

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

## 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.

# 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).

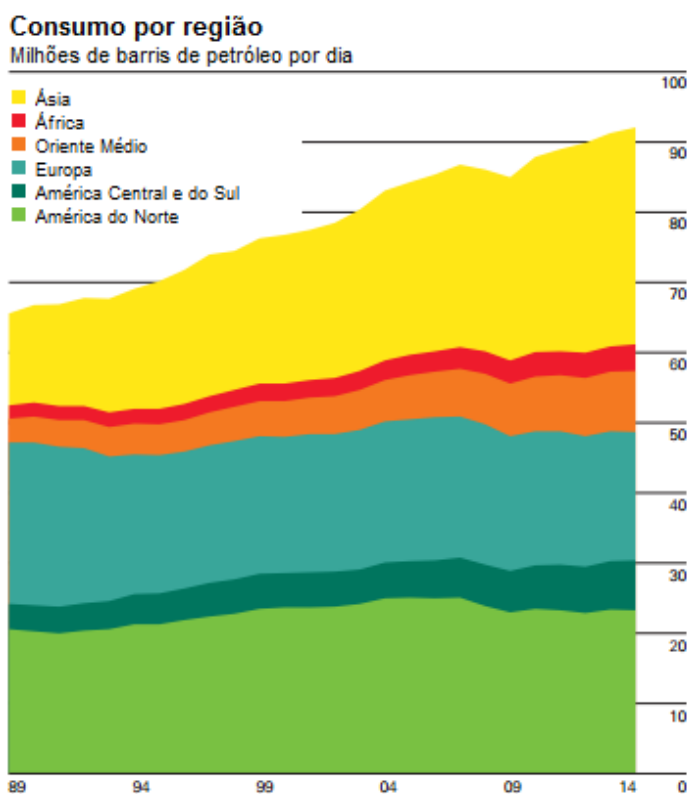
Nos EUA surgiram dezenas de companhias petrolíferas, que mais tarde se transformariam em poderosas organizações. A produção de óleo cru, nos EUA, aumentou de dois mil barris em 1859, para aproximadamente três milhões de barris em 1863, e para dez milhões de barris em 1874. Até o final do século XIX, 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).

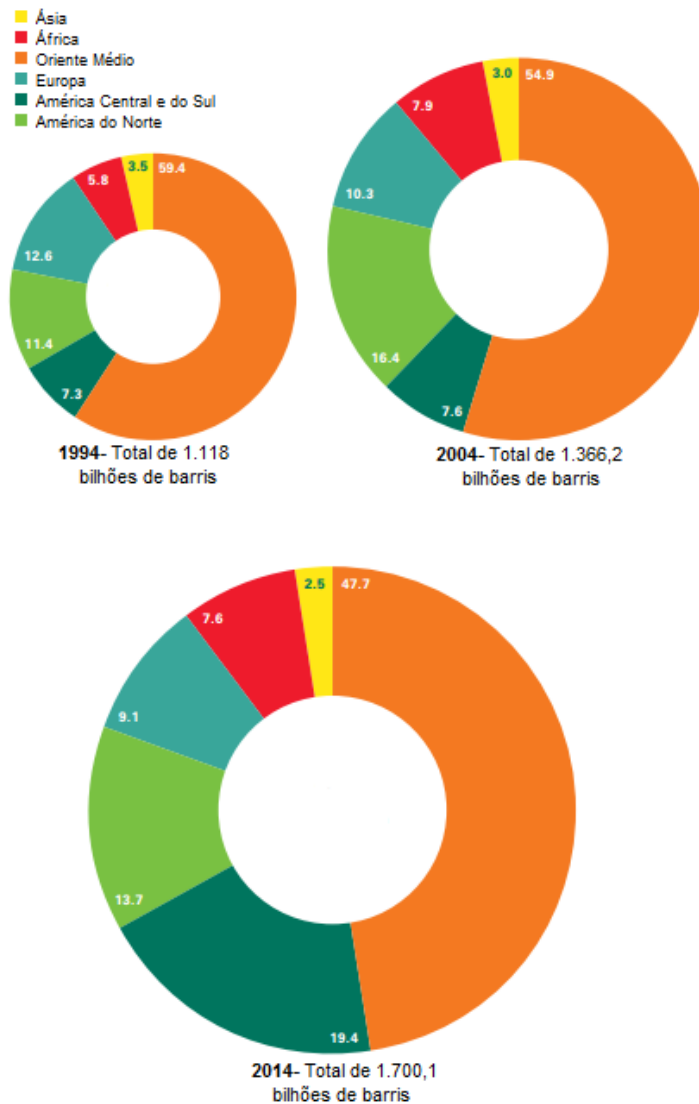
Com a ampla utilização do petróleo em produtos, o consumo mundial vem crescendo a cada ano. Atualmente, no relatório anual da British Petroleum Statistical Review of World Energy (2015), foi observado um aumento no consumo global de 0,8 milhões de barris por dia (0,8%) em 2014 comparado ao ano de 2013,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

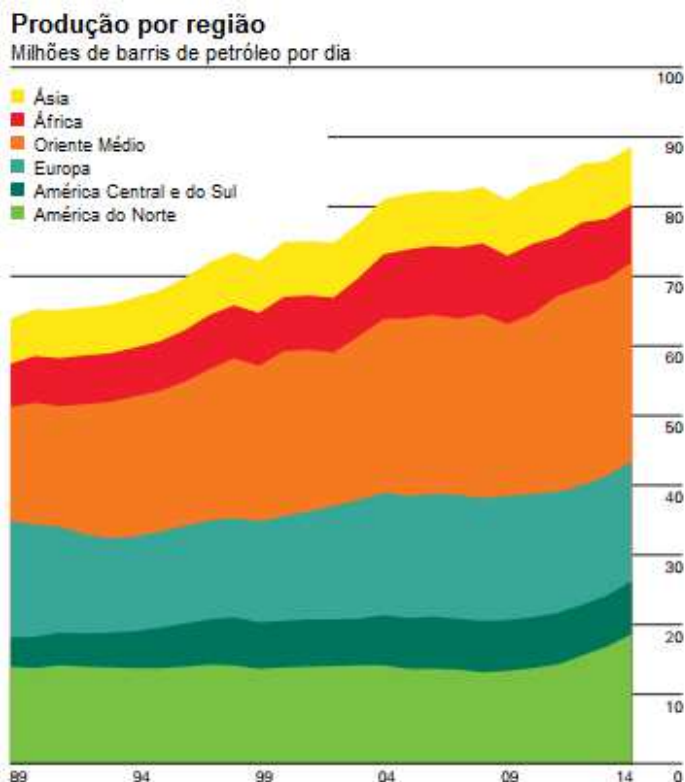
O aumento do consumo mundial impulsionou a busca por novas reservas de petróleo. No final de 2014, as reservas atingiram um total de 1.700,1 bilhões de barris, o suficiente para atender a 52,5 anos de produção global. Durante a última década, as reservas provadas mundiais aumentaram 24%, ou mais de 330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

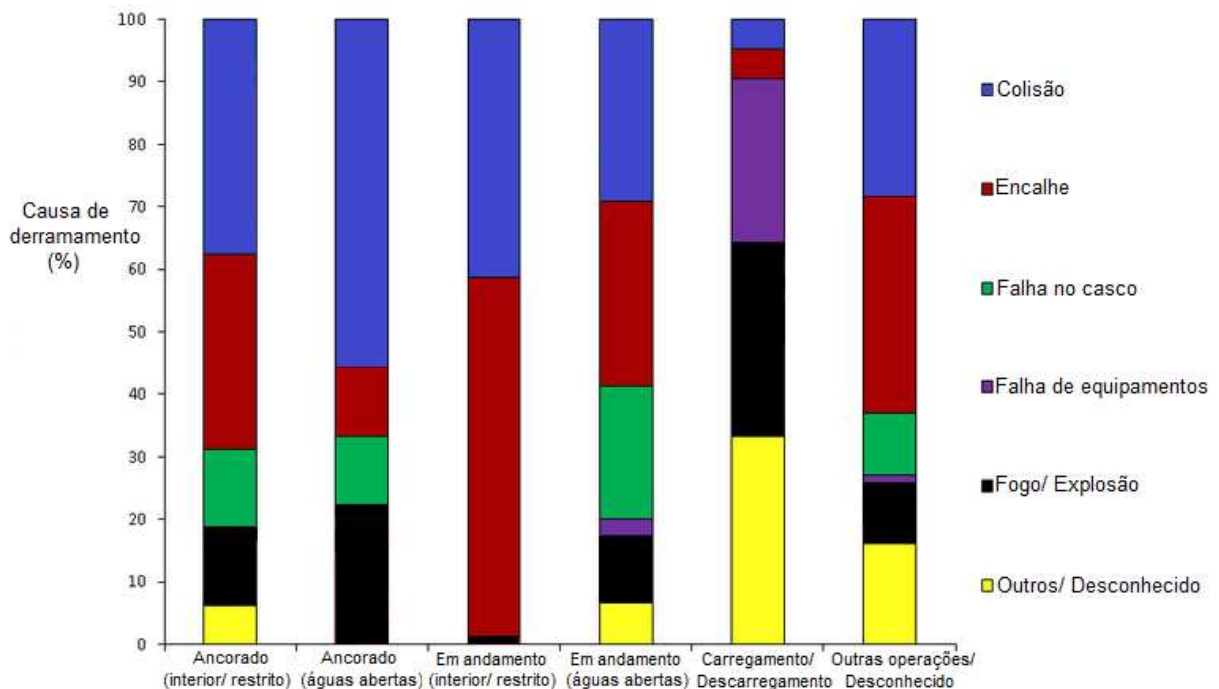
A Petrobrás (2015) estima em seu relatório de planejamento estratégico 2030, que o óleo contido na camada Pré-sal corresponderão a 53% do total da produção brasileira em 2020, estimada em 4,2 milhões de barris por dia.



## 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 *Acantopagrus 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- *Neopterygii*

Infraclasse *Teleostei*

Superordem- *Acanthopterygii*

Ordem- *Perciformes*

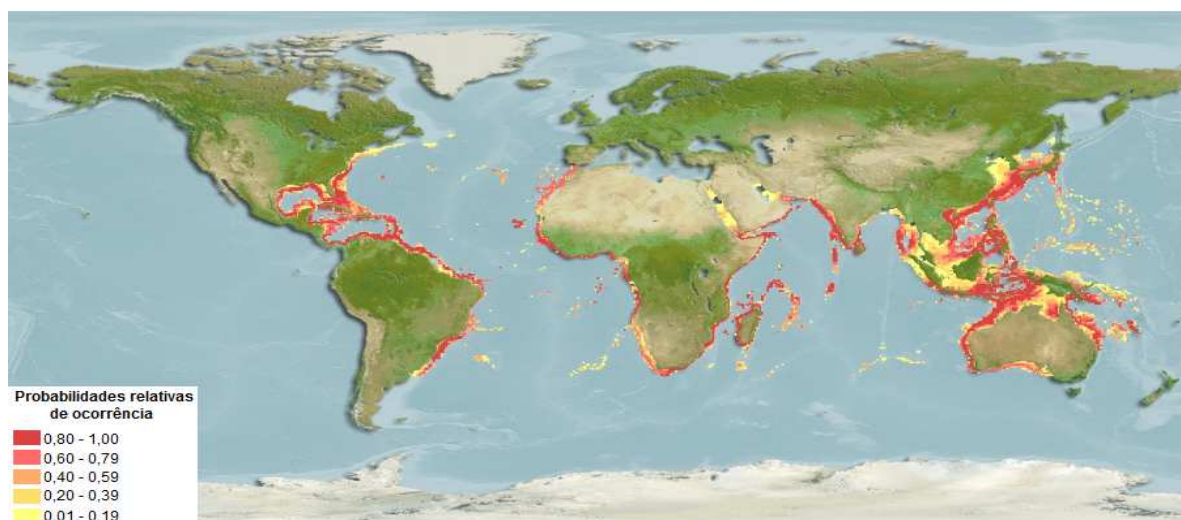
Subordem- *Percoidei*

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 (ARENDETT; 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).

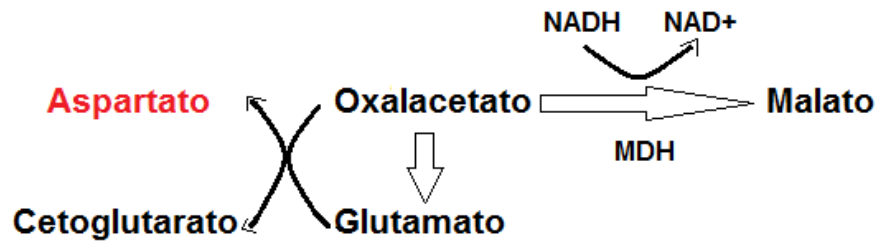
Contudo, dependendo do tipo e concentração do poluente, da espécie de peixe e da duração da exposição, pode ocorrer alterações nos parâmetros hepáticos, como mudanças histológicas e modulação da atividade das enzimas hepáticas (PARIS-PALACIOS; BIAGIANTI-RISBOURG; VERNET, 2000).

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).

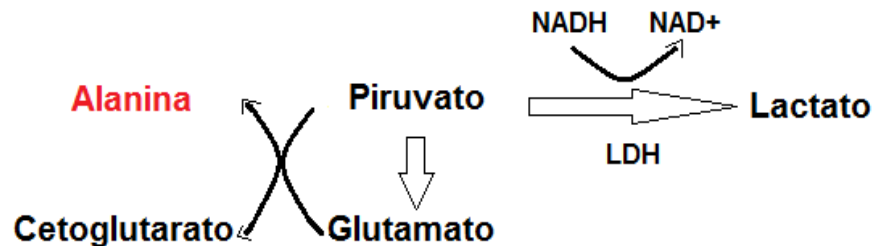
As aminotransferases são enzimas mitocondriais e citosólicas envolvidas no catabolismo de aminoácidos (BONGA, 1997). A enzima aspartato aminotransferase (AST) catalisa especificamente a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato, o qual 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).

## 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.

ARENDT, 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: Chrchill, 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.