

Karina Fernandes Oliveira Rezende

Efeitos da concentração subletal da fração solúvel em água (FSA) de petróleo em parâmetros do sistema imune inato e hepáticos do peixe marinho *Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766)

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2015

Karina Fernandes Oliveira Rezende

Efeitos da concentração subletal da fração solúvel em água (FSA) de petróleo em parâmetros do sistema imune inato e hepáticos do peixe marinho *Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766)

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

Versão original

São Paulo  
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rezende, Karina Fernandes Oliveira.

Efeitos da concentração subletal da fração solúvel em água (FSA) de petróleo em parâmetros do sistema imune inato e hepáticos do peixe marinho *Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766) / Karina Fernandes Oliveira Rezende. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Ecotoxicologia, com ênfase em alterações celulares e histológicas e atividade enzimáticas.

Versão do título para o inglês: Effects of sublethal concentration of water-soluble fraction (WSF) of petroleum on parameters of the innate immune system and hepatic of marine fish *Rachycentrum canadum* (LINNAEUS, 1766).

1. Peixe 2. Leucócitos 3. Enzimas 4. Alterações histológicas I. Silva, Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0133/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Karina Fernandes Oliveira Rezende.

Título da Tese: Efeitos da concentração subletal da fração solúvel em água (FSA) de petróleo em parâmetros do sistema imune inato e hepáticos do peixe marinho *Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766).

Orientador(a): Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

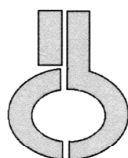
Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

---

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **124** nas fls. **109** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **José Roberto Machado Cunha da Silva**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) nos sistemas imune e de biotransformação de beijupirás, Rachycentron canadum(Linnaeus,1766)*" do qual participam o(s) aluno(s) **Karina Fernandes Oliveira Rezende**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)* em **04.11.2011, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 07 de novembro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador  
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER  
Secretário  
CEUA – ICB/USP

Aos meus pais (Fátima e Edélcio),  
irmãos (Cíntia e Danilo) e familiares  
pelo carinho e apoio...

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva, pela convivência e ensinamentos que foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional, desde a iniciação científica até o doutorado. Agradeço por todas as oportunidades a mim oferecidas ao longo desses anos, experiências únicas que levarei por toda a minha vida.

Aos meus colegas/ amigos do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva: Alfonso, Ana Paula, Andrews, Camila, Débora Figueiredo, Débora Gidali, Douglas, Emília, Gabriel, Iury, Joana, João, Juliana Justino, Juliana Moraes, Leandro, Lígia, Luciana Dzik, Luciana Sato, Paola, Renan, Renata, Ricardo, Tânia, Vanessa Agüero, Vanessa Rebelo, Willian, Yoel, que ao longo desses anos foi uma grande família, agradeço por toda a convivência, amizade e apoio.

Aos colaboradores do projeto, Dra. Joana Mona e Pinto, MSc. Gabriel Marcelino da Silva Neto, Dra. Lígia Maria Salvo, Dr. Divinomar Severino e Juliana Cristina Teixeira de Moraes pela troca de experiência e a ajuda em cada etapa.

À Emília Ribeiro, técnica de laboratório, por me ajudar na preparação de todas as soluções utilizadas nesse projeto, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Centro de Biologia Marinha (CEBIMar- USP) pela parceria e apoio na execução desse projeto (projeto cadastrado nº 2011/20).

Ao Centro Petroquímico da Petrobrás, Terminal Marítimo Almirante Barroso (TEBAR), São Sebastião- SP, pela doação das amostras de petróleo essenciais para a execução desse projeto.

À Dra. Claudia Kerber, da estação de Piscicultura ME de Ilha Bela, litoral Norte do estado de São Paulo- Brasil, pelo fornecimento dos animais.

Aos professores Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender (ICB-USP) e Dr. Francisco Javier Hernandez-Blazquez (FMVZ-USP) por disponibilizar seus laboratórios para desenvolver parte desse projeto.

Aos professores Dr. José Cesar Rosa Neto (ICB-USP), Dr. Alexander Turra (IO-USP) e Dr. José Roberto Kfoury (FMVZ- USP) por toda a ajuda e conselhos no exame de qualificação, na qual foi essencial para a finalização desse projeto.

Ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento (ICB- USP) pela oportunidade de desenvolver o doutorado, a todos os professores pela ajuda indispensável e a todos os alunos da pós- graduação pela amizade, em especial ao Felipe, Renata e Katrin.

Aos secretários do Departamento de Biologia Celular e Tecidual; Celiana, Paulo, Eloise e Ana Lúcia; por toda ajuda na parte burocrática. Em especial a secretária da pós-graduação Regina Valbom, por trabalhar sempre com muito profissionalismo, dedicação e amor, por toda a ajuda e, principalmente, por sua amizade.

Ao Professor Edison Barbieri, do Instituto de Pesca, pela amizade e a ajuda indispensável na finalização dessa tese.

Ao meu amigo Gabriel, pela sua amizade, conselhos e apoio em todos os momentos do doutorado.

Às melhores amigas de laboratório, Joana e Luciana, pela grande amizade por nós construída ao longo desses anos e que durará para toda a vida.

A todos meus amigos queridos, que são irmãos que escolhi ao longo da minha vida e que sempre estiveram e estarão ao meu lado.

Aos meus pais (Fátima e Edélcio), aos meus irmãos (Cíntia e Danilo) e aos meus cunhados (Mariana e Alexandre) por acreditarem no meu sonho e lutarem comigo. A todos os meus primos, tios e avôs que são a base da minha vida. Melhor família não há.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior- CAPES, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (2011/18220-1) e à NAP-Photo Tech - Núcleo de Apoio à Pesquisa em Tecnologia Fotoquímica- IQ/USP (FAPESP: 2010/50547-8) pelos apoios financeiros.

Sou muito grata por todos que fazem parte da minha vida. MUITO OBRIGADA!



"Muitas pessoas devem a grandeza de suas vidas aos problemas e obstáculos que tiveram de vencer"

(Robert Baden- Powell)

## RESUMO

REZENDE, K. F. O. **Efeitos da concentração subletal da fração solúvel em água (FSA) de petróleo em parâmetros do sistema imune inato e hepáticos do peixe marinho *Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766)**. 2015. 76 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O petróleo é um produto natural derivado da decomposição da matéria orgânica. Com o aumento da exploração, produção e transporte de petróleo, a ocorrência de derramamento por acidente no ambiente marinho tornou-se rotineira. Após o derramamento, ocorrem diversos processos físicos, químicos e biológicos que resultam na formação da fração solúvel em água de petróleo, ricos em hidrocarbonetos, que são moléculas tóxicas aos peixes. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da concentração subletal de 0,3 ppm da FSA de petróleo em parâmetros do sistema imune inato e hepático de *Rachycentron canadum* após o período de 7 e 14 dias. Utilizou-se, após o teste de normalidade, a análise estatística ANOVA seguido Tukey HSD (diferença estatística:  $p < 0,05$ ). Observou-se uma diminuição do fator de condição dos animais expostos por um período de 14 dias, comparado aos animais controles. A contagem diferencial de leucócitos mostrou um aumento do número de leucócitos totais após 7 dias, e uma diminuição destes após 14 dias de exposição. Conseqüentemente, há uma diminuição do número de eritrócitos em 7 dias e um aumento após 14 dias. A atividade da enzima lisozima nos animais do grupo exposto por 14 dias foi maior em comparação aos animais do grupo controle. Foram observadas, ainda, alterações nos tecidos branquiais, renais e hepáticos, após análises morfométricas e histológicas nos animais expostos à FSA de petróleo por 7 e 14 dias. Notou-se um aumento do índice hepatossomático e da atividade da enzima aspartato aminotransferase dos animais expostos por 7 e 14 dias. Em contrapartida, não foi observada atividade da enzima alanina aminotransferase em todos os grupos. Conclui-se que a concentração subletal de 0,3 ppm da FSA de petróleo altera parâmetros do sistema imune inato e hepáticos de *Rachycentron canadum*, podendo causar imunossupressão e comprometimento do sistema de biotransformação. Este estudo permite um monitoramento ambiental mais eficiente no litoral brasileiro.

**Palavras-chave:** Peixe. Leucócitos. Enzimas. Alterações histológicas.

## ABSTRACT

REZENDE, K. F. O. **Effects of sublethal concentration of water-soluble fraction (WSF) of petroleum on parameters of the innate immune system and hepatic of marine fish *Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766)**. 2015. 76 f. Ph.D. thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Petroleum is a natural product derived from the decomposition of organic matter. With increasing exploration, production and transportation of petroleum, the spill accident occurrence in the marine environment has become routine. After the shedding occur various physical, chemical and biological processes that result in the water-soluble fraction formation of petroleum, rich in hydrocarbon, molecules that are toxic to fish. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of sublethal concentration of 0.3 ppm of WSF of petroleum on parameters of the innate immune system and hepatic of *Rachycentron canadum*, after the periods of 7 and 14 days. It was used after the normality test, statistical analysis ANOVA followed by Tukey HSD (significant difference:  $p < 0.05$ ). It was observed a decrease in condition factor of animals exposed for period of 14 days compared to control animals. The differential leukocyte count showed an increased number of total leukocytes after 7 days and decreased after 14 days of exposure. Consequently, there is a decrease in the number of erythrocytes in 7 days and an increase after 14 days. The activity of the lysozyme enzyme in animals of group exposed for 14 days was higher compared to the animals of control group. There were, also, changes in gill, kidney and liver tissues after morphometric and histological analysis in animals exposed to WSF of petroleum for 7 and 14 days. It was noted an increase of the hepatosomatic index and aspartate aminotransferase enzyme activity of animals exposed for 7 and 14 days. In contrast, it was not observed activity of the enzyme alanine aminotransferase in all groups. It was concluded that the sublethal concentration of 0.3 ppm of the WSF of petroleum alters parameters of the innate immune system and hepatic of *Rachycentron canadum* that may cause immunosuppression and biotransformation system impairment. This study allows more efficient environmental monitoring on the Brazilian coast.

**Keywords:** Fish. Leukocytes. Enzymes. Histological changes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Consumo mundial de petróleo (em milhões de barris por dia) dividido em regiões, durante o período de 1989 e 2014.....	21
<b>Figura 2.</b> Reservas mundiais provadas, dividido em regiões, no ano de 1994, 2004 e 2014.....	22
<b>Figura 3.</b> Produção mundial de petróleo (em milhões de barris por dia) dividido em regiões, durante o período de 1989 e 2014.....	23
<b>Figura 4.</b> Incidência de grandes derramamentos (> 700 toneladas) por operação na hora do incidente e principal causa no período de 1970-2014.....	24
<b>Figura 5.</b> Ilustração dos fenômenos envolvidos no processo de intemperismo de uma mancha de óleo espalhada sobre a água do mar.....	25
<b>Figura 6.</b> Mapa de ocorrência mundial natural de <i>Rachycentron canadum</i> . As diferentes cores significam as probabilidades relativas de ocorrência.....	27
<b>Figura 7.</b> Esquema da ação da enzima AST que catalisa a transferência de aspartato para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato, reduzindo a malato por ação da MDH.....	32
<b>Figura 8.</b> Esquema da ação da enzima ALT que catalisa a transferência de alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato, reduzindo a lactato por ação da LDH.....	32
<b>Figura 9.</b> Espécie <i>Rachycentron canadum</i> utilizada como bioindicadora na exposição à FSA de petróleo.....	37
<b>Figura 10.</b> Espectros de excitação (nm) em função da fluorescência (u.a) de HPA na amostra da FSA de petróleo e da água do mar.....	45
<b>Figura 11.</b> Extensão sanguínea de <i>Rachycentron canadum</i> . Observa-se uma maior proporção de eritrócitos em relação a leucócitos no grupo controle (a) do que o grupo exposto à FSA (b). Em detalhes, eritrócitos (c), leucócitos granulócitos (d) e leucócitos agranulócitos (e). Escala de 10 µm.....	46
<b>Figura 12.</b> Médias (± D.P.) de eritrócitos e leucócitos (granulócito e agranulócito) de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias (letras diferente=diferença estatística significante).....	47

**Figura 13.** Fotomicrografia de corte histológico em parafina das lamelas secundárias das brânquias de *Rachycentron canadum*. a. Controle- 7 dias. O triângulo indica capilar sanguíneo, a seta fina indica células pilares, a seta grossa indica células epiteliais lamelares, o círculo indica células epiteliais na base da lamela secundária e o asterisco indica a lamela primária. Coloração hematoxilina e eosina. b. FSA- 7 dias. Setas indicam células de muco ao longo das lamelas secundárias. Coloração PAS. c. FSA- 7 dias. Setas indicam células de cloreto ao longo da lamela secundária. Coloração hematoxilina e eosina. d. FSA- 7 dias. Seta indica hiperplasia das células epiteliais na base da lamela secundária. Coloração hematoxilina e eosina. e. FSA- 14 dias. Seta indica fusão lamelar no topo da lamela secundária. Coloração hematoxilina e eosina. f. FSA- 14 dias. Seta indica deslocamento lamelar. Coloração hematoxilina e eosina. g. FSA- 14 dias. Setas indicam desarranjo dos capilares. Coloração hematoxilina e eosina. h. FSA- 14 dias. Seta indica aneurisma lamelar. Coloração hematoxilina e eosina (escala 10 µm)..... 50

**Figura 14.** Fotomicrografia de corte histológico em parafina do rim de *Rachycentron canadum*. a. Controle- 7 dias. Seta indica túbulo renal. Coloração hematoxilina e eosina. b. FSA- 7 dias. Seta indica glomérulo e o asterisco indica o aumento do espaço da capsula de Bowman. Coloração hematoxilina e eosina (escala 10 µm)..... 53

**Figura 15.** Fotomicrografia de corte histológico em parafina do fígado de *Rachycentron canadum*. a. Controle- 7 dias. Seta grossa indica células formando cordões hepáticos, seta fina indica vaso sanguíneo sem acumulo de eritrócitos. Coloração hematoxilina e eosina. b. FSA- 7 dias. Seta indica hiperemia do vaso hepático c-d. FSA- 14 dias. Imagem mostra intensa vacuolização citoplasmática. Coloração hematoxilina e eosina. Coloração hematoxilina e eosina..... 54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Concentrações (em ppm) de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos encontrados em diversas regiões do mundo, em diferentes anos.....	26
<b>Tabela 2-</b> Divisão dos grupos experimentais, número de animais por aquário (n), dias de exposição e concentração (em ppm) de FSA de petróleo.....	37
<b>Tabela 3-</b> Alterações histológicas consideradas na análise das brânquias de <i>Rachycentron canadum</i> .....	41
<b>Tabela 4-</b> Alterações histológicas consideradas na análise do rim de <i>Rachycentron canadum</i> .....	41
<b>Tabela 5-</b> Alterações histológicas consideradas na análise do fígado de <i>Rachycentron canadum</i> .....	42
<b>Tabela 6-</b> Relação entre o valor de I e os efeitos nos órgãos.....	43
<b>Tabela 7-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) do fator de condição (FC) de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	45
<b>Tabela 8-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) de eritrócitos e leucócitos (granulócito e agranulócito) de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	46
<b>Tabela 9-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) da atividade da enzima lisozima após 31 minutos em <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	47
<b>Tabela 10-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) da área (em $\mu\text{m}^2$ ) e da densidade da célula de muco de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	48
<b>Tabela 11-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) da área (em $\mu\text{m}^2$ ) e da densidade da célula de cloreto de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	48
<b>Tabela 12-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) da área (em $\mu\text{m}^2$ ) da célula epitelial de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	49
<b>Tabela 13-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) do comprimento e largura (em $\mu\text{m}^2$ ) da lamela secundária de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	49
<b>Tabela 14-</b> Alterações histológicas branquiais encontradas em <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias e seus respectivos Índice de Alteração Histológica.....	51

<b>Tabela 15-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) da área (em $\mu\text{m}^2$ ) do núcleo das células tubulares de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	51
<b>Tabela 16-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) da área (em $\mu\text{m}^2$ ) do lúmen do túbulo distal de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	52
<b>Tabela 17-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) do espaço da cápsula de Bowman (em $\mu\text{m}$ ) de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	52
<b>Tabela 18-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) da densidade de glomérulos de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	52
<b>Tabela 19-</b> Alterações histológicas renal encontradas em <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias e seus respectivos Índice de Alteração Histológica.....	53
<b>Tabela 20-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) da área (em $\mu\text{m}^2$ ) do núcleo dos hepatócitos de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	53
<b>Tabela 21-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) da densidade de vasos sanguíneos de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	54
<b>Tabela 22-</b> Alterações histológicas hepáticas encontradas em <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias e seus respectivos Índice de Alteração Histológica.....	55
<b>Tabela 23-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) do índice hepatossomático (IHS) de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	55
<b>Tabela 24-</b> Médias ( $\pm$ D.P.) da atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST) em U/L de <i>Rachycentron canadum</i> expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

< - menor

> - maior

± - mais ou menos

® - marca registrada

µL - microlitro

µm - micrômetro

ALT - alanina aminotransferase

APA - área de proteção ambiental

AST - aspartato aminotransferase

CL50 - concentração média letal de 50%

cm - centímetros

CONAMA - conselho nacional do meio ambiente

Ct - comprimento total do peixe

D.P. - desvio padrão

FC - fator de condição

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

FSA - fração solúvel em água

g - gramas

HPA - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

IAH - índice de alteração histológica

ICB - Instituto de Ciências Biomédicas

IHS - índice hepatossomático

LDH - lactato desidrogenase

MDH - malato desidrogenase

mg/L<sup>-1</sup> - miligrama por litro elevado a menos um

minutos<sup>-1</sup> - minutos elevado a menos um

mL<sup>-1</sup> - mililitros elevado a menos um

NAD<sup>+</sup> - dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma oxidada

NADH - dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida

nm - nanômetro

°C - graus Celsius



PAS - ácido periódico de Schiff

PBS - tampão fosfato-salino

Pfig - peso do fígado

ppm - partes por milhão

Ppx - peso do peixe

$\Sigma$  - somatório

u.a - unidade arbitrária de fluorescência

U/L - unidade por litro

USP - Universidade de São Paulo

v/v – volume por volume

$\Delta\lambda$  - delta lambda

$\mu\text{m}^2$  - micrômetro ao quadrado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Petróleo.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Derramamento de Petróleo no Ambiente Marinho.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3 Modelo Biológico- <i>Rachycentron canadum</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4 Biomarcadores.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.1 Parâmetros do Sistema Imune Inato.....</b>	<b>29</b>
<b>1.4.2 Parâmetros Hepáticos.....</b>	<b>31</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>33</b>
<b>3 HIPÓTESE.....</b>	<b>34</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Extração da Fração Solúvel em Água (FSA) de Petróleo.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2 Aclimação.....</b>	<b>36</b>
<b>5.3 Exposição à Concentração Subletal.....</b>	<b>37</b>
<b>5.4 Obtenção do Material de Estudo.....</b>	<b>38</b>
<b>5.5 Fator de Condição.....</b>	<b>38</b>
<b>5.6 Contagem Total e Diferencial de Leucócitos.....</b>	<b>39</b>
<b>5.7 Atividade da Enzima Lisozima.....</b>	<b>39</b>
<b>5.8 Avaliação Histopatológica Branquial, Hepática e Renal.....</b>	<b>40</b>
<b>5.9 Índice Hepatosomático.....</b>	<b>43</b>
<b>5.10 Atividade de Enzimas do Metabolismo de Proteínas.....</b>	<b>43</b>
<b>5.11 Análise Estatística.....</b>	<b>43</b>
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>

<b>6.1 Extração da Fração Solúvel em Água (FSA) de Petróleo.....</b>	<b>45</b>
<b>6.2 Fator de Condição.....</b>	<b>45</b>
<b>6.3 Contagem Total e Diferencial de Leucócitos.....</b>	<b>46</b>
<b>6.4 Atividade da Enzima Lisozima.....</b>	<b>47</b>
<b>6.5 Avaliação Histopatológica Branquial, Hepática e Renal.....</b>	<b>47</b>
<b>6.6 Índice Hepatossomático.....</b>	<b>55</b>
<b>6.7 Atividade de Enzimas do Metabolismo de Proteínas.....</b>	<b>55</b>
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Petróleo

O petróleo (do latim *petra*- pedra e *oleum*- óleo) é uma substância oleosa, inflamável, com cheiro característico, com cor variando entre o negro e o castanho escuro e, em geral, menos denso que a água (ALEXANDER, 1999; LAKE, 2006).

De origem orgânica, o petróleo é, possivelmente, formado a partir da decomposição dos organismos que compõem o plâncton, que se acumulam no fundo dos mares e dos lagos. Ao longo de milhões de anos, essa camada vai sendo coberta por outras camadas de sedimentos que, pela ação de microrganismos, bactérias, altas pressões e temperatura, se transformam em petróleo (GUPTA; DEMIRBAS, 2010; THOMAS, 2004).

Em seguida, o petróleo passa pelo processo de acumulação, mas, para isso, ocorre a expulsão do petróleo da rocha geradora, fazendo com que ele percorra rochas porosas e permeáveis até ser interceptado por uma rocha selante, que é impermeável, denominada reservatório. A rocha selante possui condições necessárias para acumulação do petróleo, por ser um ambiente de pouca permeabilidade, inibindo a ação de água circulante e diminuindo a quantidade de oxigênio existente (CARDOSO, 2005; THOMAS, 2004).

Apesar da composição do petróleo variar de acordo com o poço, todos produzem análises elementares semelhantes, constituído por carbono (83 - 87%), hidrogênio (11 - 14%), nitrogênio (0,11 - 1,7%), enxofre (0,06 - 8%), oxigênio (0,1 - 2%) e alguns metais em concentrações traço (principalmente níquel e vanádio) (até 0,3%) (FRONAPE, 2002; POFFO, 2000; THOMAS, 2004).

Segundo Nicodem et al. (2001), o carbono e o hidrogênio formam os hidrocarbonetos, que são os compostos mais abundantes do petróleo. Os hidrocarbonetos, conforme os autores, são agrupados em quatro classes principais, baseadas na composição molecular, sendo (1) aromáticos, de cadeia benzênica (insaturada), presentes em pequenas quantidades, apresentam maior toxicidade e podem ser classificados em monocíclicos (apenas uma cadeia benzênica) ou policíclicos (mais de uma cadeia benzênica); (2) alcanos (parafinas), de cadeia simples e ramificada, compreende a maior fração da maioria dos petróleos, com toxicidade geralmente baixa e facilmente biodegradado; (3) alcenos (olefinas), de

cadeia aberta com ligação dupla entre os átomos, ausentes ou presentes em pequenas quantidades no petróleo, mas abundantes em produtos de refino como a gasolina, e; (4) cicloalcanos (naftas), de cadeia fechada (cíclicas) e saturada, compreende a segunda maior fração da maioria dos petróleos, a toxicidade é variável e são resistentes à biodegradação.

O primeiro poço de petróleo foi descoberto pelo americano Edwin Laurentine Drake, em agosto de 1859, na Pensilvânia (Estados Unidos da América- EUA) a 21 metros de profundidade (GIDDONS, 1948).

Ainda no século XIX, o petróleo passou a ser usado como insumo à iluminação, mas foi em 1810, em Praga, que foi considerada a primeira destilação industrial do petróleo, obtendo-se um óleo capaz de substituir com grande vantagem os produtos até então usados para a iluminação, como o óleo de baleia e o gás de carvão. A partir do século XX, o desenvolvimento das empresas automobilísticas impulsionou, definitivamente, a indústria do petróleo (OLAH; GOEPPERT; PRAKASH, 2009; THOMAS, 2004).

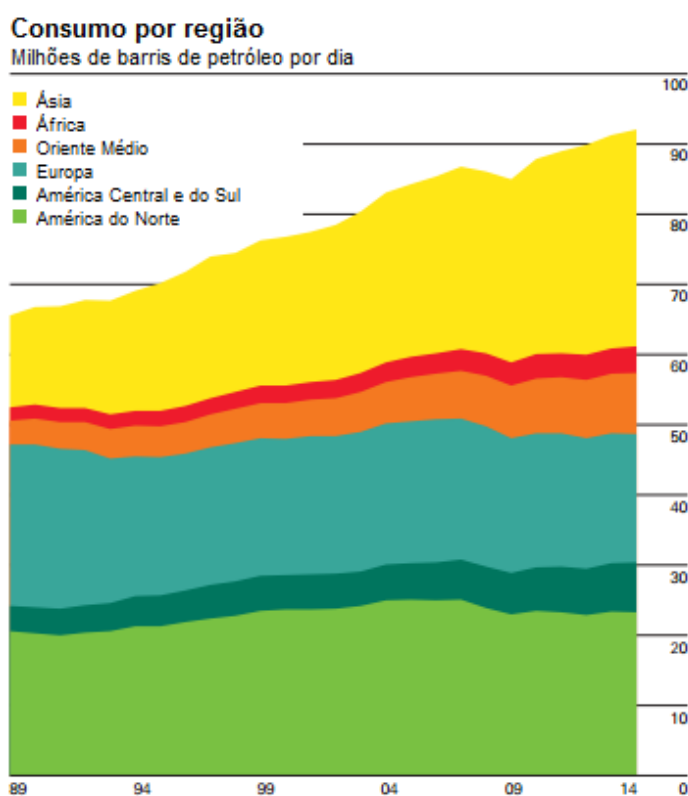
Nos EUA surgiram dezenas de companhias petrolíferas, que mais tarde se transformariam em poderosas organizações. A produção de óleo cru, nos EUA, aumentou de dois mil barris em 1859, para aproximadamente três milhões de barris em 1863, e para dez milhões de barris em 1874. Até o final do século XIX, os EUA dominaram praticamente sozinhos o comércio mundial de petróleo, devido, principalmente, à atuação do empresário John Rockefeller (OLAH; GOEPPERT; PRAKASH, 2009; SOUZA, 2006).

No Brasil, o primeiro poço foi perfurado a uma profundidade de aproximadamente 500 metros entre os anos de 1892 e 1896, na cidade de Bofete- São Paulo, não sendo bem sucedido. Porém, em 1939 na cidade de Lobato- Bahia, foi descoberto o primeiro sinal de petróleo no território brasileiro (FARIAS, 2008).

No ano de 1953, o governo brasileiro instalou o Conselho Nacional do Petróleo (CNP), surgindo assim a primeira Lei do Petróleo do país, para estruturar e regularizar as atividades petrolíferas, tornando o petróleo um patrimônio da União, criando assim a Petrobrás (PETROBRÁS, 2015). Desde a criação da Petrobrás já foi descoberto petróleo nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, São Paulo e Santa Catarina (FARIAS, 2008).

Atualmente, o petróleo é utilizado, principalmente, como combustíveis para transportes, para aquecimento e geração de energia elétrica, na preparação de asfalto e óleo lubrificante. Porém, também é utilizado como matéria prima para a fabricação de produtos químicos, plásticos e materiais sintéticos (U.S. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION, 2015).

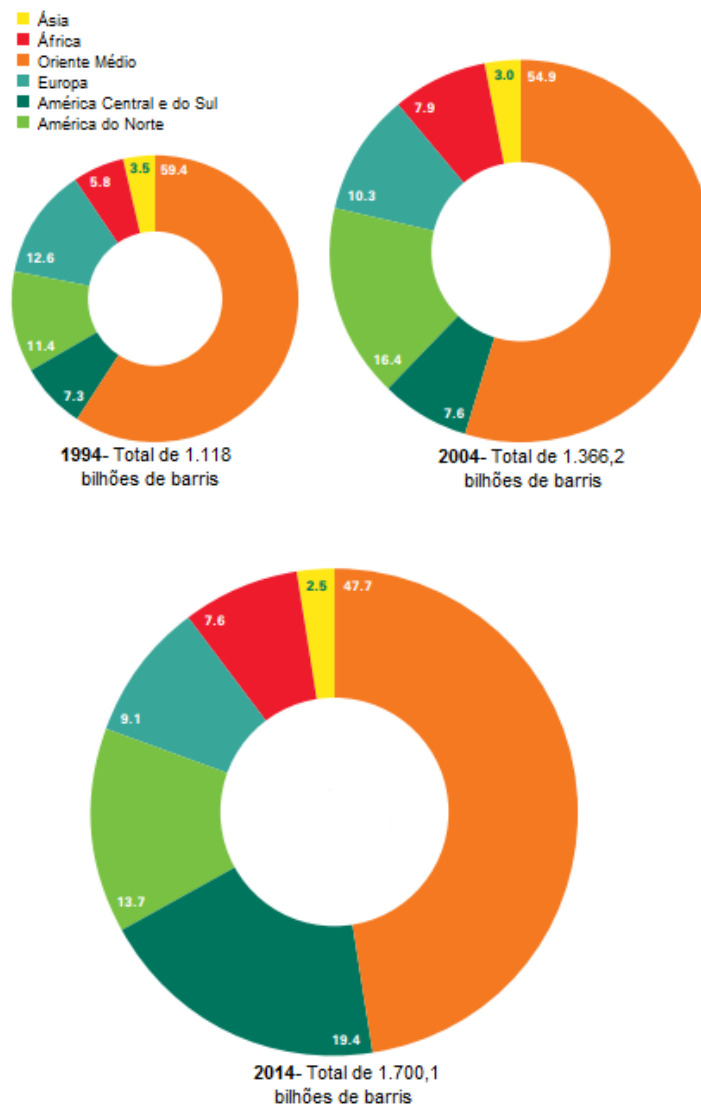
Com a ampla utilização do petróleo em produtos, o consumo mundial vem crescendo a cada ano. Atualmente, no relatório anual da British Petroleum Statistical Review of World Energy (2015), foi observado um aumento no consumo global de 0,8 milhões de barris por dia (0,8%) em 2014 comparado ao ano de 2013, chegando à marca de 92.086 milhões de barris de petróleo por dia (Figura 1).



**Figura 1.** Consumo mundial de petróleo (em milhões de barris por dia) dividido em regiões, durante o período de 1989 e 2014 (Fonte. Adaptado de British Petroleum Statistical Review of World Energy, 2015).

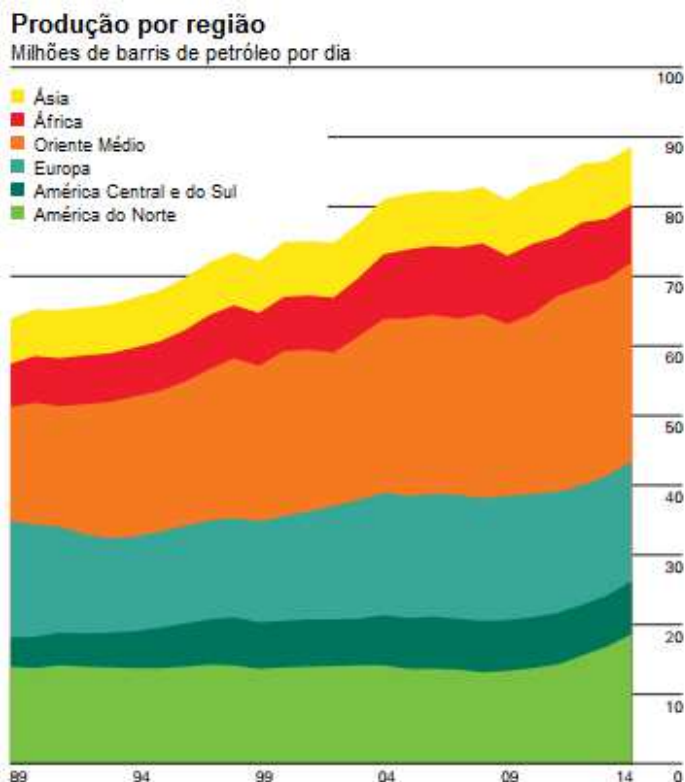
O aumento do consumo mundial impulsionou a busca por novas reservas de petróleo. No final de 2014, as reservas atingiram um total de 1.700,1 bilhões de barris, o suficiente para atender a 52,5 anos de produção global. Durante a última década, as reservas provadas mundiais aumentaram 24%, ou mais de 330 bilhões de barris (BRITISH PETROLEUM STATISTICAL REVIEW OF WORLD ENERGY, 2015) (Figura 2).

**Distribuição de reservas provadas em 1994, 2004 e 2014**  
Porcentagem



**Figura 2.** Reservas mundiais provadas, dividido em regiões, no ano de 1994, 2004 e 2014 (Fonte. Adaptado de British Petroleum Statistical Review of World Energy, 2015).

Conseqüentemente, a produção de petróleo mundial registrou um aumento de 2,1 milhões de barris por dia, ou 2,3%, comparado ao ano de 2013, atingindo a produção de 88.673 milhões barris de petróleo por dia (Figura 3). Os EUA registraram o maior crescimento no mundo (1,6 milhões barris de petróleo por dia) (BRITISH PETROLEUM STATISTICAL REVIEW OF WORLD ENERGY, 2015).



**Figura 3.** Produção mundial de petróleo (em milhões de barris por dia) dividido em regiões, durante o período de 1989 e 2014 (Fonte. Adaptado de British Petroleum Statistical Review of World Energy, 2015).

No Brasil, foi descoberta a presença de óleo na camada Pré-sal, no ano de 2006. A camada Pré-sal brasileira compreende uma extensa área rochosa, de aproximadamente 149.000 quilômetros quadrados, que se estende desde o litoral do estado de Santa Catarina até o litoral do estado do Espírito Santo, distante cerca de 300 quilômetros da costa brasileira e localizada em profundidades que variam de 4.000 a 7.000 metros (PETROBRÁS, 2015).

Atualmente, a produção de petróleo na camada do Pré-sal ultrapassou o patamar de 700 mil barris de petróleo por dia (PETROBRÁS, 2015), contribuindo com os níveis recordes de produção de 2,3 milhões barris de petróleo por dia, em 2014 (BRITISH PETROLEUM STATISTICAL REVIEW OF WORLD ENERGY, 2015).

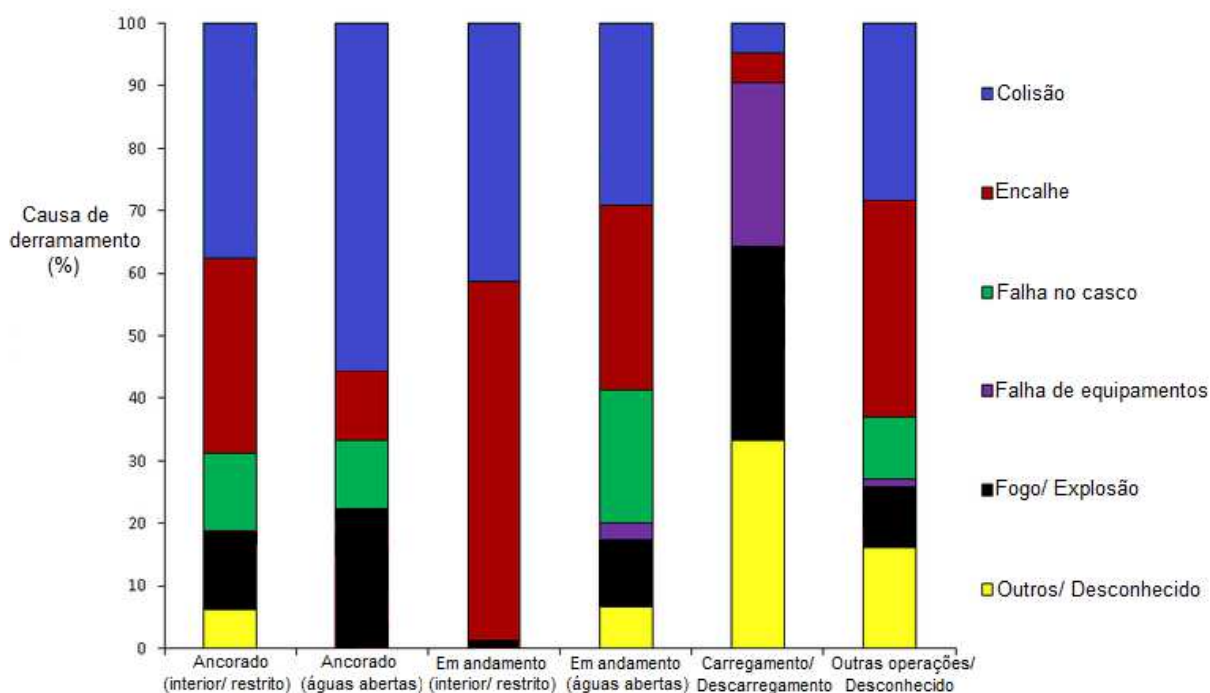
A Petrobrás (2015) estima em seu relatório de planejamento estratégico 2030, que o óleo contido na camada Pré-sal corresponderão a 53% do total da produção brasileira em 2020, estimada em 4,2 milhões de barris por dia.



## 1.2 Derramamento de Petróleo no Ambiente Marinho

Com o aumento da produção da indústria petrolífera, o risco de acidentes por derramamento tornou-se iminente. Os derramamentos são categorizados por tamanho: <7 toneladas (pequeno acidente), 7-700 toneladas (médio acidente) e >700 toneladas (grande acidente) (INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION LIMITED- ITOPF; 2014).

Estima-se que no período de 1970-2014, 50% dos grandes derramamentos de petróleo (> 700 toneladas) ocorreram enquanto os navios estavam em andamento em águas abertas. Durante este tipo de operação, 59% foram causados por colisões e encalhes. Estas mesmas causas representaram, aproximadamente, 99% dos derramamentos quando a embarcação estava em andamento em águas interiores ou restritas (ITOPF, 2014) (Figura 4).



**Figura 4.** Incidência de grandes derramamentos (> 700 toneladas) por operação na hora do incidente e principal causa no período de 1970-2014 (Fonte. Adaptado de ITOPF; 2014).

Entre os grandes incidentes, destacam-se a explosão na plataforma de exploração Deepwater Horizon no norte do Golfo do México em 2010, que resultou em 800 mil toneladas de óleo liberado para o oceano (ALLAN; SMITH; ANDERSON, 2012) e o derramamento de 3,7 mil barris de petróleo no Campo de Frade (Bacia de Campos- RJ), em 2011, causado, segundo o relatório da Agência Nacional de

Petróleo (ANP), pela estimativa incorreta da pressão no poço (por falta do conhecimento da geologia local) da empresa Chevron (LEITE et al., 2012).

Somente em 2014, de acordo com os dados da International Tanker Owners Pollution Federation Limited- ITOPF (2014), foram registrados aproximadamente 10.000 incidentes, resultando em 4.000 toneladas de óleo perdido para o ambiente.

Entre esses incidentes, a grande maioria (81%) se enquadra na categoria de pequeno derramamento, ou seja, < 7 toneladas (ITOPF, 2014). Segundo Ziulli (2009) esses pequenos derramamentos estão relacionados com operações normais de petroleiros como lavagem dos tanques e descarte de água de lastro.

Quando o petróleo é lançado ao mar, o destino final de seus componentes depende de vários processos físicos, químicos e biológicos (chamado de intemperismo), tais como: evaporação, emulsificação, dissolução, biodegradação e fotooxidação (VIEIRA et al., 2009) (Figura 5).



**Figura 5.** Ilustração dos fenômenos envolvidos no processo de intemperismo de uma mancha de óleo espalhada sobre a água do mar (Fonte. Vieira, 2009).

Uma porção relativamente pequena do petróleo se dissolve na água e torna-se biodisponível, chamada de fração solúvel em água (FSA) (RODRIGUES et al., 2010; SAEED; MUTAIRI, 1999), essa fração é muito difícil de ser detectada sem auxílio de análises químicas por ser visualmente imperceptível (ZIOLLI, 2009).

A FSA de petróleo é constituída de hidrocarbonetos com peso molecular intermediário, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de baixo peso molecular e compostos heterocíclicos. Essas moléculas, por serem solúveis em água, são os principais constituintes da fase aquosa e os maiores contribuidores para a toxicidade nos ambientes aquáticos (NEFF, 1987; SAEED; MUTAIRI, 1999).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos semivoláteis abundantes na FSA do petróleo (MIGUEL et al., 2001). Rangel; Baptista-Neto; Fonseca (2012) compararam as concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos encontrados em diversas regiões e por diversos autores. Observa-se que em uma mesma região, em datas diferentes, apresentam grande variação (Tabela 1).

**Tabela 1-** Concentrações (em ppm) de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos encontrados em diversas regiões do mundo, em diferentes anos (Fonte. Adaptado de Rangel; Baptista-Neto; Fonseca, 2012).

Área de amostragem	Concentração (ppm)	Ano da análise
Bacia do Rio Estrela- Brasil	0,00 - 0,09	2012
Baía de Guanabara- Brasil	1,57 - 18,44	1996
APA de Guapimirim (Baía de Guanabara)- Brasil	0,30 - 42,70	2003
Bacia do Rio Paraíba do Sul- Brasil	1,00 - 40,00	2002
Bacia da Tianjin- China	0,01 - 0,50	2005
Canal de Saint John- Estados Unidos da América	0,12 - 78,73	2001
Canal Trepagnier- Estados Unidos da América	0,49 - 25,64	2001
Delta do Niger- Nigéria	2,10 - 7,20	2005

### 1.3 Modelo Biológico- *Rachycentron canadum*

Estudos de vários autores, que objetivaram avaliar os efeitos da exposição aos hidrocarbonetos solúveis em água, utilizam os peixes como modelo biológico. Ernst; Neff; Anderson (1977) observaram a influência da FSA de petróleo no desenvolvimento de *Fundulus grandis*, Akaishi et al. (2004) utilizaram a espécie *Astyanax* sp. para avaliar a neurotoxicidade do óleo cru. Recentemente, Yu et al. (2015) estudaram influência do óleo cru na velocidade da natação em *Takifugu rubripes*, Kazempoor et al. (2015) registraram alterações histopatológicas em *Acanthopagrus latus* exposto ao óleo cru, e Ezike e Ufodike (2014) avaliaram parâmetros sanguíneos em *Clarias gariepinus* exposto ao petróleo.

A utilização de peixes é recomendável, pois a acumulação na cadeia trófica desses hidrocarbonetos é extremamente rápida (GRAVATO; SANTOS, 2002), tendendo a maior acumulação em peixes, quando comparado com outros organismos do ambiente (ANYAKORA et al., 2005), sendo, assim, pode apresentar consequências adversas para a saúde dos mesmos (COLLIER et al., 1996).

*Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766), conhecido popularmente como beijupirá, compreende a um único gênero, *Rachycentron*. Está classificado taxonomicamente, segundo Linnaeus (1766), da seguinte forma:

Reino- *Animalia*

Filo- *Chordata*

Classe- *Actinopterygii*

Subclasse- *Neoptergii*

Infraclasse *Teleostei*

Superordem- *Acanthopterygii*

Ordem- *Perciformes*

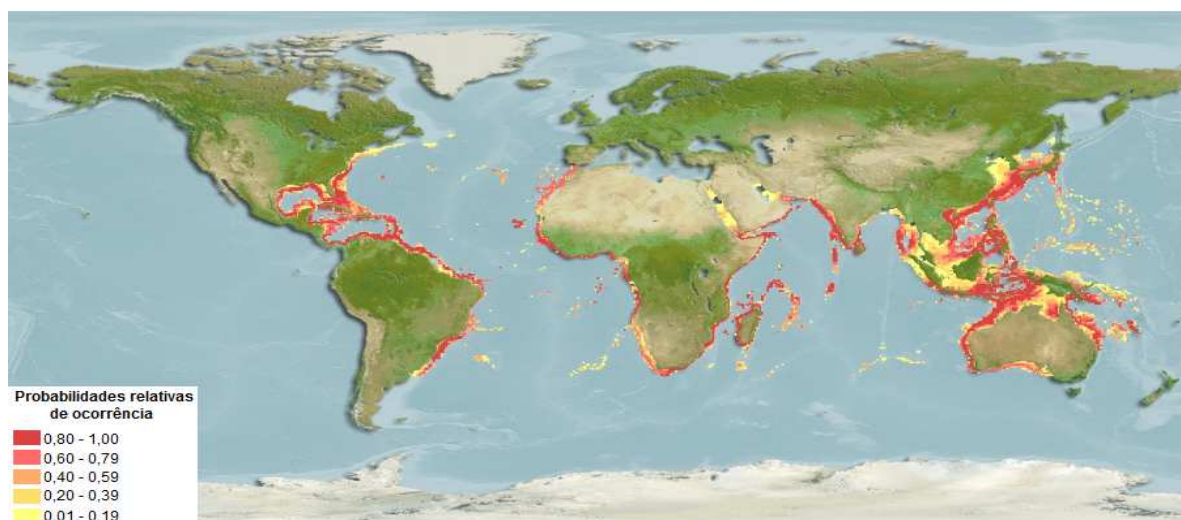
Subordem- *Percoidei*

Família- *Rachycentridae*

Gênero- *Rachycentron*

Espécie- *Rachycentron canadum*

É classificada como uma espécie nerítica e epipelágica, de hábito natatório ativo (comportamento migratório), devido à ausência de bexiga natatória. Sua ocorrência dá-se em todo o mundo, em águas tropicais e subtropicais, exceto no Pacífico Oriental. No Brasil, estes espécimes estão presentes nas regiões norte, nordeste, sul e sudeste (ARENDDT; OLNEY; LUCY, 2001; BARBIERI; DOI, 2012; CAVALLI; HAMILTON, 2009) (Figura 6).



**Figura 6.** Mapa de ocorrência mundial natural de *Rachycentron canadum*. As diferentes cores significam as probabilidades relativas de ocorrência (Fonte. Adaptado de Fishbase, 2013).

São considerados carnívoros, alimentando-se de nécton e zoobentos, incluindo peixes, crustáceos e bivalves, além de restos deixados por animais de grande porte como tubarões, raias manta e tartarugas. Por ocupar uma posição de destaque na cadeia trófica, podem fornecer informações importantes relacionadas diretamente ao ecossistema em que vivem (BENNETI et al., 2008).

Além disso, é de grande interesse comercial devido, principalmente, ao seu rápido crescimento, além de outras características, como a adaptabilidade em cativeiro e a excelente qualidade de sua carne (BARBIERI; DOI, 2012; CAVALLI; HAMILTON, 2009).

#### **1.4 Biomarcadores**

Biomarcadores são definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (DEPLEDGE, 1993), e podem ser utilizados para identificar sinais iniciais de danos aos peixes, sendo excelentes ferramentas para monitorar a saúde do ecossistema aquático (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; WALKER et al., 1996).

Segundo, Amorim (2003); Dougherty (1998); Rüdiger (1999), os biomarcadores podem ser classificados em três tipos: de exposição, de suscetibilidade e de efeito.

Biomarcadores de exposição são usados para confirmar e avaliar a exposição a uma determinada substância, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna, de um indivíduo ou um grupo (por exemplo, bioacumulação).

Biomarcadores de suscetibilidade permitem elucidar o grau de resposta da exposição provocada nos indivíduos.

Biomarcadores de Efeito que podem ser usados para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde, decorrentes da exposição e absorção da substância química. Neste trabalho utilizou-se biomarcadores de efeito para se avaliar a exposição de peixes à FSA.

A utilização de biomarcadores apresenta várias vantagens, pois permite detectar precocemente a existência de contaminação por substâncias tóxicas biologicamente significativas, identificar espécies ou populações em risco de

contaminação, avaliar a magnitude da contaminação e determinar o grau de severidade dos efeitos causados pelos contaminantes (STEGEMAN et al., 1992).

Contaminantes orgânicos podem afetar o sistema imune e parâmetros hepáticos, resultando em supressão imunológica (DEAN; HOUSE; LUSTER, 2001) e alteração do sistema de biotransformação. Sendo assim, o uso de biomarcadores celulares, histológicos e enzimáticos é muito útil na avaliação do risco toxicológico (STILLER- WINKLER et al., 1999).

#### **1.4.1 Parâmetros do Sistema Imune Inato**

O sistema imunológico de peixes apresenta similaridade com o dos mamíferos (SIWICKI et al., 1994). É dividido em inato (não específico) e adquirido (específico), porém, diferindo de outros vertebrados, o sistema imune inato dos peixes é considerado mais importante que a resposta adquirida (SAURABH; SAHOO, 2008; WHYTE, 2007), pois a resposta inata geralmente precede a resposta adquirida, ativa e determina a natureza da resposta adaptativa, além de cooperar na manutenção da homeostase (FEARON, 1997).

O sistema imune inato é dividido em três compartimentos, sendo barreira epitelial/ mucosa, parâmetros humorais e componentes celulares (URIBE et al., 2011).

A barreira epitelial/ mucosa das brânquias é extremamente importante em peixes (MAGNADOTTIR, 2010), agindo como uma das primeiras barreiras de defesa (ELLIS, 2001). As brânquias são estruturas vitais para os peixes, responsáveis pelas trocas gasosas, osmorregulação, equilíbrio ácido básico e excreção de compostos nitrogenados (MACHADO; FANTA, 2003).

Quando ocorre interferência no ambiente, os peixes desempenham ajustes para obtenção de oxigênio, como, por exemplo, a remodelação da morfologia branquial (NILSSON, 2007). Desta forma, as alterações morfológicas das brânquias são importantes ferramentas no diagnóstico à exposição de contaminantes (ROMÃO et al., 2006).

O rim recebe grande fluxo sanguíneo, proveniente principalmente das brânquias, e pode ser considerado órgão alvo para agentes químicos. Desempenhando um papel fundamental na manutenção da homeostase osmótica em peixes marinhos (AU, 2004), alterações morfológicas no rim podem ocorrer em

razão da introdução de poluentes na água, podendo ser utilizadas como parâmetros para o monitoramento ambiental (SILVA; MARTINEZ, 2007).

As células também estão presentes como primeira barreira de defesa. As principais células do sistema imune inato de peixes são aquelas capazes de fagocitar e destruir agentes infecciosos (KANTARI; PEDERZOLI-RIBEIL; WITKO-SARSAT, 2008). Entre essas células, estão os macrófagos, que são os leucócitos mais eficientes na atividade de fagocitose (SILVA et al., 1999), no qual sua atividade fagocítica se deve à fosfatase ácida. Outra importante célula, são os neutrófilos, que possuem atividade citotóxica não-específica (CUESTA; ESTEBAN; MESEGUER, 1999) e sua infiltração em reações inflamatórias é mais intensa nas fases iniciais em relação aos macrófagos. Além dos eosinófilos, que estão associados com tecido linfóide e apresentam funções relacionadas com a fagocitose e relação hospedeiro-parasita (ELLIS, 2001; FISCHER et al., 2006; SILVA et al., 1999).

Parâmetros hematológicos são suscetíveis a mudanças no ambiente aquático (BARBIERI; BONDIOLI, 2015; BOWDEN, 2008; DOTTA et al., 2015). Portanto, avaliação desses componentes colabora no diagnóstico de condições adversas (TAVARES-DIAS et al., 1999) e na compreensão da relação entre as características sanguíneas, saúde dos peixes e o meio ambiente (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Além de células, existem várias moléculas envolvidas na resposta imune inata e fagocitose. Normalmente estão presentes no soro e suas concentrações elevam-se rapidamente durante uma infecção (VERLHAC; GABAUDAN, 1997). Entre elas, está a enzima lisozima, importante agente bacteriolítico encontrado em várias espécies de peixes marinhos e dulcícolas (LIE et al., 1989). Essa enzima é produzida durante as infecções, sendo capaz de lisar a parede celular de bactérias, atuando nas ligações beta 1,4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e o ácido N-acetilglicosamínico (PAULSEN et al., 2003). Esta propriedade torna esta enzima capaz de lisar algumas bactérias gram-positivas e, combinada com as proteínas do sistema complemento, podem destruir bactérias gram-negativas (PAULSEN; ENGSTAD; ROBERTSEN, 2001; VERLHAC; GABAUDAN, 1997).

### **1.4.2 Parâmetros Hepáticos**

O fígado possui funções vitais para o metabolismo, sendo responsável pela acumulação, biotransformação e excreção de contaminantes em peixes (FERNANDES et al., 2008; ROCHA; MONTEIRO, 1999), contudo, suas células ficam expostas a um nível elevado de agentes químicos presentes no meio ambiente (LANGIANO, 2006).

O fígado dos peixes é mais susceptível à ação de poluentes quando comparado ao dos mamíferos. Isso ocorre devido a uma maior lentidão do fluxo sanguíneo em relação ao débito cardíaco, além de um fluxo biliar 50 vezes mais lento comparado ao de mamíferos, tornando mais lenta a depuração de produtos tóxicos. Por esses motivos, os poluentes exercem seus efeitos no tecido hepático por mais tempo (CAMPOS; MORAES; MORAES, 2008).

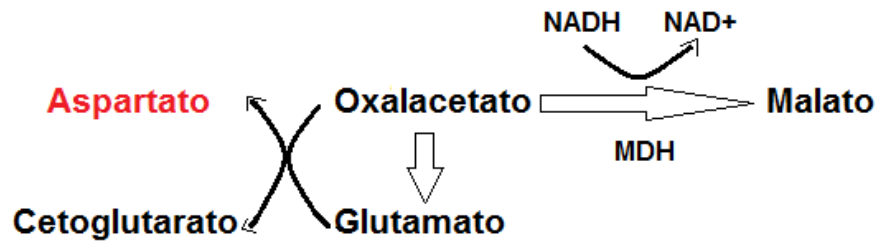
Contudo, dependendo do tipo e concentração do poluente, da espécie de peixe e da duração da exposição, pode ocorrer alterações nos parâmetros hepáticos, como mudanças histológicas e modulação da atividade das enzimas hepáticas (PARIS-PALACIOS; BIAGIANTI-RISBOURG; VERNET, 2000).

A histopatologia do fígado em peixes é a ferramenta de monitoramento que indica os efeitos de agentes estressores, e é considerado como um dos marcadores mais confiáveis a ser utilizado em estudos de impacto ambiental em animais aquáticos (FERNANDES et al., 2008; SCHMALZ; HERNANDEZ; WEIS, 2002). Segundo Simonato; Guedes; Martinez (2008), peixes expostos a poluentes, como petróleo, podem apresentar modificações histológicas em seu fígado.

Outro parâmetro utilizado são as determinações da atividade de enzimas hepáticas, utilizadas como marcadores de lesão hepática (KANEKO, 1989; SPARLING; VANN; GROVES, 1998).

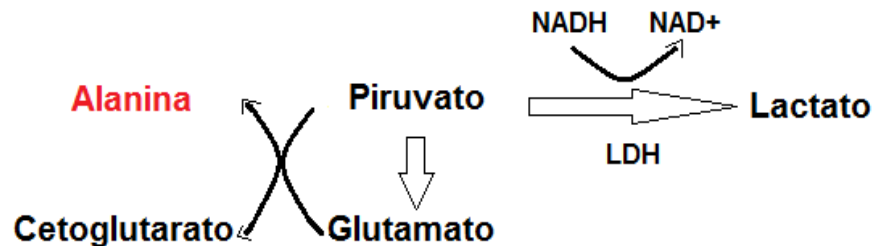
As aminotransferases são enzimas mitocondriais e citosólicas envolvidas no catabolismo de aminoácidos (BONGA, 1997). A enzima aspartato aminotransferase (AST) catalisa especificamente a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato, o qual se reduz a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada à NAD<sup>+</sup> (HARZER; STIPP; HERRERIAS, 2015) (Figura 7).





**Figura 7.** Esquema da ação da enzima AST que catalisa a transferência de aspartato para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato, reduzindo a malato por ação da MDH (Fonte. Arquivo pessoal, 2015).

A enzima alanina aminotransferase (ALT) é responsável por catalisar, de forma específica, a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato, sendo que este último é reduzido à lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD<sup>+</sup> (HARZER; STIPP; HERRERIAS, 2015) (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema da ação da enzima ALT que catalisa a transferência de alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato, reduzindo a lactato por ação da LDH (Fonte. Arquivo pessoal, 2015).

O aumento da atividade sérica de AST e ALT pode indicar ruptura dos hepatócitos, resultante de processos como necrose celular ou do processo de agressão por agentes tóxicos (KANEKO, 1989; SPARLING; VANN; GROVES, 1998).

## 2 JUSTIFICATIVA

O petróleo é um dos principais poluentes geradores de impactos ambientais. Isso se deve ao fato do risco de contaminação ser iminente em todas as etapas de produção, desde o início da sua extração até as etapas finais de transporte, armazenamento e consumo. Sabe-se que, somente no ano de 2014, foram registrados, aproximadamente, 4.000 toneladas de óleo perdido para o ambiente em todo o mundo (ITOPF, 2014).

No Brasil, a preocupação ambiental em relação ao derramamento de petróleo, se deve a descoberta de óleo na camada Pré-sal e conseqüentemente, o aumento da produção petrolífera nacional. Com isso, alertou-se para o risco de grandes e pequenos acidentes por derramamento de petróleo no ambiente aquático, afetando toda a biota.

Os peixes são espécies alvos, pois a acumulação dos hidrocarbonetos do petróleo é extremamente rápida, tendendo a maior acumulação em comparação a outros organismos do ambiente, com conseqüências adversas para a saúde dos mesmos.

A espécie nativa marinha *Rachycentron canadum* está presente em todo o litoral brasileiro, sendo de grande interesse comercial devido, principalmente, ao seu rápido crescimento e a excelente qualidade de sua carne. Essa espécie foi escolhida como modelo biológico por se encontrar no topo da cadeia trófica, alimentando-se de pequenos invertebrados e peixes, os quais podem acumular FSA de petróleo em seus organismos, identificando assim, possíveis processos de bioacumulação. Além disso, possui características de bom modelo para estudos ecotoxicológico, como adaptabilidade em cativeiro e fácil manejo.

Somada a essas características, são poucos os trabalhos relacionados com as adaptações de *Rachycentron canadum* após contaminação por xenobióticos. Além disso, estudo para o conhecimento dessa espécie nativa e suas respostas a parâmetros do sistema imune e hepático, é de grande importância para a conservação e para a utilização da mesma para o monitoramento ambiental no litoral brasileiro.

### 3 HIPÓTESE

Hipotetizou-se que a bioabsorção da FSA de petróleo pela espécie *Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766), resultaria em alterações em parâmetros imunológicos e hepáticos.

Em contato com a FSA de petróleo, esperou-se mudanças do valor relativo de células sanguíneas e alterações histológicas branquiais como primeiras linhas de defesa. Com a estimulação antigênica, causada por substâncias tóxicas, previu-se um aumento da atividade da enzima lisozima.

Esperou-se, ainda, que, uma vez a substância tóxica na corrente sanguínea, alterações histológicas renais ocorreriam para manter a homeostase osmótica.

No fígado, órgão responsável pelo sistema de biotransformação, previu-se que a sobrecarga do órgão levaria a alterações do índice hepatossomático e histológico, além do aumento das enzimas hepáticas ALT e AST.

Contudo, acreditou-se, que essas alterações causaria depleção fisiológica dos animais, avaliado pelo fator de condição.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da concentração subletal de 0,3 ppm da fração solúvel em água (FSA) de petróleo em parâmetros do sistema imune inato e hepáticos na espécie de peixe marinho *Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766).

### 4.2 Objetivos Específicos

Calcular o fator de condição de *Rachycentron canadum* após a exposição à concentração subletal de FSA de petróleo;

Calcular possível sobrecarga hepática, por meio do índice hepatossomático, após a exposição à concentração subletal de FSA de petróleo;

Avaliar e calcular o valor relativo das células sanguíneas após a exposição à concentração subletal de FSA de petróleo;

Avaliar, por meio do índice de alteração histológica, se a exposição à concentração subletal de FSA de petróleo resulta em alterações teciduais braquiais, hepáticas e renais;

Verificar se a exposição à concentração subletal de FSA de petróleo altera a atividade da enzima lisozima no soro, e;

Verificar se a exposição à concentração subletal de FSA de petróleo altera a atividade das enzimas AST e ALT no soro.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Extração da Fração Solúvel em Água (FSA) de Petróleo

Amostras de petróleo previamente caracterizadas química e fisicamente foram doadas do centro petroquímico da Petrobrás, Terminal Marítimo Almirante Barroso (TEBAR), São Sebastião- SP.

O petróleo bruto foi misturado à água do mar em uma razão de 1:10 (v/v), de acordo com Salvo et al. (2013), e através de ondas de ultrassom, utilizando um ultrasonicador (Branson 3510 Ultrasonic Cleaner, Connecticut, USA), a FSA de petróleo foi separada, por aproximadamente 60 minutos (STATE OCEANIC ADMINISTRATION, 2007). Após a separação, foi feita a análise em espectrofluorímetro SPEX Fluorolog 1681 (Spex Industries, Inc., Edison, NJ) para verificar a concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). O espectrofluorímetro é capaz de realizar movimentos simultâneos dos monocromadores de excitação e emissão, mantendo a diferença entre eles constante ou sistematicamente variável. Nesta técnica, a diferença constante entre os comprimentos de onda de excitação e de emissão é denominada delta lambda ( $\Delta\lambda$ ), e cada  $\Delta\lambda$ , é ajustado para melhor visualizar e identificar uma substância (EIROA et al., 2010).

Para determinar a concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) da fração solúvel em água de petróleo comparando com a água do mar, as amostras foram excitadas no intervalo de comprimentos de onda de 200 a 600 nm, com  $\Delta\lambda$  ajustados em intervalo de 10 nm e confirmado por um analisador automático Horiba OCMA 350 (Horiba Instruments Inc., CA).

### 5.2 Aclimação

*Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766) (Figura 9), totalizando o número de 40 indivíduos, com comprimento total de 23,18 cm ( $\pm 1,75$ ), comprimento padrão de 18,56 cm ( $\pm 1,69$ ) e peso de 52,26 g ( $\pm 3,77$ ), sem distinção quanto ao sexo, foram obtidos na estação de Piscicultura ME de Ilha Bela, litoral Norte do estado de São Paulo- Brasil e transferidos para o Biotério de Animais Aquáticos do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva (ICB- USP), onde foram conduzidos os experimentos.



**Figura 9.** Espécie *Rachycentron canadum* utilizada como bioindicadora na exposição à FSA de petróleo.

Os animais foram acondicionados em aquários de vidro, com capacidade de 150 litros, em sistema semi-estático (troca de 50% da água diariamente), com controle diário das condições abióticas: pH ( $8 \pm 0,2$ ), fotoperíodo (12 horas dia/ 12 horas noite), temperatura ( $23 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ), salinidade ( $34 \pm 2\text{‰}$ ), oxigênio dissolvido ( $6,15 \pm 0,12 \text{ mg/L}^{-1}$ ) e concentração de amônia ( $0,15 \pm 0,05 \text{ mg/L}^{-1}$ ).

Foi fornecido pescado fresco em pedaços, como alimentação, *ad libitum*, uma vez ao dia. Nessas condições, os peixes passaram por um período de aclimação de 15 dias para diminuição do estresse e adaptação.

### 5.3 Exposição à Concentração Subletal

Testes prévios do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva, determinaram que a concentração média letal de 50% (CL50) de FSA é de 0,4 ppm. Com isso, os animais foram divididos em três grupos: dois grupos controle e dois grupos experimentais, expostos a 0,3 ppm de FSA por um período de 7 e 14 dias em sistema semi-estático (Tabela 2).

**Tabela 2-** Divisão dos grupos experimentais, número de animais por aquário (n), dias de exposição e concentração (em ppm) de FSA de petróleo.

	Grupo	N	Dias de exposição	FSA
<b>Aquário 1</b>	Controle- 7 dias	10	7 dias	0 ppm
<b>Aquário 2</b>	FSA- 7 dias	10	7 dias	0,3 ppm
<b>Aquário 3</b>	Controle- 14 dias	10	14 dias	0 ppm
<b>Aquário 4</b>	FSA- 14 dias	10	14 dias	0,3 ppm

Para cada grupo foram utilizados 10 animais, em aquários de vidro de 150 litros. As condições abióticas foram semelhantes às descritas no item aclimação, com exceção da alimentação, a qual foi fornecida normalmente até 24 horas antes

do término dos experimentos, mantendo os peixes em jejum. Durante os experimentos houve uma sobrevivência de 100% dos animais manipulados experimentalmente.

Ao término do experimento, a água dos aquários foi coletada e acondicionada em recipientes plásticos de 1.000 litros. Posteriormente, os mesmos foram recolhidos pela Petrobrás para tratamento e disposição final dos resíduos, de acordo com a Resolução do CONAMA nº 358/2005.

#### **5.4 Obtenção do Material de Estudo**

Após o período de exposição subletal de 7 e 14 dias à FSA de petróleo, os peixes foram anestesiados com benzocaína 2%, tiveram o sangue puncionado e foram sacrificados por secção medular. Os procedimentos descritos foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biomédicas- Universidade de São Paulo (04.11.2011, nº124, fls. 109, livro 02).

O sangue foi coletado com seringa, sem anticoagulante, para a confecção de 5 extensões sanguíneas por peixe para realizar a contagem total e diferencial de leucócitos. Após obtenção das extensões sanguíneas, o sangue restante foi transferido imediatamente para tubos testes e acondicionados no gelo. Posteriormente, o soro foi separado por centrifugação (2000 x g por 25 minutos à 4°C, centrífuga Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) e estocado em freezer -80 °C para análise da atividade de lisozima, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

Para obtenção dos índices somáticos, o fígado de todos os animais, foram previamente pesados em balança de precisão (Bel Engineering, Monza, Italy). Fragmentos do fígado, rim e brânquias, foram fixados em Mcdowell gelado (2% glutaraldeído e 4% paraformaldeído em pH 7.4) (MCDOWELL; TRUMP, 1976) para análises morfométricas e histológicas.

#### **5.5 Fator de Condição**

Com as medidas e pesos de todos os animais manipulados, foi calculado o fator de condição (FC). Os cálculos foram feitos de acordo com o método de Lagler (1966), utilizando a seguinte fórmula:

$$FC = 100 \times (P_{px} / Ct^3)$$

Em que:

P<sub>px</sub>: peso (g) do peixe

Ct: comprimento total (cm) do peixe

## 5.6 Contagem Total e Diferencial de Leucócitos

Depois da confecção de extensões sanguíneas, as lâminas foram secas por 24 horas à temperatura ambiente e coradas com corante Rosenfeld (ROSENFELD, 1947).

A contagem total e diferencial de leucócitos consiste em determinar a proporção entre os leucócitos e eritrócitos. Para tanto, sob microscópio de luz comum, com objetiva de imersão (1000x), foram contadas 2.000 células (leucócitos e eritrócitos), percorrendo todo o material. Os leucócitos foram diferenciados em granulócitos e agranulócitos (HRUBEC; SMITH, 2000).

## 5.7 Atividade da Enzima Lisozima

A atividade da lisozima foi estabelecida de acordo com o método de Kim e Austin (2006). Em uma placa de 96 poços plana, 50 µL de soro foram diluídos (quatro diluições em série) em solução PBS (pH 6,2). Para cada poço foram adicionados 50 µL de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma). Como controle positivo utilizou-se diluições em série de lisozima de clara de ovo de galinha (Sigma). No controle negativo utiliza-se PBS para substituir o soro.

No Laboratório de Metabolismo Lipídico (ICB-USP), a reação foi incubada a 25°C e a absorvância foi medida a 570 nm em 0, 6, 16, 31, 61 e 91 minutos, por meio do aparelho BioTek Synergy H1 microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), utilizando PBS como branco. Uma unidade de atividade da lisozima foi definida como a quantidade de soro que causa uma diminuição da absorvância de 0,001 minutos<sup>-1</sup>.



## 5.8 Avaliação Histopatológica Branquial, Hepática e Renal

Brânquias, fígados e rins foram submetidos a uma desidratação em gradiente crescente de álcool etanol (de 70% ao absoluto) e diafanização em xilol. Por fim, os materiais foram emblocados em Paraplast (Sigma, St Louis, MO, USA).

Após o processo de emblocamento, os materiais foram cortados (corte aleatórios e não sequenciais) em micrótomo Zeiss Hyrax M25 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany), com espessura de 4 µm. As lâminas foram, então, coradas com hematoxilina e eosina para avaliação geral da estrutura e PAS (ácido periódico de Schiff) para a identificação das células de muco (BANCROFT; STEVENS, 1982). Por fim, foram montadas utilizando Entelan® (Merck).

Para a análise morfométrica dos tecidos branquiais, hepático e renal, foram fotodocumentados 5 campos aleatórios de cinco cortes diferentes de cada animal, por meio do microscópio (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) com sistema de fotodocumentação AxioCam HRC, em um aumento de 1000x, 400x e 100x, totalizando 25 fotodocumentação por animal para cada aumento.

Em seguida, as imagens foram submetidas à análise pelo programa de mensuração, Image J (National Institute of Health, NIH) (REZENDE et al., 2014).

Para as brânquias, foram analisados o comprimento e a largura das lamelas secundárias, área das células de muco, área das células de cloreto, área das células epiteliais, além da contagem de células de muco e de cloreto.

Para os rins, foram analisados área de células tubulares, área do lúmen tubular distal, comprimento do espaço da cápsula de Bowman, além da contagem do número de glomérulo.

Para os fígados, foram analisados área do núcleo de hepatócitos e contagem de número de vasos.

As brânquias (Tabela 3), o rim (Tabela 4) e o fígado (Tabela 5) foram histologicamente analisados por meio do Índice de Alteração Histológica (IAH), de acordo com os critérios estabelecidos por Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994). O método consiste em dois critérios, no qual o primeiro critério avalia a localização e o tipo de alterações e o segundo critério, avalia o grau de severidade.

**Tabela 3-** Alterações histológicas consideradas na análise das brânquias de *Rachycentron canadum*.

<b>Alterações histológicas branquiais</b>	<b>Estágio</b>
<b>a) Hipertrofia e hiperplasia do tecido respiratório</b>	
Hipertrofia das células epiteliais	I
Adelgamento epitelial	I
Deslocamento ou elevação das células do epitélio	I
Ruptura epitelial	II
Hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias	I
Hiperplasia das células epiteliais ao longo das lamelas secundárias	I
Fusão parcial (na base ou no topo) das lamelas secundárias	I
Fusão completa de algumas lamelas secundárias	I
Fusão completa de todas as lamelas secundárias	II
Degeneração celular	II
Infiltração de leucócitos no epitélio branquial	I
<b>b) Alterações nas células de muco e cloreto</b>	
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células de muco	I
Presença de células de muco nas lamelas secundárias	I
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células de cloreto	I
Presença de células de cloreto nas lamelas secundárias	I
<b>c) Alterações nos vasos sanguíneos lamelares</b>	
Dilatação dos capilares	I
Desarranjo dos capilares	I
Congestão vascular	I
Hemorragia causada por ruptura de capilares	II
Aneurisma lamelar	II
<b>d) Estágio terminal</b>	
Fibrose	III
Necrose	III
<b>e) Parasitas branquiais</b>	
Presença de parasitas	I

**Tabela 4-** Alterações histológicas consideradas na análise do rim de *Rachycentron canadum*.

<b>Alterações histológicas renais</b>	<b>Estágio</b>
<b>a) Alterações no tecido linfóide</b>	
Perda do contorno celular ou contorno celular atípico	I
<b>b) Alterações nos glomérulos e túbulos renais</b>	
Degeneração hialina tubular leve	I
Degeneração hialina tubular severa	II
Hipertrofia das células tubulares	I
Desorganização tubular ou glomerular	I
Degeneração tubular ou glomerular	II
Aumento ou diminuição do espaço da cápsula de Bowman	I
Dilatação dos capilares glomerulares	I
Degeneração citoplasmática das células tubulares	II
Degeneração nuclear das células tubulares	II
Presença de túbulos em regeneração ou de “novos néfrons”	I
Presença de muitos grânulos PAS-positivos no epitélio tubular	I
Obstrução tubular	I
Aumento do lúmen tubular	I
Presença de tecido linfóide na cápsula de Bowman	II
Diminuição da frequência relativa de glomérulos	I
<b>c) Alterações nos vasos sanguíneos</b>	
Dilatação dos vasos sanguíneos	I
Hiperemia	II
Ruptura dos vasos sanguíneos	II
<b>d) Estágio terminal</b>	
Necrose	III

**Tabela 5-** Alterações histológicas consideradas na análise do fígado de *Rachycentron canadum*.

<b>Alterações histológicas hepáticas</b>	<b>Estágio</b>
<b>a) Alterações nos hepatócitos</b>	
Desarranjo dos cordões hepáticos	I
Perda ou atipia do contorno celular	I
Perda ou atipia do contorno nuclear	I
Aumento do volume celular	I
Aumento do volume nuclear	I
Atrofia nuclear	II
Intensa vacuolização citoplasmática	I
Vacuolização nuclear	II
Diminuição da frequência relativa de ocorrência de núcleos	I
Degeneração citoplasmática	II
Degeneração nuclear	II
Rompimento celular	II
Diminuição do glicogênio	I
Estagnação biliar	I
<b>b) Alterações nos vasos sanguíneos</b>	
Aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos	I
Hiperemia	II
Ruptura de vasos	II
Aumento do volume relativo dos vasos	I
<b>c) Alterações nos canalículos biliares</b>	
Degeneração dos canalículos biliares	II
<b>d) Estágio terminal</b>	
Necrose (focal ou total)	III

Após essa etapa, submeteu-se a uma fórmula que permite quantificar essas alterações, tornando possível a comparação do grau de alterações histológicas em diferentes situações de poluição e em grande número de peixes e, ainda, permite correlacionar a intensidade das alterações encontradas com a intensidade da poluição a qual o animal está exposto (POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994):

$$I = \sum_{i=1}^{n_a} a_i + 10 \sum_{i=1}^{n_b} b_i + 100 \sum_{i=1}^{n_c} c_i$$

Em que:

a- primeiro estágio de alteração.

b- segundo estágio de alteração.

c- terceiro estágio de alteração.

na- número total de alterações de primeiro estágio.

nb- número total de alterações de segundo estágio.

nc- número total de alterações de terceiro estágio.

Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) estabeleceram, ainda, relações entre os valores de I e os efeitos nos órgãos, descritos na tabela 6.

**Tabela 6-** Relação entre o valor de I e os efeitos nos órgãos.

Valores de I	Efeitos
0 – 10	Órgão funcionalmente normal
11 – 20	Órgão com alterações de leves a moderadas
21 – 50	Órgão com alterações de moderadas a graves
51 – 100	Órgão com alterações graves
> 100	Órgão com danos irreversíveis

### 5.9 Índice Hepatossomático

Após a pesagem dos fígados e dos animais manipulados experimentalmente, foi estipulado o índice hepatossomático (IHS). Para isso utilizou-se o método de acordo com Weibel et al. (1969), utilizando a seguinte fórmula:

$$IHS = P_{fig} / P_{px}$$

Em que:

P<sub>fig</sub>: peso (g) do fígado

P<sub>px</sub>: peso (g) do peixe

### 5.10 Atividade de Enzimas do Metabolismo de Proteínas

Atividades de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram determinadas por meio do soro, no Laboratório de Anatomia Macroscópica e Imuno-Histoquímica (FMVZ- USP), utilizando o analisador bioquímico VetTest 8008 (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, EUA) pelo método colorimétrico. Utiliza-se slide específico IDEXX VetTest™ para cada análise (AST e ALT). Uma pequena parcela de soro é adicionada automaticamente em cada slide, ocorrendo reações bioquímicas que resulta em alterações progressivas de cor. O coeficiente de variação para o VetTest 8008 é de aproximadamente 1,2%.

### 5.11 Análise Estatística

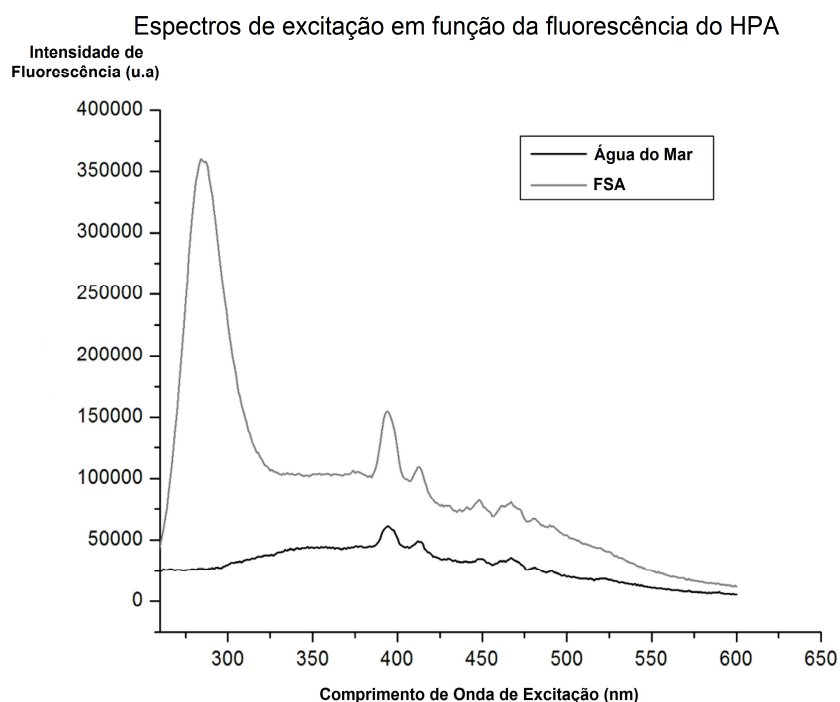
Todos os dados foram avaliados quanto à média e ao desvio-padrão. Utilizou-se o teste Kolmogorov-Smirnov para a confirmação do padrão de normalidade de todos os dados. Com isso, a análise estatística foi realizada pelo teste paramétrico ANOVA seguido de comparações múltiplas post-hoc Tukey HSD. Para isso foi

utilizado o software SPSS (SPSS, versão 14.0, SPSS, Chicago, IL, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Extração da Fração Solúvel em Água (FSA) de Petróleo

Identificou-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em intervalos de  $\Delta\lambda$  10 nm. Observou-se um pico de concentração no comprimento de onda entre 250 e 300 nm (Figura 10).



**Figura 10.** Espectros de excitação (nm) em função da fluorescência (u.a) de HPA na amostra da FSA de petróleo e da água do mar.

### 6.2 Fator de Condição

Calculando o fator de condição (FC), observou-se uma diminuição da média do grupo FSA-14 dias comparado com a média do grupo controle- 14 dias, resultando em uma diferença estatística ( $p= 0,004$ ) (Tabela 7).

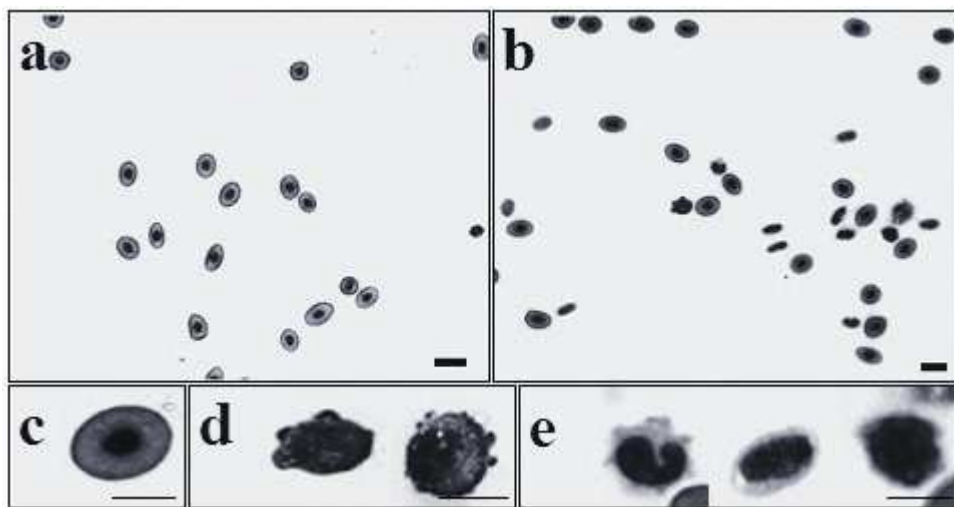
**Tabela 7-** Médias ( $\pm$  D.P.) do fator de condição (FC) de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

Grupo Experimental	FC
Controle- 7 dias	0,47 ( $\pm 0,03$ )
FSA- 7 dias	0,44 ( $\pm 0,03$ )
Controle- 14 dias	0,49 ( $\pm 0,05$ ) <sup>a</sup>
FSA- 14 dias	0,34 ( $\pm 0,09$ ) <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup>Diferença estatística significativa

### 6.3 Contagem Total e Diferencial de Leucócitos

Após a contagem total e diferencial de leucócitos (Figura 11), observou-se um aumento no número total de leucócitos após 7 dias de exposição à FSA ( $p= 0,0001$ ), mas após 14 dias de exposição à FSA houve uma diminuição ( $p= 0,002$ ). Conseqüentemente, houve uma diminuição de eritrócitos após 7 dias de exposição ( $p= 0,0001$ ) e um aumento após 14 dias de exposição à FSA ( $p= 0,002$ ) (Tabela 8 e Figura 12).

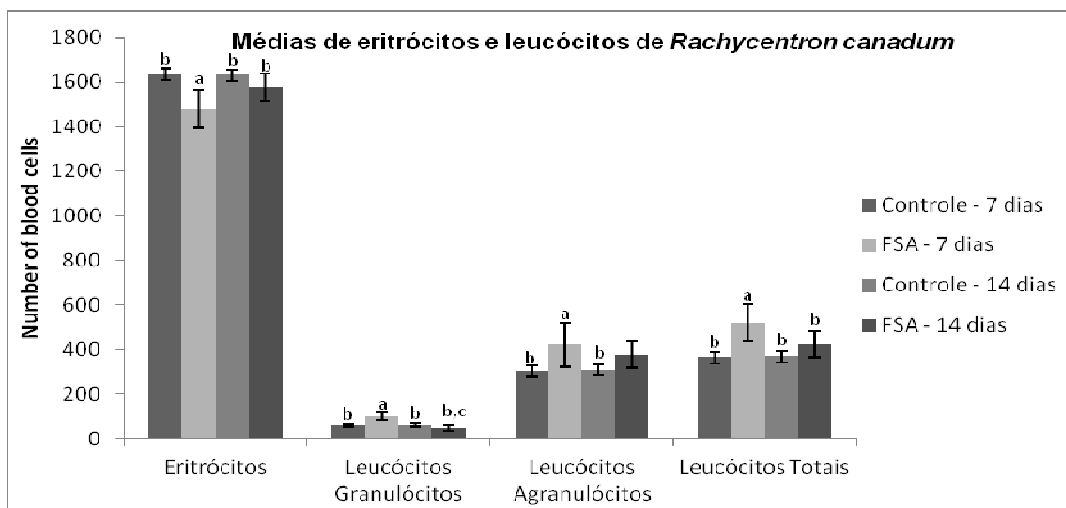


**Figura 11.** Extensão sanguínea de *Rachycentron canadum*. Observa-se uma maior proporção de eritrócitos em relação a leucócitos no grupo controle (a) do que o grupo exposto à FSA (b). Em detalhes, eritrócitos (c), leucócitos granulócitos (d) e leucócitos agranulócitos (e). Escala de 10  $\mu$ m.

**Tabela 8-** Médias ( $\pm$  D.P.) de eritrócitos e leucócitos (granulócito e agranulócito) de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

Grupo Experimental	Eritrócito	Leucócitos Granulócitos	Leucócitos Agranulócitos	Leucócitos Totais
Controle- 7 dias	1636,30 ( $\pm 25,33$ ) <sup>b</sup>	59,80 ( $\pm 6,68$ ) <sup>b</sup>	303,90 ( $\pm 23,58$ ) <sup>b</sup>	363,70 ( $\pm 25,33$ ) <sup>b</sup>
FSA- 7 dias	1480,40 ( $\pm 84,55$ ) <sup>a</sup>	99,00 ( $\pm 17,31$ ) <sup>a</sup>	420,60 ( $\pm 97,88$ ) <sup>a</sup>	519,60 ( $\pm 84,55$ ) <sup>a</sup>
Controle- 14 dias	1632,00 ( $\pm 25,23$ ) <sup>b</sup>	61,20 ( $\pm 5,67$ ) <sup>b</sup>	306,80 ( $\pm 23,63$ ) <sup>b</sup>	368,00 ( $\pm 25,23$ ) <sup>b</sup>
FSA- 14 dias	1576,60 ( $\pm 60,03$ ) <sup>b</sup>	47,80 ( $\pm 9,91$ ) <sup>b,c</sup>	375,60 ( $\pm 60,62$ )	423,40 ( $\pm 60,03$ ) <sup>b</sup>

Letras diferente=diferença estatística significativa



**Figura 12.** Médias ( $\pm$  D.P.) de eritrócitos e leucócitos (granulócito e agranulócito) de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias (letras diferente= diferença estatística significativa).

#### 6.4 Atividade da Enzima Lisozima

A atividade de lisozima foi estabelecida na diluição do soro em PBS de  $\frac{1}{4}$  aos 31 minutos. Observou-se um aumento significativo da média dos animais do grupo FSA- 14 dias em comparação aos animais do grupo controle- 7 e 14 dias ( $p= 0,002$ ) (Tabela 9).

**Tabela 9-** Médias ( $\pm$  D.P.) da atividade da enzima lisozima após 31 minutos em *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

Grupo Experimental	31 minutos (unidade mL <sup>-1</sup> )
Controle- 7 dias	80,90 ( $\pm 36,78$ ) <sup>b</sup>
FSA- 7 dias	92,03 ( $\pm 7,39$ )
Controle- 14 dias	81,65 ( $\pm 36,59$ ) <sup>b</sup>
FSA- 14 dias	106,29 ( $\pm 22,30$ ) <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup> Diferença estatística significativa

#### 6.5 Avaliação Histopatológica Branquial, Hepática e Renal

A análise microscópica branquial dos animais do grupo controle- 7 e 14 dias, demonstrou um padrão de normalidade (Figura 13a), com a presença de um capilar sanguíneo apoiado por células pilares, células epiteliais ao longo e na base da lamela secundária e células de muco e de cloreto na base da lamela secundária.

Analisando-se morfometricamente a área das células de muco das brânquias, nota-se uma diferença estatística entre os grupos controle (7 e 14 dias) e os grupos expostos à FSA (7 e 14 dias) ( $p= 0,0001$ ), além de uma diferença estatística entre o



grupo FSA- 7 dias e o grupo FSA- 14 dias ( $p= 0,0001$ ) indicando uma hipertrofia das células de muco dos grupos expostos à FSA de petróleo por 7 e 14 dias (Tabela 10).

Além disso, foi realizada a medição de densidade de células de muco, notou-se que há diferenças estatísticas entre os grupos controle- 7 e 14 dias e os grupos FSA- 7 e 14 dias ( $p= 0,0001$ ), indicando uma hiperplasia de células de muco nos grupos expostos à FSA de petróleo (Tabela 10).

**Tabela 10-** Médias ( $\pm$  D.P.) da área (em  $\mu\text{m}^2$ ) e da densidade da célula de muco de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

Grupo Experimental	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Densidade (células)
Controle- 7 dias	38,23 ( $\pm 8,72$ ) <sup>a</sup>	80 ( $\pm 3$ ) <sup>a</sup>
FSA- 7 dias	48,30 ( $\pm 10,85$ ) <sup>b</sup>	125 ( $\pm 4$ ) <sup>b</sup>
Controle- 14 dias	39,29 ( $\pm 8,32$ ) <sup>a</sup>	81 ( $\pm 2$ ) <sup>a</sup>
FSA- 14 dias	58,21 ( $\pm 13,11$ ) <sup>c</sup>	124 ( $\pm 4$ ) <sup>b</sup>

Letras diferentes = diferença estatística significativa

Observou-se também a presença de células de muco ao longo da lamela secundária nos quatro grupos (Figura 13b).

Por meio da análise morfométrica da área de células de cloreto, observou-se uma diferença estatística significativa entre os grupos controle (7 e 14 dias) e os grupos expostos à FSA (7 e 14 dias) ( $p= 0,0001$ ), além de uma diferença estatística entre o grupo FSA- 7 dias e o grupo FSA- 14 dias ( $p= 0,017$ ) (Tabela 11).

Adicionalmente, com a densidade da célula de cloreto notou-se que há diferenças estatísticas entre os grupos controle- 7 e 14 dias e os grupos FSA- 7 e 14 dias ( $p= 0,0001$ ), indicando uma hiperplasia de células de cloreto nos grupos expostos à FSA de petróleo (Tabela 11).

**Tabela 11-** Médias ( $\pm$  D.P.) da área (em  $\mu\text{m}^2$ ) e da densidade da célula de cloreto de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

Grupo Experimental	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Densidade (células)
Controle- 7 dias	44,83 ( $\pm 8,76$ ) <sup>a</sup>	60,30 ( $\pm 2,26$ ) <sup>a</sup>
FSA- 7 dias	50,84 ( $\pm 10,29$ ) <sup>b</sup>	87,80 ( $\pm 2,82$ ) <sup>b</sup>
Controle- 14 dias	45,97 ( $\pm 9,19$ ) <sup>a</sup>	61,40 ( $\pm 2,22$ ) <sup>a</sup>
FSA- 14 dias	52,56 ( $\pm 8,44$ ) <sup>c</sup>	87,40 ( $\pm 2,84$ ) <sup>b</sup>

Letras diferentes = diferença estatística significativa

Houve também a presença de células de cloreto ao longo da lamela secundário em todos os grupos analisados (Figura 13c).

Analisando-se morfometricamente a área de células epiteliais, observou-se uma diferença estatística significativa entre os grupos controle (7 e 14 dias) e os

grupos FSA (7 e 14 dias) ( $p= 0,0001$ ), indicando uma hipertrofia das células epiteliais (Tabela 12).

**Tabela 12-** Médias ( $\pm$  D.P.) da área (em  $\mu\text{m}^2$ ) da célula epitelial de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

Grupo Experimental	Área ( $\mu\text{m}^2$ )
Controle- 7 dias	5,68 ( $\pm 1,69$ ) <sup>a</sup>
FSA- 7 dias	9,20 ( $\pm 2,43$ ) <sup>b</sup>
Controle- 14 dias	5,75 ( $\pm 1,64$ ) <sup>a</sup>
FSA- 14 dias	9,38 ( $\pm 2,57$ ) <sup>c</sup>

Letras diferentes = diferença estatística significante

Além disso, verificou-se hiperplasia das células epiteliais na base da lamela secundária em todos os grupos (Figura 13d) e apenas os grupos expostos à FSA (7 e 14 dias) observou-se fusão parcial na parte superior das lamelas secundária (Figura 13e) e deslocamento das células do epitélio (Figura 13f).

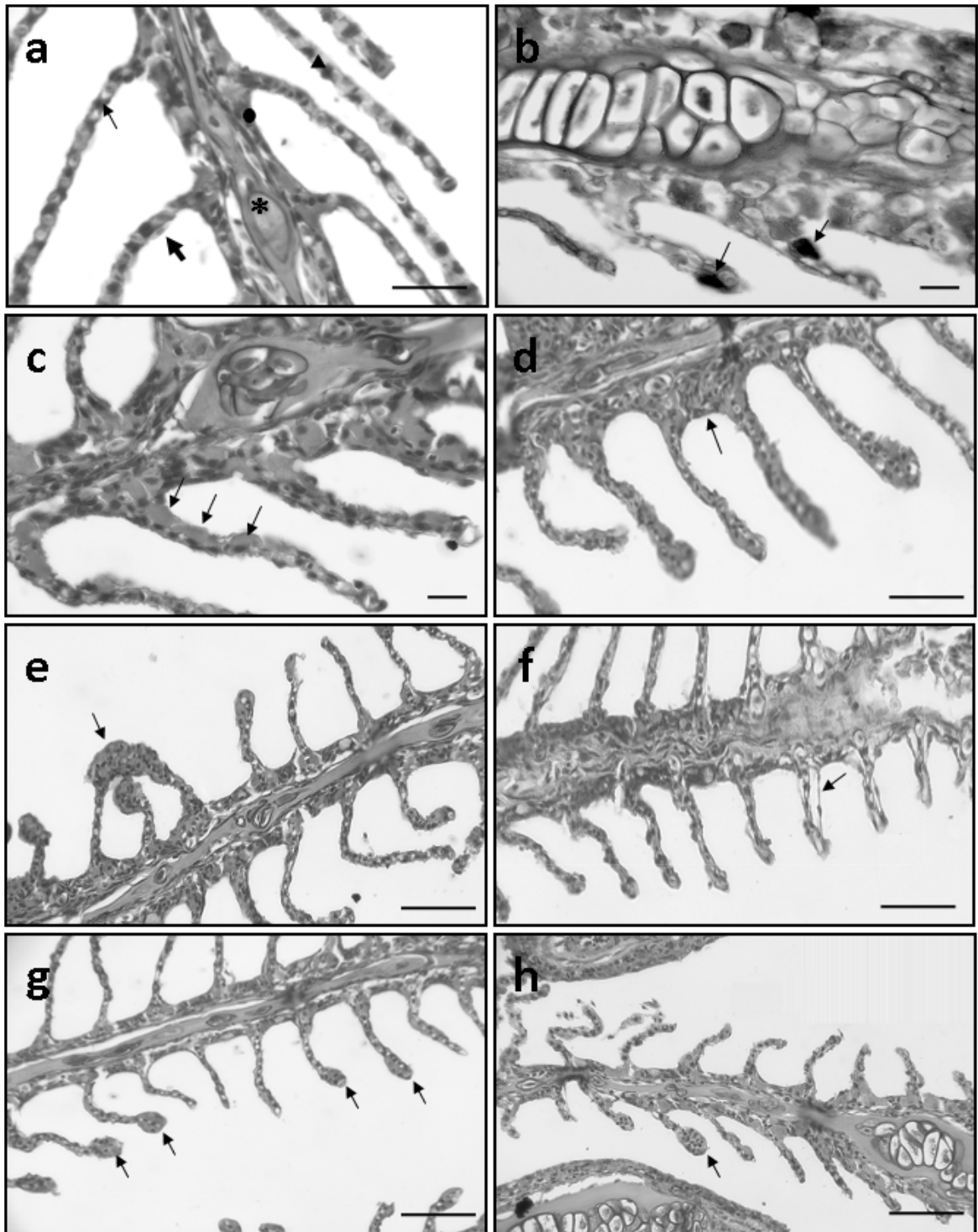
Examinando o comprimento e a largura das lamelas secundária das brânquias, constatou-se uma diferença estatística significativa, tanto no comprimento como na largura de lamelas secundárias entre os grupos controle- 7 e 14 dias e os grupo FSA-7 e 14 dias ( $p= 0,0001$ ) e, também, entre o grupo FSA- 7 dias e o grupo FSA- 14 dias ( $p= 0,0001$ ) (Tabela 13).

**Tabela 13-** Médias ( $\pm$  D.P.) do comprimento e largura (em  $\mu\text{m}$ ) da lamela secundária de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

Grupo Experimental	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )
Controle- 7 dias	87,97 ( $\pm 21,05$ ) <sup>a</sup>	4,90 ( $\pm 1,00$ ) <sup>a</sup>
FSA- 7 dias	93,30 ( $\pm 23,20$ ) <sup>b</sup>	6,23 ( $\pm 1,55$ ) <sup>b</sup>
Controle- 14 dias	89,39 ( $\pm 20,38$ ) <sup>a</sup>	4,93 ( $\pm 1,00$ ) <sup>a</sup>
FSA- 14 dias	126,78 ( $\pm 26,82$ ) <sup>c</sup>	7,74 ( $\pm 1,63$ ) <sup>c</sup>

Letras diferentes = diferença estatística significante

Além de todas essas observações, identificou-se em todos os grupos, desarranjo do capilar (Figura 13g) e aneurisma lamelar (Figura 13h).



**Figura 13.** Fotomicrografia de corte histológico em parafina das lamelas secundárias das brânquias de *Rachycentron canadum*. a. Controle- 7 dias. O triângulo indica capilar sanguíneo, a seta fina indica células pilares, a seta grossa indica células epiteliais lamelares, o círculo indica células epiteliais na base da lamela secundária e o asterisco indica a lamela primária. Coloração hematoxilina e eosina. b. FSA- 7 dias. Setas indicam células de muco ao longo das lamelas secundárias. Coloração PAS. c. FSA- 7 dias. Setas indicam células de cloreto ao longo da lamela secundária. Coloração hematoxilina e eosina. d. FSA- 7 dias. Seta indica hiperplasia das células epiteliais na base da lamela secundária. Coloração hematoxilina e eosina. e. FSA- 14 dias. Seta indica fusão lamelar no topo da lamela secundária. Coloração hematoxilina e eosina. f. FSA- 14 dias. Seta indica deslocamento lamelar. Coloração hematoxilina e eosina. g. FSA- 14 dias. Setas indicam desarranjo dos capilares. Coloração hematoxilina e eosina. h. FSA- 14 dias. Seta indica aneurisma lamelar. Coloração hematoxilina e eosina (escala 10  $\mu\text{m}$ ).

Aplicando-se o Índice de Alteração Histológica branquiais, obteve-se I= 14 para os animais dos grupos controle (7 e 14 dias) caracterizando o órgão como alterações leves e I= 19 para animais dos grupos FSA (7 e 14 dias) caracterizando o órgão como alterações moderadas (Tabela 14).

**Tabela 14-** Alterações histológicas branquiais encontradas em *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias e seus respectivos Índice de Alteração Histológica.

	Estágio	Controle 7 dias	FSA 7 dias	Controle 14 dias	FSA 14 dias
Hipertrofia das células epiteliais	I	-	OK	-	OK
Deslocamento das células do epitélio	I	-	OK	-	OK
Hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias	I	OK	OK	OK	OK
Fusão parcial no topo das lamelas secundárias	I	-	OK	-	OK
Hipertrofia das células de muco	I	-	OK	-	OK
Presença de células de muco nas lamelas secundárias	I	OK	OK	OK	OK
Hipertrofia das células de cloreto	I	-	OK	-	OK
Presença de células de cloreto nas lamelas secundárias	I	OK	OK	OK	OK
Desarranjo dos capilares	I	OK	OK	OK	OK
Aneurisma lamelar	II	OK	OK	OK	OK
<b>Índice de Alteração Histológica</b>		<b>14</b>	<b>19</b>	<b>14</b>	<b>19</b>

A análise microscópica renal dos animais dos grupos controle- 7 e 14 dias, resultou em um padrão de normalidade (Figura 14a). Foram observados túbulos proximais e distais cercados por células hematopoiéticas, glomérulos e cápsula de Bowman.

Examinando-se morfometricamente a área do núcleo das células tubulares, não foi possível observar diferença estatística entre os grupos experimentais (Tabela 15).

**Tabela 15-** Médias ( $\pm$  D.P.) da área (em  $\mu\text{m}^2$ ) do núcleo das células tubulares de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

Grupo Experimental	Área ( $\mu\text{m}^2$ )
Controle- 7 dias	11,52 ( $\pm 1,91$ )
FSA- 7 dias	11,55 ( $\pm 2,28$ )
Controle- 14 dias	11,50 ( $\pm 1,87$ )
FSA- 14 dias	11,72 ( $\pm 2,04$ )

Entretanto, na análise morfométrica da área do lúmen do túbulo distal, resultou em uma diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,0001$ ) entre os grupos

controle (7 e 14 dias) e os grupos FSA (7 e 14 dias), caracterizando um aumento do lúmen tubular (Tabela 16).

**Tabela 16-** Médias ( $\pm$  D.P.) da área (em  $\mu\text{m}^2$ ) do lúmen do túbulo distal de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

<b>Grupo Experimental</b>	<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>
<b>Controle- 7 dias</b>	68,95 ( $\pm 10,58$ ) <sup>a</sup>
<b>FSA- 7 dias</b>	76,73 ( $\pm 11,39$ ) <sup>b</sup>
<b>Controle- 14 dias</b>	69,33 ( $\pm 10,37$ ) <sup>a</sup>
<b>FSA- 14 dias</b>	77,69 ( $\pm 10,02$ ) <sup>b</sup>

Letras diferentes = diferença estatística significante

Estudando-se a morfologia do espaço da cápsula de Bowman, figura 14b, observou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,0001$ ) entre os grupos controle- 7 e 14 dias e os grupos FSA- 7 e 14 dias, resultando em um aumento do espaço da cápsula de Bowman (Tabela 17).

**Tabela 17-** Médias ( $\pm$  D.P.) do espaço da cápsula de Bowman (em  $\mu\text{m}$ ) de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

<b>Grupo Experimental</b>	<b>Espaço da cápsula de Bowman (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Controle- 7 dias</b>	3,59 ( $\pm 0,85$ ) <sup>a</sup>
<b>FSA- 7 dias</b>	5,43 ( $\pm 0,49$ ) <sup>b</sup>
<b>Controle- 14 dias</b>	3,80 ( $\pm 0,61$ ) <sup>a</sup>
<b>FSA- 14 dias</b>	5,51 ( $\pm 0,47$ ) <sup>b</sup>

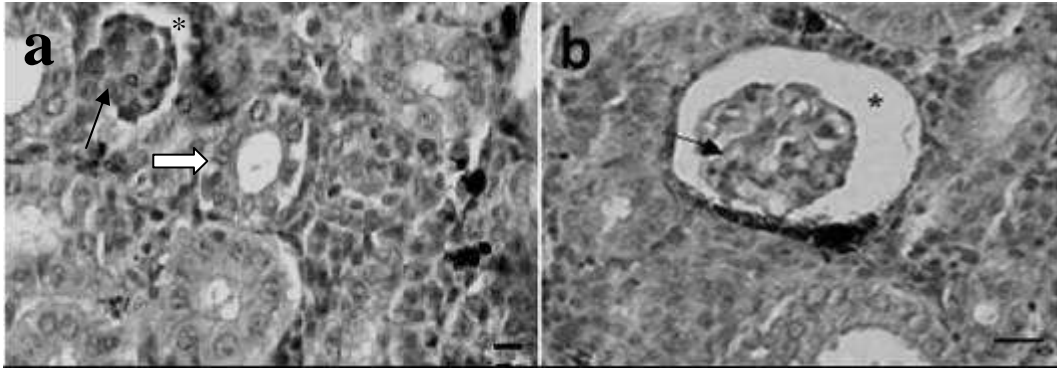
Letras diferentes = diferença estatística significante

Utilizando-se a análise de densidade de glomérulos, obteve-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,0001$ ) entre os grupos controle (7 e 14 dias) e os grupos FSA (7 e 14 dias) (Tabela 18).

**Tabela 18-** Médias ( $\pm$  D.P.) da densidade de glomérulos de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

<b>Grupo Experimental</b>	<b>Densidade (glomérulos)</b>
<b>Controle- 7 dias</b>	9,90 ( $\pm 1,10$ ) <sup>a</sup>
<b>FSA- 7 dias</b>	12,70 ( $\pm 1,42$ ) <sup>b</sup>
<b>Controle- 14 dias</b>	10,30 ( $\pm 0,95$ ) <sup>a</sup>
<b>FSA- 14 dias</b>	13,10 ( $\pm 1,60$ ) <sup>b</sup>

Letras diferentes = diferença estatística significante



**Figura 14.** Fotomicrografia de corte histológico em parafina do rim de *Rachycentron canadum*. a. Controle- 7 dias. Seta branca indica túbulo renal, seta preta indica glomérulo e o asterisco indica o aumento do espaço da cápsula de Bowman. Coloração hematoxilina e eosina. b. FSA- 7 dias. Seta indica glomérulo e o asterisco indica o aumento do espaço da cápsula de Bowman. Coloração hematoxilina e eosina (escala 10  $\mu\text{m}$ ).

Aplicando-se o Índice de Alteração Histológica renal, obteve-se os seguintes valores: I= 0 para os animais dos grupos controle (7 e 14 dias) e I= 2 para animais dos grupos FSA (7 e 14 dias) caracterizando todos os grupos como órgão funcionalmente normal (Tabela 19).

**Tabela 19-** Alterações histológicas renal encontradas em *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias e seus respectivos Índice de Alteração Histológica.

	Estágio	Controle 7 dias	FSA 7 dias	Controle 14 dias	FSA 14 dias
Aumento do espaço da cápsula de Bowman	I	-	OK	-	OK
Aumento do lúmen tubular	I	-	OK	-	OK
<b>Índice de Alteração Histológica</b>		<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>

A análise microscópica do fígado dos animais dos grupos controle demonstrou um padrão de normalidade (figura 15a). Foram observados células formando cordões hepáticos e hepatócitos com citoplasma homogêneo e núcleo bem definido.

Na análise morfométrica do núcleo dos hepatócitos, notou-se uma diferença estatística significativa entre os grupos controle- 7 e 14 dias e os grupos FSA- 7 e 14 dias ( $p= 0,0001$ ) e entre o grupo FSA- 7 dias e o grupo FSA- 14 dias ( $p= 0,0001$ ). Resultando em uma hipertrofia do núcleo dos hepatócitos (Tabela 20).

**Tabela 20-** Médias ( $\pm$  D.P.) da área (em  $\mu\text{m}^2$ ) do núcleo dos hepatócitos de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

Grupo Experimental	Área ( $\mu\text{m}^2$ )
Controle- 7 dias	8,29 ( $\pm 1,96$ ) <sup>a</sup>
FSA- 7 dias	10,75 ( $\pm 1,93$ ) <sup>b</sup>
Controle- 14 dias	8,34 ( $\pm 1,95$ ) <sup>a</sup>
FSA- 14 dias	12,23 ( $\pm 2,89$ ) <sup>c</sup>

Letras diferentes = diferença estatística significante

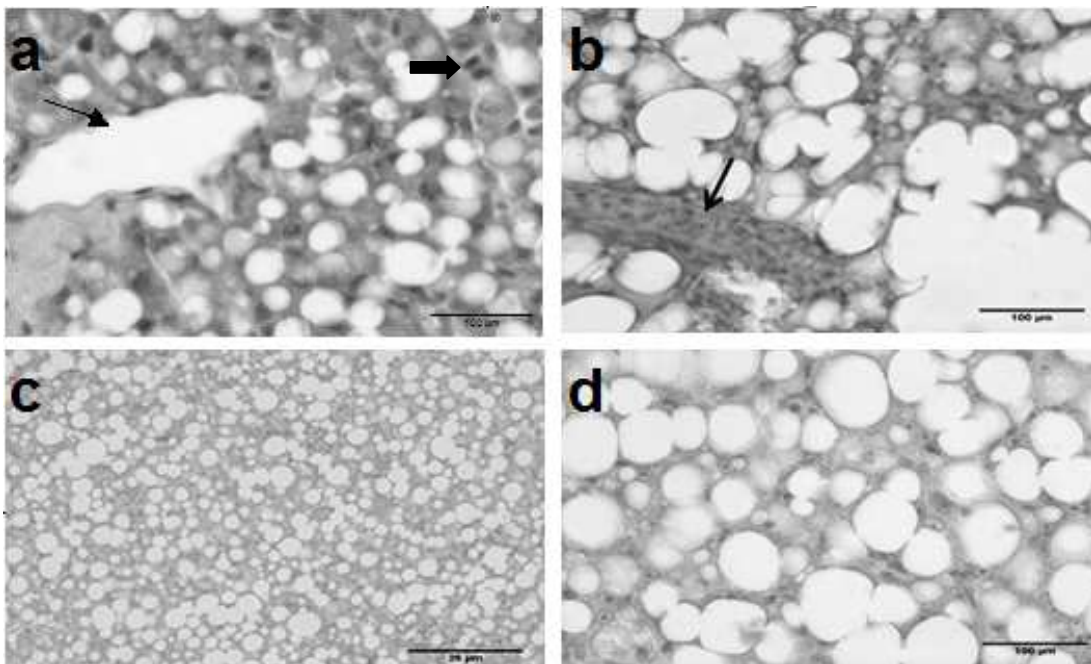
Com a análise da densidade de vasos sanguíneos hepáticos foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle- 7 dias e o grupo FSA- 7 dias ( $p= 0,009$ ) e entre o grupo controle- 14 dias e o grupo FSA- 14 dias ( $p= 0,019$ ) (Tabela 21).

**Tabela 21-** Médias ( $\pm$  D.P.) da densidade de vasos sanguíneos de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

Grupo Experimental	Densidade (vasos sanguíneos)
Controle- 7 dias	7,40 ( $\pm 1,71$ ) <sup>a</sup>
FSA- 7 dias	9,80 ( $\pm 1,75$ ) <sup>b</sup>
Controle- 14 dias	8,30 ( $\pm 1,57$ ) <sup>a</sup>
FSA- 14 dias	10,50 ( $\pm 1,27$ ) <sup>b</sup>

Letras diferentes = diferença estatística significante

Foram observados, ainda, hiperemia dos vasos hepáticos (Figura 15b) desarranjo de cordões hepáticos, atipia do contorno celular, intensa vacuolização citoplasmática (Figura 15 c-d) e nuclear nos animais dos grupos FSA- 7 e 14 dias.



**Figura 15.** Fotomicrografia de corte histológico em parafina do fígado de *Rachycentron canadum*. a. Controle- 7 dias. Seta grossa indica células formando cordões hepáticos, seta fina indica vaso sanguíneo sem acumulo de eritrócitos. Coloração hematoxilina e eosina. b. FSA- 7 dias. Seta indica hiperemia do vaso hepático c-d. FSA- 14 dias. Imagem mostra intensa vacuolização citoplasmática. Coloração hematoxilina e eosina. Coloração hematoxilina e eosina.

Aplicando-se o Índice de Alteração Histológica hepático, obteve-se  $I = 0$  para os animais dos grupos controle (7 e 14 dias), caracterizando como órgão

funcionalmente normal e I= 24 para animais dos grupos FSA (7 e 14 dias), caracterizando como órgão com alterações moderadas (Tabela 22).

**Tabela 22-** Alterações histológicas hepáticas encontradas em *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias e seus respectivos Índice de Alteração Histológica.

	Estágio	Controle 7 dias	FSA 7 dias	Controle 14 dias	FSA 14 dias
Desarranjo dos cordões hepáticos	I	-	OK	-	OK
Atipia do contorno celular	I	-	OK	-	OK
Aumento do volume nuclear	I	-	OK	-	OK
Intensa vacuolização citoplasmática	I	-	OK	-	OK
Hiperemia	II	-	OK	-	OK
Vacuolização nuclear	II	-	OK	-	OK
<b>Índice de Alteração Histológica</b>		<b>0</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>24</b>

## 6.6 Índice Hepatosomático

Calculando-se o índice hepatossomático (IHS), notou-se as seguintes médias demonstradas na tabela 23.

**Tabela 23-** Médias ( $\pm$  D.P.) do índice hepatossomático (IHS) de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

Grupo Experimental	IHS
Controle- 7 dias	3,48 ( $\pm 0,23$ ) <sup>a</sup>
FSA- 7 dias	7,08 ( $\pm 0,81$ ) <sup>b</sup>
Controle- 14 dias	3,47 ( $\pm 0,40$ ) <sup>*</sup>
FSA- 14 dias	5,69 ( $\pm 2,28$ ) <sup>**</sup>

<sup>a-b/ \* - \*\*</sup> Diferença estatística significativa

Observou-se uma diferença estatística no IHS entre o grupo controle- 7 dias e o grupo FSA- 7 dias ( $p= 0,005$ ) e, também entre o grupo controle- 14 dias e o grupo FSA- 14 dias ( $p= 0,048$ ).

## 6.7 Atividade de Enzimas do Metabolismo de Proteínas

Analisando-se a atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST) observaram-se as seguintes médias apresentadas na tabela 24.



**Tabela 24-** Médias ( $\pm$  D.P.) da atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST) em U/L de *Rachycentron canadum* expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias.

<b>Grupo Experimental</b>	<b>AST (U/L)</b>
<b>Controle- 7 dias</b>	14,25 ( $\pm$ 2,75)
<b>FSA- 7 dias</b>	33,00 ( $\pm$ 2,94) <sup>b</sup>
<b>Controle- 14 dias</b>	12,75 ( $\pm$ 1,71) <sup>b</sup>
<b>FSA- 14 dias</b>	60,25 ( $\pm$ 22,76) <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup> Diferença estatística significativa

Os dados demonstram que os animais do grupo FSA- 14 dias foi estatisticamente maior que os animais do grupo controle- 14 dias ( $p= 0,0001$ ), bem como os animais do grupo FSA- 7 dias ( $p= 0,027$ ).

Examinando-se a atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT), os dados obtidos em todos os grupos foi uma média de  $< 10$  U/L, o que significa que a atividade da enzima ALT não foi detectada nas amostras.

## 7 DISCUSSÃO

O fator de condição é frequentemente utilizado para estudar a biologia dos peixes, pois fornece informações importantes sobre seu estado fisiológico, com base no princípio de que os indivíduos de um determinado comprimento, apresentando maior peso, estão em uma condição fisiológicas melhores (LIMA-JUNIOR; CARDONE; GOITEIN, 2002).

Muitos estudos usam esse índice como uma referência adicional para estudar reprodução e ciclos sazonais, além de investigar o efeito dos poluentes (CLEMENTS; REES, 1997; DE LA TORRE; SALIBIAN; FERRARI, 2000; DETHLOFF; BAILEY; MAIER, 2001; LAFLAMME et al., 2000).

Moles e Norcross (1998) observaram uma diminuição do FC em juvenis de *Pleuronectes asper*, *Pleuronectes bilineatus* e *Hippoglossus stenolepis* exposto a sedimentos contaminados por óleo.

Em nossos estudos, observou-se que o fator de condição dos animais do grupo FSA-14 dias é menor estatisticamente em relação aos animais do grupo controle-14 dias, mostrando uma depleção das condições fisiológicas. Essa depleção é causada pelos hidrocarbonetos que, segundo Kiceniuk e Khan (1987), prejudicam a absorção de alimentos. Corroborando com o estudo de Carls et al. (1996), que observaram que os alimentos contaminados com óleo causou redução no crescimento de *Onchorhynchus gorbuscha*.

O sistema imunológico de peixes fornece potenciais biomarcadores, que podem ser sensíveis o suficiente para avaliar a contaminação ambiental (REYNAUD; DUCHIRON; DESCHAUX, 2003). Portanto, o presente estudo utilizou alguns parâmetros imunológicos inatos, como biomarcadores, para a avaliação da exposição à FSA de petróleo.

Um dos parâmetros do sistema imune inato analisado foram as contagens total e diferencial de leucócitos, que têm um grande valor para o diagnóstico de discrasias sanguíneas em peixes (HINES; YASHOUV, 1970). Estas contagens, de acordo com Mckim et al. (1977), mostram as alterações morfológicas e numéricas de células do sangue, que podem ser associadas com várias etiologias, incluindo alterações do ambiente aquático causados por produtos tóxicos (ADHIKARI et al., 2004). Entre os produtos tóxicos, está a FSA de petróleo, que, de acordo com o presente trabalho, alterou significativamente os leucócitos.

Os leucócitos são responsáveis pelo processo inflamatório, utilizando as vias sanguíneas para atuar em uma possível infecção ou lesão tecidual. Nesse trabalho, observou-se um aumento na contagem de leucócitos totais em 7 dias de exposição à FSA de petróleo. Mariappan et al. (2011) afirmam que o aumento de leucócitos é causado pela estimulação do sistema imune e o recrutamento dessas células, portanto, a exposição à FSA de petróleo por 7 dias recrutou leucócitos em resposta aos primeiros dias de exposição ao stress, mostrando uma tentativa de manter a estabilidade dos tecidos e o ambiente interno constante (homeostase).

No presente trabalho, após 14 dias de exposição à FSA de petróleo, observou-se uma diminuição do número de leucócitos, sugerindo uma possível supressão das defesas naturais (VOSYLIENÉ, 1999), indicando prejuízos ao sistema imune, na apresentação de antígeno, produção de citocinas e liberação de agentes anti-microbianos e anti-tumorais (VAZZANA et al., 2014). Leucopenia foi observada por Theron et al. (2014) que analisaram o efeito do óleo bruto sobre *Scophthalmus maximus* e correlacionou a leucopenia com os hidrocarbonetos, presentes na composição da FSA de petróleo.

Outro parâmetro muito utilizado para monitorar a influência de poluentes na imunidade inata de peixes, é a análise da atividade da enzima lisozima (SAURABH; SAHOO, 2008). Lisozima é uma enzima lítica que destrói paredes celulares bacterianas, clivando ligações glicosídicas nas camadas de peptidoglicano de bactérias gram-positivas (GRINDE; JOLLES; JOLLES, 1988; SAURABH; SAHOO, 2008) e, também ativa o sistema complemento e a fagocitose (ELLIS, 1990). Portanto, uma maior atividade da enzima lisozima tem sido comumente observada em peixes doentes (STUDNICKA; SIWICKI, 1990).

Para os estudos ecotoxicológicos com peixes, os níveis de lisozima foram frequentemente examinados em plasma ou soro. Sabe-se que exposição a substâncias tóxicas causa estimulação antigênica, alterando os níveis da atividade de lisozima, causando mudanças nas funções imuno-reguladoras (BOLS et al., 2001).

Sanchez-Dardon et al. (1999) observaram um aumento da atividade da enzima lisozima após contaminação por cádmio e zinco em *Oncorhynchus mykiss*, por um período de 30 dias, corroborando com o nosso resultado, no qual a exposição à FSA de petróleo provavelmente estimulou a atividade antigênica

resultando em um aumento da atividade da enzima lisozima no soro após a exposição por um período de 14 dias.

As brânquias são órgãos responsáveis, principalmente, pela troca gasosa, pelo processo de osmorregulação, pelo equilíbrio ácido-base e pela excreção de compostos nitrogenados. Sua posição anatômica permite um contato estreito com o ambiente externo, tornando-a uma das barreiras físicas do sistema imune inato de peixes. Essa característica torna as brânquias sensíveis a alterações na qualidade da água, sendo consideradas como alvo principal dos contaminantes (FERNANDES; MAZON, 2003; MAZON; CERQUEIRA; FERNANDES, 2002; POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

Uma das alterações encontradas nesse estudo foi a hipertrofia das células de muco, e a presença dessas células na lamela secundária nos animais dos grupos expostos à FSA de petróleo por um período de 7 e 14 dias. As células de muco apresentam muitas imunoglobulinas e enzimas, sendo responsáveis pela proteção imunológica (MONTEIRO et al., 2010). De acordo com Lichtenfels (1996), a hipertrofia e hiperplasia destas células resultam em um aumento da camada de muco, que atua como um filtro, isolando, coagulando e precipitando partículas, minimizando assim os danos causados pela FSA de petróleo.

Outra alteração observada foi a hipertrofia das células de cloreto e a presença dessas células na lamela secundária (nos animais do grupo FSA- 7 e 14 dias). Essas células são responsáveis pela osmoregulação, secretando cloreto de sódio (DE LA HOZ et al., 2014). Quando os animais são expostos a alterações ambientais, pode ocorrer uma hipertrofia relacionada com a proliferação das mitocôndrias e do retículo endoplasmático, numa tentativa de aumentar capacidade metabólica (COSTA et al., 2009), porém, de acordo com Mazon; Cerqueira; Fernandes (2002), estas alterações possivelmente causam um desequilíbrio na regulação osmótica devido a uma alteração no transporte iônico ativo.

Foram observadas ainda, uma hipertrofia e hiperplasia das células epiteliais dos animais do grupo FSA- 7 e 14 dias, que podem ser causadas por uma sobrecarga funcional do tecido branquial. A hiperplasia reduz o contato entre a água e o sangue do animal, reduzindo os danos para as lamelas, mas, conseqüentemente, prejudicando a eficiência da troca de gasosa, uma vez que reduz a área total do sistema respiratório (HINTON et al., 1992). Como uma conseqüência da hiperplasia em animais expostos à FSA de petróleo, observou-se a

fusão parcial na parte superior das lamelas secundárias, prejudicando ainda mais a eficiência da troca gasosa.

O deslocamento do epitélio lamelar, também observado nesse estudo, é uma das alterações mais precoces encontradas em brânquias de peixes expostos a agentes estressores. Essa alteração resulta em um espaço entre o epitélio lamelar e lamela secundária, podendo formar um edema. Com o aumento da difusão entre a água e o sangue causada por deslocamento, pode ocorrer uma perda na eficiência da troca gasosa e transporte de íons (MALLAT, 1985; THOPHON et al., 2003).

Outras alterações encontradas foram desarranjo capilar e aneurisma, mudanças que provavelmente são causados por uma ruptura de células pilares, responsáveis por manter a estrutura lamelar e controlar o fluxo sanguíneo. Uma vez as células pilares corrompidas, ocorre uma perda da estrutura dos capilares, causando um desarranjo. Este desarranjo pode acarretar em uma acumulação de células sanguíneas caracterizando um aneurisma (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2003).

O rim desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase osmótica em peixes marinhos. O organismo recebe um grande volume de fluxo sanguíneo e este órgão é uma importante via de excreção de metabólitos de vários poluentes, incluindo a FSA de petróleo (AU, 2004).

Apesar de poucos estudos utilizarem histologia renal como biomarcadores de poluição ambiental, Ortiz; Canales; Sarasquete (2003) alertam que lesões renais são bons indicadores de poluição ambiental.

Neste estudo, após a exposição à FSA de petróleo por 7 e 14 dias, foi encontrado alteração tubular (aumento do lúmen tubular). Alterações tubulares são degenerativas e causadas por distúrbio metabólico resultante, provavelmente, da exposição dos animais à FSA de petróleo (TAKASHIMA; HIBYIA, 1995).

Outra alteração encontrada foi o aumento do espaço da cápsula de Bowman nos animais do grupo FSA- 7 e 14 dias. Esse aumento pode prejudicar a filtração e excreção renal da FSA de petróleo. Como forma de adaptação, ocorre o aumento do número de glomérulos, que é pouco desenvolvido em peixes marinhos (AU, 2004), como observado nesse projeto, nos grupos FSA- 7 e 14 dias, aumentando assim, a excreção dos metabólitos da FSA de petróleo.

Este estudo não encontrou alterações histológicas branquiais e renais de estágio 3, que são consideradas mais graves por não serem mais reversíveis.

Porém, as alterações encontradas prejudicam o desempenho das funções de ambos os órgãos.

As alterações histopatológicas observadas no presente estudo, não são específicas para a FSA de petróleo, podendo ser encontradas após a exposição a diversos poluentes, e, portanto, apenas indicam a qualidade geral do ambiente, em vez de tipos específicos de poluentes (AU, 2004).

Essas alterações histológicas foram observadas por muitos pesquisadores. Rezende et al. (2014) observaram algumas destas alterações em *Oreochromis niloticus* coletados em um ambiente contaminado por metais pesados. Akaishi et al. (2004) verificaram alterações semelhantes depois de estudar o efeito da exposição aguda da FSA em *Astyanax* sp. Khan (2003) observou essas alterações em peixes marinhos em uma região com possível contaminação por óleo, assim como Simonato; Guedes; Martinez (2008) que estudaram o efeito do diesel em *Prochilodus lineatus*, e, Norton; Mattie; Kearns (1985) que estudaram a exposição durante 24 e 48 horas de uma mistura homogênea de benzeno, tolueno e xileno em *Pimephales promelus*.

Esses estudos mostram que a sensibilidade das brânquias e rim à fração solúvel em água de petróleo e óleo tornam estes órgãos um modelo eficiente para o estudo de impacto ambiental por derivados de petróleo. Porém, vale ressaltar que as brânquias e os rins são órgãos essenciais na saúde de peixes e alterações histológicas podem comprometer a sua sobrevivência (DI GIULIO; HINTON, 2008).

A concentração subletal de 0,3 ppm da FSA de petróleo no período de 7 e 14 dias afeta de forma representativa o sistema imune inato do peixe marinho *Rachycentrum canadum*. Estes dados indicam uma importância ecotoxicológica, pois a fração solúvel em água de petróleo tem potencial imunossupressor, levando os peixes a maior susceptibilidade a várias doenças.

O fígado pode ser considerado um órgão alvo, pois é um órgão desintoxicador essencial para o metabolismo e para a excreção de substâncias tóxicas (BERNET et al., 1999; FERNANDES et al., 2008). A alteração da estrutura física e bioquímica deste órgão pode indicar o estado de saúde dos animais após a exposição de poluentes (MYERS et al., 1998).

Como um dos parâmetros hepáticos, foram avaliadas alterações histológicas hepáticas. Foi observada uma intensa vacuolização citoplasmática nos animais expostos à FSA de petróleo. Essa intensa vacuolização pode ser um indicativo de

processos degenerativos, decorrentes da metabolização anormal de lipídeos, como a peroxidação (LEE et al., 2012; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995), possivelmente como resultado da exposição à FSA de petróleo. Desta forma, a intensa vacuolização pode ter levado ao desarranjo dos cordões hepáticos observado nos animais expostos à FSA de petróleo por 7 e 14 dias.

Observou-se, ainda, em animais expostos à FSA de petróleo, aumento do volume nuclear dos hepatócitos, o que pode indicar uma intensificação da atividade metabólica dos hepatócitos (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995).

Foi observada uma hiperemia dos vasos hepáticos no grupo dos animais expostos à FSA. A hiperemia é o aumento de células sanguíneas causada, provavelmente, por um aumento do fluxo sanguíneo no tecido hepático, facilitando assim o transporte de nutrientes e melhora da oxigenação em áreas com possíveis injúrias (ANDERSON; ZEEMAN, 1995).

Não foram encontradas, assim como na análise histológica branquial e renal, alterações histológicas de estágio 3, aquelas consideradas mais graves por não serem mais reversíveis.

O índice hepatossomático em peixes pode indicar o estado metabólico hepático alterado (HUUSKONEN; SEPPA, 1995; TELES; PACHECO; SANTOS, 2006), sendo um bom parâmetro hepático. Aumento do IHS foi observado em estudos em ambientes contaminados por HPA, em *Ameiurus nebulosus* (PINKNEY et al., 2001; YANG; BAUMANN, 2006), corroborando com o presente estudo, que observou um aumento do IHS no grupo exposto à FSA por 7 e 14 dias.

Aumento do IHS e diminuição no FC são observados em estudos em que os animais foram coletados em áreas contaminadas (ADAMS; RYON, 1994; KARELS et al., 1998; VAN DER OOST et al., 1996), como observado nesse estudo em animais do grupo expostos à FSA por um período de 14 dias. Khan (1998), afirma que a relação entre o aumento do IHS e a diminuição da FC sugere que a exposição à FSA de petróleo afeta não só o metabolismo hepático, como a fisiologia geral dos peixes.

Porém, Domingo et al. (2007) observaram o aumento do IHS sem alteração no FC, como observado no presente estudo nos animais expostos à FSA por 7 dias. Esses dados mostram que a exposição por um período de 7 dias não afetou a fisiologia geral dos peixes, porém foi suficiente para alterar o metabolismo hepático.

Outro parâmetro hepático analisado no presente estudo foi a atividade das enzimas AST e ALT. Estas enzimas desempenham um papel essencial no catabolismo de aminoácidos, e são utilizados para demonstrar os danos ao fígado (GHOLAMI-SEYEDKOLAEI et al., 2013; ORUÇ; UNER, 1999; POLEKSIC; KARAN, 1999).

AST é uma enzima localizada predominantemente nas mitocôndrias e ALT é uma enzima localizada no citosol das células hepáticas, ambas com baixa atividade. Após uma danificação das células hepáticas, a enzima ALT é liberada rapidamente em comparação a enzima AST, aumentando a atividade no soro (AL-HABORI et al., 2002; MING et al., 2012). No presente estudo, foi observado apenas o aumento da atividade de AST no soro, sugerindo que a exposição à FSA de petróleo afetou as células hepáticas, prejudicando as suas funções. Porém, por ser uma exposição crônica, não foi detectada a atividade da enzima ALT.

Alguns estudos mostram alterações da atividade da enzima AST em peixes expostos a outros contaminantes, como a clomazona (CRESTANI et al., 2006), o glifosato (GHOLAMI-SEYEDKOLAEI et al., 2013; LORO et al., 2015) e o cobre (KARAN et al., 1998).

Por ser um órgão responsável por várias reações bioquímicas, incluindo o metabolismo dos metais, o fígado torna-se sensível a exposição à FSA de petróleo. Uma vez danificado, pode diminuir suas funções, prejudicando, assim, o sistema de biotransformação dos peixes.

Vale ressaltar que a avaliação do efeito da exposição à FSA de petróleo no peixe marinho nativo *Rachycentron canadum* é de extrema importância. Os dados encontrados nesse estudo mostram que os animais têm alterações em alguns parâmetros do sistema imune inato e hepáticos, podendo alterar funções vitais e levar os animais a óbito. Além disso, o conhecimento das alterações e suas adaptações servirão como base para a conservação da espécie e um monitoramento ambiental mais eficaz no litoral brasileiro.



## 8 CONCLUSÃO

A partir do exposto, conclui-se que a concentração subletal de 0,3 ppm da fração solúvel em água (FSA) de petróleo causou depleção fisiológica do peixe marinho *Rachycentron canadum*, além de alterações nos parâmetros imunes e hepáticos.

A exposição à FSA de petróleo causou mudanças no valor relativo de células sanguíneas e no índice hepatossomático; alterações histológicas branquiais, renais e hepáticas; além do aumento da atividade das enzimas lisozima e aspartato aminotransferase. Essas alterações podem causar imunossupressão nos animais, e ainda, podem comprometer o funcionamento do sistema de biotransformação.

Não foram observados alterações histológicas de terceiro estágio (alterações graves e irreversíveis) e aumento da atividade da enzima alanina aminotransferase.

*Rachycentron canadum* demonstrou ser um bom modelo biológico para estudos de avaliação dos efeitos da fração solúvel em água de petróleo.

Estudos que determinem alterações em órgãos alvos para a ação da FSA devem ser realizados a fim de prever o impacto nas populações dos peixes estudados e para um monitoramento ambiental mais eficiente.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ADAMS, S. M.; RYON, M. G. A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant-related stress on fish populations. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**, v. 3, p. 15-25, 1994.

ADHIKARI, S. et al. Effects of cipermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, p. 220-226, 2004.

AKAISHI, F. M. et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 244-253, 2004.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1999. 453 p.

AL-HABORI, M. et al. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Ethno-Pharmacology**, v. 83, p. 209-217, 2002.

ALLAN, S. E.; SMITH, B. W.; ANDERSON, K. A. Impact of the Deepwater Horizon oil spill on bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons in Gulf of Mexico coastal waters. **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 2033-2039, 2012.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, 2003.

ANDERSON, D. P.; ZEEMAN, M. G. Immunotoxicology in Fish. In: RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology effects: environmental fate and risk assessment**. 2nd ed. Delaware: Taylor & Francis, 1995. p. 345-369.

ANYAKORA, C. et al. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, p. 323-330, 2005.

ARENDRT, M. D.; OLNEY, J. E.; LUCY, J. A. Stomach content analysis of cobia, *Rachycentron canadum*, from lower Chesapeake Bay. **Fishery Bulletin- National**, v. 99, p. 665-670, 2001.

AU, D. W. T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 817-834, 2004.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice in of histological technicians**. 2nd ed. London: Chruchill, 1982. 662 p.

---

<sup>1</sup> De acordo com:  
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARBIERI, E.; BONDIOLI, A. C. V. Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. **Aquaculture Research**, v. 46, p. 565-571, 2015.

BARBIERI, E.; DOI, S. A. Acute toxicity of ammonia on juvenile Cobia (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766) according to the salinity. **Aquaculture International**, v. 20, p. 373-382, 2012.

BENNETI, D. D. et al. Advances in hatchery and grow-out technology of cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus). **Aquaculture**, v. 39, p. 701-711, 2008.

BERNET, D. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BOLS, N. C. et al. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 853-873, 2001.

BONGA, S. E. W. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 591-625, 1997.

BOWDEN, T. J. Modulation of the immune system of fish by their environment. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, p. 373-383, 2008.

BRITISH PETROLEUM STATISTICAL REVIEW OF WORLD ENERGY. **Oil**. London: BP Statistical Review of World Energy, 2015. 48 p.

CAMPOS, C. M.; MORAES, J.; MORAES, F. R. Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no Rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 200-205, 2008.

CARDOSO, L. C. **Petróleo do poço ao posto**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2005. 192 p.

CARLS, M. G. et al. Growth, feeding and survival of pink salmon fry exposed to food contaminated with crude oil. **American Fisheries Society Symposium**, v. 18, p. 608-618, 1996.

CAVALLI, R. O.; HAMILTON, S. Marine fish farming in Brazil with emphasis on cobia production. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 64-69, 2009.

CLEMENTS, W. H.; REES, D. E. Effects of heavy metals on prey abundance, feeding habits, and metal uptake of brown trout in the Arkansas River, Colorado. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 126, p. 774-785, 1997.

COLLIER, T. K. et al. Petroleum exposure and associated biochemical effects in subtidal fish after the Exxon Valdez oil spill. **American Fisheries Society Symposium**, v. 18, p. 671-683, 1996.

COSTA, P. M. et al. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. **Aquatic Toxicology**, v. 92, p. 202-212, 2009.

CRESTANI, M. et al. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 48-55, 2006.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes- Assessment by flow cytometry and microscopy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, p. 161-171, 1999.

DE LA HOZ, M. F. T. et al. Surface ultrastructure of the gills of *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835)(Teleostei: Atheriniformes) from a temperate Shallow Lake. **International Journal of Morphology**, v. 32, p. 1341-1346, 2014.

DE LA TORRE, F. R.; SALIBIAN, A.; FERRARI, L. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. **Environmental Pollution**, v. 109, p. 277-282, 2000.

DEAN, J. H.; HOUSE, R. V.; LUSTER, M. I. Immunotoxicology: effects of, and response to, drugs and chemicals. **Principles and Methods of Toxicology**, p. 1415-1450, 2001.

DEPLEDGE, M. H. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: FOSSI, M. C.; LEONZIO, C. **Nondestructive biomarkers in vertebrates**. Lewis Publishers: Boca Raton, 1993. p. 261-285.

DETHLOFF, G. M.; BAILEY, H. C.; MAIER, K. J. Effects of dissolved copper on select hematological, biochemical, and immunological parameters of wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, p. 371-380, 2001.

DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **The toxicology of fishes**. Boca Raton: Crc Press, 2008. 1096 p.

DOMINGO, J. L. et al. Benefits and risks of fish consumption. Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. **Toxicology**, v. 230, p. 219-226, 2007.

DOTTA, G. et al. Hematological profile of the red snapper *Lutjanus analis* captured in Florianópolis, SC, Brazil, and cultured in floating net cages. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41, p. 183-189, 2015.

DOUGHERTY, J. Employee health monitoring data bases and their role in defining the safety of chemical products. **International Archives Occupational and Environmental Health**, v. 71, p. 101-103, 1998.

EIROA, A. A. et al. Critical approach to synchronous spectrofluorimetry II. **Trends In Analytical Chemistry**, v. 29, p. 902-927, 2010.

ELLIS, A. E. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 827-839, 2001.

ELLIS, A. E. Lysozyme assay. In: STOLEN, J. S. et al. **Techniques in fish immunology**. Fair Haven: SOS Publication, 1990. p. 101-103.

ERNST, V. V.; NEFF, J. M.; ANDERSON, J. W. The effects of the water-soluble fractions of No. 2 fuel oil on the early development of the estuarine fish, *Fundulus grandis* Baird and Girard. **Environmental Pollution**, v. 14, p. 25-35, 1977.

EZIKE, C.; UFODIKE, E. B. C. Blood assay of African cat fish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) exposed to petrol. **Journal of Aquatic Sciences**, v. 24, p. 1-5, 2014.

FARIAS, R. F. **Introdução à química do petróleo**. Rio de Janeiro: Ciência Moderna, 2008.

FEARON, D. T. Seeking wisdom in innate immunity. **Nature**, v. 388, p. 323-324, 1997.

FERNANDES, C. et al. Monitoring pollution in Esmoriz–Paramos lagoon, Portugal: Liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 145, p. 315-322, 2008.

FERNANDES, M. N.; MAZON, A. F. Environmental pollution and fish gill morphology. In: VAL AL, K. B. G. **Fish Adaptations**. Enfield: Science Publishers, 2003. p. 203-231.

FISCHER, U. et al. Cytotoxic activities of fish leucocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, p. 209-226, 2006.

FISHBASE. **Native Distribution Map for *Rachycentron canadum* (Cobia)**. 2013. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/3542#>>. Acesso em: 02 jun. 2015.

FRONAPE- FROTA NACIONAL DE PETROLEIROS. **Plano de emergência para derrames de hidrocarbonetos**. Rio de Janeiro: Petrobrás-FRONAPE, 2002.

GHOLAMI-SEYEDKOLAEI, S. J. et al. Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: Assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 135-141, 2013.

GIDDONS, P.H. **Early days of oil**. Princeton: Princeton University Press, 1948.

GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, p. 115-127, 2002.

GRINDE, B.; JOLLES, J.; JOLLES, P. Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **European Journal Biochemistry**, v. 173, p. 269-273, 1988.

GUPTA, R. B.; DEMIRBAS, A. **Gasoline, diesel and ethanol biofuels from grasses and plants**. New York: Cambridge University Press, 2010.

HARZER, B.; STIPP, M. C.; HERRERIAS, T. Avaliação da função hepática de peixes *Rhamdia quelen* expostos aos desreguladores endócrinos estriol e estrona. **Conselho Editorial Científico**, v. 8, p. 82, 2015.

HINES, R.; YASHOUV, A. Differential leucocyte counts and total leucocyte and erythrocyte counts for some normal israeli mirror carp. **Bainidgeh**, v. 22, p. 106-113, 1970.

HINTON, D. E. et al. Histopathologic biomarkers. In: HUGGET, R. J. et al. **Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. p. 155-209.

HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A. Hematology of fish. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. p. 1120-1125.

HUUSKONEN, S.; SEPPA, P. L. Hepatic cytochrome P4501A and other biotransformation activities in perch (*Perca fluviatilis*): the effects of unbleached pulp mill effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 31, p. 27-41, 1995.

INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION LIMITED-ITOPF. **Oil tanker spill statistics**. London: ITOF, 2014.

JIRAUNGKOORSKUL, W. et al. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology**, v. 18, p. 260-267, 2003.

KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4th ed. San Diego: Academic, 1989. 932 p.

KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; WITKO-SARSAT, V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. **Contributions to microbiology**, v. 15, p. 118-146, 2008.

KARAN, V. et al. Functional enzymes activity and gill histology of carp after cooper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, p. 49-55, 1998.

KARELS, A. E. et al. Effects of ECF-bleached kraft mill effluent on reproductive steroids and liver MFO activity in populations of perch and roach. **Ecotoxicology**, v. 7, p. 123-132, 1998.

KAZEMPOOR, R. et al. Histopathological changes of water soluble fraction of Iranian crude oil in muscle of yellow fin sea bream (*Acanthopagrus latus*). **International Journal of Biosciences**, v. 6, p. 451-459, 2015.

KHAN, R. A. Health of flatfish from localities in Placentia Bay, Newfoundland, contaminated with petroleum and PCBs. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, p. 485-492, 2003.

KHAN, R. A. Influence of petroleum at a refinery terminal on feral winter flounder, *Pleuronectes americanus*. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 61, p. 770-777, 1998.

KICENIUK, J. W.; KHAN, R. A. Effect of petroleum hydrocarbons on Atlantic cod, *Gadus morhua*, following chronic exposure. **Canadian Journal of Zoology**, v. 65, p. 490-494, 1987.

KIM, D. H.; AUSTIN, B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 21, p. 513-524, 2006.

LAFLAMME, J. S. et al. Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 57, p. 1692-1700, 2000.

LAGLER, K. **Freshwater fishery biology**. W.M.C. Brown Co, 1966. 421 p.

LAKE, L. W. **Petroleum engineering handbook: general engineering**. Society of Petroleum Engineers, 2006.

LANGIANO, V. C. **Toxicidade do Roundup® e seus efeitos para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus***. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

LEE, O. et al. Biosensor zebrafish provide new insights into potential health effects of environmental estrogens. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, p. 990, 2012.

LEITE, J. R. M.; SILVA, L. J. A. Juridicidade do Dano Ambiental: gestão da zona costeira e aspectos da exploração do pré-sal pelo Brasil. **Sequência (Florianópolis)**, v. 65, p. 305-328, 2012.

LICHTENFELS, A. J. E. C. et al. Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. **Journal Comparative Pathology**, v. 115, p. 47-60, 1996.

LIE, O. et al. Study of lysozyme activity in some fish species. **Diseases Aquatic Organisms**, v. 6, p. 1-5, 1989.

LIMA-JUNIOR, S. E.; CARDONE, I. B.; GOITEIN, R. Determination of a method for calculation of allometric condition factor of fish. **Acta Scientiarum: Biological and Health Sciences**, p. 397-400, 2002.

LINNAEUS, C. Systema natura. **British Museum Natural History**, p. 491, 1766.

LORO, V. L. et al. Glyphosate-based herbicide affects biochemical parameters in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837). **Neotropical Ichthyology**, v. 13, p. 229-236, 2015.

MACHADO, M. R.; FANTA, E. Effects of the organophosphorous methyl paraterion on the branchias epithelium of a frescwater fisch metynnis roosevelti. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 46, p. 361-372, 2003.

MAGNADOTTIR, B. Immunological control of fish diseases. **Marine Biotechnology**, v. 12, p. 361-379, 2010.

MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal Fisheries Aquatic Science**, v. 42, p. 630, 1985.

MARIAPPAN, G. et al. Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and toxicological evaluation of some newer 3-methyl pyrazolone derivatives. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, p. 115-122, 2011.

MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research**, v. 88, p. 52-63, 2002.

MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Archives Pathology Laboratory Medicine**, v. 100, p. 405-414, 1976.

MCKIM, J. M. Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 34, p. 1148-1154, 1977.

MIGUEL, A. H. et al. Seasonal variation of the particle size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and of major aerosol species in Claremont, California. **Atmospheric Environment**, v. 38, p. 3241-3251, 2001.

MING, J. H. et al. Effects of emodin and vitamin C on growth performance, biochemical parameters and two HSP70s mRNA expression of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) under high temperature stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, p. 651-661, 2012.

MOLES, A.; NORCROSS, B. L. Effects of oil-laden sediments on growth and health of juvenile flatfishes. **Canadian Journal Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 55, p. 605-610, 1998.

MONTEIRO, K. M. et al. Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. **Proteomics**, v. 10, p. 1985-1999, 2010.



MYERS, M. S. et al. Toxicopathic hepatic lesions as biomarkers of chemical contaminant exposure and effects in marine bottom fish species from the northeast and Pacific Coast, USA. **Marine Pollution Bulletin**, v. 37, p. 92-113, 1998.

NEFF, J. M. Biological effects of oil in the marine environment. **Chemical Engineering Progress**, v. 83, 1987.

NICODEM, D. E. et al. Photochemistry of petroleum. **Progress in Reaction Kinetics and Mechanism**, v. 26, p. 219, 2001.

NILSSON, G. E. Gill remodeling in fish - a new fashion or an ancient secret?. **Journal Experimental Biology**, v. 210, p. 2403-2409, 2007.

NORTON, W. N.; MATTIE, D. R.; KEARNS, C. L. The cytopathologic effects of specific aromatic hydrocarbons. **The American Journal of Pathology**, v. 118, p. 387, 1985.

OLAH, G.; GOEPPERT, A.; PRAKASH, G. K. S. **Beyond oil and gas- The methanol economy**. 2nd ed. Alemanha: Wiley-VCH, 2009.

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

ORTIZ, J. B.; CANALES, M. L. G.; SARASQUETE, C. Histopathological changes induced by lindane (gamma-HCH) in various organs of fishes. **Scientia Marina**, v. 67, p. 53-61, 2003.

ORUÇ, E. O.; UNER, N. Effects of 2, 4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. **Environmental Pollution**, v. 105, p. 267-272, 1999.

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbation of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulphate. **Aquatic Toxicology**, v. 50, p. 109-124, 2000.

PAULSEN, S. M. et al. *In vivo* effects of beta- glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 14, p. 39-54, 2003.

PAULSEN, S. M.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast beta-glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, p. 23-37, 2001.

PETROBRÁS. **Pré-sal**. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/areas-de-atuacao/exploracao-e-producao-de-petroleo-e-gas/pre-sal/>>. Acesso em: 02 jun. 2015.

PETROBRÁS. **Trajetória**. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/pt/quem-somos/trajetoria/>>. Acesso em: 02 jun. 2015.

PINKNEY, A. E. et al. Tumor prevalence and biomarkers of exposure in brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from the tidal Potomac River, USA, Watershed. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 1196-1205, 2001.

POFFO, I. R. F. **Vazamentos de óleo no litoral norte do estado de São Paulo: Análise histórica (1974 a 1999)**. 2000. 175 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

POLEKSIC, V.; KARAN, V. Effects of trifluralin on carp: biochemical and histological evaluation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, p. 213-221, 1999.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Rome: FAO, 1994. p. 339-352.

RANGEL, C. M. A.; BAPTISTA-NETO, J. A.; FONSECA, E. M. Estudo geoambiental das concentrações de hidrocarbonetos de petróleo (Policíclicos aromáticos–HPAs) ao longo do Rio Estrela, Baía de Guanabara–RJ. **Revista Tamoios**, v. 8, n. 2, 2012.

REYNAUD, S.; DUCHIRON, C.; DESCHAUX, P. 3-methylcholanthrene inhibits lymphocyte proliferation and increases intracellular calcium levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 63, p. 319-331, 2003.

REZENDE, K. F. O. et al. Histopathological and genotoxic effects of pollution on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) in the Billings Reservoir (Brazil). **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 24, p. 404-411, 2014.

ROCHA, E.; MONTEIRO, R. A. F. Histology and cytology of fish liver: A review. In: SAKSENA, D. N. **Ichthyology: recent research advances**. New Hampshire: Science Publishers, 1999. p. 321-344.

RODRIGUES, R. V. et al. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 2054-2059, 2010.

ROMÃO, S. et al. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 49, p. 441-448, 2006.

ROSENFELD, G. Corante pancromico para hematologia e citologia clínica, nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-334, 1947.

RÜDIGER, H. W. Biomonitoring in occupational medicine. In: MARQUART, H.; SCHÄFER, S. G.; MCCLELLAN, R.; WELSCH, F. **Toxicology**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 1027-1039.

SAEED, T.; MUTAIRI, M. Chemical composition of the water soluble fraction of leaded gasolines em sea water. **Environment International**, v. 25, p. 117-129, 1999.

SALVO, L. M. et al. Proteomic approach for the evaluation of the effects of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) irradiated in the marine fish *Rachycentron canadum*. **Society of Environmental Toxicology and Chemistry**, Europe 23rd Annual Meeting in Glasgow, UK, 2013.

SANCHEZ-DARDON, J. Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vivo*. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 18, p. 1492-1497, 1999.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 223-239, 2008.

SCHMALZ, W. F.; HERNANDEZ, A. D.; WEIS, P. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Environmental Research**, v. 54, p. 539-542, 2002.

SILVA, A. G.; MARTINEZ, C. B. R. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 185-192, 2007.

SILVA, J. R. M. C. et al. Experimental studies on the relationship between fish (*Notothenia coriiceps*, Richardson, 1844) and parasite (*Pseudoterranova decipiens*, Krabbe, 1878) at Antarctic temperatures. **Polar Biology**, v. 22, p. 417-424, 1999.

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 oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 112-120, 2008.

SIWICKI, A. K. et al. Monoclonal antibodies against goldfish (*Carassius auratus*) immunoglobulin: application to the quantification of immunoglobulin and antibody-secreting cells by ELISPOT and seric immunoglobulin and antibody levels by ELISA in carp (*Cyprinus carpio*). **Veterinary Research**, v. 25, p. 458-467, 1994.

SOUZA, F. R. **Impacto do preço do petróleo na política energética mundial**. 2006. 160 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Planejamento Energético)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SPARLING, D. W.; VANN, S.; GROVES, R. A. Blood changes in mallards exposed to white phosphorus. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 2521-2529, 1998.

STATE OCEANIC ADMINISTRATION. **The specification for marine monitoring-seawater analysis**. Beijing: Maritime Press, 2007. p. 42-44.

STEGEMAN, J. J. et al. Molecular responses to enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGET, R. J. et al. **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Chelsea: SETAC/Lewis Publishers, 1992. p. 235-335.

STILLER-WINKLER, R. et al. Immunological parameters in humans exposed to pesticides in the agricultural environment. **Toxicology Letters**, v. 107, p. 219-224, 1999.

STUDNICKA, M.; SIWICKI, A. The nonspecific immunological response in carp (*Cyprinus carpio* L) during natural infection with eimeria-subepithelialis. **Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, v. 42, p. 18-21, 1990.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **Fish histology - normal and pathological features**. Tokyo: Kodansha, 1995.

TAVARES-DIAS, M. et al. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus*, Garavelo e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887 (Characidae). **Acta Scientiarum**, v. 21, p. 337-342, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress, 2004. 144 p.

TELES, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, stress and genotoxic effects of 17 $\beta$ -estradiol in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Environment International**, v. 32, p. 470-477, 2006.

THERON, M. et al. Chemical dispersion of crude oil: assessment of physiological, immune, and antioxidant systems in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Water, Air and Soil Pollution**, v. 225, p. 1-17, 2014.

THOMAS, J. E. **Fundamentos de engenharia de petróleo**. 2nd ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2004.

THOPHON, S. et al. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, v. 121, p. 307-320, 2003.

U.S. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION. **Oil: crude and petroleum product**. USA: U.S. Energy Information Administration, 2015.

URIBE, C. et al. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, p. 486-503, 2011.

VAN DER OOST, R. et al. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. **Aquatic Toxicology**, v. 36, p. 189-222, 1996.

VAZZANA, M. et al. In vitro effect of cadmium and copper on separated blood leukocytes of *Dicentrarchus labrax*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 102, p. 113-120, 2014.

VERLHAC, V; GABAUDAN, J. **The effect of vitamin C on fish health**. Switzerland: Roche Vitamins, 1997.

VIEIRA, V. C. C. et al. Langmuir films of petroleum at the air-water interface. **Langmuir**, v. 25, p. 12585-12590, 2009.

VOSYLIENÉ, M. Z. The effect of heavy metals on haematological indices of fish. **Acta Zoologica Lituanica**, v. 9, p. 76-82, 1999.

WALKER, C. H. et al. **Principles of ecotoxicology**. London: Taylor and Francis, 1996.

WEIBEL, E. R. et al. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I Morphometric model, stereological methods, and normal morphometric data for rat liver. **Journal of Cell Biology**, v. 42, p. 68-91, 1969.

WHYTE, S. K. The innate immune response of finfish- A review of current knowledge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, p. 1127-1151, 2007.

YANG, X.; BAUMANN, P. C. Biliary PAH metabolites and the hepatosomatic index of brown bullheads from Lake Erie tributaries. **Ecological Indicators**, v. 6, p. 567-574, 2006.

YU, X. et al. Effects of crude oil and dispersed crude oil on the critical swimming speed of puffer fish, *Takifugu rubripes*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 94, p. 549-553, 2015.

ZIOLLI, R. L. Aspectos ambientais envolvidos na poluição marinha por petróleo. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 3, p. 32-41, 2009.