tubo digestório, abertura anal e os animais passaram a apresentar movimentação constante. Com o início da bexiga natatória tem início o estágio de pré-flexão, que se estende por até 230 hpe. Durante este estágio, foi observada a transição entre a alimentação endógena e a exógena, sendo a reserva vitelínica totalmente absorvida após 74 hpe (com os animais atingindo $4,17 \pm 0,36$ mm de CT) e em até 86 hpe foi possível observar a primeira alimentação no trato digestório. Após esse período, teve início o estágio de flexão da parte final da notocorda e da estruturação da nadadeira caudal (11 e 13 dias após a eclosão). Por fim, no último estágio de desenvolvimento larval (pós-flexão), foi observada a segmentação completa dos raios das nadadeiras e o início do aparecimento das escamas (CT: $5,97 \pm 0,65$ mm). O desenvolvimento ontogenético larval de *A. lacustris* foi concluído após 22 dias pós-eclosão (dpe).

Palavras-chave: *Asyanax lacustris*, Bexiga natatória, Morfometria larval, Notocorda, Ontogenia.

Introduction

Ordinarily, embryos and larvae are the most susceptible life stages to changes in environmental conditions, and these stages can get affected even by events of low intensity and short duration (Ramos *et al.*, 2015). Thus, studies of post-hatching fish development are often used to assess the effects of a variety of xenobiotics, such as heavy metals

(Sfakianakis *et al.*, 2015), silver (Barrera, 2013), and oil derivatives (Lema *et al.*, 2007; Ingvarsdóttir *et al.*, 2012), on the quality of aquatic environment (McKim, 1977; Meier *et al.*, 2010).

During the early stages of ontogenetic development, several metamorphic processes lead to the differentiation of specific structures, including the definition of food and reproductive characters of each species. These processes,

¹Sector de Ciências Agrícolas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua dos Funcionários, 1540, 80210-170 Curitiba, PR, Brazil. diegozooteumesp@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5313-9167> (corresponding author)

²Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), Rua dos Funcionários, 1540, 80210-170 Curitiba, PR, Brazil. ostrensky@ufpr.br

combined with possible physiological limitations of the larvae, can cause high mortality rates within the first hours of life (Nakatani *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2014).

The exclusive use of morphometric indicators, such as length and weight, does not necessarily reflect the relations that have occurred during larval development (Maciel *et al.*, 2010). According to Gisbert (1999) and Kupren *et al.* (2014) the different morphometric changes associated with the allometric or isometric development of each region of the body, as well as larval movement and feeding, are parameters that allow better analysis of the initial ontogeny of fish, providing further accurate information on the normal development of the species.

Asyanax lacustris (Lütken, 1875), achieves 10 to 15 cm length and 60 grams in weight, and it is found in small streams to large rivers in watersheds of the neotropical environments in South America (Porto-Foresti *et al.*, 2005). The species has been increasingly used as a bioindicator in environmental studies (Ostrensky *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 2009; Dal Pont, 2012; Siqueira-Silva *et al.*, 2015), due to its great trophic plasticity and diverse environmental compartments occupation (Peretti, Andrian, 2008). It has also been used as a model species in laboratory tests (Almeida, 2007; Vicente, 2014; Ostrensky *et al.*, 2015) among other reasons, for presenting short life cycle, small size and ease of reproduction and handling under controlled conditions (Garutti, 2003).

This study sought to describe the morphological processes of the tetra *Asyanax lacustris* by evaluating and individually identifying larvae transformations and reporting specific events occurring from hatching to the end of the postflexion period. This study may contribute to the use of this species as a model organism in several laboratory studies and assays.

Material and Methods

Broodstock management and hormonal induction. The specimens of *A. lacustris* used for the induced reproduction process were selected based on their secondary sexual characters. We selected only the males that presented spicules on their anal fin based on the texture of the spicules, and selected females that presented red urogenital pore and bulging belly.

Mature individuals, deprived of food for 24 h, were removed from the breeding tank using a hand net and anaesthetized, to accordance with the method proposed by Vicente (2014), by using 35 µL L⁻¹ clove essential oil solution (10%). After morphometric evaluation, three females and nine males, with 24.1 ± 1.4 g and 5.2 ± 2.0 g (mean weight ± standard deviation), and 9.9 ± 1.0 cm and 8.4 ± 0.3 cm (total length ± standard deviation) respectively, were selected.

Selected broodfishes were housed in a finl maturation system, consisting of a 100-L polyethylene tank connected to mechanical and biological filters through a submerged pump (SB-2000, Sarlobetter, Brazil), with constant aeration and temperature of 25°C.

For hormonal induction, we used crude carp pituitary extract (CCPE), which was administered in a single dose of 5.0 mg/kg for females and 1.0 mg/kg for males. The accumulated thermal unit (ATU) was calculated from the time of hormone administration and ranged between 190 and 200 hours-degree (HD).

Spawns. After hormonal induction, all broodfishes were placed in a tank-grid of 25 × 15 × 15 cm (length, width, height), made from a woven-nylon net of 3 mm and a mesh of 1.5 × 1.5 cm, which was maintained in a 100-L polyethylene tank, at a controlled temperature of 25°C using a 300 watts heater (BOYU, Taiwan). The tank was also connected to an external 60 L physical and biological filtration system. The animals were kept in the tank-grid until ovulation and subsequent fertilization of oocytes.

Immediately after spawning, the eggs were removed by siphoning, retained on a 0.5-mm-mesh sieve and washed with tap water. Then, they were collected with a Pasteur pipette, and observed using an optical microscope Leica® DML8 fitted with a digital camera Dino-Eye (AM-423X, Taiwan). Eggs were then transferred into eight tissue-culture plates, each with six wells and a lid (Kasvi K12-006, China). Each well had a total volume of 17 ml and contained one fertilized egg. The plates were kept in vertical incubators B.O.D. (ADAMO, Brazil), and maintained with 12 h light/12 h dark photoperiods at 25°C.

Morphology and morphometric measurements were obtained using a stereomicroscope Leica® MZ6, with a magnification of 0.63× and 0.8×, fitted with a Dino-Eye camera (AM-423X, Taiwan). Larval development and the number of heartbeats were recorded daily using the optical microscope Leica® DML8. Differentiation of the various stages of larval development was performed as described by Nakatani *et al.* (2001) (Tab. 1.), with some modifications. The evolutionary timeline was described in hours-degree (HD), accumulated thermal unit (ATU), hours post-induction (hpi), minutes post-hatching (mph), hours post-hatching (hph), and days post-hatching (dph).

Tab. 1. Description of *Asyanax lacustris* developmental stages, from hatching until the end of the initial period of development.

Stage	Description
Yolk-sac larval	From hatching until the beginning of the development of the digestive tract, which is characterised by the opening of the oral and anal cavities and the appearance of the swim bladder;
Preflexion	From the appearance of the swim bladder until the beginning of the distal folding of the notochord. Also featured by the beginning of the segmentation of the pectoral and anal finrays;
Flexion	Development of the dorsal and caudal fin rays, and total folding of the distal tip of the notochord;
Postflexion	Characterised by the total segmentation of the anal, dorsal, and caudal fin rays, and the beginning of the development of scales.

Larval morphology and morphometry. To perform the morphological analysis and morphometric measurements the tissue-culture plates were individually removed from the B.O.D. incubator. The water from each well was then reduced to 3/4 of its original volume using a Pasteur pipette, and then the animals were individually observed in the wells using the stereomicroscope.

General observations were performed at regular intervals of 60 min from hatching to full absorption of the yolk reserves; every 12 h from total absorption of the yolk reserves until complete folding of the notochord; and every 24 h from this point until the end of the postflexion stage.

When 50% of the animals had completely absorbed their yolk reserves, all animals of the experiment were fed with 0.1 g the microencapsulated ration (American B.P., USA), containing 46% protein, weighed on a precision scale (Shimadzu-AUY220, Japan), and then dissolved in 40 ml of water. By using a Pasteur pipette, one drop of this suspension was given to each larva every day at 18:00h.

The animals were examined under an optical microscope (4X), and had their morphological variables recorded based on the development of internal and external structures. We established the developmental stage by taking into consideration the time at which all other remaining animals completed the development of this structure.

Morphometric analyses involved the measurement of the following parameters: i) Total length (TL), measured as notochord length in preflexion and flexion larvae, and as standard length in postflexion larvae; ii) body height (BH); iii) head length (HL); iv) head height (HH); v) eye diameter (ED); vi) yolk-sac length (YL); vii) yolk-sac height (YH); and viii) yolk reserve volume (V), calculated according to the equation:

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

At the end of each observation, the original volume (*i.e.* 17 ml) of water in each well was refilled, and the plates were again covered with the lid, re-housed in the incubator, and maintained until the following period of observation. To ensure temperature control, the room where the tests were conducted was also maintained at 25°C.

Water quality. The water used for daily renewal of the culture wells was collected from a polyethylene water tank (1000 L) linked to a biological and mechanic air-lift-type filter, being then filtered in a bag (45 µm), chlorinated, and neutralized with sodium thiosulfate. Before use, the water was kept in an incubator in order to reach 25°C.

Due to the low volumes, the siphoned water from the wells was concentrated in a beaker and analyzed as a single sample. The water collected from the wells and the water used for refills were both daily analyzed for the following physicochemical parameters: pH, using a digital pH meter (AZ-86505, Taiwan); dissolved oxygen (DO) and oxygen saturation percentage (%SO₂), using a digital oximeter (YSI Pro20, USA); alkalinity

and carbon dioxide (CO₂) concentration, measured by titration with 0.02N sodium hydroxide solution (APHA 2005); and nitrogen concentration in the form of total ammonia [N-AT = NH₃ + NH₄⁺], obtained using the indophenol method (APHA 2005) and the nitrite method (APHA 1995). Colorimetric analyses were performed on a bench spectrophotometer (Spectronic 20, Genesys, USA).

Statistical analysis. A database was created and organized using the Excel® and Access®, Microsoft Office Professional Plus 2013. Water quality data was analyzed using the Shapiro–Wilk normality test, followed by the Mann–Whitney *U* test. Biometric data were compared using descriptive statistics. Survival was analysed by the Kaplan–Meier method. All analyses were performed using the Statsoft Statistica^{MR} version 12.0®.

Results

Yolk-sac stage (0 - 26 hph). After hatching, the head of the larvae of *A. lacustris* is attached to the anterior region of the yolk-sac, resembling a distended posture, and the larvae have no fins. Some larvae hatch without pigmentation, whereas others present pigmentation at the edge of the yolk-sac. At this developmental stage, all larvae have an embryonic membrane and a rudimentary digestive tract with no anal opening. During the first hours after hatching, pigmentation of the eyes is initiated together with great development of the embryonic fin membrane.

The head is observed in three different positions during the first hours of larval developmental. Initially, it is attached to the yolk-sac, separated by the perivitelline space. About 10-12 hph, the head assumes a semi-terminal position and followed by a terminal position 20 h later. During this stage, the mouth also undergoes significant transformation, moving from a ventral to a terminal position (Fig. 1).

The yolk-sac stage was the one with the shortest duration (between 18 and 26 hph). This stage ends when the swim bladder, located above the digestive tract and below the notochordal segment, becomes functional.

The size of the post-hatching larvae ranged from 2.28 to 3.31 mm. Two hph, we observed the beginning of pigmentation of the yolk-sac frontal region and the eyes. Between 5 and 7 hph, the TL was 2.99 ± 0.31 mm (mean ± standard deviation), and it was possible to identify the digestive tract, with a straight morphology, and the anal opening.

Preflexion (27 - 230 hph). After inflating with air, the swim bladder, along with the other swim structures (caudal and pectoral fins), supported a steady larval movement. At this stage, we observed an increased pigmentation particularly in the eyes, which were completely dark at 32 hph.

The development of the four gill arches rapidly occurred a few hours later (37 hph). The movement of the operculum, the constant movements of the pectoral fins, and the blood flow were now synchronized with the heartbeats (Fig. 2).

e170073[3]

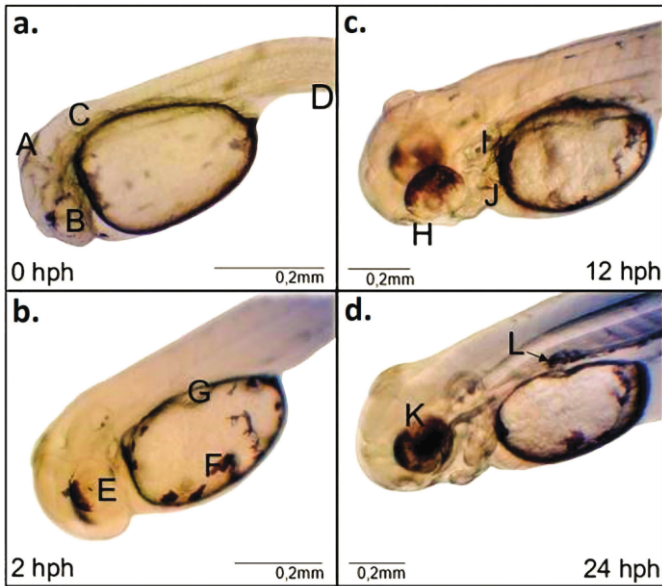


Fig. 1. Development of *Asyanax lacustris* during the yolk-sac larval stage: **a.** newly hatched larva, with adhesive gland (A), eyes with little pigmentation (B), the optic vesicle (C), and no anal opening (D); **b.** increased pigmentation of the eye (E), increased pigmentation of the yolk reserves (F), and button of the pectoral fin (G); **c.** mouth in ventral position (H), further development of the optic vesicle (I), and pigmentation of the heart (J); **d.** pigmented eyes (K) and swim bladder (L).

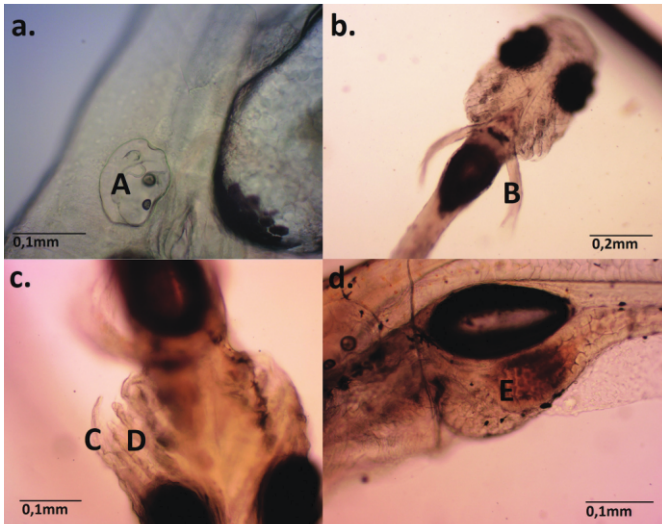


Fig. 2. Development of *Asyanax lacustris* during the preflexion stage: **a.** optical vesicle (A); **b.** fin pectoral (B); **c.** operculum (C), gill arches (D); **d.** food in the digestive tract (D).

e170073[4]

This was the most critical time for the survival of the animals because abrupt morpho-physiological changes occurred in some larvae (Tab. 2), especially in those whose yolk reserves had been exhausted (74 hph) and still had no food in the digestive tract (86 hph).

During this stage, there was an increase in body pigmentation. The animals began to show a greater amount of dendritic chromatophores, which were mostly distributed above the notochord, and punctate chromatophores, mainly distributed in the upper region of the head. The key event for the transition to the following developmental stage was the beginning of the folding of the notochord distal part. More precisely, the folding of the tip of the caudal fin

Flexion (231 - 314 hph). During the flexion stage, complete pigmentation of the eye (retina) was observed. At the beginning of the flexion stage, on average 30 myomeres were noted (Fig. 3a). Bodies were more pigmented (dark brown) when compared with the previous stage. During this period, the rays of the anal fin became structured, concurrent with the folding of the distal tip of the notochord, forming a 45° angle (Fig. 3b).

When folding of the notochord was completed, 7-11 (minimum–maximum) rays were observed in the upper region of the caudal fin, and 8-18 rays in the lower region.

Tab. 2. Chronology of the main morphological events from hatching until complete absorption of the yolk reserves of the tetra *Asynbranchia lacustris*. *Time expressed as minimum–maximum observed; **Values are expressed as means and standard deviation.

Time* (mpf)	Timeline		Larval Stage	Size** (mm)	Observed morphological event
	hph	ATU			
80 - 120	1 - 2	25 - 50	Yolk-sac larval	2.99 ± 0.32	Beginning of eye pigmentation
120 - 240	3 - 4	74 - 100	Yolk-sac larval	2.99 ± 0.24	Beginning of blood pigmentation
300 - 360	5 - 6	125 - 150	Yolk-sac larval	3.00 ± 0.24	Formation of the digestive tract
300 - 420	5 - 7	125 - 175	Yolk-sac larval	3.00 ± 0.24	Opening of the anal cavity
360 - 420	6 - 7	150 - 175	Yolk-sac larval	3.00 ± 0.24	Observation of a gill arch
480 - 600	8 - 10	200 - 250	Yolk-sac larval	3.01 ± 0.32	Head detached from yolk-sac
660 - 720	11 - 12	275 - 300	Yolk-sac larval	3.03 ± 0.31	Head in semiterminal position
1140 - 1200	19 - 20	475 - 500	Yolk-sac larval	3.05 ± 0.31	Mouth in terminal position
1380 - 1440	23 - 24	575 - 600	Yolk-sac larval	3.07 ± 0.31	Development of the pectoral fin
1080 - 1560	18 - 26	450 - 650	Yolk-sac larval	3.04 ± 0.28	Swim bladder inflated
1200 - 1560	20 - 26	500 - 650	Yolk-sac larval	3.05 ± 0.29	Development of the mandible
1800 - 1920	30 - 32	750 - 800	Preflexion	3.11 ± 0.29	Head in terminal position
1860 - 1920	31 - 32	775 - 800	Preflexion	3.12 ± 0.30	Eye pupil fully pigmented
1920 - 1980	32 - 33	800 - 825	Preflexion	3.13 ± 0.30	Completed formation of gill arches
2280 - 2460	38 - 41	950 - 1025	Preflexion	3.29 ± 0.29	Bundling of the intestine
2580 - 2700	43 - 45	1075 - 1125	Preflexion	3.42 ± 0.30	Appearance of the pharynx and oesophagus
3300 - 4440	55 - 74	1375 - 1850	Preflexion	3.92 ± 0.32	Complete absorption of yolk reserves
3720 - 5160	62 - 86	1550 - 2150	Preflexion	4.02 ± 0.30	First food in the digestive tract
5160 - 5880	86 - 98	2150 - 2450	Preflexion	4.16 ± 0.33	Disappearance of the adhesive gland

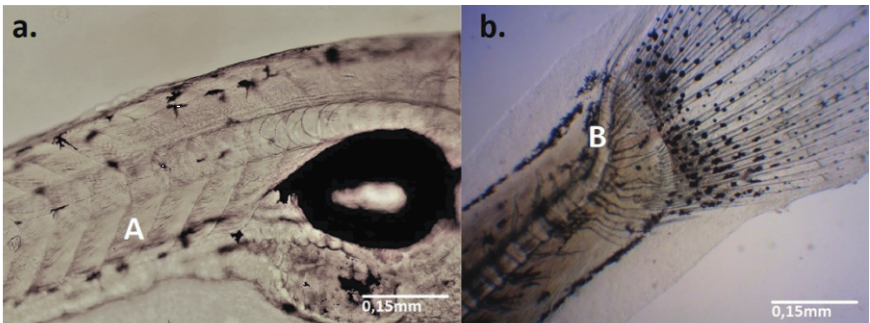


Fig. 3. Individual of *Asynbranchia lacustris* in the flexion stage: a. myomeres (A); b. flexion of the notochord (B).

Postflexion (315 - 542 dph). During the postflexion stage, increased pigmentation of the lateral region of the head and torso was noted. In the operculum, several chromatophores were observed. The swim bladder presented two compartments, an anterior and a posterior. By using *in vivo* microscopy, the presence of food in the intestinal folds could be observed. This visual identification of food was only possible at the beginning of the postflexion stage because during this stage the body becomes opaque; thus, after this stage, the differentiation of internal organs is no longer possible.

The first evidence of scales appeared at 17 dph (Fig. 4). Initially, they were concentrated in the ventral region, along with the swim bladder extension and the structures of the digestive tract and operculum. No myomeres could be observed at this stage.

Water quality in the experimental system. During yolk-sac larval development, there was no significant difference in the parameters measured to assess the quality of the water between maintenance (well) and water renewal ($p > 0.05$)

(as shown in Tab. 3). During the preflexion stage, there was a tendency to decrease of DO concentration, %SO₂, and alkalinity compared to those of the renewal water. The pH showed slight acidification compared to the maintenance water during the flexion and postflexion stages. Regarding the levels of total ammonia, nitrite, and CO₂, a significant increase was observed in the siphoned water from the tissue-culture wells. During the larval stages, there was an increase trend in the concentration of ammonia, carbon dioxide, and alkalinity. Other parameters did not show any correlation with larval development.

Survival. We noted two critical moments for the survival (Fig. 5) during larval ontogeny (Fig. 6). The first occurred during the feeding transition period, causing 28% mortality between 4 and 5 dph. The second occurred at the beginning of the notochord folding (between 10 and 11 dph, during which the survival rate was 36%. From 18 dph onwards, there were no more deaths, and the final survival rate was 8%.

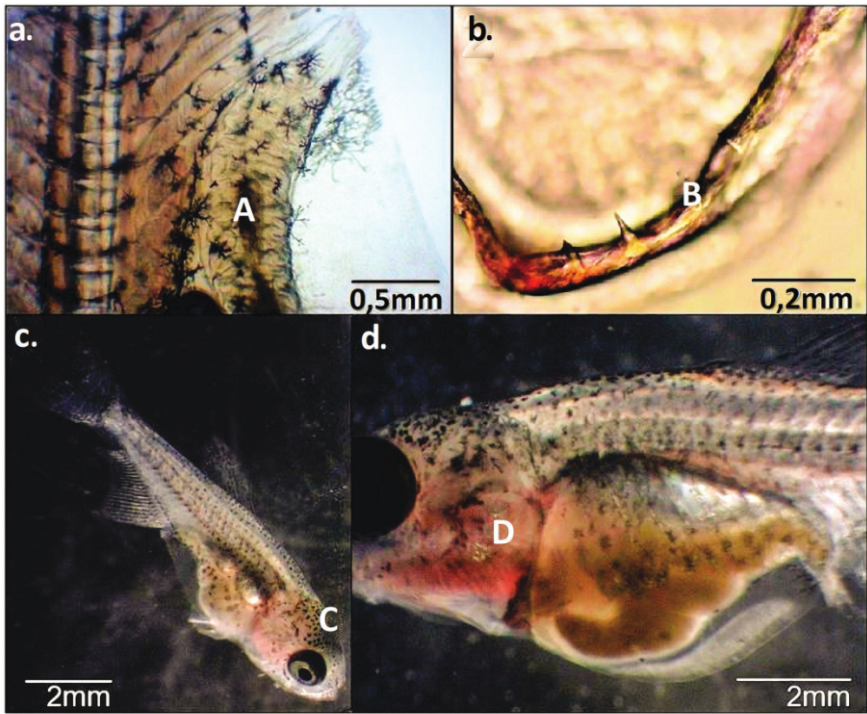


Fig. 4. Specimens of *Asyanax lacustris* in the postflexion stage: **a.** presence of food in the digestive tract (A); **b.** teeth (B); **c.** punctate pigmentation on the dorsal region of the head (C); and **d.** scales (D).

Tab. 3. Water quality parameters of the tissue culture plates system measured at each developmental stage of *Astyanax lacustris*, before and after water renewal. * Values are expressed as medians and ranges (min-max). Lowercase letters (superscript) indicate significant differences ($p < 0.05$) of water quality parameters between times of analysis (i.e. measured before and after water renewal), in each of the developmental stages. Capital letters (superscript) indicate significant differences ($p < 0.05$) of water quality between stages: YX: Indicates significant differences between water quality parameters used for renewal of culture plates (Before); AB: Indicates significant differences between the water quality parameters within the culture plates along each stage (After).

Stage		Parameter						
		pH	OD (mg L ⁻¹)	OD (% Sat.)	N-AT (mg L ⁻¹)	N-NO2 (mg L ⁻¹)	CO ₂ (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	Alcalinity (mg L ⁻¹)
Yolk-sac larval	Renewal	7.38	6.61	77.80	0.02	0.01	0.44	50.60
	Maintenance	7.63	5.71	58.90	0.05	0.09	0.45	50.20
Preflexion	Renewal	7.52 (7.25-7.82)	6.71 ^{uv} (6.02-6.92)	85.90 ^a (72.10-90.50)	0.03 ^{uv} (0.02-0.04)	0.01 ^a (0.01-0.01)	0.50 ^a (0.27-0.57)	68.00 ^{uv} (55.60-82.80)
	Maintenance	7.34 (5.58-7.68)	3.54 ^b (3.25-5.89)	47.90 ^b (44.60-63.70)	0.43 ^{ba} (0.06-0.48)	0.15 ^b (0.06-0.19)	1.04 ^{ba} (0.62-1.18)	27.80 ^{ba} (14.40-46.50)
Flexion	Renewal	7.46 ^a (7.34-7.68)	6.41 ^a (6.31-6.52)	83.60 ^a (80.20-84.50)	0.02 ^{xy} (0.02-0.03)	0.01 ^a (0.01-0.02)	0.42 ^a (0.31-0.56)	45.80 ^{xy} (44.00-58.00)
	Maintenance	6.70 ^b (6.61-6.74)	3.92 ^b (3.71-4.07)	49.06 ^b (45.70-50.10)	0.52 ^{ab} (0.51-0.54)	0.17 ^b (0.14-0.18)	1.16 ^{ab} (1.08-1.32)	38.20 ^{ab} (36.00-41.00)
Postflexion	Renewal	7.71 ^a (7.37-7.83)	6.49 ^a (6.02-7.05)	83.95 ^a (71.70-102.80)	0.02 ^{ab} (0.01-0.03)	0.01 ^a (0.01-0.02)	0.42 ^a (0.28-0.05)	53.00 ^{ab} (41.80-59.40)
	Maintenance	6.77 ^b (5.76-7.05)	3.83 ^b (3.15-4.43)	47.00 ^b (43.80-56.60)	0.51 ^{ab} (0.44-0.73)	0.13 ^b (0.12-0.18)	1.63 ^{ab} (1.29-1.88)	40.60 ^{ab} (29.00-48.60)

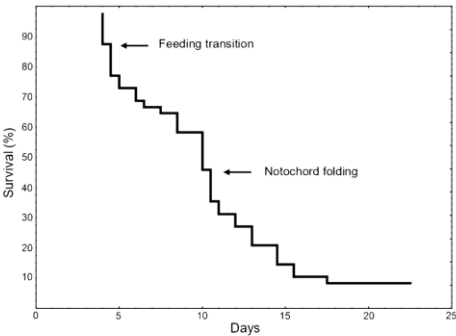


Fig. 5. Survival curve, from hatching to the end of the postflexion stage, of *Astyanax lacustris*. Arrows indicate the most critical periods for larval survival.

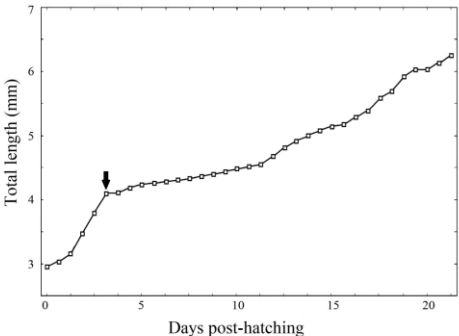


Fig. 6. Total length (mm) of *Astyanax lacustris* during its larval development. Arrows indicate the total consumption time of yolk reserves.

Discussion

According to Nakatani *et al.* (2001), mosh fis species present a relatively similar morphological post-hatching pattern. Some of the morphological characteristics mentioned in their study are also observed in our study, in the larvae of *A. lacustris*, such as the presence of small pigments formed by dendritic chromatophores, spread through the outer edges of the yolk-sac and near the eyes. In addition, the post-hatching morphometric parameters analysed in this study agree with those described by Nakatani *et al.* (2001) also for *A. lacustris* larvae, although in their study, specimens were collected from the natural environment.

An important characteristic of the *A. lacustris* larvae is the presence of the adhesive gland. According to Godinho *et al.* (2003), in the natural environment, this gland allows the larvae to remain in the hatching place when dragged by water currents, increasing their dispersion capacity. The gland was not recorded in animals after 98 hph. During the first hours following hatching, there was greater pigmentation by dendritic chromatophores, spread throughout the region above the notochord, and by punctate chromatophores, scattered around the cranial region. According to Meijide, Guerrero (2000), studies concerning fishes body pigmentation are essential for the identification of larval stages in various species. Larvae of

the species *Atherinella brasiliensis* (Franca *et al.*, 2007) and *Rhinolepis aspera* (Perini *et al.*, 2010) have only one type of chromatophore. Other species have both types of chromatophores, such as *Pimelodus maculatus* (Buzollo *et al.*, 2011) and *Rhamdia quelen* (Amorim *et al.*, 2009). At the yolk-sac larval stage, we also observed the development of the digestive tract structures, in particular of those associated with the opening and functionality of the buccal cavity, together with the development of the digestive tube and anal opening.

With the appearance of the swim bladder and the development of the pectoral and caudal fin, the postflexion stage started. According to Trotter *et al.* (2003), as soon as the swim bladder becomes functional, the larvae need to capture atmospheric air. The development of these structures provides better swimming balance and control, increasing the potential for food capture and, consequently, the survival of larvae.

Regarding fin development, the pattern observed in this study was similar to that reported by Bialecki *et al.* (2001) for *Auchenipterus oosteorhynchus*, which start with the metamorphosis of the embryonic caudal membrane. The same process is also observed in the larvae of *Danio rerio* (Parichy *et al.*, 2009), which is followed by appearance of the button of the pectoral fin (yolk-sac larval period), disappearance of the embryonic membrane, emergence of the caudal fin (postflexion stage), and development of the anal and dorsal fin in the postflexion stage.

The period length until the absorption of yolk reserves observed in this study differed from the one reported by Almeida (2007) for specimens of the same species. According to the author, full absorption of yolk reserves and the beginning of exogenous feeding occurred at 18 hph (yolk-sac larval stage). In the present study, these processes were observed only at 74 hph, close to the developmental time reported for larvae of *Brycon orbignyanus* (Maciel *et al.*, 2010; Nogueira *et al.*, 2014).

In Nakatani *et al.* (2001), total absorption of the yolk-sac occurred when the specimens of *A. lacustris* reached a TL of 4.50 mm (preflexion). However, in our work, the larvae had a TL of 3.90 mm, which can indicate the presence of genetic variations within the same species, or that the ontogenetic development in the laboratory differs from the patterns observed in nature. In natural environments, animals are often exposed to different water temperatures during early development, in contrast to laboratory conditions.

The transition period from endogenous to exogenous the nutrition is characterized by a high mortality rate during the first days of life. Between 62 and 86 hph, the presence of food in the digestive tract of larvae was observed, which indicates that the transition occurred when the specimens still had traces of yolk reserves. According to Guerrero Alvarado (2003), larvae do not immediately recognize inert artificial diets as food, which may explain the great range of time observed (about 24 h) between the record of food in the digestive tract in the first and last analysed

specimens of *A. lacustris*. Pittman *et al.* (2013) reported that some factors, such as TL and mouth size, are essential during the early stages to increase the chances of larvae survival, while they are related to a greater ability to capture food. The same authors also report that, in the absence of predators and with high food availability, this advantage no longer exists, since there are no literature reports showing that bigger larvae necessarily become bigger juveniles and adults. In addition, in laboratory studies, one of the main factors associated with the success of the fish feeding process is the adaptation of the early life stages to external foods, especially when using inert feeds. This process can be affected both by the type of food and by the structure where the animals are maintained. In this study, since it was not possible to promote continuous resuspension of food in the tissue-culture plates, the feed particles were sedimenting over time, hindering or even preventing the fish access to them.

When larvae reached an average TL of 4.93 mm (11-13 hph), folding of the notochord caudal tip started. To our knowledge, there are no other records of the time of notochord folding for this species. In larvae of *Brycon hilarii*, total folding of the notochord occurs when individuals reach a TL of 9.00 mm (Oliveira *et al.*, 2012). In larvae of *Pyrrhulina australis*, notochord folding occurs when the specimens reach a TL of about 5.33 mm (Taguti *et al.*, 2009).

During this stage of development, the number of pre- and post-anal myomeres ranged from 13 to 17 and 13 to 16, respectively. In Nakatani *et al.* (2001), the total number of myomeres in *A. lacustris* ranged from 32 to 37 during the postflexion stage. In our work, the maximum number of myomeres observed during the folding stage of the notochord was 33. There were no visible myomeres during the postflexion larval stage. The number of myomeres differentiates *A. lacustris* from other species of the Characidae family, such as *Pyrrhulina australis* (Taguti *et al.*, 2009), *Brycon orbignyanus* (Faustino *et al.*, 2011), and *Brycon hilarii* (Oliveira *et al.*, 2012).

According to Nakatani *et al.* (2001), individuals of the species *A. lacustris* reach the postflexion stage with a TL of 8.10 mm, and scales are visible when the specimens reach a TL of 13.08 mm. In our observations, the larvae reached the notochord postflexion stage with a TL of 4.98 mm and showed scales with a TL of 5.97 mm (17 hph). Again, these differences may be related to genetic variations or due to the laboratory conditions.

Although there are great individual variations in the number of fin rays, no studies are available regarding this morphological feature during the early development stages of *A. lacustris*. The rays of the pectoral, anal, caudal, and dorsal fin allowed differentiation of the *A. lacustris* specimens observed by Nakatani *et al.* (2001). This supports that, even after completion of the larval period, some morphological alterations may still occur in this species.

In order to use larvae in laboratory experiments, one of the challenges to overcome is water quality deterioration

in the experimental setting, which is caused by increased production of metabolic waste and decomposition of unconsumed diet. Such processes could be mainly noted by the increase in the concentrations of ammonia and CO₂ that occurred during the development of the individuals. In a study performed by Dal Pont (2012) on ammonia toxicity in adult *A. lacustris*, the CL₅₀ at 24 h was more than 100 mg L⁻¹. However, there is no detailed information on the toxicity of ammonia or CO₂ or about the critical levels of the other water quality parameters to the larvae of *A. lacustris*. Therefore, the hypothesis that the alterations in the baseline of these compounds in the water may have affected the growth rate or even the survival of animals cannot be excluded a priori.

Despite variations in water quality, larvae kept at 25 °C were able to survive (even in relatively low proportion), adapting to the intense and unavoidable manipulations to which they were subjected throughout the experiment. In addition, it was possible to observe that these animals effectively fed and showed an adequate development of their morphological and anatomical structures. The results corroborate the potential use of tetra, *Asyanax lacustris*, as model animals in laboratory trials.

Acknowledgments

The experiment was performed in the Laboratory of Research on Aquatic Organisms (LAPOA), from the Integrated Group on Aquaculture and Environmental Studies (GIA), located in the Agricultural Sciences Sector of the Federal University of Paraná (UFPR), Brazil. The study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) (076/2015 protocol number). This work was funded by the Petróleo Brasileiro S.A. (Petrobras) who had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Almeida RC. *Asyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomaniplulação. [MSc Dissertation]. Botucatu, SP: Universidade Estadual Paulista; 2007.
- De Amorim MP, Gomes BVC, Martins YS, Sato Y, Rizzo E, Bazzoli N. Early development of the silverheafis *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces: Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. *Aquac Res*. 2009; 40(2):172-80.
- American Public Health Association (APHA). NO₂ Nitrogen (Nitrite). Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed. Washington: APHA, AWWA, WEF; 1995.
- American Public Health Association (APHA). Method 4500 F-Fluoride. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington: APHA, AWWA, WEF; 2005.
- Barrera EAL. Avaliação dos efeitos da exposição de nanopartículas de prata em larvas de *Rhamdia quelen* e da coexposição com Benzo (a) pireno em indivíduos adultos. [PhD Thesis]. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2013.
- Bialecki A, Baumgartner G, Sanches, PV, Galuch AV, Luvisato MA, Nakatani, et al. Caracterização do desenvolvimento inicial de *Auchenipterus osteomystax* (Osteichthyes, Auchenipteridae) da bacia do rio Paraná, Brasil. 2011; *Acta Scientiarum*, 23(2):377-82.
- Buzollo H, Verissimo-Silveira R, Oliveira-Almeida IR, Alexandre JS, Okada HT, Ninkaus-Silveira A. Structural analysis of the *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) embryogenesis (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotrop Ichthyol*. 2011; 9(3):601-16.
- Dal Pont G. Toxicidade do óleo diesel para o peixe *Asyanax altiparanae*. [MSc Dissertation]. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2012.
- Faustino F, Nakaghi LS, Neumann E. *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae): aspects of the embryonic development in a newfish species with aquaculture potential. *Zygote*. 2011; 19(4):351-63.
- França EJ, Severi W, Castro MF, Medeiros TN, El-Deir ACA. Description of *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1825) (Atheriniformes : atherinopsidae) larvae from the Jaguaribe River estuary, Itamaracá island, Northeastern Brazil. *Neotrop Ichthyol*. 2007; 5(3):369-74.
- Garutti V. *Piscicultura Ecológica*. São Paulo, SP: Fundação Editora da UNESP - FEU; 2003.
- Gisbert E. Early development and allometric growth patterns in *Siberian sturgeon* and their ecological significance. *J Fish Biol*. 1999; 54(4):852-62.
- Godinho HP, Santos JB, Sato Y. Ontogênese larval de cinco espécies de peixes do São Francisco. In: Godinho HP, Godinho AL, editors. *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas; 2003. p.133-148.
- Guerrero-Alvarado CE. Treinamento alimentar de pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829): Sobrevivência, crescimento e aspectos econômicos. [MSc Dissertation]. Jaboicabal, SP: Universidade Estadual Paulista; 2003.
- Ingvarsdóttir A, Björkblom C, Ravagnan E, Godal BF, Arnberg M, Joachim DL, Sami S. Effects of different concentrations of crude oil on first feeding larvae of Atlantic herring (*Clupea harengus*). *J Mar Syst*. 2012; 93:69-76.
- Kupren K, Prusinska M, Żarski D, Krejziceff S, Kucharczyk D. Early development and allometric growth in *Nannacara anomala* Regan, 1905 (Perciformes: Cichlidae) under laboratory conditions. *Neotrop Ichthyol*. 2014; 12(3):659-65.
- Lema SC, Schultz IR, Scholz NL, Incardona JP, Swanson P. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquat Toxicol*. 2007; 82(4):296-307.
- Maciel CMRR, Lanna EAT, Maciel Junior A, Donzele JL, Neves CA, Menin E. Morphological and behavioral development of the piracanjuba larvae. *R Bras Zootec*. 2010; 39(5):961-70.
- McKim JM. Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. *J Fish Res Board Can* 1977; 34(8):1148-54.

- Meier S, Craig Morton H, Nyhammer G, Grøsvik BE, Makhotin V, Geffen A, Boitsov S, Kvestad KA, Bohne-Kjersem A, Goksøyr A, Folkvord A, Klungsoyr J, Svardal A. Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water during early life stages: Effects on embryos, larvae, and juvenile fish. *Mar Environ Res*. 2010; 70(5):33-91.
- Majide F, Guerrero G. Embryonic and larval development of a substrate-brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) under laboratory conditions. *J Zool*. 2000; 252(4):481-93.
- Nakatani K, Agostinho AA, Baumgartner G, Bialecki A, Sanches PV, Makrakis MC, Pavanelli CS. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá, PR: Educim; 2001.
- Nogueira DJ, Castro SC, Sá OR. Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanæ* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas, Minas Gerais. *Rev Bras Zootecnia*. 2009; 11(3):237-32.
- Nogueira LB, Godinho AL, Godinho HP. Early development and allometric growth in hatchery-reared characin *Brycon orbignyanus*. *Aquac Res*. 2014; 45(6):1004-11.
- Oliveira FG, Bialecki A, Gomes LC, Santin M, Taguti TL. Larval development of *Brycon hilarii* (Characiformes, Characidae). *Iheringia Ser Zool*. 2012; 102(1):62-70.
- Ostrensky A, Bogger WA, Duboc LF, Wegbecher FX, Pilchowski RW, Zumberlan E. 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, Barigui and Iguaçu. *International Oil Spill Conference Proceedings*. 2003;2003(1):971-76.
- Ostrensky A, Pedrazzani AS, Vicente AL. Use of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and propofol (2, 6-diisopropylphenol) as anesthetics for the tetra *Astyanax altiparanæ* (Teleostei, Characidae). *Aquac Res*. 2015; 47(11):3477-88.
- Parichy DM, Elizondo MR, Mills MG, Gordon TN, Engeszer RE. Normal table of post-embryonic Zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev Dyn*. 2009; 238(12):2975-3015.
- Peretti D, Andrian I. Feeding and morphological analysis of the digestive tract of four species of fish (*Astyanax altiparanæ*, *Parauchenipterus galeatus*, *Serrasalmus marginatus* and *Hoplias aff. malabaricus*) from the upper Paraná River floodplain, Brazil. *J Biol*. 2008; 6(3):671-79.
- Perini VR, Sato Y, Rizzo E, Bazzoli N. Biology of eggs, embryos and larvae of *Phinelepis aspera* (Spix & Agassiz, 1829) (Pisces: Siluriformes). *Zygote*. 2010; 18(2):159-71.
- Pitman K, Yáfera M, Pavlidis M, Geffen AJ, Kovac W, Ribeiro L, Zambonino-Infante JL, Tandler A. Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. *Rev Aquac*. 2013; 5(s1):s224-67.
- Porto-Foresti F, Castilho-Almeida R, Foresti F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanæ*). In: Baldissarotto B, Gomes LC. Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Santa Maria, RS: UFSM; 2005. p.105-120.
- Ramos S, Cabral H, Elliott M. Do fish larvae have advantages over adults and other components for assessing estuarine ecological quality? *Ecol Indic*. 2015; 55:74-85.
- Russo T, Scardi M, Cataudella S. Applications of Self-organizing maps for ecomorphological investigations through early ontogeny of fish. *PLoS One*. 2014; 9(1):e86646.
- Sfakianakis DG, Renieri E, Kentouri M, Tsatsakis AM. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. *Environ Res*. 2015; 137:246-55.
- Siqueira-Silva DH, Santos Silva AP, Nimaus-Silveira A, Verissimo-Silveira R. The effects of temperature and busulfan (Mylgram) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanæ* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. *Theriogenology*. 2015; 84(6):1033-42.
- Taguti TL, Kipper D, Bialecki A, Sanches PV, Makrakis MC, Baumgartner G, Fernandes R. Early development of *Pyrrhulina australis* Eigenmann & Kennedy, 1903 (Characiformes, Lebiastidae). *Biota Neotrop*. 2009; 9(4):59-65.
- Trotter AJ, Pankhurst PM, Morehead DT, Battaglene SC. Effects of temperature on initial swim bladder inflation and related development in cultured striped trumpeter (*Lateolabrax lineatus*) larvae. *Aquaculture*. 2003; 221(1-4):141-56.
- Vicente AL. Uso de óleos essenciais e de compostos sintéticos como agentes anestésicos para o lambari *Astyanax altiparanæ* (Garutti & Britski, 2000). [MSc Dissertation]. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2014.



Submitted July 20, 2017

Accepted May 05, 2018 by Franco Teixeira de Mello

10 BIBLIOGRAFIA

- ABNT, A. B. d. N. T. (2011). "Aquatic ecotoxicology, acute toxicity, test with fish." NBR 15088: 22.
- Anderson, J. W., J. M. Neff, B. A. Cox, H. E. Tatem and G. M. Hightower (1974). "Characteristics of Dispersions and Water-Soluble Extracts of Crude and Refined Oils and Their Toxicity to Estuarine Crustaceans and Fish." Marine Biology (Berlin) **27**: 75-88.
- Barker, S. A. (2007). "Matrix solid phase dispersion (MSPD)." Journal of biochemical and biophysical methods **70**(2): 151-162.
- Barker, S. A., A. R. Long and C. R. Short (1989). "Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion." Journal of Chromatography A **475**(2): 353-361.
- Barron, M., T. Podrabsky, S. Ogle and R. Ricker (1999). "Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms?" Aquatic Toxicology **46**(3): 253-268.
- Barron, M. G., T. Podrabsky, S. Ogle and R. W. Ricker (1999). "Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms?" Aquatic Toxicology **46**(3-4): 253-268.
- Bernet, D., H. Schmidt, W. Meier, P. Burkhardt-Holm and T. Wahli (1999). "Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution." Journal of Fish Diseases **22**(1): 25-34.
- Bettim, F. L., G. L. Galvan, M. M. Cestari, C. I. Yamamoto and H. C. Silva de Assis (2016). "Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline." Chemosphere **144**: 1467-1474.
- Bidinoto, P. M., R. H. S. Souza and G. Moraes (1997). "Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples." Boletim Técnico do CEPTA-Pirassununga **10**: 53-60.
- Boeger, W. A., A. T. B. Guimarães, S. Romão, A. Ostrensky, E. Zamberlan and F. H. Falkiewicz (2003). Histopathology as an approach to evaluate the effect of an oil spill on fishes of the Arroio Saldanha and Rio Iguacu (Brazil). International Oil Spill Conference, American Petroleum Institute.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1): 248-254.
- Braz-Mota, S., H. Sadauskas-Henrique, R. M. Duarte, A. L. Val and V. M. F. Almeida-Val (2015). "Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*." Chemosphere **135**: 53-60.
- CETESB (1990). Companhia de Tecnologia e Saniamento Ambiental - *Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*.
- Clarke, F. E. (1950). "Determination of Chloride in Water Improved Colorimetric and Titrimetric Methods." Analytical Chemistry **22**(4): 553-555.
- Dal Pont, G. (2012). Toxicidade do óleo diesel para o peixe *Astyanax altiparanae*. Mestrado em Ciências Veterinárias Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná.

- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres and R. M. Featherstone (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." Biochemical Pharmacology **7**(2): 88-95.
- EPA (2002). United States of Environmental Protection Agency. Methods of measuring the acute toxicity of effluents and receiving eaters to freshwater and marine organisms. Washington, EUA: 266.
- Fernandes, A. N., C. D. Gouveia, M. T. Grassi, J. da Silva Crespo and M. Giovanela (2014). "Determination of Monoaromatic Hydrocarbons (BTEX) in Surface Waters from a Brazilian Subtropical Hydrographic Basin." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **92**(4): 455-459.
- 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.
- 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* (Characidae) After Exposure and Recovery to Water-Soluble Fraction of Gasoline (WSFG)." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **97**(1): 63-70.
- Heath, A. G. (1995). Water Pollution and Fish Physiology, Lewis Publishers.
- Henry, R. P. (1991). Techniques for Measuring Carbonic Anhydrase Activity in Vitro. The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics. S. J. Dodgson, R. E. Tashian, G. Gros and N. D. Carter. Boston, MA, Springer US: 119-125.
- Keen, J. H., W. H. Habig and W. B. Jakoby (1976). "Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases." Journal of Biological Chemistry **251**(20): 6183-6188.
- Levine, R. L., J. A. Williams, E. R. Stadtman and E. Shacter (1994). "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins." Methods Enzymol **233**: 346-357.
- Lushchak, V. I. (2011). "Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals." Aquatic Toxicology **101**(1): 13-30.
- Machado, A. d. A. S., C. M. Wood, A. Bianchini and P. L. Gillis (2014). "Responses of biomarkers in wild freshwater mussels chronically exposed to complex contaminant mixtures." Ecotoxicology **23**(7): 1345-1358.
- McCormick, S. D. and H. A. Bern (1989). "In vitro stimulation of Na⁺-K⁺-ATPase activity and ouabain binding by cortisol in coho salmon gill." American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **256**(3): R707-R715.
- OECD (1994). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organization for Economic.
- 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. 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." Un-Repar/Petrobrás **2**: 32-52.

- Ostrensky, A., M. A. Marchiori and L. H. Poersch (1992). "Toxicidade Aguda da Amônia no Processo Produtivo de Pós-Larvas de *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967." Anais da Academia Brasileira de Ciências **64**(4): 383-389.
- 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: n/a-n/a.
- Ostrensky, A. and W. Wasielesky (1995). "Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967." Aquaculture **132**(3): 339-347.
- 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.
- Pilchowski, R. W. (2012). "Avaliação dos impactos de derramamento de óleo sobre a ictiofauna do altíssimo, alto e médio Rio Iguaçu, Paraná, Brasil."
- Poleksić, V. and V. Mitrović-Tutundžić (1994). "Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution." Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford: Fishing News Books: 339-352.
- Rezaee, M., Y. Assadi, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi and S. Berijani (2006). "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction." Journal of Chromatography A **1116**(1): 1-9.
- 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.
- Schwaiger, J., R. Wanke, S. Adam, M. Pawert, W. Honnen and R. Triebkorn (1997). "The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish." Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery **6**(1): 75-86.
- Silva, C., C. O. Ribeiro, A. Katsumiti, M. Araújo, E. Zandoná, G. C. Silva, J. Maschio, H. Roche and H. S. 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.
- Souza-Bastos, L. R. d. (2011). Fisiologia de teleósteos expostos a contaminação e alterações nas concentrações de amônia, sal e oxigênio. Doutor, Universidade Federal do Paraná.
- U.S.EPA (1996). US Environmental Protection Agency - Method 5021: Volatile organic compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis: 1-13.
- U.S.EPA (1996). US Environmental Protection Agency - Method 8021B: Aromatic and halogenated volatiles by gas chromatography using photoionization and/or electrolytic conductivity detectors: 1-19.
- U.S.EPA (2001). United States Environmental Protection Agency. Guidance for Reporting Toxic Chemicals: Polycyclic Aromatic Compounds Category. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency. **EPA 260-B-01-03** 40.
- 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.

Verdouw, H., C. J. A. Van Echteld and E. M. J. Dekkers (1978). "Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate." Water Research **12**(6): 399-402.

Zhang, Y. and H. K. Lee (2012). "Determination of ultraviolet filters in water samples by vortex-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1249**: 25-31.