

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA RURAL
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

EFEITOS DO ÓLEO DIESEL BRUTO E DA SUA FRAÇÃO SOLÚVEL NOS ASPECTOS
COMPORTAMENTAIS DO PEIXE *Poecilia vivipara*

FABIANA ALVES DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. William Severi

Co-orientadora: Prof. Dra. Cristiane Maria Varela
de Araújo Castro

Recife, PE
Agosto, 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA RURAL**

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

FABIANA ALVES DA SILVA

**EFEITOS DO ÓLEO DIESEL BRUTO E DA SUA FRAÇÃO SOLÚVEL NOS ASPECTOS
COMPORTAMENTAIS DO PEIXE *Poecilia vivipara***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental, Área de Concentração: Gestão Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientador: Prof. Dr. William Severi

Co-orientadora: Prof. Dra. Cristiane Maria
Varela de Araújo Castro.

Recife, PE
Agosto, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA RURAL

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

EFEITOS DO ÓLEO DIESEL BRUTO E DA SUA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ASPECTOS
COMPORTAMENTAIS DO PEIXE *Poecilia vivipara*

FABIANA ALVES DA SILVA

APROVADO EM: DE DE 2015

Prof. Dr. William Severi

Presidente/Orientador

Prof. Dr. Paulo Guilherme Vasconcelos de Oliveira

Membro

Prof. Dr. Vicente de Paula Silva

Membro

Coordenador do PPEAMB

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal Rural de Pernambuco e a todos os professores do seu corpo docente, que proporcionaram informações importantes na minha formação.

Ao meu orientador, William Severi, pela confiança ao me aceitar como orientanda, por todo ensinamento dado ao longo de todos esses anos. A ele devo respeito, amizade e gratidão. Agradeço também à sua esposa, Verônica Severi, por todos os conselhos, que com certeza serão sempre lembrados.

À professora Cristiane Castro, por todo apoio com o experimento, com a correção da dissertação, pela paciência e por ter me aceito no laboratório e fornecido o essencial para realização desse projeto.

Ao professor Vicente De Paula e Paulo Oliveira por ter aceitado fazer parte da banca e pela leitura e crítica construtiva desse trabalho

Ao Professor Marcus Metri e Nana, obrigada por tudo!

A todos do LECA, em especial a Priscila e Francisco, pela ajuda na montagem do experimento.

Aos funcionários do Departamento de Pesca e Aquicultura, em especial a Telma, pelo sempre pronto atendimento em servir o que lhes fosse solicitado.

A todos do Laboratório de Ictiologia, em especial a Tais, Bela e Rodrigo, presentes em minhas coletas, e mais que especialmente agradeço a Helder.

A meus amigos Elisangela, Valério, Clodomir, Waldemir, Zalmon, Joyce, Cleide, Manuela e Liliana, por todo apoio.

.

À minha Família, pela compreensão e apoio.

E, finalmente, a Deus, que sempre está abrindo portas para mim.

Dedicatória

Aos meus pais, que são meus exemplos;
às minhas irmãs, pelo carinho; a meu
companheiro, pelo apoio, e às minhas
filhas.

“Aprendemos a voar como pássaros, a nadar
como peixes, mas ainda não aprendemos a
conviver como irmãos.” Martin Luther King

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto causado pela contaminação ambiental do óleo diesel em aspectos comportamentais de peixes, além de efeitos tóxicos letais, utilizando como organismo teste o peixe teleósteo *Poecilia vivipara*. Para tal, foi utilizado óleo diesel S-50, tendo os experimentos sido conduzidos com óleo diesel bruto e com a sua fração solúvel em água (FSD). Os peixes foram expostos às concentrações de 2,5, 5 e 10% do diesel e da FSD, em aquários de vidro com aeração e temperatura ambiente por 96h. Foram utilizados 10 animais por aquário, numa densidade correspondente ao volume de 1g/L, em triplicata para todos os tratamentos e controle. O experimento foi conduzido em sistema semi-estático, com renovação diária de 20% do conteúdo de água. A cada troca de água, a FSD foi renovada, porém o diesel, que forma uma camada na interface ar/água, não foi renovado. Durante o período experimental, os animais não receberam alimentação e os aquários foram cobertos com folha de papel filme. As alterações comportamentais foram monitoradas nos períodos de 2, 24, 48, 72 e 96 h de exposição, sendo que cada unidade experimental (aquário) foi observada por um período total de 10 minutos para análise dos padrões comportamentais de cada organismo, com a quantificação dos animais que apresentavam cada alteração comportamental. Os resultados obtidos demonstraram que tanto o óleo diesel quanto a FSD induziram mudanças comportamentais e mortalidade. Com relação ao óleo diesel, foi observada uma mortalidade de 100% após 72 horas nas concentrações de 5 e 10%. Na maior concentração da FSD, a mortalidade chegou a 50% após 96 h de exposição. Nesse estudo, as principais alterações foram relacionadas à movimentação (irritabilidade, hipoatividade e letargia), aos distúrbios respiratórios (hipóxia e natação na superfície do aquário) e natatórios.

Palavras-chave: *Poecilia vivipara*; óleo diesel; comportamento.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the impact of environmental pollution of diesel on behavioral aspects, as well as lethal toxic effects of fish, using the teleost fish *Poecilia vivipara* as test organism. For this, we used the diesel oil S-50, and the experiments were conducted with raw diesel oil and its water soluble fraction (FSD). Fish were exposed to concentrations of 2.5, 5 and 10% of diesel and FSD in glass aquariums with aeration and room temperature for 96 hours. Ten animals were used per tank in a volume corresponding to a density of 1g / L in triplicate for all treatments and control. The experiment was conducted in a semi-static system, with daily renewal of 20% of water content. Each water exchange, the FSD was renewed, but the diesel fuel, which forms a layer at the air / water interface, was not renewed. During the experimental period, the animals did not receive food and the aquariums were covered with a film sheet of paper. The behavioral changes were monitored for the periods of 2, 24, 48, 72 and 96 h exposure, and each experimental unit (tank) was observed for a total period of 10 minutes to analyze the behavioral patterns of each organism, quantifying the animals that showed each behavioral change. The results showed that both diesel oil and FSD induced behavioral changes and mortality. With regard to diesel oil, 100% mortality was observed after 72 hours at concentrations of 5 and 10%. At the highest concentration of FSD, mortality reached 50% after 96 h exposure. In this study, the main changes were related to the movement (irritability, lethargy and underactivity), respiratory (hypoxia and erratic swimming near the aquarium surface) and natatory disorders.

Keywords: *Poecilia vivipara*; diesel oil; behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 <i>Poecilia vivipara</i>	19
Figura 2 Coleta de <i>Poecilia vivipara</i>	20
Figura 3 Preparação fração solúvel do diesel.....	21
Figura 4 Sistema de exposição do Diesel.....	23
Figura 5 Irritabilidade- Comportamento observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) da FSD e do Diesel em relação ao tempo (H) para a espécie <i>Poecilia vivipara</i>	29
Figura 6 Hipoatividade- Comportamento observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) da FSD e do Diesel em relação ao tempo (H) para a espécie <i>Poecilia vivipara</i>	30
Figura 7 Nado errático- comportamento observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) da FSD e do Diesel em relação ao tempo (H) para a espécie <i>Poecilia vivipara</i>	31
Figura 8 Letargia- Comportamento observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) da FSD e do Diesel em relação ao tempo (H) para a espécie <i>Poecilia vivipara</i>	32
Figura 9 Forragear- Comportamento observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) da FSD em relação ao tempo (H) para a espécie <i>Poecilia vivipara</i>	33
Figura 10 Hipóxia- Comportamento observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) da FSD em relação ao tempo (H) para a espécie <i>Poecilia vivipara</i>	34
Figura 11 Agressividade- Comportamento observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) da FSD em relação ao tempo (H) para a espécie <i>Poecilia vivipara</i>	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Alterações comportamentais evidenciadas nos animais expostos ao Diesel e a FSD em tratamento agudo (96h). Modificado de MENEZES-FARIA et. al (2007).....23

Tabela 2 Sobrevivência de *Poecilia vivipara* expostas a fração solúvel do diesel (FSD). Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.....25

Tabela 3 Sobrevivência de *Poecilia vivipara* expostas ao diesel. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.....25

Tabela 4. Comportamentos observados durante a condução do experimento de Toxicidade da Fração solúvel do diesel (FSD) em relação ao tempo (H) para a espécie *Poecilia vivipara*. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.....27

Tabela 5. Comportamentos observados durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) do diesel em relação ao tempo (H) para a espécie *Poecilia vivipara*. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.28

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Petróleo	13
2.2 O óleo diesel.....	14
2.3 Contaminação e comportamento do diesel em ambientes aquáticos	14
2.4 Ecotoxicologia	15
2.5 O uso de peixes como organismos-teste	18
2.6 <i>Poecilia vivipara</i>	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Obtenção e manutenção dos animais	20
3.2 Obtenção do óleo diesel e da FSD.....	20
3.3 Exposição aguda ao óleo diesel e à FSD.....	21
3.4 Sobrevivência e alterações comportamentais	22
3.5 Análises estatísticas	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

Poluentes ambientais são definidos como compostos químicos de origem sintética ou natural, liberados no ambiente através de atividades antrópicas, causando efeitos indesejáveis aos seres humanos podendo, ainda, comprometer a biota, tornando inviável a utilização dos recursos naturais para fins comerciais, industriais e recreativos (HUTZINGER E VERKAMP, 1981; BRASIL, 1981). Na maioria das vezes, o efeito indesejável é um efeito tóxico, isto é, um efeito prejudicial à vida (DIAS, 2000).

O petróleo e seus produtos refinados constituem um desses poluentes químicos encontrados em todo o planeta (ALBERS, 2002), podendo a intensa movimentação de óleo cru e derivados ocasionalmente causar a poluição, tanto de solos quanto de cursos ou corpos de água. Por exemplo, 40 milhões de litros de óleo e derivados, aproximadamente, foram, acidentalmente, lançados no meio ambiente entre 1975 e 2004, impactando solos, rios, manguezais e praias, no Brasil (BAPTISTA, 2007).

Estima-se que a principal fonte de contaminação por petróleo e seus derivados seja causada por pequenos e contínuos vazamentos de combustíveis em postos de distribuição, devido ao envelhecimento dos tanques de combustíveis. Ainda, a descarga de resíduos industriais e domésticos também se caracteriza como importante foco de contaminação crônica de rios e outros ecossistemas aquáticos (PACHECO E SANTOS, 2001; GUADALUPE MENICONI *et al.*(2002) ;TIBURTIUS *et al.*(2005).

Por não comporem o sistema biológico de um organismo, as substâncias tóxicas são também denominadas xenobióticos. Os xenobióticos estão em constante aumento no ambiente, tanto em sua quantidade, quanto em sua variedade, o que reduz a qualidade ambiental, comprometendo a saúde dos seres vivos que habitam nesses ecossistemas (ARIAS *et al.* (2007); LIVINGSTONE, 1993; WALKER *et al.*(1996). Nos diferentes tipos de xenobióticos, os derivados de petróleo são alguns dos mais relevantes para a ecotoxicologia aquática (PACHECO E SANTOS, 2001a) e têm causado bastante preocupação, tanto pela frequência dos eventos de contaminação, como pelo elevado potencial poluidor de seus compostos.

Hidrocarbonetos de petróleo, principalmente os policíclicos aromáticos (HPAs) e os monoaromáticos (BTEX) são conhecidos por induzir diversos tipos de alteração em peixes, o que justifica a preocupação global com a contaminação provocada por derrames de petróleo

que, em sua maioria, são causados pelo transporte marítimo de produtos HAMOUTENE *et al.* (2002).

Na avaliação da qualidade da água, por meio de análises biológicas, são empregados métodos fisiológicos, que constituem na exposição dos organismos a uma amostra de água ou sedimento, avaliando se a intensidade do efeito produzido na sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos, ou métodos ecológicos, que partem do levantamento das comunidades presentes no corpo de água, cuja composição permite inferir condições ambientais prevalentes (ROBERTO; ABREU, 1991).

Vários organismos podem ser utilizados como detectores de distúrbio ambiental, os quais são denominados bioindicadores e, Segundo JOHNSON *et al.* (1993), um bioindicador "ideal" deve possuir as seguintes características: ser taxonomicamente bem definido e facilmente reconhecível por não-especialistas, apresentar distribuição geográfica ampla, ser abundante ou de fácil coleta, ter baixa variabilidade genética e ecológica, preferencialmente possuir tamanho grande, apresentar baixa mobilidade e longo ciclo de vida, dispor de características ecológicas bem conhecidas, e ter possibilidade de uso em estudos em laboratório. Os monitoramentos realizados com bioindicadores em bacias hidrográficas apontam alterações das condições limnológicas, que às vezes não são detectadas apenas pelos parâmetros físicos e químicos da água (JUNQUEIRA *et al.* (2000). A interação entre os métodos de biomonitoramento e as variáveis abióticas do sistema proporciona um diagnóstico mais preciso sobre a qualidade ambiental do sistema, sendo essas informações convergentes e complementares (BRIGANTE *et al.* (2003).

Os peixes são excelentes indicadores ambientais, a ictiofauna vêm sendo muito utilizada na avaliação da qualidade ecológica de habitats aquáticos, pois são relativamente fáceis de amostrar, devido à sua conspicuidade nestes ambientes. As informações disponíveis sobre peixes como indicadores de poluição (presença ou ausência, tolerância aos fatores químicos e físicos) servem, portanto, como uma ferramenta suplementar para uma rápida avaliação das condições de qualidade da água em adição às análises químicas e físicas (MYSLINSKI & GINSBURG, 1977). Em áreas poluídas, os peixes encontram-se submetidos ao estresse químico que pode ocasionar alterações em órgãos-alvos, afetando diferentes sistemas orgânicos, dentre eles o sistema imunológico (BETOULLE, 1998). Desta forma, estes organismos podem trazer informações importantes para retratar de um modo eficiente a saúde do meio ambiente em que estão vivendo (SCOTT E SLOMAN, 2004).

Diante deste contexto, é importante se obter um maior número de dados técnicos, para que se possa entender a dinâmica do processo de contaminação e de se promover a recuperação da área contaminada. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a mortalidade e respostas comportamentais do peixe *Poecilia vivípara* relacionadas à toxicidade durante sua exposição aguda ao óleo diesel bruto e de sua fração solúvel em água (FDS).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Petróleo

O petróleo tem se tornado um dos principais contaminantes de vários ecossistemas, especialmente do ambiente aquático, onde cerca de 3,2 milhões de toneladas contaminam o ambiente marinho todos os anos (PEDROZO *et al.*, (2002). Segundo NEFF (1978), 75% dos constituintes do petróleo são hidrocarbonetos de cadeias longas e curtas, sendo que os de cadeias curtas, sendo que os de cadeia curta apresenta maior volatilidade, porém maior potencial tóxico aos organismos. Já os hidrocarbonetos de cadeia longa são menos solúveis e persistentes no ambiente aquático sendo considerados menos tóxicos aos peixes (NEFF, 1979; FREEDMAN, 1989).

Atividades petroquímicas como o processo e refino na produção de petróleo, assim como, acidentes que envolvem o derramamento direto de seus produtos e derivados em corpos receptores, como lagos, rios e oceanos, também elevam consideravelmente os níveis ambientais de HPAs (PAGE *et al.* 1999, YUNKER *et al.* 2002, SISINNO *et al.* 2003).

Quando o petróleo ou um subproduto, como o óleo diesel, entra em contato com a água, ocorre a solubilização de compostos polares e de baixo peso molecular, a evaporação dos componentes voláteis presentes na superfície da água ao mesmo tempo em que o óleo derramado se emulsifica na água e solubiliza parte do óleo derramado, formando a fração do petróleo solúvel em água ou a mesma fração solúvel de um derivado (NEFF, 1985).

Segundo BRAUNER *et al.* (1999), os hidrocarbonetos de cadeias curtas são voláteis, permanecendo menos tempo nos ambientes aquáticos, no entanto são muito mais tóxicos. No entanto, apesar da quantidade do óleo dissolvido na água ser pequena, essa fração hidrossolúvel que causa os impactos mais imediatos aos organismos aquáticos, sendo assim considerado um importante determinante de toxicidade do petróleo e seus derivados em acidentes ambientais (SAEED; MUTAIRI, 1999).

Esse impacto causa redução no crescimento de peixes (VIGNIER *et al.*, 1992) efeitos imunotóxicos (FOSSI *et al.* (1997) e, além disso, pode provocar distúrbios na habilidade

respiratória, alterações hematológicas e prejuízos ao sistema imunológico (COHEN *et al.* (2001); COHEN *et al.* (2005); GAGNON e HOLDWAY, 1999), além de lesões histopatológicas nos sistemas respiratório, digestório e excretor (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008).

2.2 O óleo diesel

Dentre os derivados do petróleo, o óleo diesel merece destaque em termos de risco ambiental por ser continuamente lançado nos ambientes costeiros, em função de seu uso como combustível de embarcações, veículos rodoviários e máquinas em geral (KENNISH, 1992). No Brasil, o óleo diesel é o derivado propulsor do refino e corresponde a 34% do volume do barril de petróleo. Na maioria dos outros países do mundo, esta demanda situa-se entre 15 e 25% do volume do barril de petróleo (PORTAL BR, 2005).

De acordo com NEFF (2002), o óleo diesel, também chamado de óleo n° 2, é considerado um óleo de densidade média, composto basicamente por hidrocarbonetos alifáticos (HAs), principalmente parafinas, além de apresentar uma pequena porcentagem de hidrocarbonetos aromáticos. Dentre os aromáticos, os monocíclicos, que apresentam apenas um anel benzeno, são os mais abundantes, seguidos pelos policíclicos (HPAs), principalmente os compostos por 2 a 4 anéis (WANG *et al.* (2003); NEFF; STOUT; GUNSTER, 2005).

No óleo diesel o naftaleno é o mais frequente encontrados dentre os HPAs (VANZELLA; MARTINEZ; CÓLUS, 2007).

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são considerados poluentes orgânicos prioritários em estudos ambientais, alguns desses contaminantes estão relacionados com ações mutagênicas e tumorais em sistemas biológicos (WHO, 1983). Os HPAs de baixo peso molecular apresentam toxicidade aguda significativa para os organismos aquáticos, enquanto os de alto peso molecular podem ser carcinogênicos e estão amplamente distribuídos no meio ambiente (NEWMAN & UNGER, 2003).

Os hidrocarbonetos do óleo diesel são basicamente parafínicos, olefínicos e aromáticos. Substâncias contendo enxofre, nitrogênio, metais e oxigênio também estão presentes, porém em menor quantidade (REFAP, 2004).

2.3 Contaminação e comportamento do diesel em ambientes aquáticos

A indústria petrolífera é de fundamental importância na economia mundial, pois esse recurso pode ser utilizado como fonte de energia ou fonte de matéria-prima para outros tipos

de indústria. Apesar de sua importância econômica, a atividade da indústria petrolífera pode gerar impactos ambientais seja por derramamentos acidentais de petróleo ou por descargas crônicas de combustíveis utilizados nas cidades (FILHO, 2006).

Acidentes ambientais, como derrames de petróleo e seus derivados, constituem a principal fonte de contaminação aguda e estão relacionados a danos na biota e nos ecossistemas como um todo (KENNISH, 1992). No Brasil, destacam-se: o derrame de 1,3 milhão de litros de óleo na Baía da Guanabara, RJ, em janeiro de 2000; o vazamento de 4 milhões de litros de óleo nos rios Barigüi e Iguaçú, PR em julho do mesmo ano; e em novembro de 2004, o vazamento de mais de 6 milhões de litros de diferentes tipos de óleo em Paranaguá (PR). Em todos estes eventos foram observados impactos em diversos ecossistemas (MENICOM *et al.* (2002); FILHO, 2006).

De acordo com FILHO (2006), a contaminação crônica provocada pelo consumo de petróleo e seus derivados, sejam por carros, barcos ou navios, provocam lixiviação de solo em áreas urbanas, e uma grande parcela de petróleo que é introduzida no mar advém de vazamentos em postos de combustível.

2.4 Ecotoxicologia

ZAGATTO, 2006 define a ecotoxicologia como ciência multidisciplinar que estuda os efeitos deletérios não intencionais das mais diversas substâncias químicas, tentando caracterizar a toxicidade encontrada nos organismos e ecossistemas. RAMADE (1977) publicou o primeiro livro de ecotoxicologia, definindo-a como a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividades humanas, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre os seres vivos que habitam a biosfera. Que através da integração da ecologia com a toxicologia, procura-se compreender os mecanismos de ação tóxica de compostos químicos em conjunto com avaliações de impacto ambiental (RODRIGUES *et al.* (2003).

A legislação brasileira (Resolução n. 357, CONAMA, 2005) prevê a aplicação de ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos, para estudo de substâncias ou contaminantes ainda não listados na resolução, que possam causar danos aos seres vivos. As substâncias tóxicas podem trazer muitos riscos ao ambiente aquático, visto que uma vez presentes em grandes quantidades no organismo podem causar efeitos prejudiciais bastante visíveis (RAND; PETROCELLI, 1985; RAND *et al.*, 1995). Enquanto os organismos que se expõem a baixas concentrações de determinados poluentes

durante longos períodos de tempo (STEPHAN e MOUNT, 1973), ocasionando efeitos crônicos a níveis subletais e, até mesmo, letais ao longo do tempo.

Com o objetivo de aumentar o conhecimento dos efeitos dos agentes químicos na biota aquática, têm sido utilizados testes de toxicidade que detectam a capacidade de um agente tóxico ou uma mistura em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos, permitindo saber em que medida as substâncias são nocivas, como e onde se manifestam os efeitos ((MARTINEZ; CÓLUS, 2002 ; MAGALHÃES e FILHO, 2008) Com o objetivo de aumentar o conhecimento dos efeitos dos agentes químicos na biota aquática, têm sido utilizados, nas últimas décadas, testes de toxicidade com organismos dulcícolas, estuarinos e marinhos, em condições laboratoriais e de campo

Para se avaliar os efeitos tóxicos sobre espécies vivas utilizam-se bioensaios. Os bioensaios mais importantes aplicados mundialmente na atualidade foram normatizados internacionalmente pela International Standardization Organisation (ISO) ou estão em processo de normatização. Isso assegura a aplicação unitária dos métodos-teste em escala mundial e, conseqüentemente, resultados comparáveis (OSHA, 2005).

Segundo HEATH (1995), os estudos toxicológicos dos compostos químicos iniciam-se com testes de avaliação da toxicidade aguda da qual se determina a concentração do agente tóxico que causa 50% de mortalidade (CL₅₀) à espécie teste (RAND e PETROCELLI, 1985). A exposição a um agente tóxico pode ser aguda, quando a concentração letal do agente tóxico é liberada em um único evento e rapidamente absorvida, ou crônica, quando o agente tóxico é liberado em eventos periodicamente repetidos, em concentrações subletais, durante um longo período de tempo (SCHVARTSMAN, 1991).

A determinação da letalidade é importante para estimar a concentração e o risco potencial que uma substância química tem de causar a morte em uma determinada espécie, bem como a sensibilidade da espécie em estudo (HEATH, 1995).

Ensaio de toxicidade são métodos utilizados na detecção e avaliação da capacidade inerente de um agente em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos. Consistem na exposição de organismos padronizados a diferentes concentrações de substâncias químicas, presentes nos efluentes ou água, por um determinado período de tempo RODRIGUES *et al.* (2003).

Os testes de toxicidade não permitem obter uma resposta absoluta sobre o risco que uma substância apresenta para populações específicas, uma vez que é muito difícil extrapolar

os resultados de toxicidade obtidos para os organismos-teste em laboratório para outras espécies (RIBO, 1997).

A utilização de ensaios de caráter ecotoxicológico, que venham a dar informações quanto ao efeito tóxico causado em ecossistemas por substâncias químicas nele presentes, torna-se a cada dia mais importante nas avaliações de impacto ambiental. Os testes de toxicidade aquática são bastante utilizados porque os ecossistemas aquáticos constituem os principais receptores de contaminantes, sejam eles lançados diretamente nos corpos d'água por meio das descargas de efluentes, emitidos no ar ou depositados nos solos COSTA *et al.* (2008)

Segundo MARCUCELLA & ABRAMSON (1978) define-se como “toxicologia comportamental” as mudanças do comportamento de um organismo, induzidas pelo estresse, que excedem o limite normal de variabilidade.

Para LITTLE E FINGER (1990) o comportamento pode ser usado como um indicador de toxicidade válido e consistente, podendo ser facilmente incorporado em protocolos para avaliar a sensibilidade dos testes de toxicidade padrão. Testes que medem os efeitos agudos, tais como mortalidade e imobilidade dos peixes, quando em contato com substâncias químicas em exposições, podem identificar o processo de poluição e servem para entender a dinâmica de um ecossistema aquático como um todo (SAAR, 2007). WINKALER *et al.* (2001) afirmam que os efeitos dos contaminantes nos peixes podem se manifestar em vários níveis de organização biológica, incluindo disfunções fisiológicas, alterações estruturais em órgãos e tecidos e modificações comportamentais que levam ao prejuízo do crescimento e da reprodução.

A aquisição de dados em ensaios ecotoxicológicos, pela avaliação de biomarcadores e bioindicadores, gera uma base de dados para o conhecimento dos diferentes mecanismos de efeito de contaminantes químicos nos organismos. O maior desafio para a ecotoxicologia é a utilização das informações adquiridas para avaliação de risco ambiental, visando auxiliar nas tomadas de decisão pelos órgãos governamentais, de modo a proporcionar a proteção das populações das espécies que se quer preservar e impedir que elas diminuam ou desapareçam.

2.5 O uso de peixes como organismos-teste

Os peixes são usados como excelentes modelos para quantificação de biomarcadores e bioindicadores em estudos ecotoxicológicos, por acumularem em seu organismo frações disponíveis de contaminantes orgânicos presentes nos ecossistemas aquáticos (ERICKSON et al. 2008). A experimentação animal nos testes ecotoxicológicos é realizada com hidrocarbonetos WOODWARD *et al.* (1987), herbicidas (SARIKAYA E MEHMET, 2003), detergentes BARBIERI *et al.* (1998, 2000) e com metais pesados DRUMMOND, *et al.* (1973). Já alteração no comportamento de natação em peixes expostos ao diuron foi observada por SAGLIO E TRIJASSE (1998) e foram feitos estudos com herbicida atrazine sobre o peso de alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*), BOTELHO *et al.* (2009).

Testes de toxicidade que utilizam peixes nativos através da avaliação de diferentes estratégias comportamentais, e da exposição a concentrações letais e subletais de compostos químicos, geram respostas de efeito que podem auxiliar na tomada de decisões para avaliações de risco ambiental BRITO *et al.* (2012). Estes testes aplicados em laboratório apresentam a grande vantagem da exibição de um realismo que é incorporado nas alterações das atividades biológicas, em exposições a concentrações referentes àquelas que apresentam uma resposta letal, presente nos cenários de uma possível exposição em campo (RAND, 2008).

2.6 *Poecilia vivipara*

Poecilia vivipara Bloch e Schneider, 1801 (**Figura 1**) pertencem à família Poeciliidae e ordem Cyprinodontiformes, conhecidos popularmente como guarus ou barrigudinhos. Estão presentes nos mais diversos habitats, desde ambientes com salinidade 0 até 32, se mostrando bem adaptado, também apresentando uma tolerância a variações termais AMARAL *et al.* (2001). Os guarus são considerados onívoros e apresentam uma tendência à ingestão de larvas de insetos, alimentando-se principalmente de invertebrados aquáticos, detritos, algas e plantas (NASCIMENTO; GURGEL, 2000). Dessa maneira, os barrigudinhos são resistentes às condições adversas do ambiente aquático e considerados bons modelos biológicos para estudos de toxicidade SABÓIA-MORAES *et al.* (1996).

Figura 1 – *Poecilia vivipara*



Os poecilídeos apresentam uma variedade de adaptações reprodutivas e se reproduzem ao longo de todo o ano (MENDONÇA; ANDREATA, 2001). *Poecilia vivipara* apresenta dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos, os quais atingem em média até 6,0 cm de comprimento total, e a fêmea, 8,0 cm (NOMURA, 1984). Apesar da aparência frágil, são muito resistentes, suportando baixo teor de oxigênio para o seu metabolismo respiratório (SNELSON, 1989). Muitas espécies dessa família vêm sendo comumente encontradas tanto em regiões limpas quanto em córregos contendo resíduos de esgotos domésticos e pluviais, pois são resistentes a contaminação orgânica. ARAÚJO *et al.* (2009).

A espécie *Poecilia vivipara* foi utilizada em experimentos que visavam avaliar o efeito, do cádmio e a tolerância térmica (AMARAL; BONECKER; ORTIZ, 2001) e foi sugerida para teste de toxicidade que avaliaram sua sensibilidade ao dicromato de potássio e duodecilsulfato de sódio. Também se estudou os efeitos do fluoreto de sódio no epitélio da brânquia da *Poecilia vivipara* (BRESEGHELO, 2004), enquanto MATTOS *et al.* (2010) utilizaram o guaru para verificar a expressão gênica do peixe exposto ao óleo diesel, como também foi analisado os efeitos tóxicos do herbicida Roundup HARAYASHIKI *et al.* (2013)

Diante do que foi exposto, *Poecilia. vivipara* é um bom candidato a peixe-modelo para estudos ecotoxicológicos no Brasil, podendo ser utilizado em estudos que visem à determinação dos efeitos da toxicidade do óleo diesel e da sua FSD.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e manutenção dos animais

Os exemplares de *Poecilia vivipara* foram coletados de maneira aleatória com puçá na Estação de Piscicultura Continental Johei Koike da UFRPE (Figura 2), onde foram identificados, e transportados ao Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA), do Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal. Neste laboratório, os animais foram mantidos em aquário com água dechlorada e aclimatados por 7 dias a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, com aeração constante e submetidos a um fotoperíodo de 12:12 horas. Durante este período, os peixes receberam ração peletizada para peixes, duas vezes ao dia, e 50% da água dos aquários foi renovada diariamente.

Figura 2 Coleta de *Poecilia vivipara*



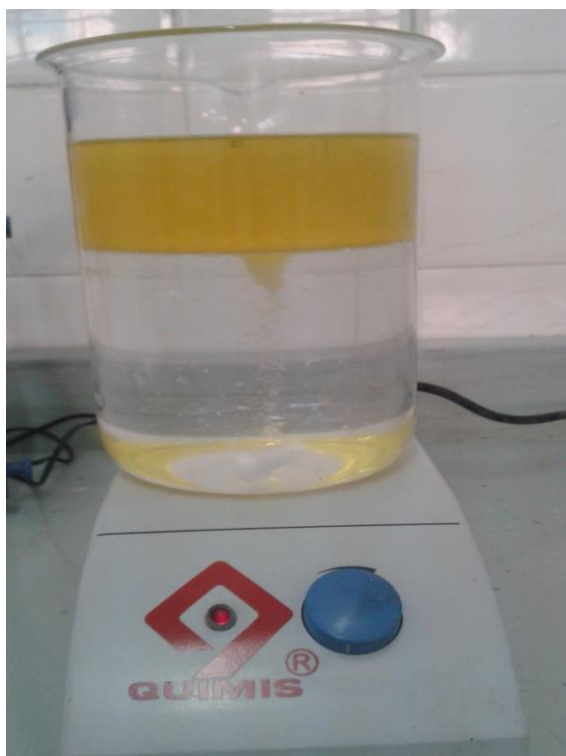
3.2 Obtenção do óleo diesel e da FSD

O óleo diesel utilizado nos experimentos foi adquirido diretamente em um posto de combustível na cidade de Recife-PE. O óleo diesel comercializado é o S-50, que possui 0,005% de enxofre e contém 5% de biodiesel em sua composição (PETROBRAS, 2010).

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

metodologia descrita por Anderson et al. (1974), com algumas modificações, tendo uma parte de óleo sido cuidadosamente adicionada a quatro partes de água (1:4) e as duas substâncias foram agitadas vagarosamente, com auxílio de agitador magnético, observando-se a formação de um vórtex com cerca de 1/3 da altura do recipiente. **(Figura 3)**. Após 23 horas, a solução foi mantida sem agitação por aproximadamente uma hora. Depois de uma hora de repouso, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico e a FSD retirada por gravidade. Imediatamente após a separação, a FSD obtida foi diluída em diferentes concentrações, utilizando água para alcançar concentrações pré-estabelecidos de 2,5; 5,0 e 10% para os testes de toxicidade.

Figura 3. Preparação fração solúvel do diesel



3.3 Exposição aguda ao óleo diesel e à FSD

O experimento foi conduzido de acordo com a metodologia de determinação de concentração letal (CL50) (EPA, 2002), com algumas modificações.

Antes do início do experimento, os animais foram aclimatados às condições experimentais por 48 horas e não foram alimentados, tendo ao final desse período, as alíquotas do óleo diesel e da FSD sido adicionadas ao sistema.

O experimento foi realizado durante 96 h. Os peixes foram expostos às concentrações de 2,5, 5 e 10% do diesel e da FSD, em aquários de vidro com aeração e temperatura

ambiente (**Figura 4**). Foram utilizados 10 animais por aquário, numa densidade correspondente a um volume de 1g/L, em triplicata para todos os tratamentos, e controle, totalizando 24 aquários. O experimento foi conduzido em sistema semi-estático, com renovação diária de 20% do conteúdo de água. A cada troca de água, a FSD foi renovada, porém o diesel, que forma uma camada na interface ar/água, não foi renovado. Durante o período experimental de 96 h, os animais não receberam alimentação e os aquários foram cobertos com folha de papel filme para evitar a volatilização da FSD e do diesel.

Figura 4. Sistema de exposição do Diesel



3.4 Sobrevivência e alterações comportamentais

A sobrevivência foi registrada nos tempos de exposição de 2, 24, 48, 72 e 96 h e expressa como porcentagem do total de animais da unidade experimental.

As alterações comportamentais foram monitoradas nos mesmos períodos de exposição, sendo que cada unidade experimental (aquário) foi analisada por um período total de 10 minutos, para análise dos padrões comportamentais de cada organismo, com a quantificação do número daqueles que apresentavam cada alteração comportamental avaliada.

Nesses períodos, mensurou-se a proporção de animais que exibiam cada comportamento, por meio da razão do número de peixes alterados pelo número total de peixes no aquário (expresso em porcentagem). A lista de comportamentos observados encontra-se no (Tabela 1), tais comportamentos foram obtidos de PIRES, (2013).

Tabela 1 Alterações comportamentais evidenciadas nos animais expostos ao Diesel e a FSD em tratamento agudo (96 h). Modificado de PIRES, (2013).

Desordens comportamentais	Características evidentes observadas durante o experimento
1) Irritabilidade	O peixe se apresenta incomodado pela mudança do ambiente no qual foi inserido. Onde apresenta mudança na sua coloração e natação rápida e brusca.
2) Hipóxia	Aumento do número de movimentos operculares, e animais nesse estado tendem a ficar perto da cânula de oxigenação.
3) Hipoatividade	Os animais expostos permanecem apáticos sem se deslocarem na coluna de água. Entretanto apresentam poucos movimentos aparentes das nadadeiras peitorais e caudais
4) Agressividade	Durante a exposição ao agente estressor os animais se agrupam. Entretanto o animal agressivo se isola e quando outros se agrupam ao seu redor, este tende a morder e perseguir os outros animais.
5) Letargia	Os animais tornam-se completamente estáticos e exauridos. Não se deslocam na coluna d'água e não apresentam movimentos das nadadeiras. O abdômen fica em contato com o fundo do aquário, em completa apatia apresentando exaustão. Esses só se locomovem quando tocados com o bastão de vidro.
6) Nado errático	Momento no qual o peixe possui natação desordenada, sem direção, perda de sentido e equilíbrio durante o nado.
7) Nado na superfície do aquário	O peixe em exposição nada ate a superfície e começa a “mastigar” a tensão superficial, misturando o ar atmosférico à água que passa pelas brânquias.
8) Perda do mecanismo de fuga	O animal perde a resposta de defesa, não reconhece a presença do perigo que o envolve. “Ao se colocar pinça ou bastões de vidro limpos na proximidade, o peixe permanece parado, sem responder a essa situação”.
9) Choque contra a parede do aquário	Por estar em estado de estresse causado pelo ambiente, ele tenta fugir, e dessa forma, ele se choca contra a parede do recipiente ou pula fora do aquário.

3.5 Análises estatísticas

Os dados foram avaliados quanto a diferenças significativas dos parâmetros analisados entre os diferentes tempos de exposição, mediante avaliação preliminar de sua normalidade e homocedasticidade das variâncias. Tendo em vista não terem sido atendidos os pré-requisitos de uma análise paramétrica, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Em caso de diferença significativa ($p < 0,05$), foi aplicado o teste a posteriori de Dunnett (Zar 1984), utilizando o software Statistica 7.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exposição aguda de *Poecilia vivipara* à FSD e ao diesel induziu mudanças comportamentais e mortalidade diferenciada, de acordo com a concentração e o tempo de exposição. Para o FSD (**Tabela 2**), foi observada uma menor mortalidade (30%) durante a exposição aguda para as concentrações 2,5 e 5% após 96 h, tendo atingido 50% na concentração de 10%. Diferença significativa entre as concentrações foi observada apenas após 96 h para a concentração de 10% em relação às demais. Já para diesel, foi observada uma tendência de aumento gradual das taxas de mortalidade dos peixes, culminando com a mortalidade de 100% dos indivíduos após 72 h, nas concentrações de 5 e 10%, e após 96 h na concentração de 2,5 (**Tabela 3**).

Tabela 2 Sobrevivência de *Poecilia vivipara* exposta à fração solúvel do diesel (FSD). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tempo (H)	FDS			
	SOBREV. (0)	SOBREV. (2,5)	SOBREV. (5)	SOBREV. (10)
2	100a	100a	100a	100a
24	100a	100a	100a	100a
48	90a	100a	100a	80a
72	90a	90a	80a	70a
96	80a	70a	70a	50b

Tabela 3 Sobrevivência de *Poecilia vivipara* exposta ao diesel. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tempo (H)	DIESEL			
	SOBREV. (0)	SOBREV. (2,5)	SOBREV. (5)	SOBREV. (10)
2	100a	100a	100a	100a
24	100a	90a	80a	70a
48	90a	60a	50a	20a
72	90a	10a	0a	0a
96	80a	0b	0b	0b

De acordo com a literatura, a fração solúvel em água de um óleo combustível apresenta, em geral, maior toxicidade para peixes em comparação ao óleo bruto (ALBERS,

2003). VANZELLA *et al.* (2007), atribuem os danos genéticos observados para *P. lineatus*, submetidos à exposição aguda à fração solúvel do óleo diesel, A mortalidade avaliada por RODRIGUES *et al.* (2010), para o peixe peixe-rei *Odontesthes argentinensis*, apontou maior toxicidade da FSD, enquanto DAVISON *et al.* (1992) expuseram exemplares do peixe antártico *Pagothenia borchgrevinki* a 100% da FSD e não observaram mortalidade alguma ao final de 72 horas. já estudos com o peixe dourado *Carassius auratus* tem mostrado um aumento das defesas antioxidantes nesses animais após a exposição a diferentes concentrações da FSD.

Porém, neste trabalho, foi observado um efeito diferente durante a exposição, onde a maior toxicidade se deu ao óleo bruto. Essa maior toxicidade pode estar relacionada à maior concentração de HPAs detectada no óleo diesel utilizado no teste agudo, especialmente pela alta concentração apresentada por alguns compostos, como o naftaleno, por exemplo (PONT *et al.* 2012). Esse HPA apresenta, segundo ANDERSON (1979), maior potencial para a bioacumulação e retenção no organismo comparado a hidrocarbonetos monoaromáticos.

As principais alterações observadas no presente estudo foram aquelas relacionadas à movimentação dos organismos (irritabilidade, hipoatividade e letargia), aos distúrbios respiratórios (hipóxia e natação na superfície do aquário) e natatórios. No comportamento estudado, a perda de fuga, agressividade e nado na superfície não foram significativos para FSD durante as 96 h de exposição. Porém, ocorreu um aumento significativo na hipoatividade a partir das 48 h e na letargia a partir das 72 h (**Tabela 4**), quando os peixes permaneciam imóveis, mesmo com a aproximação do observador, além de desequilíbrio, acompanhado de nado errático.

Já para o diesel (**Tabela 5**), apenas a perda da resposta de fuga não foi significativa, tendo os animais apresentado comportamento de irritabilidade, hipóxia, choque e forrageamento durante as 72 horas de experimento nas concentrações da FSD, enquanto os peixes expostos ao diesel apresentaram tais respostas somente nas primeiras horas. Foi observada uma maior intensidade na hipoatividade e letargia nas primeiras horas para a exposição do diesel.

A exposição de peixes aos hidrocarbonetos do petróleo pode gerar interferências no sistema reprodutor e anormalidades durante o desenvolvimento de embriões e larvas de peixes (KNUTZEN, 1995; MIDDAUGH *et al.*, 1998; CARLS; RICE; HOSE; 1999), alterações nas funções cardíacas, respiratórias e comportamentais (WIDDOWS; JOHNSON, 1988), efeitos imunotóxicos FOSSI *et al.* (1997), a exposição prolongada pode provocar a morte de células neurais ou mesmo alterações na síntese de neurotransmissores, podendo alterar diretamente

aquelas respostas, tornando o indivíduo e a população mais vulneráveis à predação (WEIS et al., 2000; WEIS et al., 2001).

Tabela 4. Comportamentos observados durante a condução do experimento de toxicidade da fração solúvel do diesel (FSD) em relação ao tempo para a espécie *Poecilia vivipara*. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Comportamento (%)	Tempo (hora)				
	2	24	48	72	96
Irritabilidade	50a	50a	50a	41,42a	0b
Hipóxia	30a	30a	22,5a	18,11a	0a
Hipoatividade	0a	0ab	16,5ab	23,61b	26,78bc
Agressividade	0a	0a	0a	0a	0a
Letargia	0a	0a	0ac	5,5ac	15,64bc
Nado errático	0a	0ac	19,00b	21,00bc	15,63b
Nado superfície	0a	0a	0a	0a	0a
Perda de fuga	0a	0a	0a	0a	0a
Choque	10a	10a	10,5a	13,5a	0a
Forragear	10a	20a	15a	22,17a	0a

Com o aumento no tempo de exposição à FSD e ao diesel para *Poecilia vivipara*, a irritabilidade se apresentou nas 96 h para a FSD e até as 48 h para o Diesel (**Figura 5**), justificado pelo aumento na letargia que apresentou um crescimento a partir das 48 h para FSD e para o diesel (**Figura 6**). Na hipoatividade, o aumento a partir das 24 h seguido por uma queda a partir das 48 h para FSD, já no diesel não houve diferença significativa (**Figura 7**). Houve um aumento no nado errático a partir das 24h para FSD, já na exposição ao diesel não houve diferença significativa (**Figura 8**). Houve um aumento no forrageamento nas concentrações de 2,5 e 5% de FSD e a partir das 72 h houve uma queda. Já para o Diesel, não houve diferença significativa (**Figura 9**). Na hipóxia, houve uma queda a partir das 48 h já para a agressividade houve um aumento, porém no diesel tanto para hipóxia quanto para a agressividade não houve diferença significativa (**Figuras 10 e 11**).

Tabela 5. Comportamentos observados durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) do diesel em relação ao tempo para a espécie *Poecilia vivipara*. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Comportamento (%)	Tempo (hora)				
	2	24	48	72	96
Irritabilidade	35a	19,61b	0ab	0ab	0a
Hipóxia	20a	14,28a	0a	0b	0a
Hipoatividade	15a	35,42a	50a	0a	0a
Agressividade	5a	0a	0a	0a	0a
Letargia	0a	5,55a	18,33a	0a	0a
Nado errático	20a	19,44a	0a	0a	0a
Nado superfície	35a	35,42a	55a	0a	0a
Perda de fuga	0a	0a	0a	0a	0a
Choque	10a	14,28	0	0	0a
Forragear	10a	0a	0a	0	0a

PIRES (2013) sugeriu que o comportamento de hipóxia é registrado quando ocorre um alto índice de animais com distúrbios de movimentação, ou houve alteração da comunicação entre as células nervosas e dessas com as fibras musculares; ou diminuição da quantidade de oxigênio disponível na corrente sanguínea.

A apatia, por sua vez, também pode estar relacionada à diminuição de níveis de oxigênio nos tecidos dos animais. Nesse sentido, é descrito que peixes expostos ao óleo diesel e FSD apresentam alterações branquiais, tais como, fusão lamelar e degeneração da musculatura dos arcos branquiais ROCHA *et al.* (2012).). Infere-se que tal processo acarretaria a diminuição da superfície de contato da água com as superfícies branquiais e redução da função das brânquias nas trocas gasosas, levando o animal a aumentar a frequência dos movimentos operculares e a diminuição da motilidade. Nesse sentido, as concentrações de O_2 dissolvido no sangue seriam reduzidas, tendo como consequência a diminuição do metabolismo cerebral e muscular.

Figura 5. Comportamento de irritabilidade observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) da FSD (acima) e do diesel (abaixo) em relação ao tempo para a espécie *Poecilia vivipara*.

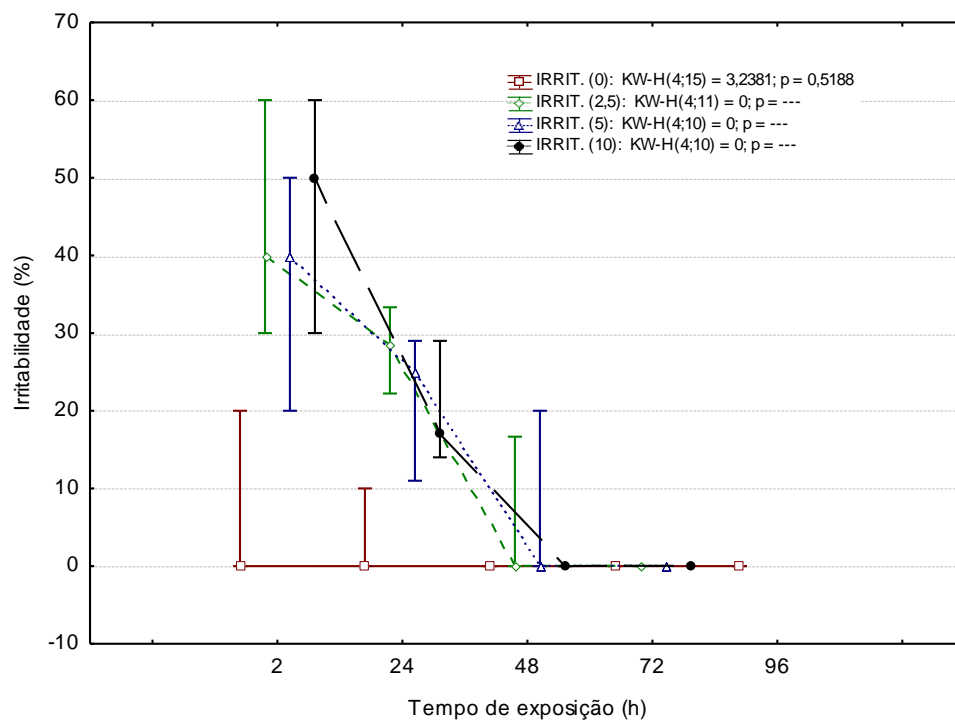
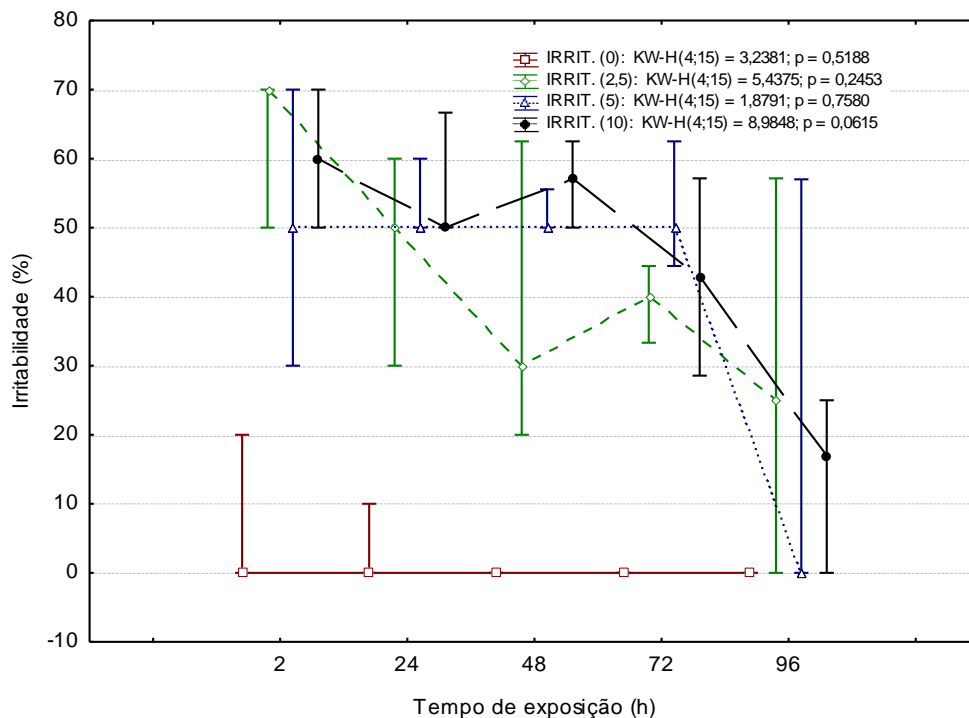


Figura 6. Comportamento de letargia observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) FSD (acima) e do diesel (abaixo) em relação ao tempo para a espécie *Poecilia vivipara*.

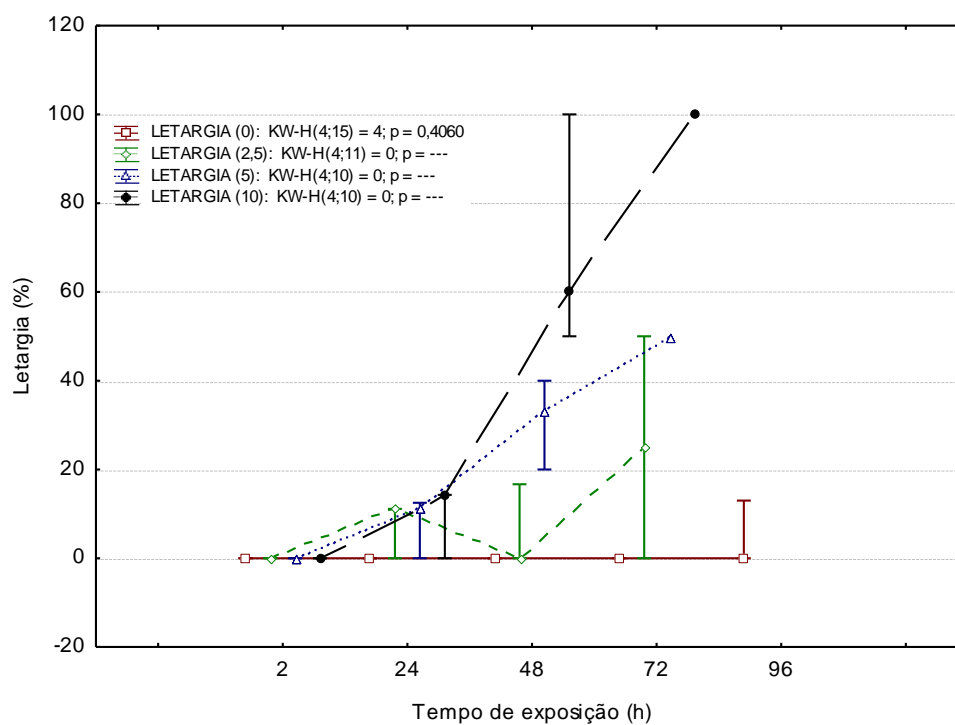
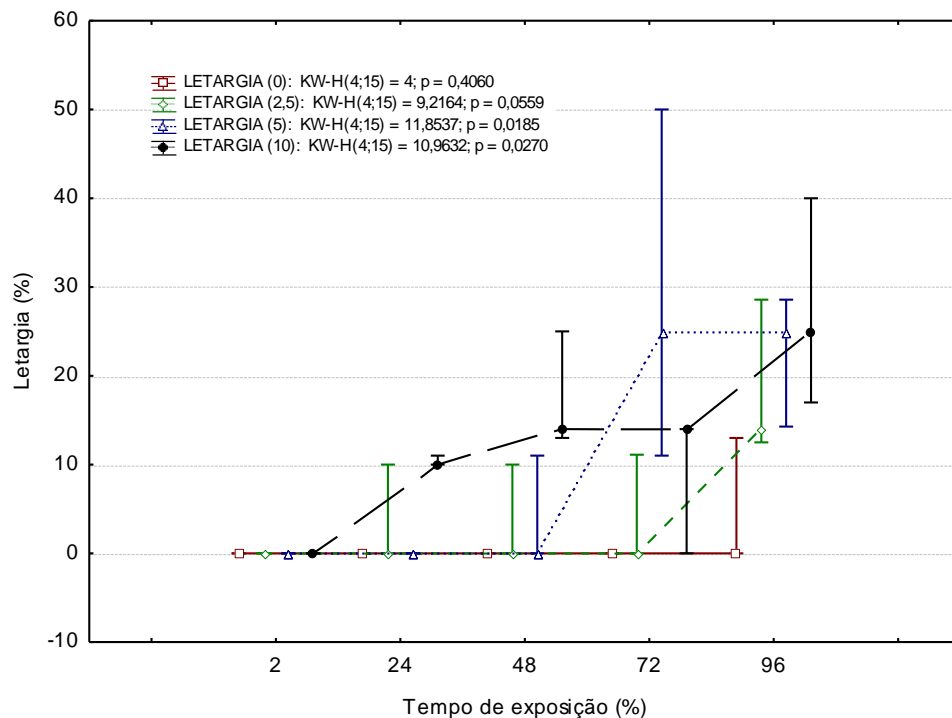


Figura 7. Comportamento de hipoatividade observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) FSD (acima) e do diesel (abaixo) em relação ao tempo para o peixe *Poecilia vivipara*.

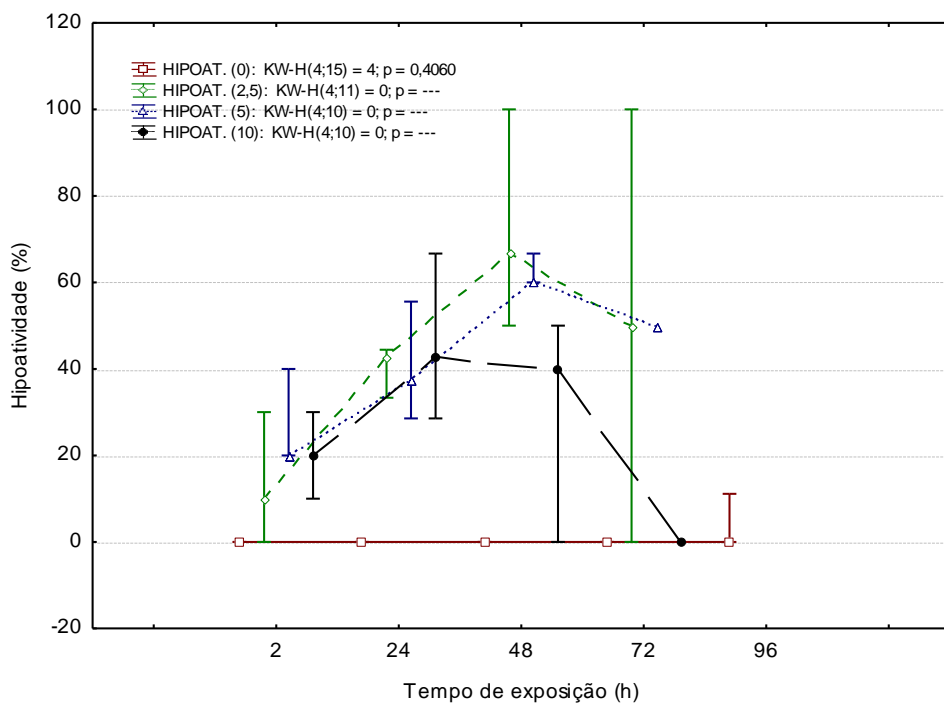
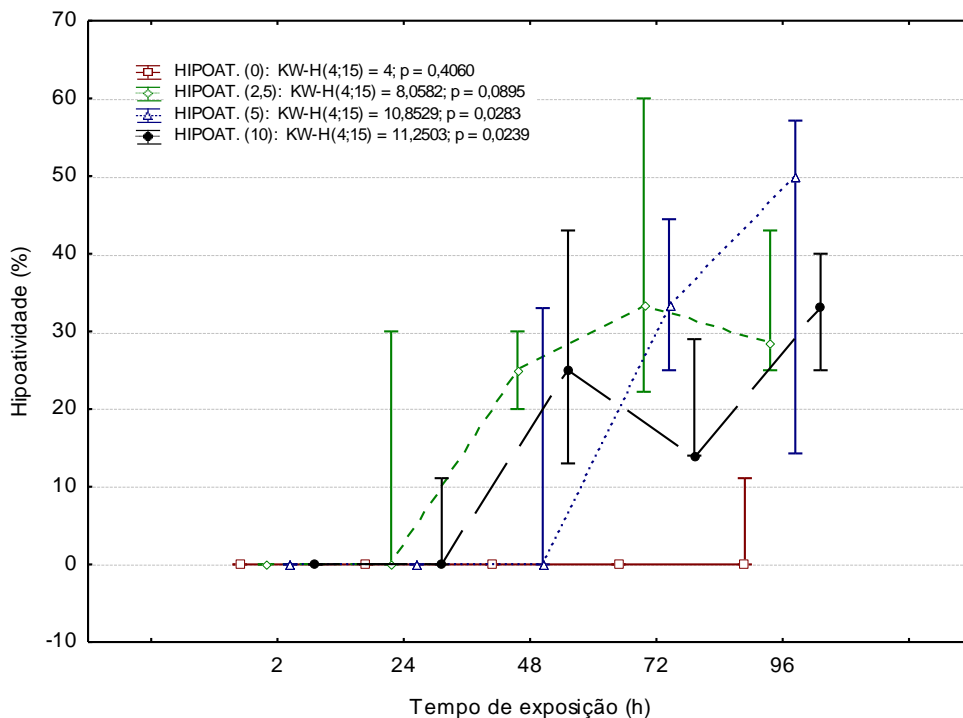


Figura 8. Comportamento de nado errático observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) FSD (acima) e do diesel (abaixo) em relação ao tempo para o peixe *Poecilia vivipara*.

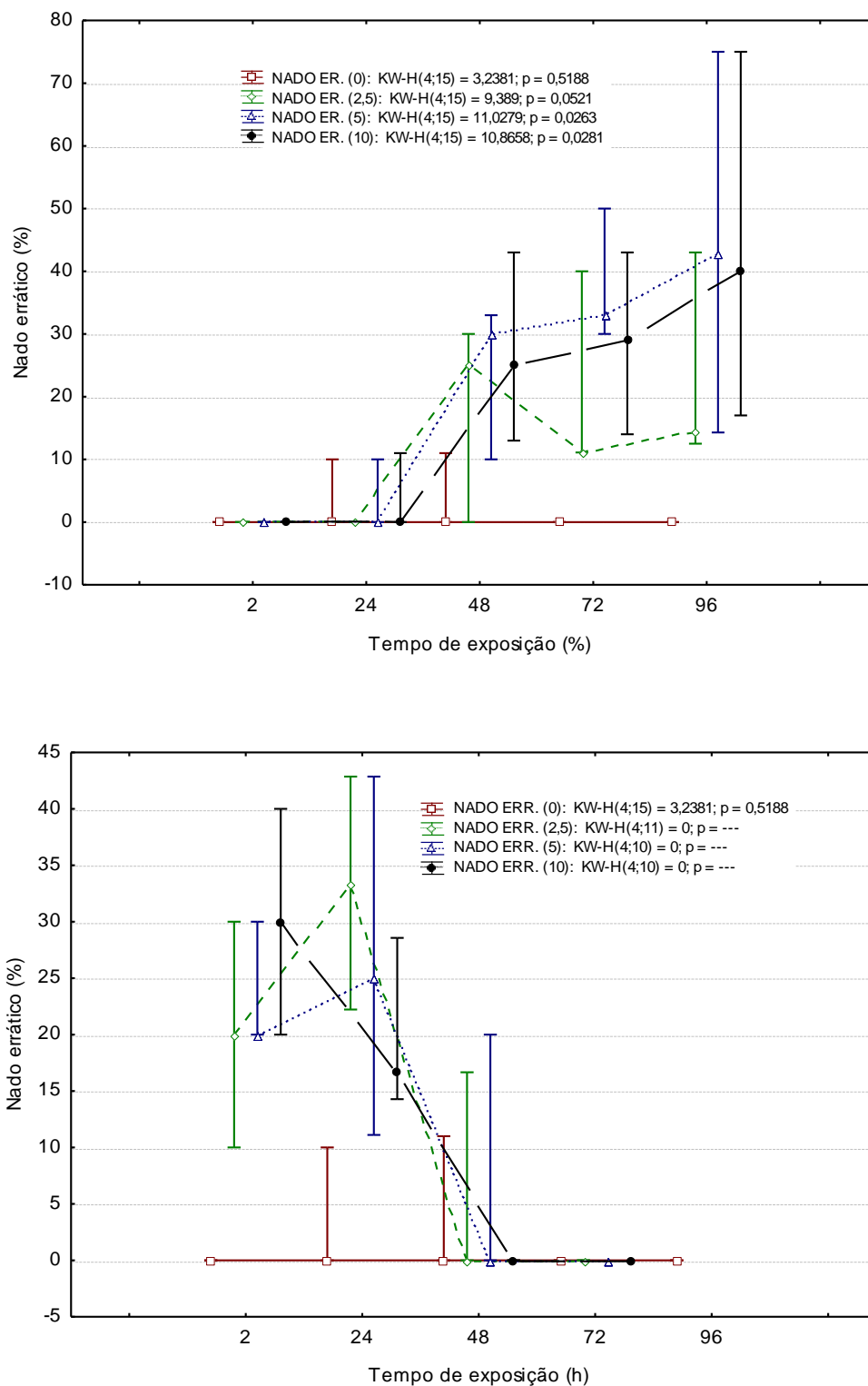


Figura 9. Comportamento de forrageamento observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) FSD (acima) e do diesel (abaixo) em relação ao tempo para a espécie *Poecilia vivipara*.

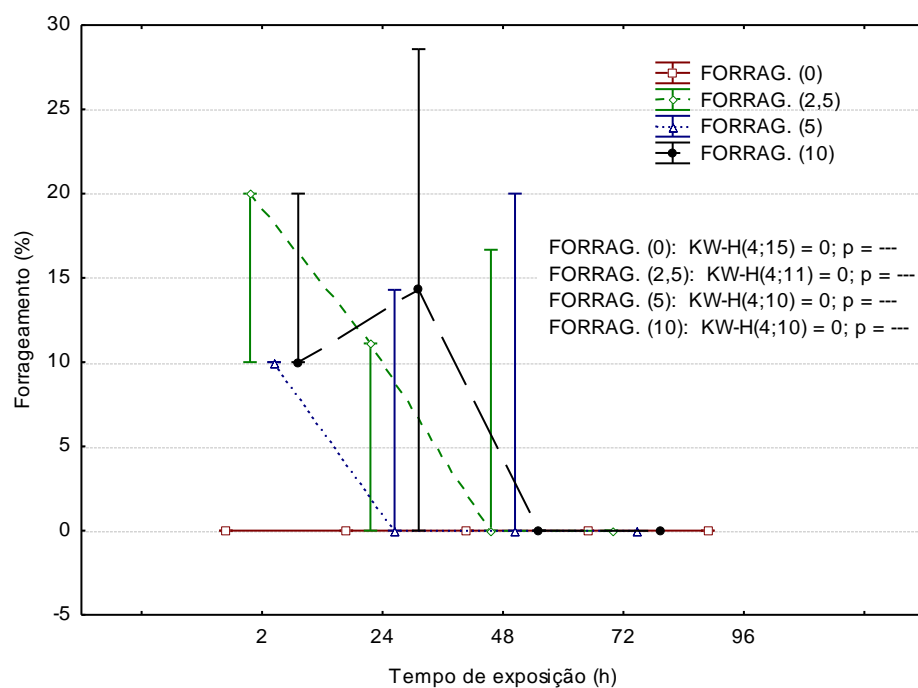
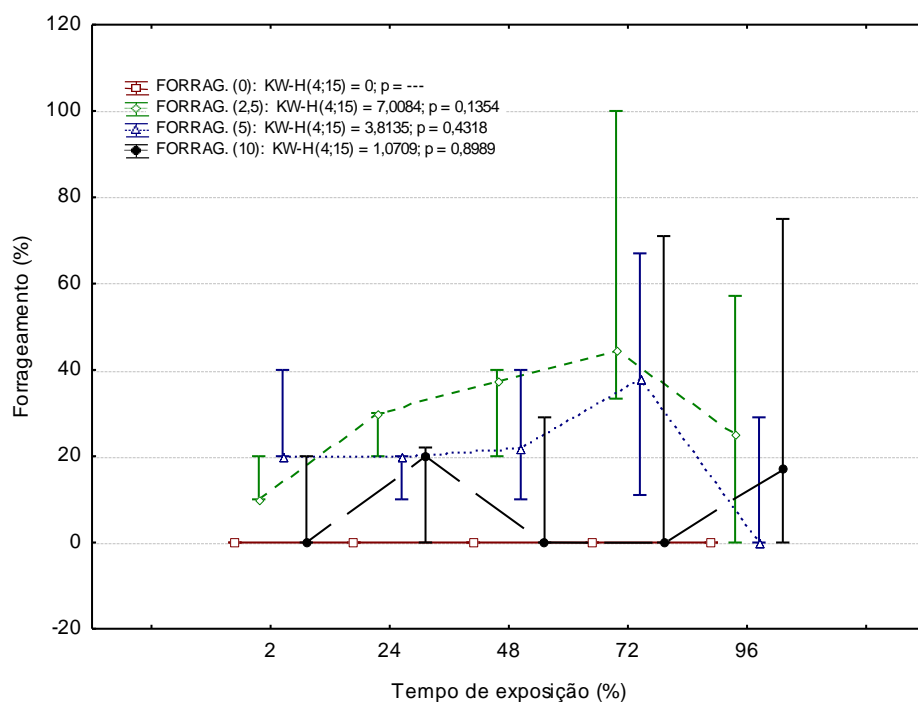


Figura 10. Comportamento de hipóxia observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) FSD (acima) e do diesel (abaixo) em relação ao tempo para o peixe *Poecilia vivipara*.

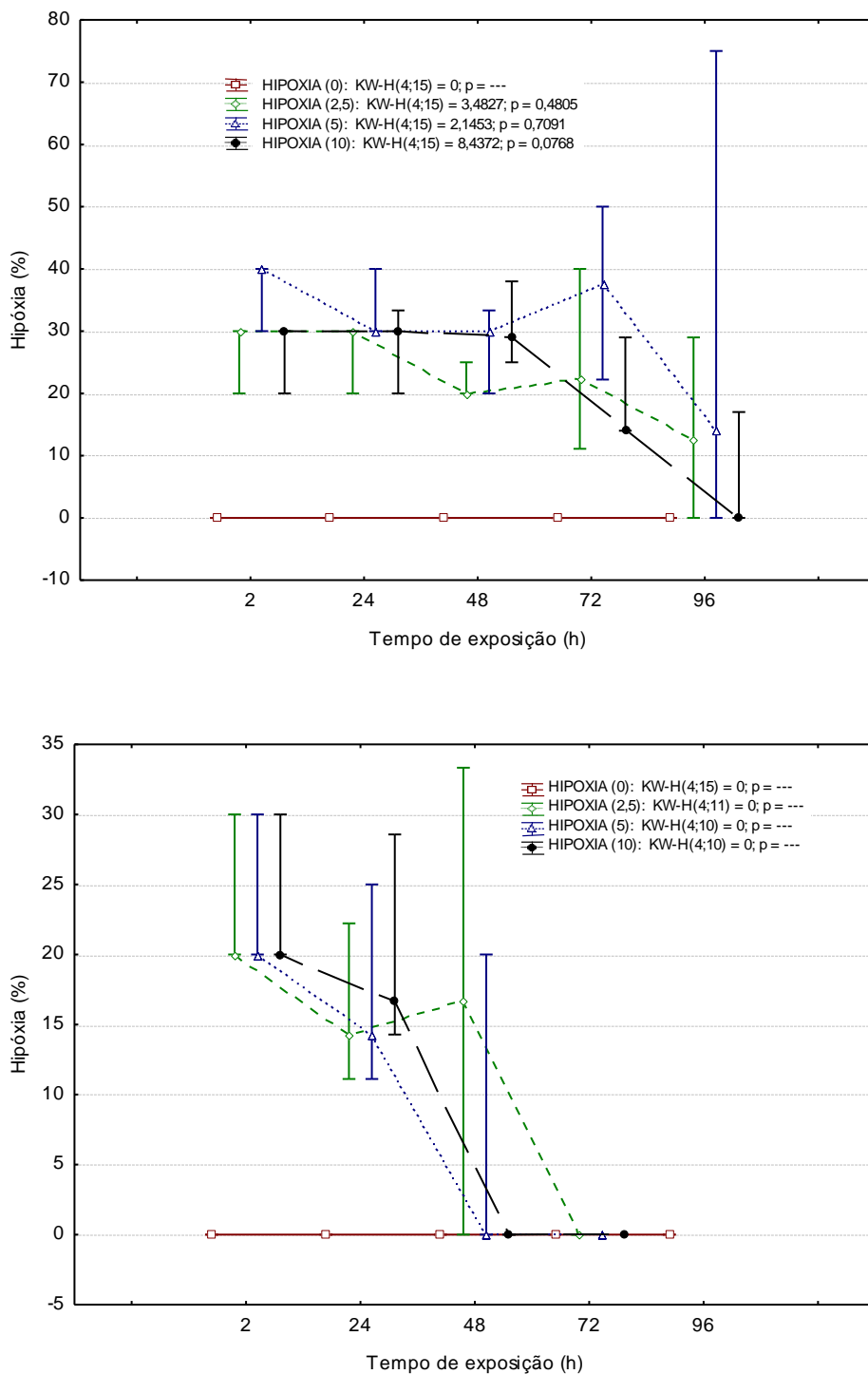
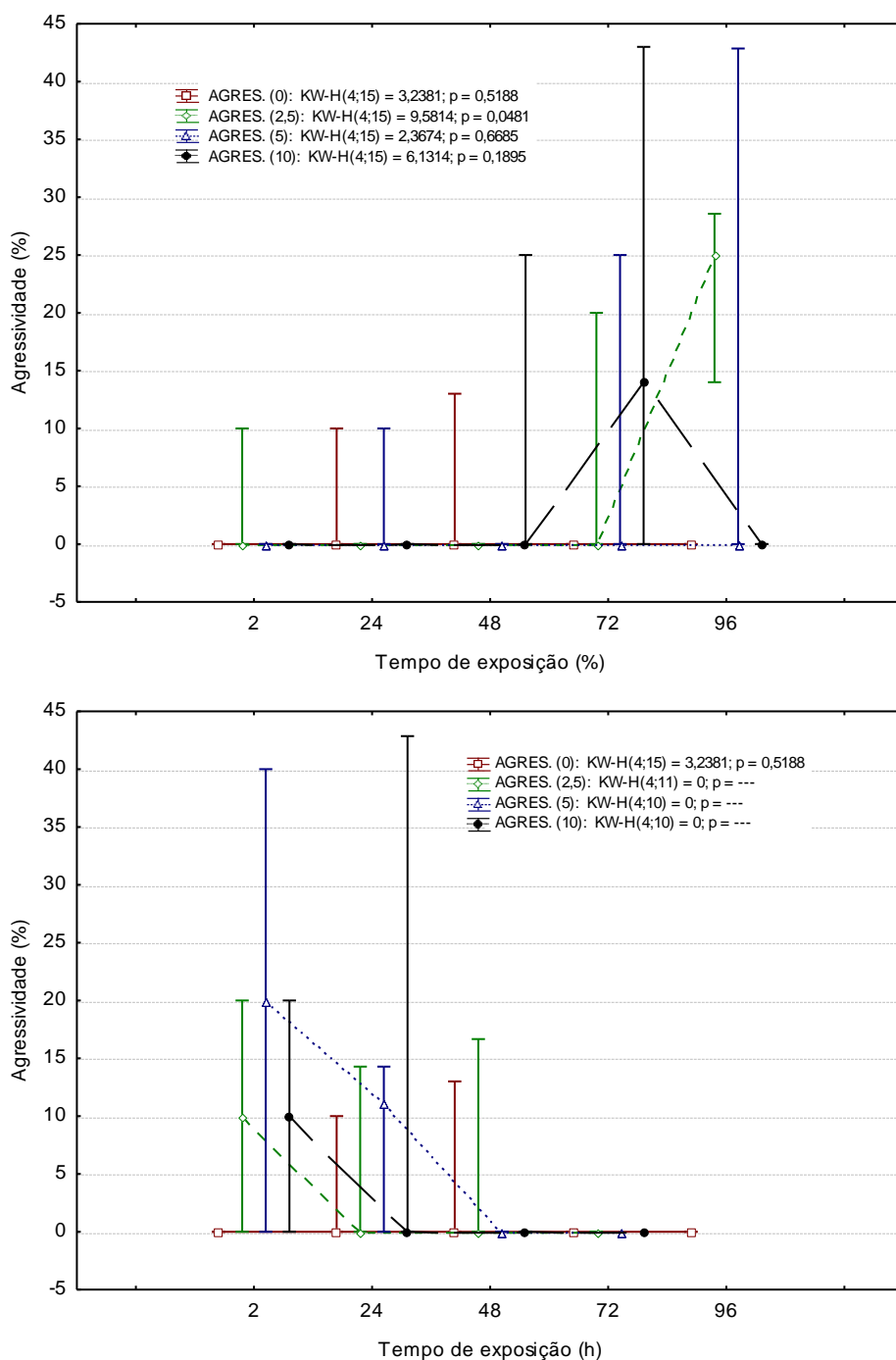


Figura 11. Comportamento de agressividade observado durante a condução do experimento de toxicidade aguda (96 horas) FSD (acima) e do diesel (abaixo) em relação ao tempo para o peixe *Poecilia vivipara*.



A hipotatividade natatória nos peixes leva a uma redução na taxa de alimentação, pela diminuição da taxa de encontro com as presas e diminuição do crescimento dos mesmos (WEIS, 1998). Os contaminantes ambientais podem causar várias alterações nestes processos,

desde aspectos relativos ao metabolismo dos peixes na disponibilização de energia, até à eficiência no comportamento de forrageio WEIS *et al.* (2003).

5. CONCLUSÕES

O presente estudo contribuiu com informações que reforçam a indicação da espécie *Poecilia vivipara* como organismo-teste para estudos comportamentais e toxicológicos. Os resultados apresentados indicam que o diesel e sua fração solúvel promoveram alterações significativas no comportamento da espécie, tendo as principais alterações observadas neste estudo sido relacionadas à movimentação (irritabilidade, hipoatividade e letargia), a distúrbios respiratórios (hipóxia e natação na superfície do aquário) e natatórios.

Com isso, concluímos que o óleo diesel interfere em aspectos comportamentais e na sobrevivência de *P. vivipara*, embora estudos complementares de parâmetro bioquímicos e histológicos sejam necessários para uma melhor avaliação dos impactos deste composto sobre os peixes em geral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERS, P. H. Petroleum and Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: HOFFMAN, D. J., B. A. RATTNER, G. A. BURTON AND J. CAIRNS. Handbook of Ecotoxicology. 2nd. New York: Lewis Publishers, 2003, 14, p.1315.
- AMARAL, M.C; BONECKER, A.C.T. ORTIZ, C.H.D. Activity Determination of Na⁺ K⁺ - ATPase and Mg⁺⁺ - ATPase Enzymes in the Gill of *Poecilia vivipara* (Osteichthyes, Cyprinodontiformes) in Different Salinities Brazilian Archives of Biology and Technology, v.44, n.1, p.1 - 6, 2001.
- ANDERSON JW, NEFF JM, COX BA, TATEM HE, HIGHTOWER GM. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Mar Biol* 1974; 27:75-88.
- ARAÚJO, F.G. et al. Distribution of guppies *Poecilia reticulata* (Peters, 1860) and *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) along a polluted stretch of the Paraíba do Sul River, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 69, p. 41-48, 2009.
- ARAÚJO, F.G. Adaptação do índice de integridade biótica usando a comunidade de peixes para o rio Paraíba do Sul. *Revista Brasileira de Biologia*. v.58, n.4, p.547-558, 1998.
- ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. FORSIN; ALBUQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M. MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12 (1) p.61-72, 2007.
- BARBIERI, E., V. N. PHAN & V. GOMES. 1998. Efeito do DSS, dodecil sulfonato de sódio, no metabolismo e na capacidade de natação de *Cyprinus carpio*. *Rev. Brasil. Biol.* 58 (2): 263-271.
- BARBIERI, E., V.N. PHAN, E GOMES. 2000. Efeito do LAS-C12, Dodecil Benzeno Sulfonato de Sódio Linear, na Taxa Metabólica e na Capacidade de Natação de *Cyprinus carpio*. *Ecotox. Environ. Rest.* 3(2): 69-75.
- BOTELHO, R.G.; SANTOS, J.B.; OLIVEIRA, T.A.; BRAGA, R.R.; BYRRO, E.C.M. Toxicidade aguda de herbicidas a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Planta daninha, viçosa*, v.27, n.3, p.621-626, 2009.

- BRASIL (1981) Lei Federal n. 6.939, de 31 de agosto de 1981. Define a Política Nacional do Meio Ambiente.
- BRAUNER, C.J.; BALLANTYNE, C.L.; VIJAYAN, M.M.; VAL, A.L. 1999. Crude oil exposure affects airbreathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 123: 127-134.
- BRESEGHELO, L. et al. Efeitos do fl uoreto de sódio no epitélio da brânquia do peixe Guaru (*Poecilia vivipara*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 41, n. 4, p. 274-280, 2004.
- BRIGANTE, J.; ESPINDOLA, E.L.G. Praguicidas no sedimento do rio Mogi-Guacu. In: BRIGANTE, J; ESPINDOLA, E.L.G. *Limnologia fluvial: Um estudo no rio Mogi-Guacu*. São Carlos: Rima, 2003. p.121-128.
- CARLS, M. G.; RICE, S. D.; HOSE, J. E. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacifi c herring (*Clupea pallasí*).*Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 18, n. 3, p. 481-493, 1999.
- CLARK, J., DICKSON, K., GIESY, J., LACKEY, R., MIHAICH, E., STAHL, R., ZEEMAN, M., 1999. Using reproductive and developmental effects data in ecological risk assessments for oviparous vertebrates exposed to contaminants, in: Di Giulio, R.T., Tillitt, D.E. (Eds.), *Reproductive and developmental effects of contaminants in oviparous vertebrates*. SETAC, Pensacola, Florida, U.S.A., pp. 366-401.
- COHEN, A., NUGEGODA, D. AND GAGNON, M. M. Metabolic Responses of Fish Following Exposure to Two Different Oil Spill Remediation Techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.48, 3, p.306-310, 2001.
- COHEN, A., GAGNON, M. AND NUGEGODA, D. Alterations of Metabolic Enzymes in Australian Bass, *Macquaria novemaculeata*, After Exposure to Petroleum Hydrocarbons. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.49, 2, p.200-205, 2005
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Água - Teste de Toxicidade aguda com peixe. Parte I – Normalização Técnica L 5.019-I CETESB, São Paulo: 1990.
- CONAMA, 2005. Resolução nº 357, de 17 de março. Diário Oficial da União.

- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova* [online], v.31, n.7, p. 1820-1830, 2008.
- DAL PONT, Giorgi. Toxicidade do óleo diesel para o peixe *Astyanax altiparanae*. Dissertação (Especialização em Ciências Veterinárias)–Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- DAVISON, W., FRANKLIN, C.E., MCKENZIE, J.C., DOUGAN, M.C.R. The effects of acute exposure to the water soluble fraction of fuel oil on survival and metabolic rate of an Antarctic fish (*Pagothenia borchgrevinki*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1992; 102C: 185-188
- DIAS, A. E. X. O. (2000) Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos. In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M. (Org.) *Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 142 p.
- DRUMMOND, R.A., W.A. SPOOR E F.F. OLSON. 1973. Some Short-term indicators of sublethal effects of copper on brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *J.Fish. Res. Board Can.* 30: 698-701.
- ERICKSON, R.J., NICHOLS, J.W., COOK, P.M., ANKLEY, G.T., 2008. Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems, in: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), *Toxicology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 9-54.
- FILHO, A.M.S. Planos Nacionais de Contingencia para Atendimento a Derramamento de Óleo: Análise de Países Representativos das Américas para Implantação no Caso do Brasil. 2006. 217 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Planejamento Ambiental) - Curso de Pós-graduação em Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- FOSSI, M. C. ET AL. Use of nondestructive biomarkers and residue analysis to assess the health status of endangered species of pinnipeds in the South West Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*, v. 34, n. 3, p. 157-162, 1997.
- FREEDMAN, B. 1989. *Environmental ecology: The impacts of pollution and other stresses on ecosystem structure and function*. Academic Press, San Diego. 424pp.

- FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE DE SANTA CATARINA. Testes ecotoxicológicos, métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289 p.
- GAGNON, M. M. AND HOLDWAY, D. A. Metabolic Enzyme Activities in Fish Gills as Biomarkers of Exposure to Petroleum Hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.44, 1, p.92-99, 1999.
- GUADALUPE MENICONI, M. D. F., TEREZINHA GABARDO, I., ROCHA CARNEIRO, M. E., MARIA BARBANTI, S., CRUZ DA SILVA, G. AND GERMAN MASSONE, C. Brazilian Oil Spills Chemical Characterization--Case Studies. *Environmental Forensics*, v.3, 3-4, p.303-321, 2002.
- HARAYASHIKI, C. A.Y., JUNIOR, A. S. V. , MACHADO, A. A. S.CABRERA, L.C., PRIMEL, E. G., BIANCHINI, A. CORCINI, C. D., 2013. *Aquat. Toxicol.*, 142–143 (15): 176–184
- HAMOUTENE, D.; PAYNE, J. F.; RAHIMTULA, A.; LEE, K. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, v. 54, p. 471– 474, 2002.
- HEATH, A.G., 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*, 2nd Ed ed. Lewis Publishers.
- HUTZINGER, O. & VERCAMP, W. (1981). Microbial degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds. London: Academic press. ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M.J. et al. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 27, p. 447-486, 2006.
- JOHNSON, R. K.; WIEDERHOLM, T. & ROSENBERG, D. M., 1993. Freshwater biomonitoring using individual organisms, populations, and species assemblages of benthic macroinvertebrates. In: *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates* (D. M. Rosenberg & V. H. Resh, ed.), pp. 40-158, New York: Chapman & Hall.
- JUNQUEIRA, M. V., Amarante, M. C., Dias, C. F. S. & França, E. S. 2000. Biomonitoramento da qualidade das águas da Bacia do Alto Rio das Velhas (MG/Brasil) através de macroinvertebrados. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 12: 73-87.
- KENNISH, M.J. *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects*. Londres: CRC Press, 1992. 494 p. KEPLER, C.; RINGWOOD, A. H. Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters,

- Crassostrea virginica: seasonal and pollutant related effects. *Aquatic Toxicology*, v. 54, p. 195-204, 2001.
- KNUTZEN, J. Effects on marine organism from polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and other constituents of waste water from aluminum smelters with examples from Norway. *Science of the Total Environment*, v. 163, n. 5, p. 107-122, 1995.
- LIVINGSTONE, D.R. Biotechnology and Pollution Monitoring - Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 57, p. 195-211. 1993.
- LITTLE, E.E., FINGER, S.E., 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 13–19.
- MAGALHÃES, D.P.; FILHO, A.S.F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* v.12, n.3, p. 355-381, 2008.
- MARCUCELLA, H., ABRAMSON, C.I., 1978. Behavioral toxicology and teleost fish. In: Mostofsky, D.J. (Ed.), *The Behavior of Fish and Other Aquatic Animals*. Academic Press, London, UK, pp. 33–77.
- MENDONÇA, J.P., ANDREATA, J.V., 2001. Aspectos reprodutivos de *Poecilia vivipara* (Bloch & Schneider) (Poeciliidae) da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 18, 1041-1047.
- MIDDAUGH, D. P. et al. Preliminary observation on responses of embryonic and larval Pacific herring, *Clupea pallasii*, to neutral fraction biodegradation products of weathered Alaska North Slope oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 34, n. 2, p. 188-196, 1998.
- MYSLINSKI, E. AND GINSBURG, W.: 1977, *J. Amer. Water Works Assoc.*, October, 538–544.
- NASCIMENTO, R. S. S.; GURGEL, H. de C. B. Estrutura populacional de *Poecilia vivipara* Bloch & Schneider, 1801 (Atheriniformes, Poeciliidae) do rio Ceará-Mirim - Rio Grande do Norte. *Acta Scientiarum*, v.22, n.2, p.415-422, 2000.
- NEFF, J.M. 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbon in the aquatic environment: sources, fates and biological effects. Applied Science Publishers, London. 262pp.
- NEFF, J.M. Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water Amsterdam. The Netherlands: Elsevier Science Publishers, 2002. 452 p.

- NEFF, J.M.; STOUT, S.A.; GUNSTER, D.G. Ecological risk assessment of PAH in sediments: Identifying sources and ecological hazard. *Integrated Environmental Assessment and Management*, v. 1, p. 22-33, 2005.
- NEWMAN, M.C.; UNGER, M.A. *Fundamentals of Ecotoxicology*, 2. ed., Lewis Publishers, EUA, p. 33-34; p. 75-93; p. 113-129, 2003.
- NOMURA, H. *Dicionário de peixes do Brasil*. Brasília: Editerra. 1984.
- OCCUPATIONAL SAFETY & HEALTH ADMINISTRATION – OSHA. Material Safety Data Sheet : Number ACPA 0003: Polyethylene Homopolymers. 2005. New Jersey, USA.
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; PELLETIER, E.; PFEIFFER, W.C e ROULEAU, C. 2000.Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and Nordic freshwater fish. *Environmental Research Section A*, 83: 286-292.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, Endocrine, and Genetic Responses of *Anguilla anguilla* L. to Petroleum Distillate Products and Environmentally Contaminated Waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 49, p. 64-75,2001a. PAGE, D.S.; BOEHM, P.D.; DOUGLAS, G.S.; BENCE, A.E.;
- PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SHENEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. *Ecotoxicologia e avaliação de risco do Petróleo*. Série Cadernos de Referência Ambiental, Salvador-BA, v. 12, p. 229, 2002.
- PIRES, F.S.2013. *Disrupção endócrina em testículos de Poecilia reticulata causada pelo herbicida Glifosato*. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal de Goiás. Goiânia.
- RAMADE, F. 1977 *Ecotoxicologie*. Masson, Paris, France, 205p.
- RAND, G.M.& PETROCELLI, S.R. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Hemisphere Publishing Corporation, Washington.61p.
- RAND, G.M.; WELLS, P.G. AND MCCARTY, L.S. 1995. *Introdution to aquatic toxicology*. In: RAND, G.M., 2008. *Fish Toxicity Studies*, in: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A., pp. 659-681.

- ROBERTO, S., ABREU, R.M. Utilidade dos indicadores de qualidade das águas. Ambiente. v.5, n.1, 1991.
- ROCHA, T.L. Biomarcadores comportamentais, histopatológicos e proteômicos da toxicidade aguda da formulação comercial do herbicida glifosato em *Poecilia reticulata*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia – ICB – UFG, 2012
- RODRIGUES, L.H.R., ARENZON, A., RAYA-RODRIGUESZ, M.T., FOUNTOURA, N.F., 2003. Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de ensaios de toxicidade crônica. *Biociências* 11, 137-144.
- RODRIGUES RV, KC MIRANDA-FILHO, EP GUSMÃO, CB MOREIRA, LA ROMANO & LA SAMPAIO. 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci. Total. Environ*, 408: 2054-2059.
- ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. (Ed.). *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. New York: Chapman and Hall, 1993. p. 195-233.
- SAGLIO, P.; TRIJASSE, S. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch. Environmental Contamination and Toxicology*. v.35, p.484-491, 1998.
- SAEED, T.; MUTAIRI, M. A. Chemical Composition of the Water Soluble Fraction of Leaded Gasoline in Seawater. *Environment International*, v. 25, p.117-129, 1999.
- SABÓIA-MORAES, S.M.T.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J; MOTA, D.L.; BITTENCOURT, A.M. Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryhaline fish *Poecilia vivipara*. *Journal of Fish Biology*, v.49, p.545-548, 1996.
- SARIKAYA, R. E Y. MEHMET. 2003. Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). *Chemosphere*. 52(1): 1195-201.
- SCHVARTSMAN, S. *Intoxicações agudas*. 4, ed. Sao Paulo: Sarvier, 1991.
- SCOTT, G.R., SLOMAN, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369-392.

- SNELSON, F. F. JR .1989. Social and Environmental Control of Life History Traits in Poeciliid Fishes. In: Snelson, F. F.Jr & Meffe, G. K. eds. Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae). New Jersey: Prentice Hall. p. 149–161.
- SIMONATO, J.D.; GUEDES C.L.B.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel .. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 69, p. 112-120, 2008.
- SISINNO, C.L.S.; NETTO, A.D.P.; REGO, E.C.P. & LIMA, G.S. 2003. Hidrocarbonetos policíclicos Aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. *Caderno de Saúde Pública*, 19(2): 671-676.
- STEPHAN, C.E.; MOUNT, D.I. 1973. Use of toxicity tests with fish in water pollution control. In, *Biological Methods for the Assessment of Water Quality*, ASTM STP 528. Am. Soc. Testing and materials. Philadelphia, Pa.
- TIBURTIUS, E.R.L. et al. Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. *Química Nova*, v. 28, p. 61-64, 2005.
- VANZELLA, T.P.; MARTINEZ, C.B.R.; COLUS, I.M.S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 631, p. 36-43, 2007.
- VIGNIER, V.; VANDERMEULEN, J.H.; FRASER, A.J. 1992. Growth and Food Conversion by Atlantic Salmon Parr during 40 Days' Exposure to Crude Oil. *Transactions of the American Fisheries Society* , 122: 322-332.
- WALKER, C.H. et al. *Principles of Ecotoxicology*. Londres: Taylor & Francis, 1996. 321 p.
- WANG, Z. et al. *Characteristics of Spilled Oils, Fuels, and Petroleum Products: Composition and Properties of Selected Oils*. North Carolina: United States Environmental Protection Agency, 2003. 286 p.
- WEIS, J.S.; SMITH, G.; ZHOU, T.; SANTIAGO-BASS, C.; WEIS, P. 2001. Effects of Contaminants on Behavior: Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences. *BioScience* , 51: 209-217.

- WEIS, J.S.; SMITH, G.M.; SANTIAGO-BASS, C. 2000. Predator/prey interactions: a link between the individual level and both higher and lower level effects of toxicants in aquatic ecosystems. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 7: 145-153.
- WIDDOWS, L.; JOHNSON, D. Physiological energetic of *Mytilus edulis*: scope for growth. *Marine Ecology Progress Series*, v. 46, p. 113-121, 1988.
- WINKALER, E. U.; SILVA, A. G. : GALINDO, H. C.: MARTINEZ, C. B. R Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum, Maringá*, v. 23, n. 2, 507 – 514p. mar. 2001.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1983. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, chemical environmental and experimental data, 32. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Pp 477.
- WOODWARD, D.F., E.E. LITTE E L.M. SMITH, L.M. 1987. Toxicity of live shale oils to fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Cantam. Toxicol.* 16: 239-248.
- ZAGATTO, P. Z. & BERTOLETTI, E. (ed.). *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*. São Carlos BR: Rima Editora. 2006. 464p.