



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA EXPOSIÇÃO DE
TAINHAS *Mugil platanus* À FRAÇÃO SOLÚVEL DO
PETRÓLEO EM ÁGUA**

CAUÊ BONUCCI MOREIRA

FURG
RIO GRANDE, RS
Abril 2010

Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA EXPOSIÇÃO DE TAINHAS *Mugil platanus*
À FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO EM ÁGUA

CAUÊ BONUCCI MOREIRA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de mestre em Aquicultura no programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Prof. Dr. Kleber C. Miranda Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Romano

Rio Grande -RS- Brasil

Abril, 2010

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
1. RESUMO GERAL	iv
2. ABSTRACT	v
3. INTRODUÇÃO GERAL	1
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
5. ARTIGO ANEXO	26
6. CONCLUSÕES	62

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, por terem acreditado e apoiado em minhas decisões...

Aos meus amigos, por estarem ao meu lado no decorrer deste mestrado...

E ao meu orientador, Prof. Kleber, por ter tido muita paciência e atenção!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Kleber Campos Miranda Filho, que muito mais que um orientador se tornou um grande amigo. Deixo meu sincero agradecimento por ter me inserido no mundo da pesquisa com humildade, sinceridade e uma coragem desafiadora para novos trabalhos. Com você aprendi a acreditar mais em mim, descobri que sou capaz. Muito obrigado mano Kleber.

Ao professor Luis André Sampaio, por todo apoio nos diversos trabalhos desenvolvido ao longo desse mestrado. Muito obrigado Sampaio.

Ao professor Luis Romano, que com sua simplicidade e facilidade de ensinar, me ajudou tanto na elaboração desta dissertação. Muito obrigado Romano.

À minha equipe de trabalho, que modéstia à parte, que equipe hein! À Emeline, que, antes mesmo de se tornar chefe, já tinha envergadura para tal. Muito obrigado pela força e dedicação. Agradeço também ao Ricardo, que mesmo antes de tornar professor, tem o dom nato de ensinar. Grande profissional, seu lugar na ciência está guardado. Aprendi muito com a experiência de vocês Ricardo e Emeline.

Aos colaboradores diretos deste trabalho: Renatão, Gabi, Marcelo (bruxo) e simpatizantes, vocês foram muito mais do que ajudantes para o desenvolvimento deste trabalho, vocês foram e são meus amigos.

Agradeço à professora Isabel e ao professor Griep do PRH-27, que sempre alegres e prontos à me ajudar, auxiliaram-me profissionalmente. Agradeço aos bons momentos passados em viagens e congressos, que de fato me proporcionaram grandes experiências e aprendizagens.

Ao professor Charrid Resgalla pela participação da banca avaliadora.

Aos meus grandes amigos Renatão, Marcondes, Marcelo (bruxo), Kassião, Arturzão (paquito), Marlon, Talibã, Iuri, Luciano, Sabrina, Roberta, Paulinha, Viviana, Cristina, Mateus (gigas), João Xavier, Shei, kotoko, Eduardo entre outros...! O que seria desse mestrado sem vocês?

Aos vigilantes Lúcio Flávio, Nero, Fabiano, Cristiano e Marcos, que muito mais do que vigias, davam alegria à Estação Marinha de Aquicultura. Ao secretários Getulio e Pilengui, agilidade e rapidez.

E finalmente agradeço à minha família, meu paizão Waltinho, minha mãe linda e maravilhosa Cíntia, minhas irmãs super legais Inaê e Iana e a minha namorada linda e companheira, Fernanda.

1. RESUMO GERAL

O desenvolvimento humano tem contribuído com o aumento dos níveis de poluentes nos ambientes aquáticos. Dentre os principais poluentes encontrados nos corpos hídricos, destacam-se os hidrocarbonetos do petróleo. Frente aos problemas de degradação dos ecossistemas aquáticos, novas espécies vêm sendo testadas como possíveis indicadoras da integridade ambiental. O presente estudo determinou a concentração letal mediana (CL_{50}) para espécie *Mugil platanus* frente a exposição aguda à fração solúvel do petróleo em água (FSA). Estudos histopatológicos e a análise da frequência de micronúcleos foram também observados em teste crônico. Juvenis de tainha ($25 \pm 2,3$ g) foram expostos a três concentrações crônicas (1,7, 3,5 e 7%), mais o grupo controle por 14 dias com mais 7 dias de período de depuração (sem FSA). Ao longo do período experimental (24, 96 h, 14 e 21 dias) foram coletadas amostras sanguíneas da veia caudal para observação de micronúcleos (MC) e amostras de fígado e brânquias para visualização de histopatologias. Para esses procedimentos foram amostrados sete peixes por concentração testada. A CL_{50} para 96 h foi estimada em 37,5% da FSA e o nível de segurança em 3,5% da FSA. O tempo requerido para formação de MC foi de 96 h de exposição. O tempo de depuração foi suficiente para que fosse atingida a frequência de eritrócitos similar ao do grupo controle. Estudos histopatológicos indicaram mudanças severas nas brânquias e no tecido hepático. A telangiectasia foi a histopatologias branquial mais relevante. Histopatologias hepáticas como colestase, dilatação dos sinusóides e infiltrados inflamatórios foram comumente observadas. O teste do micronúcleo e o estudo histológico detectaram com eficácia alguns danos gerados pela exposição crônica de juvenis de tainha à FSA.

2. ABSTRACT

Human development has contributed to increased levels of pollutants in aquatic environments. Among the main pollutants found in water bodies, the petroleum hydrocarbons have a prominent place. Facing the problems of degradation of aquatic ecosystems, new species are being tested as possible indicators of environmental integrity. This study determined the median lethal concentration (LC₅₀) for mullet *Mugil platanus* facing acute exposure to the soluble fraction of oil in water (FSA). Histopathological studies and micronuclei frequency analysis were also studied in chronic tests. Mullet juveniles (25 ± 2.3 g) were exposed to three chronic concentrations (1.7, 3.5 and 7%), plus the control group for 14 days over 7 days without FSA. Throughout the experimental period (24, 96 h, 14 and 21 days) blood samples were collected from the caudal vein for observation of micronuclei (MC) and samples of liver and gills for histopathological study. For these procedures seven fish were sampled per concentration tested. The LC₅₀ for 96 h was estimated at 37.5% of FSA and the safe level at 3.5% of FSA. The time required for the formation of MC was 96 h of exposure. The time of clearance was sufficient to achieve a similar MC frequency of the control group. Histopathological studies showed severe changes in the gill and liver tissues. The most relevant histopathology in the gills was telangiectasia. Hepatic histopathology as cholestasis, dilated sinusoids and inflammatory infiltrates were commonly described. The MC test and histological study effectively detected some damage caused by exposure of juvenile mullet to the FSA.

3. INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, as concentrações de poluentes nos ecossistemas aquáticos têm aumentado de forma alarmante como resultado da atividade antrópica. Este fato contribuiu para a crescente redução da qualidade ambiental, comprometendo em demasia a saúde de todos os seres vivos que dependem desses ecossistemas (Cajaraville *et al.* 2000).

Acredita-se que a intensa ocupação humana das regiões costeiras de todo o mundo seja responsável pelo significativo aumento dos níveis da contaminação de estuários, mares e oceanos. A enorme descarga de lixos tóxicos provenientes de efluentes industriais, os processos de drenagem agrícola, os derrames acidentais de petróleo e derivados, a deposição atmosférica e os esgotos domésticos lançados em rios e mares contribuem para a contaminação dos ecossistemas aquáticos com uma miríade de agentes tóxicos como metais pesados, praguicidas, compostos orgânicos sintéticos, hidrocarbonetos do petróleo, entre outros (Kennish 1997).

Dentre os poluentes orgânicos, os hidrocarbonetos encontrados no petróleo e produtos derivados, constituem uma das classes de poluentes mais frequentemente encontradas nos sistemas aquáticos (Kettrup & Marth 1998). O petróleo e seus derivados possuem ampla utilização pela população humana, na forma de combustíveis, solventes, plásticos, entre outros. Nos últimos anos o Brasil tem se destacado no campo exploratório de jazidas de petróleo e por conseguinte no cenário da energia mundial. O nosso país é detentor de tecnologia de ponta para extração de petróleo em águas profundas e ultra profundas (Petrobras, 2008). No entanto, é notório que as diversas atividades da indústria do petróleo podem causar efeitos nocivos ao ambiente.

A simples presença de um xenobiótico em um ecossistema aquático, não pode por si só indicar um efeito deletério a este ecossistema. Segundo Hori *et al.* (2008) conexões devem se estabelecer entre os níveis externos da exposição dos organismos com seus possíveis efeitos internos .

Bioindicadores e biomarcadores

O uso de organismos como bioindicadores de poluição, tem sido amplamente difundido para monitoramento da contaminação ambiental (Claisse 1989). O interesse em utilizar organismos decorre do fato de alguns contaminantes muitas vezes serem pouco registrados no sedimento, enquanto são bioacumulados, ou até mesmo, biomagnificados ao longo da cadeia trófica. Neste caso, a análise do tecido dos organismos possibilita a avaliação da fração biodisponível do contaminante no ambiente (Baumard *et al.* 1998).

Segundo De Kock & Kramer (1994) existem vantagens no uso de organismos (bioindicadores) no monitoramento químico de ambientes aquáticos por contaminantes. As principais seriam:

(a) os organismos vivem em equilíbrio com o seu ambiente, integrando o que se encontra biodisponível (ou seja, assimilável biologicamente) na água durante um certo período de tempo;

(b) os organismos revelam as relações entre concentrações internas de poluentes e os efeitos biológicos resultantes;

(c) os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) ocorrem em maiores concentrações em organismos do que no meio aquático circundante, o que torna a sua determinação analítica bem mais fácil e barata.

Com o propósito de estudar a ação dos xenobióticos nos seres vivos, os pesquisadores utilizam-se dos chamados biomarcadores. Entende-se como biomarcador, qualquer mudança de uma resposta biológica envolvendo variações bioquímicas, biomoleculares, celulares, histológicas, fisiológicas e comportamentais, devido à presença de um elemento ou substância química presente no ambiente, passível de ser detectada por alterações moleculares e fisiológicas ou ainda por mudanças comportamentais nos organismos em estudo (Depledge 1993; Peakall 1994; Rand *et al.* 1995).

A classificação mais utilizada tem sido a que divide biomarcadores de exposição e de efeito. Biomarcadores de exposição são aqueles que indicam a exposição do organismo aos poluentes, mas que não fornecem informações sobre os efeitos adversos causados por estes compostos. Já os biomarcadores de efeitos, são aqueles que demonstram um efeito adverso no organismo, não apontando necessariamente o agente responsável (Huggett *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1997; De Coen, 2000).

A utilização de biomarcadores tem sido crescente na avaliação da qualidade ambiental. Biomarcadores específicos e não específicos têm sido muito empregados em monitoramentos, *in situ* e em laboratório, para investigar a contaminação por hidrocarbonetos do petróleo. Existem diversas vantagens no uso de biomarcadores, tais como a quantificação de poluentes biologicamente disponíveis, reunindo diferentes episódios de exposição no tempo e no espaço, e a integração das interações toxicológicas nos organismos, resultantes da exposição à mistura complexa de substâncias (Widdows & Johnson 1988; Huggett *et al.* 1992; Lowe & Pipe 1994; Lowe *et al.* 1995).

A poluição por petróleo

Kennish (1997) relata que o petróleo consiste de uma mistura complexa de hidrocarbonetos e compostos contendo oxigênio, nitrogênio, enxofre e metais como o cobre, ferro, níquel e vanádio. São em sua grande maioria compostos orgânicos hidrofóbicos com diversas configurações espaciais que assumem diferentes propriedades físico-químicas. Centenas de compostos estão presentes compondo quatro principais classes de hidrocarbonetos no petróleo: alcanos de cadeia aberta (n-alcanos e n-parafinas), alcanos ramificados (isoparafinas), cicloalcanos (cicloparafinas) e aromáticos.

- Hidrocarbonetos Alifáticos (Cadeia aberta)

Os hidrocarbonetos alifáticos são amplamente distribuídos no ambiente. Formam um dos principais grupos de compostos presentes no petróleo, sendo também encontrados amplamente distribuídos entre os compostos naturais do meio marinho (Clark 2001).

- Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Os HPAs são substâncias naturais, ubíquas e frequentemente incluídas em diversos estudos de contaminação ambiental por seu potencial tóxico (Maskaoui *et al.* 2002; Rocher *et al.* 2004; Olajire *et al.* 2005; Barra *et al.* 2006; Wang *et al.* 2006). Sua distribuição é controlada por diversos processos físicos, químicos e biológicos. Para entender estes processos, deve-se considerar a interação ar-água, água-sedimento, água-biota, água-matéria orgânica dissolvida (Lima 1996). Os HPAs são compostos químicos apolares, tipicamente constituídos de dois a dez anéis aromáticos (Barra *et al.* 2006; Hylland 2006). Com base no peso molecular, os HPAs podem ser divididos em dois grupos: aqueles com baixo peso molecular, que possuem dois ou três anéis aromáticos e os de alto peso molecular, compostos por quatro ou mais anéis aromáticos. Os HPAs de

baixo peso molecular são mais voláteis, menos lipofílicos e apresentam toxicidade aguda significativa para os organismos aquáticos, enquanto os de alto peso molecular possuem maior pressão de vapor, menor solubilidade em água, maior resistência às reações de óxido-redução (maior persistência), caracteristicamente são carcinogênicos e estão amplamente distribuídos no meio ambiente (Lima 2001; Newman & Unger 2003). Todas as características atribuídas aos HPAs contribuem com a sua tendência à bioacumulação (Bjørseth & Ramdahl 1985).

Atualmente, diversos órgãos nacionais e internacionais reconhecem os perigos em potencial da ocorrência dos HPAs no ambiente. Até hoje foram relatados mais de 30 compostos e centenas de derivados dos HPAs como apresentando efeitos carcinogênicos, fazendo deles a maior classe de compostos carcinogênicos conhecida. Segundo a USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), há 16 HPAs prioritários, entre os milhares existentes na natureza: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-cd)pireno, naftaleno e pireno; dentre estes, diversos já tiveram efeitos mutagênicos e carcinogênicos comprovados.

Os HPAs podem ser provenientes de fontes naturais e/ou antrópicas. No ambiente aquático, eles estão naturalmente presentes em baixas concentrações, embora os níveis tenham aumentado significativamente como resultado da exploração de petróleo e do uso cada vez mais exacerbado de combustíveis fósseis. As fontes antrópicas incluem a queima de combustíveis fósseis e madeira, da atividade industrial (pirolítica) e da liberação dos produtos de petróleo (petrogênica). As fontes naturais de HPAs incluem o escoamento natural do petróleo e sua consequente deposição (Kowalewska & Konat 1997; Zakaria *et al.* 2001; Hylland 2006).

Dentre as numerosas formas de introdução destes compostos no ambiente marinho, a UNEP (1991) destaca:

- Formas naturais de aporte

- Infiltrações naturais através de fendas nos fundos oceânicos;
- Combustão de biomassa vegetal;
- Biossíntese por organismos (vegetais e animais) marinhos ou terrestres;
- Transformações diagenéticas de produtos biossintéticos, principalmente nos sedimentos ou na coluna d'água;
- Trocas atmosféricas;
- Erosão de sedimentos continentais.

- Formas antrópicas de aporte

- Combustão incompleta durante as queimadas de florestas e campos, posteriormente transportado para o ambiente marinho via processo eólico ou fluvial;
- Pirólise de madeira para a produção de carvão;
- Incineração de resíduos domésticos e industriais;
- Exploração e produção de petróleo;
- Combustão parcial de combustíveis fósseis e madeira, para transporte, aquecimento e geração de energia;
- Transporte de petróleo em operações com navios, carga e descarga em terminais petrolíferos, estocagem e refino;
- Acidentes com petroleiros.

A maioria dos HPAs que entra nos sistemas aquáticos permanece relativamente próxima às suas fontes, decrescendo aproximadamente de forma logarítmica, com a

distância da origem. Assim, grande parte dos HPAs encontrados está localizada em rios, estuários e águas costeiras (Lima 2001).

A solubilidade é de grande importância no comportamento de compostos orgânicos no ambiente aquático. Apesar de, como um grupo, serem considerados hidrofóbicos, os HPAs apresentam uma grande faixa de solubilidade em água. Segundo Varanasi (1989), há uma relação inversamente proporcional entre salinidade e solubilidade dos HPAs, como previsto pela teoria de “salting out”, onde a adição de eletrólitos na fase aquosa diminui a solubilidade dos HPAs. A solubilidade pode variar por um fator de até dois na faixa de salinidade de 0 a 36‰. Já a variação da solubilidade dos HPAs com a temperatura pode chegar a um fator de cinco.

Como compostos com baixa solubilidade em água tendem a se ligar com o material particulado presente, o comportamento de partição dos HPAs entre água, sedimento e biota é principalmente determinado pelo conteúdo lipídico e de carbono orgânico presentes.

As concentrações relativas dos HPAs nos ecossistemas aquáticos são na maioria das vezes mais altas nos sedimentos, intermediárias na biota e baixas na coluna d'água (Lima, 2001).

De acordo com Anyakora *et al.* (2005), os peixes são ótimos biomarcadores de contaminação por HPAs, pois como descrito anteriormente, os hidrocarbonetos tendem muitas vezes a se acumular mais em organismos do que no próprio sedimento, em função do caráter lipofílico desses contaminantes.

- Benzeno, Tolueno, Etil-Benzeno e Xileno (BTEX)

De acordo com Akaishi *et al.* (2004), a fração solúvel do petróleo em água (FSA) contém uma mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno),

fenóis, e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio ou enxofre. Mesmo que os compostos mais tóxicos sejam voláteis, como é o caso dos BTEX, os animais aquáticos podem absorver rapidamente parte da FSA com consequências adversas à homeostase (Stephens *et al.* 1997). Ziolli (1999) afirma que a FSA é a principal responsável pelo impacto ambiental causado por compostos derivados de petróleo, tanto por ser visualmente imperceptível quanto pelas transformações químicas de seus constituintes iniciais.

Porém, são poucos os estudos que levam em consideração os BTEX. Tal fato decorre principalmente da sua elevada volatilidade no ambiente e da dificuldade na análise quantitativa dos mesmos (Stephens *et al.* 1997; Dórea *et al.* 2007). Estão presentes como contaminantes do meio ambiente devido principalmente a vazamentos e derrames de petróleo e derivados (Gaujac *et al.* 2006).

Dentre os estudos avaliando a toxicidade da FSA em peixes é possível destacar os trabalhos com a trutira arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Lockhart *et al.* 1996); a tilápia *Oreochromis niloticus* (Omorieg & Ufodike 2000; Dede & Kaglo 2001) e o lambari *Astyanax sp* (Akaishi *et al.* 2004). Apesar da existência de alguns estudos relacionados com FSA, a escassez de informações ainda é uma realidade global. O Brasil, não foge a essa regra e os poucos estudos contemplam praticamente ambientes de água doce. Trabalhos com espécies marinhas são quase inexistentes e a demanda de informação é grande, tendo em vista que o potencial da atividade petrolífera no Brasil está quase que exclusivamente voltado ao ambiente marinho.

Testes de toxicidade

Os testes de toxicidade constituem uma importante ferramenta analítica para avaliar o efeito de agentes químicos—de forma integrada sob condições padronizadas,

permitindo a comparação com outros agentes químicos testados sobre os organismos vivos. Podem ser delineados visando detectar os efeitos agudos (de curta duração) ou crônicos (de longa duração) gerados por concentrações letais ou subletais, respectivamente (Rand & Petrocelli 1985).

Alguns efeitos letais e sub-letais gerados pelos HPAs em organismos aquáticos mantidos em laboratório ou obtidos do ambiente, já foram relatados:

- Interferências no sistema reprodutor e anormalidades durante o desenvolvimento de embriões e larvas (Knutzen 1995; Middaugh *et al.* 1998; Carls *et al.* 1999);
- Alterações nas funções cardíacas, respiratórias e comportamentais (Albers 1995; Widdows & Johnson 1988);
- Efeitos imunotóxicos (Fossi *et al.* 1997);
- Formação de “off-flavor” em organismos mantidos em sistemas de criação (Lovell 1983);
- Efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (Carls *et al.* 1999; Baršienė *et al.* 2007);
- Lesões histopatológicas nos tecidos dos sistemas respiratório, digestivo e excretor (Lee & Page 1997; Brand *et al.* 2001; Simonato *et al.* 2008; Rodrigues *et al.* 2010);
- Indução da fase I enzimática em peixes (Hylland 2006).

A maioria dos poluentes químicos exercem seus efeitos via mecanismos metabolicamente tóxicos e genotóxicos. Substâncias genotóxicas podem causar efeitos tais como carcinogênese, teratogênese, embriotoxicidade, assim como um rol de desordens referidas como síndrome de doenças genotóxicas (Klobucar *et al.* 2003).

Atualmente, pesquisas da Agência Internacional de Estudo do Câncer (IARC) classificam alguns HPAs como genotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos. Compostos

genotóxicos são aqueles com capacidade de induzir alterações no material genético de organismos a eles expostos, ou seja, é tóxica para o DNA. Ela pode se unir diretamente a ele ou atuar indiretamente afetando as enzimas ligadas a sua replicação, levando a mutações que podem gerar efeitos deletérios. No entanto, vale ressaltar que substâncias genotóxicas não são necessariamente cancerígenas. Compostos carcinogênicos são aqueles capazes de induzir um carcinoma, tumor maligno com tendência a produzir metástases. Evidências sobre a carcinogenicidade dos HPAs são indicadas principalmente por estudos de exposição crônica em baixas concentrações. Já compostos mutagênicos são capazes de induzir ou aumentar a frequência de mutação no cromossomo de um organismo (EPA 2000).

Inicialmente, a exposição aos HPAs causam alterações na estrutura do DNA. Posteriormente, o dano ao DNA é processado e subsequentemente expressado como fruto de uma mutação. Finalmente, doenças e anomalias podem ter origem a partir do referido dano genético (Huggett *et al.* 1992).

Assim, a primeira função dos testes de toxicologia genética seria pesquisar o potencial que agentes químicos possuem em induzir mutações nas células somáticas, ou que por ventura venham a ser transmitidas às futuras gerações. As respostas biológicas à exposição de xenobióticos têm sido reconhecidas como uma fonte potencial de informação (Da Silva *et al.* 2003).

Biomarcadores

Dentre os biomarcadores de genotoxicidade e mutagênese, o ensaio do micronúcleo tem sido aplicado após exposição a vários poluentes orgânicos. É relativamente fácil de ser utilizado e em função do baixo custo envolvido, o mesmo vem

sendo rotineiramente empregado em programas de monitoramento (Rabello-Gay *et al.* 1991).

O ensaio de micronúcleo detecta dano genético irreversível por meio da frequência de micronúcleos encontradas em amostras de eritrócitos. É considerado um teste citogenético que avalia o efeito de agentes clastogênicos (causa ruptura dos cromossomos) e aneugênicos (afeta a divisão celular resultando na perda ou ganho de cromossomos inteiros) em vários tipos de células (Ribeiro *et al.* 2003).

A formação do micronúcleo é o principal pré-requisito para o monitoramento da genotoxicidade. O referido ensaio é um indicador sensível do dano no cromossomo e tem sido utilizado para avaliar a atividade genotóxica de poluentes orgânicos como os HPAs em ambientes costeiros (Huggett *et al.* 1992).

Segundo Heddle *et al.* (1983) as vantagens do teste do micronúcleo incluem, além da simplicidade e rapidez:

1. MN pode ser observado durante o ciclo celular e o número de células contáveis é ilimitado;
2. A contagem pode ser feita por qualquer pessoa com pouco treinamento em citogenética;
3. Não é necessário o cariótipo;
4. O MN formado persiste pelo menos até a próxima intérfase;
5. Não é necessário nenhum reagente para bloquear o fuso.

A utilização de biomarcadores de efeito (e.g. ensaio do micronúcleo) concomitantemente a biomarcadores de exposição (e.g. histologia) podem prover informações mais detalhadas e minuciosas dos processos de contaminação e poluição.

Segundo Bernet *et al.* (1999) a histopatologia é um método rápido, que detecta o efeito de diferentes poluentes em vários tecidos e órgãos dos peixes. As brânquias e o

fígado são órgãos que normalmente podem atuar como biomarcadores histológicos para a toxicidade de hidrocarbonetos do petróleo (Brand *et al.* 2001). As brânquias destacam-se por apresentarem uma fina e elevada superfície de troca, sendo responsáveis por funções metabólicas vitais para os peixes, como respiração, osmorregulação e excreção de amônia (Moyle & Cech Jr. 1988). Este órgão possui constante contato com o ambiente podendo refletir a sua condição. Em situações de contaminação ou de poluição, as brânquias são uma importante via de entrada dos hidrocarbonetos do petróleo em animais aquáticos (Hylland 2006). Já o fígado destaca-se por ser o principal órgão de desintoxicação em vertebrados e atua através de processos de transformação enzimática de compostos xenobióticos que são concentrados ou ingeridos pelos animais. Por este motivo, o fígado responde rapidamente à presença de poluentes, demonstrando prontamente alterações estruturais, bioquímicas e moleculares (Romano, 1999). Diversos estudos laboratoriais documentaram que efeitos da exposição de óleo bruto em órgãos de peixes adultos, no aspecto bioquímico, enzimas de biotransformação, são existentes em quase todos os órgãos vitais, mas a sua atividade é comprovadamente maior no fígado, pele, pulmão, intestino e órgãos reprodutores (Krahn 1984).

A biotransformação, ou seja, a transformação metabólica de compostos químicos é necessária para que haja a alteração da atividade biológica do composto e para que a interação entre a célula afetada e o agente agressor cesse. O processo de biotransformação tem a função de converter estruturas tóxicas em menos tóxicas e excretá-las rapidamente convertendo químicos lipofílicos em estruturas mais hidrofílicas. O metabolismo das drogas envolve dois tipos de reações bioquímicas, conhecidas como reações de fase I e de fase II. Frequentemente essas reações ocorrem sequencialmente, mas isso pode variar (Rang & Dale 2003). As reações de fase I introduzem ou expõem um grupo funcional no composto original por meio de reações

oxidativas (desalquilação, hidroxilação, oxidação e desaminação) e reações de hidrólise. Nas reações de fase II, o composto previamente alterado combina com um substrato endógeno para produzir um produto de conjugação solúvel em água que seja prontamente excretado (Hodgson & Goldstein 2001). Geralmente, a conversão metabólica de compostos químicos tem natureza enzimática.

O amplo emprego de peixes como indicadores de poluição e contaminação pode ser explicado pela capacidade dos mesmos em responder a compostos tóxicos de maneira semelhante aos grandes vertebrados, podendo desempenhar o papel de bioindicadores de compostos com potencial carcinogênico e teratogênico em humanos. Por outro lado, os peixes também podem ser considerados os maiores vetores de transferência de contaminantes e poluentes para os seres humanos por meio da cadeia trófica (Al Sabti & Metcalfe 1995).

A tainha como espécie alvo

A tainha *Mugil platanus* é um representante da família Mugilidae distribuindo-se desde o Brasil até a Argentina, ocupando águas costeiras e estuarinas (Vieira 1985). É uma espécie muito apreciada pela gastronomia, sendo um importante recurso pesqueiro na Lagoa dos Patos-RS (Reis & D’Incao, 2000).

A referida espécie reúne atributos que a faz potencialmente explorável em atividades aquícolas, tais como: elevada robustez, fácil manejo alimentar (pois aceitam com facilidade a dieta inerte), ampla tolerância à salinidade e temperatura, além de tolerar facilmente as condições de confinamento (Sampaio *et al.* 2002; Carvalho *et al.* 2010). Nos últimos anos, esta espécie tem sido alvo de estudos para sua introdução na aquicultura, principalmente em função do seu elevado consumo. Vários aspectos relacionados à sua criação já encontram-se estudados, como por exemplo, a sua

reprodução, larvicultura e manutenção de juvenis em cativeiro, tolerância a compostos nitrogenados, entre outros (Narahara *et al.* 1989; Yamanaka *et al.* 1990; Godinho *et al.* 1993; Miranda-Filho *et al.* 1995; Sampaio *et al.* 2002; Poersch *et al.* 2007).

Outras características da tainha *M. platanus*, espécie alvo do estudo (Figueiredo & Menezes 2000; Sampaio *et al.* 2002):

- Suas populações são bem abundantes no sul e sudeste do Brasil;
- São fáceis de coletar e tolerantes o suficiente para sobreviver em cativeiro;
- São exploradas comercialmente;
- Possuem hábito alimentar pouco seletivo;
- Sua ecologia e biologia são relativamente bem conhecidas;
- Larvas e juvenis de *M. platanus* já foram utilizados em testes de toxicidade com compostos nitrogenados;
- Ocorrem várias espécies de tainha em diferentes partes do mundo, permitindo comparações;
- Quando jovens não são migratórias, refletindo as condições do local.

Preocupação e justificativa

Ainda que os derrames de petróleo ou acidentes com compostos derivados do petróleo sejam considerados remotos no complexo estuarino de Rio Grande, as possibilidades existem, uma vez que a região abriga um dos maiores portos do Brasil, servindo como escoadouro de quase todo insumo produzido no Rio Grande do Sul e adjacências, envolvendo também o transporte, os carregamentos e as descargas nesta região.

De acordo com o que fora descrito, existe uma inquietação inerente com a integridade dos ambientes naturais. Desta forma, o estudo toxicológico com espécies

nativas é o primeiro passo para posteriormente se realizar um trabalho de biomonitoramento regional. De acordo com a USEPA (1997), os princípios ecotoxicológicos visam garantir a saúde dos ecossistemas que são alvos da ação antrópica e também auxiliam a prevenção de possíveis processos de poluição. Outro ponto a ser destacado é o uso da água para aquicultura. A atividade na região é dependente da água estuarina. Com isso torna-se clara a realização de estudos ecotoxicológicos com espécies da região. Desta forma, a tainha *M. platanus*, sendo um peixe de ampla distribuição ao longo do litoral sudeste-sul brasileiro passível de ser cultivado e de ser empregado como bioindicador da qualidade ambiental da região, foi a espécie escolhida para o presente estudo.

Objetivo do estudo

Os objetivos do presente estudo foram:

- Investigar os efeitos letais e subletais gerados pela exposição à FSA do petróleo leve, tendo como organismo-alvo os juvenis da tainha *M. platanus*.
- Avaliar a formação de micronúcleos em eritrócitos periféricos da tainha *Mugil platanus* após exposição a FSA do petróleo leve.
- Diagnosticar as possíveis histopatologias em brânquias e fígados da tainha *Mugil platanus* após exposição a FSA do petróleo leve.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERS PH, DJ HOFFMAN, BA RATTNER, GAJR BURTON & J CAIRNS. 1995. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Jr. Eds. Handbook of ecotoxicology. Lewis publishers, Boca Raton, Florida, USA, 330-355.
- AKAISHI FM, HCS ASSIS, SCG JAKOBI, DR EIRAS-STOFELLA, SD ST-JEAN, SC COURTENAY, EF LIMA, ALR WAGENER, AL SCOFIELD & CAO RIBEIRO. 2004. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax sp.*) after Waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 46: 244-253.
- ANYAKORA C, A OGBECHÉ, P PALMER & H COKER,. 2005. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. *J. Chromat.*, 1073: 323-330.
- BARRA R, P POPP, R QUIROZ, H TREUTLER, A ARANEDA, C BAUER & R URRUTIA. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons fluxes during the past 50 years observed in dated sediment cores from Andean mountain lakes in central south Chile. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 63: 52-60.
- BARŠIENĖ J, V DEDONYTĖ, A RYBAKOVAS, L ANDREIKENAITĖ & OK ANDERSEN. 2007. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquat. Toxicol.*, 78: 99-104.

- BAUMARD P, H BUDZINSKI, Q MICHON, P GARRIGUES, T BURGEOT & J BELLOCK. 1998. Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from mussel and sediment records. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 47: 77-90.
- BERNET D, H SCHMIDT, W MEIER, P BURCKHARDT-HOLM & T WAHLI. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.*, 22: 25-34.
- BJØRSETH A & T RAMDAHL. 1985. Sources and Emissions of PAH. In : BJØRSETH, A. & RAMDAHL, T. eds. Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons - Vol 2, Emission Sources and Recent Progress in Analytical Chemistry. Marcel Dekker, USA, p. 1-20.
- BRAND DG, R FINK, W BENGUEYFIELD, IK BIRTWELL & CD MCALLISTER. 2001. Salt water-acclimated pink salmon fry (*Oncorhynchus gorbuscha*) develop stress-related visceral lesions after 10-day exposure to sublethal concentrations of the water-soluble fraction of North Slope crude oil. *Toxicol. Pathol.*, 29(5): 574-584.
- CAJARAVILLE MP, JM BEBIANNO, J BLASCO, C PORTE, C SARASQUETE & A VIARENGO. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.*, 247: 295-311.
- CARLS MG, SD RICE & JE HOSE. 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: part i. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*clupea pallasii*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 481-493.

- CARVALHO CVA, A BIANCHINI, MB TESSER & LA SAMPAIO. 2010. The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet (Günther). *Aquacul. Res.*, 41: 511-518.
- CLAISSE D. 1989. Chemical contamination of French coasts: The results of a ten years Mussel Watch. *Mar. Pollut. Bull.*, 20: 523-528.
- CLARK R. 2001. Marine pollution. 5^a ed. Oxford University Press. 172p.
- DA SILVA J, V HEUSER & V ANDRADE. 2003. Biomonitoramento Ambiental. In: J DA SILVA, B ERDTMANN & JAP HENRIQUES,. (Org.) *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance, Porto Alegre-RS, Brasil, p.166-180.
- DE COEN W. 2000. Have Biomarkers lost their charm? “Old” concepts put into a “new” perspective. *SETAC Globe*, 1(6): 35-37.
- DE KOCK WC & KJM KRAMER. 1994. Active Biomonitoring (ABM) by translocation of bivalve molluscs. in: KRAMER, KJM (Ed). *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*. p. 51-84.
- DEDE EB & HD KAGLO. 2001. Aqua-toxicological effects of water soluble fractions (WSF) of diesel fuel on *O. niloticus* fingerlings. *J. Appl. Sci. Environ. Mant.*, 5(1): 93-96.
- DEPLEDGE MH. 1993. Ecotoxicology: a science or a management Tool? *Ambio*, 22(1): 51-52.
- DÓREA HS, JRL BISPO, KAS ARAGÃO, BB CUNHA, S NAVICKIENE, JPH ALVES, LPC ROMÃO & CAB GARCIA, 2007. Analysis of BTEX, PAHs and metals in the oilfield produced water in the State of Sergipe, Brazil. *Microchem. J.*, 85: 234-238.

- EPA (Environmental Protection Agency) 2000. Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories - Chapter 2: Risk Assessment and Fish Consumption Limits. 3 ed., EPA Washington, DC, 61 p.
- FIGUEIREDO JL & NA MENEZES. 2000. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. Museu de Zoologia da USP, São Paulo, SP, 116 p.
- FOSSI MC, L MARSILI, M JUNIN, H CASTELLO, JA LORENZANI, S CASINI, C SAVELLI & C LEONZIO, 1997. Use of nondestructive biomarkers and residue analysis to assess the health status of endangered species of pinnipeds in the South-West Atlantic. *Mar. Pollut. Bull.*, 34(3): 157-162.
- GAUJAC A, ES EMÍDIO, S NAVICKIENE & HS DÓREA. 2006. Determinação de BTEX em efluentes por P&T-GC-PID/FID. 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia-SP, Pg 1.
- GODINHO MH, TE KAVAMOTO, FE ANDRADE-TALMELLI, SCP SERRALHEIRO, P PAIVA & ME FERRAZ. 1993. Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* Günther, 1880, em Cananéia, São Paulo, Brazil. *B. Inst. Pesca*, 20: 59-66.
- HEDDLE JA, M HITE, B JRKHART, JT MACGREGOR & MF SALOMONE .1983. The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutat.Res.*, 123: 61-118.
- HODGSON E & JA GOLDSTAIN. 2001. Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics. In: HODGSON, E & SMART, RC. (eds) Introduction to biochemical toxicology 3rd ed. New York, Wiley-Interscience, p 67-113.
- HORI TSF, MA Ive, KI George, CJ Stewart, M Gilberto & OB ALuis. 2008. Impairment of the stress response in matrinxã juveniles (*Brycon amazonicus*)

- exposed to low concentrations of phenol. *Comp. Biochem. Physiol.*, 147: 416-423.
- HUGGETT R, RA KIMERLE, PM MEHRLE & HL BERGMAN. 1992. Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. SETAC special Publications Series, Lewis Publishers, USA, 347 p.
- HYLLAND K. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *J. Toxicol. Environ. Health Part A.*, 69: 109-123.
- KENNISH M. 1997. Practical handbook of estuarine and marine pollution. Boca Ratón, Florida, USA, CRC Press. 524 p.
- KETTRUP A & P MARTH. 1998. Specimen banking as environmental surveillance tool. In: SCHRÜÜRMAN, G & B MARKERT (eds) Ecotoxicology-ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects. Wiley-Spektrum, 413-336.
- KLOBUCAR GI, M PAVLICA, R ERBEN, & D PAPES. 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquat Toxicol.*, 64: 15-23.
- KNUTZEN J. 1995. Effects on marine organisms from polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and other constituents of waste water from aluminum smelters with examples from Norway. *Sci. Total Environ.*, 163: 107-122.
- KOWALEWSKA G. & J KONAT. 1997. Distribution of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of the Southern Baltic Sea. *Oceanologia.*, 39: 83-104.
- LEE RF & DS PAGE. 1997. Petroleum hydrocarbons and their effects in subtidal regions after major oil spills. *Mar. Poll. Bull.*, 34(11): 928-940.

- LIMA ALC. 1996. Geocronologia de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs). Estudo de caso: Baía de Guanabara. Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado, PUC-RJ, 106 p.
- LIMA EFA. 2001. Acumulação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metais traço em invertebrados marinhos e avaliação do uso de biomarcadores celulares e bioquímicos no biomonitoramento. Tese de Doutorado, PUC-RJ, 187 p.
- LOCKHART WL, DA DUNCAN, BN BILLECK, RA DANNELL, & MJ RYAN. 1996. Chronic toxicity of the “water soluble fraction” of Norman Wells crude oil to juvenile fish. *Spill Sci. Technol. Bull.*, 3(4): 259-262.
- LOVELL R. 1983. New off-flavors in pond-cultured channel catfish. *Aquaculture*, 30: 329-334.
- LOWE DM, VU FOSSATO & MH DEPLEDGE. 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussel *Mytilus galloprovinciales* from the Venice Lagoon: in vitro study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 129: 189-196.
- LOWE DM. & RK PIPE. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study, *Aquat. Toxicol.*, 30: 357-365.
- MARONI M, C COLOSIO, A FERIOLI & A FAIT. 2000. Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *In. Toxicol.*, 143: 1-118.
- MASKAOUI K, JL ZHOU, HS HONG & ZL ZHANG. 2002. Contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Jiulong river Estuary and Western Xiamen Sea, China. *Environ. Pollut.*, 118: 109-122.
- MIDDAUGH DP, ME SHELTON, JR MCKENNEY, G CHERR, PJ CHAPMAN & LA COURTNEY. 1998. Preliminary observation on responses of embryonic and larval Pacific herring, *Clupea pallasii*, to neutral fraction biodegradation products

- of weathered Alaska north slope oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 34: 188-196.
- MIRANDA-FILHO KC, WJ WASIELESKY & AP MAÇADA. 1995. Efeito da amônia e nitrito no crescimento da tainha *Mugil platanus* (Pisces, Mugilidae). *Braz. J. Biol.*, 55: 45-50.
- MOYLE PB & JJ CECH-JR. 1988. Fishes - an introduction to ichthyology. 2nd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 559 p.
- NARAHARA MY, EF ANDRADE, E ROMAGOSA, HM & MCM GODINHO GUILHERME. 1989. Observações preliminares das características da reprodução da tainha *Mugil* sp. da região estuarino-lagunar de Cananéia, SP. Seminário sobre Mugilídeos da Costa Brasileira, São Paulo, Resumos, p. 24-25.
- NEWMAN MC. & MA UNGER. 2003. Fundamentals of Ecotoxicology, CRC Press, EUA, 480 p.
- OLAJIRE AA, R ALTENBURGER, E KQSTER & W BRACK. 2005. Chemical and ecotoxicological assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon - contaminated sediments of the Niger delta, Southern Nigeria. *Sci. Total Environ.*, 340: 123-136.
- OMOREGIE E. & W UFODIKE. 2000. Effects of water soluble fractions of crude oil on growth of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 64: 601-605.
- PEAKALL DW. 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicology. News.*, 1: 55-60.
- PETROBRAS 2008. Centro de pesquisas da Petrobras (CENPES), <http://www2.petrobras.com.br/tecnologia>, acesso agosto de 2009.

- POERSCH LHS, MHS SANTOS, KC MIRANDA-FILHO & WJ WASIELESKY. 2007. Efeito Agudo do Nitrato sobre Alevinos da Tainha *Mugil platanus* (Pisces: Mugilidae). *B. Inst. Pesca*, 33: 247-252.
- RABELLO-GAY MN, MAR RODRIGUES & R MONTELEONE-NETO. 1991. Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética.
- RAND GM. 1995. Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment. Second Edition. Taylor and Francis, Washington, D.C., 1083 p.
- RAND GM. & SR PETROCELLI. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications, New York, Hemisphere Publishing Corporation. 666 p.
- RANG, HP & MM DALE. 2003. Farmacologia, 4 Ed Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.
- REIS EG & F D'INCAO. 2000. The present status of artisanal fisheries of extreme Southern Brazil: an effort towards community-based management. *Ocean Coast. Manage.*, 43: 585-596.
- RIBEIRO LR, DMF SALVADORI & EK MARQUES. 2003. Mutagênese Ambiental. Canoas- RS. Editora da ULBRA. 356p.
- ROCHER V, S GARNAUD, R MOILLERON & G CHEBBO. 2004. Hydrocarbon pollution fixed to combined sewer sediment: a case study in paris. *Chemosphere*, 54: 795-804.
- RODRIGUES RV, KC MIRANDA-FILHO, EP GUSMÃO, CB MOREIRA, LA ROMANO & LA SAMPAIO. 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci. Total. Environ*, 408: 2054-2059.

- ROMANO LA. 1999. Bioindicadores de contaminación acuática. Revista Aquatic. Disponível online em <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp.?t=h&c=67>.
- SAMPAIO LA, WJ WASIELESKY & KC MIRANDA-FILHO. 2002. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 68 (5): 668-674.
- SIMONATO JD, CLB GUEDES & CBR MARTINEZ. 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 69(1): 112-120.
- STEPHENS SM, AYA ALKINDI, CP WARING & JA BROWN. 1997. Corticosteroid and thyroid responses of larval and juvenile turbot exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *J. Fish Biol.*, 50: 953-964.
- UNEP (United Nations Environment Programme) 1991. Determinations of Petroleum Hydrocarbons in Sediments. Reference Methods for Marine Pollution Studies. No. 20. 97 p.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) 1997. Guidance for assessing chemical contaminant data for use in fish advisories, Volume 2: risk assessment and fish consumption limits. Second edition. EPA 823-B-97-009. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Science and Technology, Washington, DC.
- VARANASI U. 1989. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, CRC Press, Boca Raton, USA., 341 p.
- WALKER CH, SP HOPKIN, RM SIBLY & DB PEAKALL. 1997. Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis ed. 321 p.

- WANG X, S SUN, H MA & Y LIU. 2006. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments of Jiaozhou Bay, Qingdao, China. *Mar. Pollut. Bull.*, 52: 129-138.
- WIDDOWS J & D JOHNSON. 1988. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: scope for growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46: 113-121.
- ZAKARIA MP, T OKUDA & H TAKADA. 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) and Hopanes in stranded Tar-balls on the Coast of Peninsular Malaysia: applications of biomarkers for identifying sources of oil pollution. *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 1357-1366.
- YAMANAKA N, S TANJI, R OLIVEIRA, MSN GALVÃO, CMM PIMENTEL, MC PORTELLA, NET ROJAS, RA SILVA & MM PEDREIRA. 1999. Larvicultura da tainha *Mugil platanus*, em Cananéia, Est. São Paulo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12-16 MAR., Natal, Anais. Natal, RN, p. 45.
- ZIOLLI RL. 1999. Fotodegradação da fração solúvel em águas do mar sob ação da luz solar. Campinas, Tese de Doutorado em química - Departamento de Química Analítica, Unicamp, 110 p.

5. ARTIGO ANEXO

**Avaliação toxicológica em tainhas *Mugil platanus* expostas a fração solúvel do
petróleo em água (FSA)**

**Co-autores: Ricardo Vieira Rodrigues, Luis Alberto Romano, Luís André
Sampaio, Emeline Pereira Gusmão, Kleber Campos Miranda-Filho**

Segundo normas da revista “Science of the Total Environment”

Toxicological assessment in mullet *Mugil platanus* exposed to water-soluble fraction of petroleum (WSF)

Cauê Bonucci Moreira^a, Ricardo Vieira Rodrigues^a, Luis Alberto Romano^b, Luís André Sampaio^b, Emeline Pereira Gusmão^a, Kleber Campos Miranda-Filho^b

^a Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

^b Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

*Corresponding author:

Kleber Campos Miranda Filho

Universidade Federal do Rio Grande

Instituto de Oceanografia, Laboratório de Piscicultura
Estuarina e Marinha

Rua do Hotel, 02 Bairro Querência

96.210-030 - Rio Grande - RS - Brazil

Phone/FAX: + 55 53 3236-8042

E-mail: kleber08@gmail.com

ABSTRACT

Human development has contributed to increased levels of pollutants in aquatic environments. Among the main pollutants found in water bodies, the petroleum hydrocarbons have a prominent place. Facing the problems of degradation of aquatic ecosystems, new species are being tested as possible indicators of environmental integrity. This study determined the median lethal concentration (LC₅₀) for mullet *Mugil platanus* facing acute exposure to the soluble fraction of oil in water (FSA). Histopathological studies and micronuclei frequency analysis were also studied in chronic tests. Mullet juveniles (25 ± 2.3 g) were exposed to three chronic concentrations (1.7, 3.5 and 7%), plus the control group for 14 days over 7 days without FSA. Throughout the experimental period (24, 96 h, 14 and 21 days) blood samples were collected from the caudal vein for observation of micronuclei (MC) and samples of liver and gills for histopathological study. For these procedures seven fish were sampled per concentration tested. The LC₅₀ for 96 h was estimated at 37.5% of FSA and the safe level at 3.5% of FSA. The time required for the formation of MC was 96 h of exposure. The time of clearance was sufficient to achieve a similar MC frequency of the control group. Histopathological studies showed severe changes in the gill and liver tissues. The most relevant histopathology in the gills was telangiectasia. Hepatic histopathology as cholestasis, dilated sinusoids and inflammatory infiltrates were commonly described. The MC test and histological study effectively detected some damage caused by exposure of juvenile mullet to the FSA.

KEYWORDS: petroleum WSF, mullet, micronucleus, histopathology.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as concentrações de poluentes nos ecossistemas aquáticos têm aumentado de forma alarmante como resultado da atividade antrópica (Cajaraville et al., 2000). Dentre os poluentes orgânicos, os hidrocarbonetos do petróleo são os que demandam maior preocupação com o risco ambiental (Varanasi, 1989). A toxicidade do petróleo é uma questão de contínua investigação, sendo necessário o conhecimento de seus efeitos sobre a biota aquática em diferentes níveis ontogenéticos (Rodrigues et al., 2010).

A biodisponibilidade e a toxicidade do petróleo dependerão do tipo de óleo e o grau de degradação física, química e biológica. Estes pontos são relevantes e devem ser considerados em estudos de avaliação toxicológica (Rice, 1985). Os testes de toxicidade constituem uma importante ferramenta analítica para avaliar o efeito de agentes químicos-de forma integrada sob condições padronizadas, permitindo a comparação com outros agentes químicos testados sobre os organismos vivos. Podem ser delineados visando detectar os efeitos agudos (de curta duração) ou crônicos (de longa duração) gerados por concentrações letais ou subletais, respectivamente (Rand & Petrocelli, 1985).

Dentre as diversas formas que o petróleo pode ocorrer no ambiente, a fração solúvel do petróleo (FSA) é a porção que se solubiliza no ambiente aquático requerindo especial atenção, principalmente aos hidrocarbonetos monoaromáticos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno). Em função da sua alta capacidade de hidrossolubilização, podem ser rapidamente absorvidos pelo organismo, ocasionando toxicidade à biota (Stephens et al., 1997; Dórea et al., 2007). Além dos BTEX, a FSA é composta também por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os HPAs são compostos químicos apolares, tipicamente de dois a dez anéis aromáticos (Barra et al.,

2006; Hylland, 2006). Esses contaminantes possuem reconhecida importância em estudos ambientais devido seu potencial carcinogênico (Newman & Unger, 2003).

A biotransformação de hidrocarbonetos do petróleo em peixes é principalmente facilitada pelo conjunto de enzimas formadas pela família citocromo P450 1A, pertencente à fase I de biotransformação. Geralmente essa família de enzimas age por meio de reações oxidantes e redutoras, tentando transformar o composto hidrofóbico num composto mais hidrossolúvel, por conseguinte, facilitando a sua excreção (Goksoyr & Förlin, 1992). Porém, essa transformação pode gerar um composto intermediário mais tóxico que a forma original e o metabólito formado pode possuir um potencial mutagênico e carcinogênico (Nebert & Gonzales, 1987; Buhler & Williams, 1988).

Uma maneira eficaz de detectar a ação mutagênica desses compostos é por meio do ensaio do micronúcleo. Esse teste tem sido comumente usado com grande sucesso para avaliar a mutagenicidade de poluentes ambientais e outros compostos químicos (Klobucar et al., 2003). O ensaio do micronúcleo detecta dano genético irreversível a partir das frequências de micronúcleos encontradas em amostras de eritrócitos nucleados. É considerado um teste citogenético que avalia o efeito de agentes clastogênicos (causam a ruptura dos cromossomos) e aneugênicos (afetam a divisão celular resultando na perda ou ganho de cromossomos inteiros) em vários tipos de células (Ribeiro et al., 2003). De acordo com a literatura existe uma associação entre a frequência de micronúcleos com a exposição a agentes tóxicos (Ayllon & Garcia-Vazquez, 2000; Gustavino et al., 2001; Pacheco & Santos, 2002; Ferraro et al., 2004; Vanzella et al., 2007). Essa relação também tem sido encontrada em estudos histopatológicos, onde é possível notar uma resposta específica em relação a uma determinada concentração ou dose frente à ação de poluentes ambientais (Solangi &

Overstreet, 1982; Haensly et al., 1982; Khan, 1995). É notório que a FSA do petróleo induz mudanças microscópicas em tecidos branquiais e hepáticos sob exposições crônicas (Khan, 1995; Simonato et al., 2008). Em trabalho realizado por Brand et al. (2001), salmonídeos (*Oncorhynchus gorbuscha*) foram expostos a concentrações subcrônicas de FSA do petróleo e verificou-se uma série de histopatologias hepáticas associadas aos HPAs, entre elas: a proliferação epitelial no ducto biliar, necrose hepatocelular e pleomorfismo.

Apesar da importância em se estudar os efeitos deletérios causados pelos hidrocarbonetos do petróleo, as informações sobre a toxicidade gerada por esses compostos em organismos marinhos ainda são bastante escassas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos letais e subletais gerados pela exposição à FSA do petróleo leve, tendo como organismo-alvo juvenis da tainha *Mugil platanus*. A referida espécie é um representante da família Mugilidae distribuindo-se desde o Brasil até a Argentina, ocupando águas costeiras e estuarinas (Vieira, 1985). Sua população é abundante nessas regiões, permitindo facilmente a obtenção de espécimes para fins de pesquisa. Sua ampla distribuição permite a comparação da integridade ambiental dos diferentes ecossistemas ao longo da costa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO EM ÁGUA (FSA)

O petróleo utilizado no presente estudo foi doado pela Agência Brasileira de Petróleo e Gás (ANP). A fração hidrossolúvel foi preparada em uma câmara exaustora, livre da radiação luminosa, na razão de nove partes de água para uma de petróleo. A água utilizada na preparação da FSA possuía 23°C, pH 7,98 e salinidade de 29. A FSA

foi lentamente misturada com o auxílio de um agitador magnético (Quimis, Q241, Brasil), durante 22 h em frasco tipo “Mariotti 10 L”, de acordo com a metodologia descrita por Anderson et al. (1974), com algumas modificações descritas por Rodrigues et al. (2010). Depois de 1 hora de repouso a FSA foi retirada para ser empregada nos testes de toxicidade.

2.2. QUALI-QUANTIFICAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS PRESENTES NA FSA

Em amostras de 100% de FSA foram analisados os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e os hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX). Os HPA foram analisados de acordo com o método proposto pela EPA 8270D, usando um cromatógrafo a gás com espectromômetro de massa (EM) Perkin-Elmer (Clarus 500). As análises de BTEX foram realizadas de acordo com o método proposto pela EPA 8015B, utilizando um cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (DIC) (Clarus 500) acompanhado de um amostrador Turbomatrix HS-40. Ambas as amostras foram feitas no laboratório com acreditação da ISATEC (Pesquisa, Desenvolvimento e Análises Químicas LTDA) em Rio Grande - RS.

2.3. TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Antes da realização do teste de toxicidade aguda foi feito um teste preliminar agudo (96 h) para definir a faixa letal da FSA sobre os juvenis de tainha *M. platanus*.

O teste de toxicidade aguda definitivo foi conduzido com juvenis de tainha com peso médio $0,9 \pm 0,15$ g, tendo duração de 96 h. As concentrações nominais de FSA em termos percentuais foram: 20%, 25%, 30%, 35%, 40% e 45%, mais um grupo controle sem adição de FSA. Todos os tratamentos foram conduzidos em triplicata com vinte e um peixes, utilizando béqueres de 1 L. Foi proporcionada aeração leve e suave e

renovações de 100% foram feitas diariamente com soluções teste elaboradas no momento que antecedeu esse procedimento. Durante o experimento, o fotoperíodo foi mantido em 12 h L/12 h E, com intensidade de luz entre 750 e 1.000 lux (Chauvin Arnoux, CA 810, França). Não foi oferecida alimentação aos organismos testados. A salinidade foi mensurada com refratômetro (Atago, S/Mill, Japão), a concentração de oxigênio dissolvido com oxímetro digital (Yellow Spring International, 55/12 FT, EUA) e o pH com pHmetro de bancada (Hanna, 221, Romênia). Todos parâmetros foram mensurados diariamente. A mortalidade dos peixes foi mensurada a cada 24 h e os peixes foram considerados mortos quando não respondiam a nenhum estímulo mecânico.

2.4. TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA

O teste de toxicidade crônica foi conduzido durante o período de 21 dias, sendo dividido em 14 dias de exposição à FSA e mais sete dias de depuração em água livre de contaminantes em sistema semi-estático. Foram utilizadas quatro caixas circulares (320 L) com volume útil de 200 L, compreendendo 4 tratamentos, o grupo controle e mais três concentrações nominais de FSA. Quarenta juvenis de tainhas com peso médio de 25 g foram utilizados em cada tratamento, sendo providos de aeração e alimento inerte (Guabi, 35% de proteína). De acordo com Cohen & Nugegoda (2000), a aeração não chega a causar perdas significativas de hidrocarbonetos do petróleo em testes realizados em tanques experimentais.

As concentrações crônicas testadas foram definidas de acordo com o resultado da CL_{50-96h} multiplicado pelo fator de aplicação (0,1) proposto por Sprague (1971), tendo como resultado o Nível de Segurança (NS). Sendo assim, foram testadas as seguintes concentrações: concentração 1 = 1,7% da FSA (abaixo do nível de segurança);

concentração 2 = 3,5% da FSA (coincidindo com o nível de segurança) e concentração 3 = 7% da FSA (o dobro do nível de segurança). Os parâmetros físico-químicos (oxigênio, temperatura e salinidade) foram monitorados diariamente conforme descrito no item 2.3. Renovações de 90% dos meios foram feitas a cada 48 horas.

2.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a coleta de material biológico, os animais sofreram eutanásia em benzocaína (10%) na concentração de 100 ppm. Posteriormente, a partir de cada tratamento testado, brânquias e fígado foram amostrados de sete animais nos períodos de 1, 4, 14 e 21 dias. Após amostragem os tecidos foram fixados em formalina tamponada a 10%. Todas as amostras foram processadas em equipamento automatizado (LUPE-PT05) e sua inclusão foi realizada em “Paraplast”. Os blocos de amostras de tecidos foram cortados em micrótomo (MRP03 LUPE) com espessura de 5 μ . Cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina. As fotomicrografias foram obtidas por um microscópio Olympus B201e uma câmera (PM20).

2.6. ANÁLISE DE MICRONÚCLEO (MN)

Para o estudo de micronúcleo, o sangue dos juvenis de tainha, previamente eutanasiados (item 2.5), foi coletado por meio de corte na nadadeira caudal. Uma gota de sangue foi colocada sobre uma lâmina de vidro, previamente limpa em ácido clorídrico a 5%, formando uma fina película. Os esfregaços foram então fixados em metanol absoluto por 10 min e corados com Giemsa diluído em água destilada na concentração de 10% (Baršienė et al., 2004) para observação de eritrócitos periféricos em microscópio. Esse procedimento foi realizado após 24 h de exposição à FSA e repetido nos períodos de 4, 14 e 21 dias. A frequência de micronúcleos foi avaliada a

cada 1.000 células utilizando um microscópio Nikon E-200 com aumento de 1.000x. Um total de 3.000 eritrócitos com membrana e núcleos intactos foram analisados por peixe, sete animais por concentração. Somente foram contados micronúcleos que possuíam 1/3-1/20 do tamanho do núcleo.

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As concentrações letais medianas (CL's $_{50}$) da FSA calculadas para as tainhas em 24, 48, 72 e 96 h e seus respectivos intervalos de confiança (95%) foram calculados usando o programa Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al., 1977) e os níveis de segurança foram estimados de acordo com Sprague (1971). Comparações entre os parâmetros de qualidade da água foram calculados utilizando-se ANOVA, uma via. Para análise das diferenças de frequência entre os micronúcleos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para as referidas análises foi utilizado o programa “Statistica 6.0”.

3. RESULTADOS

3.1. ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DA FSA

A concentração total de HPAs e BTEX foram estimadas em 52,87 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 15.431,92 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente e a soma dos hidrocarbonetos totais do petróleo foi calculada em 15.484,79 $\mu\text{g L}^{-1}$ para amostras de 100% da FSA.

3.2. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os valores médios de temperatura, oxigênio dissolvido e pH para cada concentração da FSA estão apresentados nas tabelas 2 e 3. Tanto no teste de toxicidade

aguda quanto no teste de toxicidade crônica esses parâmetros não apresentaram diferença estatística significativa.

3.3. TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Os resultados das CL's₅₀ estimadas para 24, 48, 72 e 96 h e o nível de segurança (NS) para juvenis de tainha *M. platanus* expostos à FSA são mostrados na tabela 4.

3.4. ANÁLISE DE MICRONÚCLEO EM ERITRÓCITOS PERIFÉRICOS

As frequências relativas de micronúcleos em eritrócitos de *M. platanus* expostas a FSA em teste crônico (21 dias) podem ser observadas na Figura 2. Confrontando os dados obtidos dos animais expostos a FSA com o grupo controle nota-se que não houve diferença estatística no período de 24 h. Para o período de exposição de 96 h (4 dias), a média de micronúcleos produzida nas diferentes concentrações de FSA foi maior que a condição controle, no entanto, na menor concentração testada (1,7% da FSA) não foi observada diferença estatística significativa ($P > 0.05$). Para 96 h, os valores médios de micronúcleos formados foram de 0,4‰ para o controle e 1,6; 2,5 e 3,8‰ para as concentrações 1, 2 e 3, respectivamente. Para o período de 14 dias de exposição todas as concentrações testadas diferiram significativamente do tratamento controle e as médias de micronúcleos foram, 0,3‰ para o grupo controle e 2,3; 1,6 e 1,7‰ para as concentrações 1, 2 e 3, respectivamente. De maneira geral, o tempo requerido para formação de MC diminuiu com o aumento das concentrações de FSA testadas. Após o período de 7 dias de depuração, livre da contaminação pela FSA, foi verificada uma queda na frequência de micronúcleos. Nesta ocasião não foi mais observada diferença estatística significativa entre os tratamentos. A maior frequência de MC registrada foi

no período de 96 h, fato também relatado por outros autores (Kumar et al., 2009; Yadav et al., 2009).

3.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA

As análises das histopatologias causadas pela exposição à FSA do petróleo em juvenis de tainha revelaram anomalias tanto nas brânquias como no fígado (Tab. 5). As alterações foram mais severas com o aumento das concentrações de FSA do petróleo. As lesões mais relevantes encontradas nas brânquias foram a telangiectasia (Fig. 3C) e a elevação do epitélio branquial (Fig. 3B). As hiperplasias distal e difusa (Fig. 3D) foram comumente observadas em todas as concentrações testadas e na maioria dos períodos analisados, principalmente a hiperplasia difusa. No grupo controle não foi observada hiperplasia difusa, entretanto, houve ocorrência de hiperplasia distal. Na concentração de 3,5% houve um aumento nas células de cloreto nos quatro primeiros dias de exposição. Após o período de depuração a ocorrência de histopatologias diminuiu. Porém telangiectasia foi registrado no tratamento submetido à maior concentração de FSA. Hiperplasia distal também foi observado nesse período.

Nenhuma histopatologia foi observada nos tecidos hepáticos do grupo controle. De uma maneira geral as histopatologias foram mais relevantes de acordo com o aumento das concentrações de FSA. Infiltrados inflamatórios focais (Fig. 4C) e ao redor do ducto biliar (Fig. 4B) foram encontrados com maior relevância a partir de 96 h de exposição nas concentrações de 3,5 e 7%, não sendo encontrados no período de depuração, no qual os animais permaneceram isentos de contaminação por FSA. Porém, colestases (Fig. 4E) e células granulares eosinófilas (Fig. 4E) foram observadas somente na menor concentração (1,7%). Nas concentrações de 3,5 e 7% foi observado um aumento da concentração de lipídeos em todos os períodos de exposição à FSA. Outra

anomalia verificada somente na concentração de 7% e nos períodos de 96 h e 14 dias, foi à dilatação dos sinusóides (Fig. 4D) com acúmulo de eritrócitos. De maneira geral, as histopatologias diminuíram no período de depuração. Contudo foi registrada a presença de infiltrados inflamatórios ao redor do ducto biliar e a presença de células eosinófilas, ambas na maior concentração, evidenciando processos inflamatórios.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, o valor da CL_{50-96} h da FSA do petróleo leve estimado para os juvenis de tainha *M. platanus* foi de 37,15%. Comparando esse resultado com outros estudos de FSA do petróleo é possível notar um efeito tóxico mais pronunciado desse poluente sobre a espécie testada. Gusmão (2009) observou que larvas de peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis* expostas a concentrações crescentes de FSA do petróleo pesado apresentaram uma CL_{50-96} h de 55%, entretanto, é sabido que o petróleo leve é mais tóxico para biota, pois apresenta maiores teores de BTEX. Já Neff et al. (2000) trabalhando com juvenis da espécie marinha *Menidia beryllina* estimaram as CL_{50-96} h para três diferentes tipos de petróleo, encontrando valores entre 32 e 88% da FSA. É sabido que a radiação luminosa potencializa a toxicidade do petróleo por meio da fototransformação de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. No entanto, Álvarez et al. (2008) não registraram diferenças estatisticamente significativas após exposição do peixe *Cyprinodon variegatus* à fração solúvel acomodada do petróleo pesado submetidas a fotooxidação. Os referidos autores estimaram a CL_{50-96} h em 53% de diluição da referida fração. Gusmão (2009) registrou valores de BTEX ($13,55 \mu\text{g L}^{-1}$) e HPAs ($4.843,02 \mu\text{g L}^{-1}$) bem inferiores comparado ao petróleo leve (Tab. 1) utilizado no presente estudo. Esse fato poderia explicar a menor tolerância expressa na forma de

CL₅₀ para juvenis de tainha comparado com as espécies *O. argentinensis* e *C. variegatus*.

Toda comparação toxicológica envolvendo o petróleo deve ser feita com diligência, pois o petróleo é constituído por uma mistura complexa de compostos orgânicos que variam em proporção de acordo com a sua origem (Neff et al., 2000; Wake et al., 2005). Outro fato que deve ser levado em consideração é a metodologia empregada para a produção da FSA do petróleo. Os diferentes tipos de metodologia podem influenciar o potencial toxicológico da FSA (Saeed and Al-Mutairi, 1999; Singer et al., 2000; Ziolli and Jardim, 2002).

Os processos de biotransformação de HPAs em peixes frequentemente transformam estes xenobióticos lipofílicos em compostos mais solúveis em água e passíveis de serem excretados. Por outro lado, existe a possibilidade das enzimas catalisarem a conversão de compostos como os HPAs em compostos intermediários mais reativos e tóxicos (Maria et al., 2002), podendo inclusive causar dano oxidativo ao DNA. Os efeitos genéticos como quebra do DNA e formação de micronúcleo podem refletir em mutagenicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade (Tuvikene et al., 1999).

O teste do micronúcleo é uma ferramenta importante para análise de genotoxicidade de poluentes em laboratório e em campo, sendo um teste simples, sensível e independente das características cariotípicas do organismo-teste. De acordo com Al-Sabt e Metcalfe (1995), o teste do MC respondeu positivamente a uma série de contaminantes, como as aflatoxinas, benzydina, hidrocarbonetos clorados e HPAs.

No presente estudo, a formação de micronúcleos observada em juvenis de tainha pode ser uma consequência desses processos oxidativos, onde compostos monoaromáticos e poliaromáticos presentes na FSA podem ter originado compostos

eletrofílicos que se associariam covalentemente a sítios moleculares no DNA, causando uma disfunção no mecanismo de divisão celular ou agindo diretamente no DNA.

Observando a Figura 1 podemos notar uma elevada formação de MC após 4 e 14 dias de exposição à FSA, evidenciando a ação de agentes aneugênicos e/ou clastogênicos presentes na FSA testada. De acordo com Ribeiro et al. (2003), os agentes aneugênicos induzem a aneuploidia ou segregação cromossômica anormal, enquanto que os agentes clastogênicos resultam em alterações cromossômicas através de dano ao DNA.

O trabalho de exposição à FSA com *M. platanus* corroborou os resultados encontrados por Cavas et al., (2005), onde a maior frequência de MC foi registrada em juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus* expostos por 72 h para efluente oriundo de uma refinaria de petróleo. De acordo com Al-Sabti & Metcalfe, (1995) é necessário conhecer o período ideal para o surgimento do MC para cada espécie, visto a diferença de metabolização entre os diferentes contaminante e a interespecificidade de metabolização entre as espécies. Uma faixa de frequência de MC ampla tem sido reportada por diferentes autores (Gustavino et al., 2001; Ferraro et al., 2004; Vanzella et al., 2007; Kumar et al., 2009).

Fazendo uma comparação com outro poluente orgânico, a resposta de formação de MC obtidos nas tainhas em função da exposição à FSA do petróleo assemelha-se àquela encontrada por Kumar et al. (2009), onde o teleósteo *Channa punctatus* foi submetido à diferentes concentrações subletais de malation (organofosforado) durante 0, 1, 3, 7, 15, 22 e 29 dias. Os autores descreveram que foi observada uma maior indução após 3 e 7 dias de exposição, diminuído relativamente com a diminuição da frequência de MC ao decorrer do experimento conforme aumento dos dias. Nossos resultados indicam uma grande quantidade de eritrócitos micronucleados aos 14 dias de exposição,

posteriormente, a partir do período de depuração houve uma diminuição da frequência de MC. Há dados que indicam a atividade do baço na remoção seletiva de eritrócitos micronucleados do sangue periférico (Meir et al., 1999; Cristaldi et al., 2004). O período de sete dias de depuração foi suficiente para que a frequência de eritrócitos micronucleados retornassem à condição normal. Poucos trabalhos relatam o comportamento micronuclear em processos de depuração após a exposição a compostos xenobiontes. O presente estudo indica que os peixes em processos de depuração tiveram tempo de renovar seus eritrócitos, removendo mais rapidamente os eritrócitos micronucleados.

Além dos marcadores citogenéticos, alguns órgãos como as brânquias e o fígado vêm sendo comumente utilizados como bioindicadores de poluição aquática. De acordo com Heath (1995), as brânquias são importantes na respiração, osmorregulação, balanço iônico e excreção de compostos nitrogenados, constituindo a maior área de contato entre o meio interno e o meio externo. Por esses motivos esse órgão tem sido usado com sucesso no biomonitoramento ambiental (Schwaiger et al., 1997). No presente estudo, as brânquias das tainhas expostas a concentrações subletais de FSA apresentaram uma série de histopatologias associadas aos hidrocarbonetos constituintes do petróleo. Algumas dessas lesões podem ser atribuídas a processos adaptativos como defesa frente à intoxicação, como é o caso da elevação do epitélio descrita por Simonato et al. (2007). Dentre as histopatologias observadas nas brânquias de *M. platanus*, a telangiectasia (Fig. 3C) foi a lesão de maior relevância. Esses resultados também foram verificados em juvenis de *O. gorbuscha* (Brand et al., 2001) expostos ao petróleo bruto e para juvenis de *Prochilodus Lineatus* expostos à FSA do diesel (Simonato et al., 2008). Já a hiperplasia distal foi encontrada em todos os grupos, inclusive no grupo controle. Esse

fato também foi registrado por Brand et al. (2001) e parece ser uma anomalia normalmente encontrada em peixes em função da exposição a uma gama de poluentes.

Em 24 e 96 h de exposição na concentração de 3,5% foi observado um aumento nas células de cloreto, fato esse também relatado por Costa et al. (2009). Os referidos autores também relataram um grande número de casos de hipertrofia das células de cloreto após exposição a sedimentos contaminados por HPAs e PCBs (bifenis policlorados), sugerindo que essas alterações não estejam relacionadas ao aumento na capacidade metabólica, o que refletiria na proliferação das mitocôndrias e no retículo endoplasmático. De acordo com Mazon et al. (2002), essas alterações possivelmente podem causar um desequilíbrio na regulação osmótica ao alterar o transporte ativo iônico. Fanta et al. (2003) registraram a mesma alteração em peixes expostos a níveis subletais de compostos orgânicos fosforados diluídos em água. De acordo com Sidermann (1979), mudanças na estrutura lamelar podem afetar as trocas gasosas, osmorregulação, bem como alterar a suscetibilidade a uma variedade de organismos patogênicos causadores de doenças.

Em trabalho realizado por Costa et al. (2009), os autores também descreveram a ocorrência de hiperplasias distais e difusas, aumento das células de cloreto e telangiectasia em linguados (*S. sonegalensis*) expostos ao sedimento contendo HPAs durante o período de 28 dias. Essas alterações podem ocorrer isoladamente ou simultaneamente, podendo promover uma série de mudanças fisiológicas, como exemplo a telangiectasia, causada pela ruptura das células pilares, que por sua vez podem comprometer a circulação do sangue no tecido epitelial, que podem por fim, causar a morte do organismo.

O fígado pode ser considerado um órgão alvo de estudo de grande importância para os vertebrados, uma vez que participam dos processos de metabolização e excreção

de xenobiontes. Por esse motivo, o fígado tem sido empregado como biomarcador ambiental em função de sua alta sensibilidade à contaminantes (Thophon et al., 2003). A alteração em sua estrutura bioquímica e física pode ser uma indicação do estado de saúde dos animais sujeitos a ação de poluentes (Myers et al., 1998).

Após o período experimental foi possível notar que os animais do grupo controle não apresentaram nenhuma alteração histológica no tecido hepático. Entretanto, nos animais expostos a FSA foi verificado um acréscimo nas alterações morfológicas e histopatológicas conforme o aumento das concentrações testadas. Dentre as histopatologias encontradas é possível relatar um grande número de infiltrados inflamatórios peridutais e infiltrados parenquimais observados nas três concentrações crônicas de FSA testadas (1,7; 3,5 e 7%). Estas histopatologias também foram relatadas por outros autores (Nero et al., 2006; Silva et al., 2009) estando associadas a exposição aos HPAs. Células granulares eosinófilas também foram observadas nas concentrações de 1,7% e 7%. Romano et al. (2006) relataram uma abundância dessas células em *Prochilodus platensis*, células essas associadas à função imunológica. Esses autores também notaram que essas células são similares aos mastócitos em mamíferos, distribuindo-se dentro do tecido hepático e rodeando estruturas vasculares e ductos biliares. Tal distribuição sugere que estas células desempenham funções imunológicas, sendo sugerida como bioindicadora de poluição aquática.

Já Rodrigues et al. (2010) estudando larvas de peixe-rei marinho *O. argentinensis* expostas à FSA verificaram a dilatação dos sinusóides no fígado. Essa alteração foi descrita pela primeira vez na literatura e foi tida como a histopatologia de maior relevância encontrada no fígado das larvas, hipotetizando que o aumento sanguíneo para o interior desse órgão esteja relacionado à detoxificação do organismo. No presente estudo também foi registrada a dilatação dos sinusóides com acúmulo de

eritrócitos na maior concentração testada, após 4 e 14 dias de exposição, corroborando os resultados de Rodrigues et al. (2010). Colestases também foram observadas no estudo com *M. platanus* no período de 1 e 14 dias após exposição a FSA. Pacheco & Santos (2001) também relataram colestases em fígados de *Aguilla anguilla* expostas a concentrações crônicas de benzo[a]pireno, um dos principais HPAs encontrados no petróleo. Os autores referem-se à colestase como uma manifestação fisiopatológica atribuída a uma falha no metabolismo. Uma explicação seria que a excreção da bilirrubina depende de sua solubilidade em água, obtida através da conjugação com o ácido glicurônico. Esta conjugação é catalisada pela enzima UDP-transferase glucuronil. A diminuição na capacidade da glucuronidase bilirrubina pode ser a principal razão para essa disfunção hepática (Nikinma e Oikari, 1982) e essa diminuição pode estar relacionada tanto com a inibição da enzima de conjugação quanto com a exaustão dos processos de conjugação, particularmente no que se refere à ativação do ácido glicurônico.

A partir da análise dos efeitos observados nos testes de toxicidade aguda e crônica da FSA com outras espécies de peixes foi possível concluir que o petróleo leve possui uma maior toxicidade quando comparado com o petróleo pesado. Os eritrócitos periféricos da presente espécie sofreram mutação com maior frequência após 96 horas de exposição. O período de sete dias posterior a exposição foi suficiente para que a frequência de micronúcleos retornassem a níveis equivalentes ao do grupo controle. A FSA do petróleo ocasionou uma série de histopatologias em tecidos hepáticos e brânquiais de juvenis da tainha *M. platanus*. O estudo histopatológico das brânquias revelou a talangiectasia como a histopatologia de maior relevância, sendo encontrada mesmo depois do processo de depuração. Já no estudo histopatológico do fígado notaram-

se infiltrados inflamatórios periductais, parenquimais e células granulares eosinófilas, demonstrando uma resposta do sistema imune frente a contaminação pela FSA.

5. REFERÊNCIAS

- Al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res* 1995; 343:121-135.
- Álvarez LS, Bellas J, Nieto O, Bayona JM, Albaigés J, Beiras R. Toxicity and phototoxicity of water-accommodated fraction obtained from Prestige fuel oil and Marine fuel oil evaluated by marine bioassays. *Sci Total Environ* 2008; 394:275-282.
- Anderson JW, Neff JM, Cox BA, Tatem HE, Hightower GM. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Mar Biol* 1974; 27:75-88.
- Ayllon F, Garcia-Vazquez E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat Res* 2001; 467:177-186.
- Barra R, Popp P, Quiroz R, Treutler H, Araneda A, Bauer C & Urrutia R. Polycyclic aromatic hydrocarbons fluxes during the past 50 years observed in dated sediment cores from Andean mountain lakes in central south Chile. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006; 63:52-60.
- Baršienė J, Lazutka J, Šyvokiene J, Dedonyte V, Rybakovas A, Bjornstad A, et al. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and the North Seas. *Environ Toxicol* 2004; 19:365-371.
- Brand DG, Fink R, Bengueyfield W, Birtwell IK, Mcallister CD. Salt water-acclimated pink salmon fry (*Oncorhynchus gorbuscha*) develop stress-related visceral

- lesions after 10-day exposure to sublethal concentrations of the water-soluble fraction of North Slope crude oil. *Toxicol Pathol* 2001; 29(5):574-584.
- Buhler DR, Williams DE. The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquatic Toxicol* 1988; 11:19-28.
- Cajaraville MP, Bebianno JM, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ* 2000; 247:295-311.
- Cavas T, Garanko NN, Arkhipchuk VV. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food Chem Toxicol* 2005; 43:569-574.
- Cohen AM, Nugegoda D. Toxicity of three oil spill remediation techniques to the Australian bass *Macquaria novemaculeata*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2000; 47:178-185.
- Costa PM, Diniz MS, Caeiro S, Lobo J, Martins M, Ferreira AM, et al. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. *Aquat Toxicol* 2009; 92:202-212.
- Cristaldi M, Ieradi LA, Udroui I, Zilli R. Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. *Mut Res* 2004; 559:1-9.
- Dórea HS, Bispo JRL, Aragão KAS, Cunha BB, Navickiene S, Alves JPH, et al. Analysis of BTEX, PAHs and metals in the oilfield produced water in the State of Sergipe, Brazil. *J Microchem* 2007; 85:234-238.
- Fanta E, Rios FS, Romao S, Vianna ACC, Freiburger S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 2003; 54:119-130.

- Ferraro MVM, Fenocchio AS, Mantovani MS, Oliveira RC, Cestari MM. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genet Mol Bio* 2004; 27(1):103-107.
- Goksoyr A, Förlin L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicol* 1992; 22:287-312.
- Gusmão EP, Rodrigues RV, Moreira CB, Sampaio LA, Miranda-Filho KC. Efeitos histopatológicos da exposição crônica de larvas do peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis* à fração solúvel do petróleo em água (FSA). Dissertação de Mestrado. FURG 2009.
- Gustavino B, Scornajjenghi KA, Minissi S, Ciccotti E. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X- Ray and colchicine. *Mutat Res Genet Toxicol Envir Mutag* 2001; 494:151-159.
- Haensly WE, Neff, JM, Sharp JR, Morris, AC, Bedgood MF, Boem PD. Histopathology of *Pleuronectes platessa* L. from Amber Wrach and Amber Benoit, Brittany, France: long – term effects of the Amoco Cadiz crude oil spill. *J Fish Dis* 1982; 5:365-391.
- Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median Lethal Concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol* 1977; 11:714-719.
- Heath AG. *Water Pollution and Fish Physiology*, second editors Lewis Publishers, Boca Raton: FL1995.
- Hylland K. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 2006; 69:109-123.

- Khan RA. Health of flatfish from localities en Placentria Bay, New foundland, Contaminated with petroleum and PCBs. Arch Environ Contam Toxicol 2003; 44:485-492.
- Klobucar GI, Pavlica M, Erben R, Papes D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. Aquat Toxicol 2003; 64:15-23.
- Kumar R, Nagpure NS, Kushwaha B, Srivastava SK, Lakra WS. Investigation of the genotoxicity of malathion to freshwater teleost fish *Channa punctatus* (Bloch) using the micronucleus test and comet assay. Arch Environ Contam Toxicol 2009.
- Mazon AF, Cerqueira CCC, Fernandes MN. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. Environ Res 2002; 88:52-63.
- Meier JR, Vernsing P, Torsella J. Feasibility of micronucleus methods for monitoring genetic damage in two feral species of small mammals. Environ Mol Mut 1999; 33:219-225.
- Myers MS, Johnson LL, Olson OP, Stehr CM, Horness BH, Collier TK, 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. Mar Pollut Bull 1998; 37:92-113.
- Nebert DW, Gonzalez FJ. Annu Reu Biochem 1987; 6:945-993.
- Neff JM, Ostazeski S, Gardiner W, Stejskal I. Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and diesel fuel to marine animals. Environ Toxicol Chem 2000; 19(7):1809-1821.

- Nero V, Farwell A, Lister A, Van Der Kraak G, Lee LEJ, Van Meer T, et al. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sand process-affected water. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006; 63:365-377.
- Newman MC. & Unger MA. *Fundamentals of Ecotoxicology*, CRC Press, 2003, EUA, 480 p.
- Nikinma M, Oikari A. Physiological changes in trout (*Salmo gairdneri*) during a short-term exposure to resin acids and during recovery. *Toxicol Lett* 1982; 14:103-110.
- Pacheco M, Santos MA. Naphthalene and β -Naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. *Environ In* 2002; 28: 285-293.
- Rand GM. & Petrocelli SR. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*, New York, Hemisphere Publishing Corporation. 1985. 666 p.
- Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*. Editora ULBRA Canoas RS: E-Publishing-Inc; 2003. p.356.
- Rice SD. Effects of oil on fish. In: Engelhardt, FR, editors. *Petroleum Effects in the Arctic Environment*. Elsevier Essex UK: E-Publishing-Inc; 1985. p. 281.
- Rodrigues RV, Miranda-Filho KC, Gusmão EP, Moreira CB, Romano LA, Sampaio LA. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci Total Environ* 2010; 408:2054-2059.
- Romano LA, Lucchini L, Alvarez M, Wicky G, Huidobro SP, Marozzi A. Distribución de células granulares eosinófilas en *Prochilodus platensis* y sus características tintoriales. *CIVA* 2006; 24-31.

- Saeed T, Mutairi MA. Chemical composition of the water soluble fraction of leaded
gasolines in sea water. *Environ Int* 1999; 25:117-129.
- Schwaiger J, Wanke R, Adam S, Pawert M, Honnen W, Triebkorn R. The use of
histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J
Aquat Ecosys Stress Recov* 1997; 6:75-86.
- Silva Ca, Ribeiro CAO, Katsumiti A, Araújo MLP, Zandoná EM, Silva GPC. et al.
Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5years after an accident in
Southern Brazil. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72:400-4009.
- Simonato JD, Guedes CLB, Martinez CBR. Biochemical, physiological, and
histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to
diesel oil. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008; 69(1):112-120.
- Sindermann CJ. Pollution-associated diseases and abnormalities of fish and shellfish: A
review. *Fish Bull* 1979; 76:717-749.
- Singer MM, Aurand D, Bragin GE, Clark JR, Coelho GM, Sowby ML, Tjeerdema RS.
Standardization of the preparation and quantification of water-accommodated
fractions of petroleum for toxicity testing. *Mar Pollut Bull* 2000; 40:1007-1016.
- Solangi MA, Overstreet RM. Histopathological changes in two estuarine fishes,
Menidia beryllina (Cope) and *Trinectes maculatus* (Bloch and Schneider),
exposed to crude oil and its water-soluble fractions *J Fish Dis* 2006; 5:13-35.
- Sprague JB. Measurement of pollutant toxicity to fish – III Sublethal effects and safe
concentrations. *Water Res* 1971; 5:245-266.
- Stephens SM, Alkindi AYA, Waring CP, Brown JA. Corticosteroid and thyroid
responses of larval and juvenile turbot exposed to the water-soluble fraction of
crude oil. *J Fish Biol* 1997; 50:953-964.

- Thophon S, Kruatrachue M, Upatham ES, Pokethitiyook P, Sahaphong S, Jaritkhuan S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ Pollut* 2003; 121:307-320.
- Tuvikene A, Huuskonen S, Koponen K, Ritola O, Mauer U, Lindström-Seppä P. Oil shale processing as a source of aquatic pollution: monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish. *Environ Health Perspect* 1999; 107:745-752.
- Vanzella TP, Martinez CBR, Cólus IMS. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water- soluble fraction on a tropical fish species. *Mutat Res* 2007; 631:36-43.
- Vieira JP. 1985. Distribuição, abundância e alimentação dos jovens de Mugilidae no Estuário da Lagoa dos Patos e movimentos reprodutivos da “tainha” (*Mugil platanus* Günther, 1880) no litoral sul do Brasil. Dissertação de Mestrado, FURG, Rio Grande, RS, 104p
- Yadav KK, Trivedi SP. Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*. *Chemosphere* 2009; 77:1495-1500.
- Ziulli RL, Jardim WF. Operational problems related to the preparation of the seawater soluble fraction of crude oil. *J Environ Monit* 2002; 4:138-141.

Tabela 1. Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) totais de hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (BTEX) e dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de 100% da fração solúvel do petróleo leve em água.

Hidrocarbonetos	Petróleo
Benzeno	6.622,29
Tolueno	5.672,53
Etilbenzeno	98,74
Xileno	3.038,36
Σ BTEX	15.431,92
Naftalina	51,085
Acenaftaleno	<i>Nd</i>
Acenafteno	<i>Nd</i>
Fluoreno	0,766
Fenantreno	1,024
Antraceno	<i>Nd</i>
Fluoranteno	<i>Nd</i>
Pireno	<i>Nd</i>
Benzo[a]Antraceno	<i>Nd</i>
Criseno	<i>Nd</i>
Benzo[b]Fluoranteno	<i>Nd</i>
Benzo[k]Fluoranteno	<i>Nd</i>
Benzo[a]Pireno	<i>Nd</i>
Indeno[1.2.3-C.D]Pireno	<i>Nd</i>
Dibenzo[a,i,h]Antraceno	<i>Nd</i>
Benzo[g,h,i]Perileno	<i>Nd</i>
Σ HPAs	52,87
Σ Hidrocarbonetos do petróleo	15.484,79

*Nd = não detectado

Tabela 2. Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante avaliação da toxicidade aguda da fração solúvel do petróleo leve em água (FSA) para juvenis da tainha *Mugil platanus*.

Composto Tóxico	Concentrações FSA %	Temperatura (°C)	Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	pH	Salinidade
Petróleo leve	Controle	24,19 \pm 0,36 ^a	5,72 \pm 1,10 ^a	7,80 \pm 0,37 ^a	30
	20 %	23,95 \pm 0,29 ^a	5,26 \pm 0,92 ^a	7,75 \pm 0,97 ^a	30
	25 %	23,93 \pm 0,32 ^a	5,14 \pm 0,62 ^a	7,90 \pm 0,11 ^a	30
	30 %	23,85 \pm 0,26 ^a	5,21 \pm 0,44 ^a	7,88 \pm 0,06 ^a	30
	35 %	23,90 \pm 0,19 ^a	5,58 \pm 0,56 ^a	8,00 \pm 0,15 ^a	30
	40 %	24,23 \pm 0,96 ^a	5,31 \pm 1,02 ^a	7,95 \pm 0,18 ^a	30
	45%	23,87 \pm 0,20 ^a	5,03 \pm 1,58 ^a	7,87 \pm 0,27 ^a	30

As letras em cada linha indicam diferenças estatísticas significativas.

Tabela 3. Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros de qualidade da água durante avaliação da toxicidade crônica da fração solúvel do petróleo leve em água (FSA) para juvenis da tainha *Mugil platanus*.

Tóxico	Concentrações FSA %	Temperatura (°C)	Oxigênio dissolvido (mg L⁻¹)	pH	Salinidade
Petróleo leve	Controle	22,18 \pm 1,15 ^a	5,94 \pm 0,96 ^a	8,06 \pm 0,11 ^a	28
	1,7%	22,36 \pm 1,01 ^a	5,75 \pm 0,98 ^a	8,05 \pm 0,10 ^a	28
	3,5%	22,67 \pm 1,43 ^a	5,62 \pm 0,94 ^a	8,00 \pm 0,09 ^a	28
	7%	22,81 \pm 0,73 ^a	5,63 \pm 0,97 ^a	8,04 \pm 0,11 ^a	28

As letras em cada linha indicam diferenças estatísticas significativas.

Tabela 4. Concentrações Letais Medianas (CL's ₅₀ para diferentes períodos), intervalo de confiança e o Nível de Segurança (NS) para fração solúvel do petróleo leve em água em juvenis da tainha *Mugil platanus*.

Período	CL₅₀	Nível de Segurança
24 h	51,27% (53,72 - 48,93)	5,1%
48 h	47,18% (51,22 - 43,46)	4,7%
72 h	39,05% (43,31 - 35,20)	3,9%
96 h	37,15% (41,21 - 37,15)	3,7%

Tabela 5. Ocorrência de histopatologias observadas em brânquias e fígados de juvenis da tainha *Mugil platanus* expostas à fração solúvel do petróleo leve em água.

Lesões observadas	Grupos expostos a FSA															
	Controle				1,7%				3,5%				7%			
	Período de exposição															
Brânquias	24h	96h	14d	21d	24h	96h	14d	21d	24h	96h	14d	21d	24h	96h	14d	21d
Hiperplasia distal	X	X	X	X	X	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	X	Nd	Nd	Nd
Hiperplasia difusa	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	X	X	X	X	X	X	Nd	X	X	X	Nd
Elevação epitelial	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	X	X	X	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Aumento das células de cloreto	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	X	X	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Telangiectasia	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	X	Nd	Nd	X
Fígado	24h	96h	14d	21d	24h	96h	14d	21d	24h	96h	14d	21d	24h	96h	14d	21d
Colestase	Nd	Nd	Nd	Nd	X	Nd	X	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Infiltrado inflamatório	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	X	Nd	Nd	Nd	X	Nd	Nd
Infiltrado inflamatório no ducto biliar (peridutal)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	X	X	Nd	X	X	X	Nd	Nd	X	X	X
Células Granulares eosinófilas	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	X	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	X
Metamorfose gordurosa	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	X	X	X	X	Nd	X	X	X	Nd
Dilatação do sinusóide com acúmulo de eritrócitos	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	X	X	Nd

*Nd = não detectada

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia de eritrócitos da tainha *Mugil platanus* com presença de micronúcleos (setas). Aumento de 1.000x.

Figura 2. Gráfico da frequência de micronúcleos a cada 1.000/células analisadas.

Figura 3. Fotomicrografias mostrando o tecido branquial de juvenis da tainha *Mugil platanus* expostas à FSA do petróleo leve, onde se observa: A- epitélio branquial do grupo controle (aumento 400x); B- elevação epitelial (seta) observada em tainhas expostas à FSA (3,5%) no período de 96 h de exposição (aumento de 400x). C- telangiectasia (seta) em brânquias de tainhas expostas à FSA (7%) no período de 24 h de exposição (aumento de 400x). D- hiperplasia distal e difusa (seta) em tainhas expostas à FSA (7%) no período de 24 h (aumento de 400x).

Figura 4. Fotomicrografias mostrando o tecido hepático de juvenis da tainha *Mugil platanus* expostas à FSA do petróleo leve, onde se observa: A- (h) hepatócito; (nh) núcleo do hepatócito; (n) nucléolo (aumento 400x). B- infiltrado inflamatório periductal (seta) em tainhas expostas à FSA (7%) no período de 14 dias (aumento 400x). C- infiltrados inflamatórios (seta) em tainhas expostas à FSA (7%) no período de 14 dias (aumento de 1.000x). D- dilatação dos sinusóides (seta) com acúmulo de eritrócitos em tainhas exposta à FSA (7%) no período de 96 horas de exposição (aumento de 400x). E- presença de colestases (setas pretas) e células granulares eosinófilas (setas brancas) no tecido parenquimal em tainhas expostas à FSA (1,7%) após 14 dias de exposição.

Fig.1

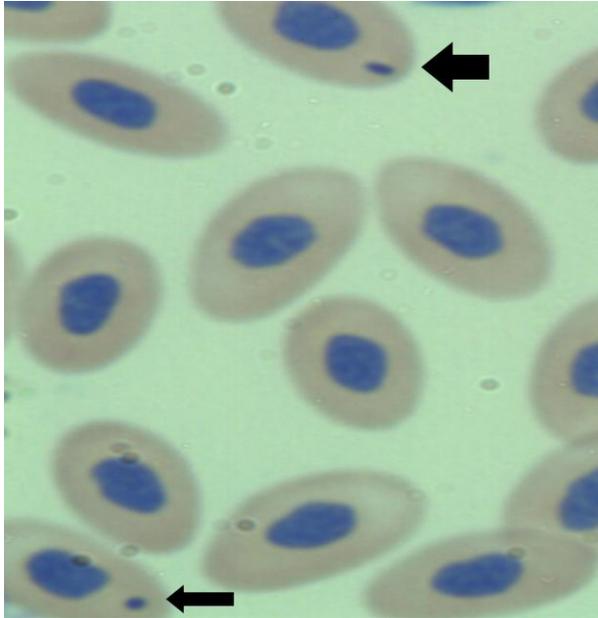
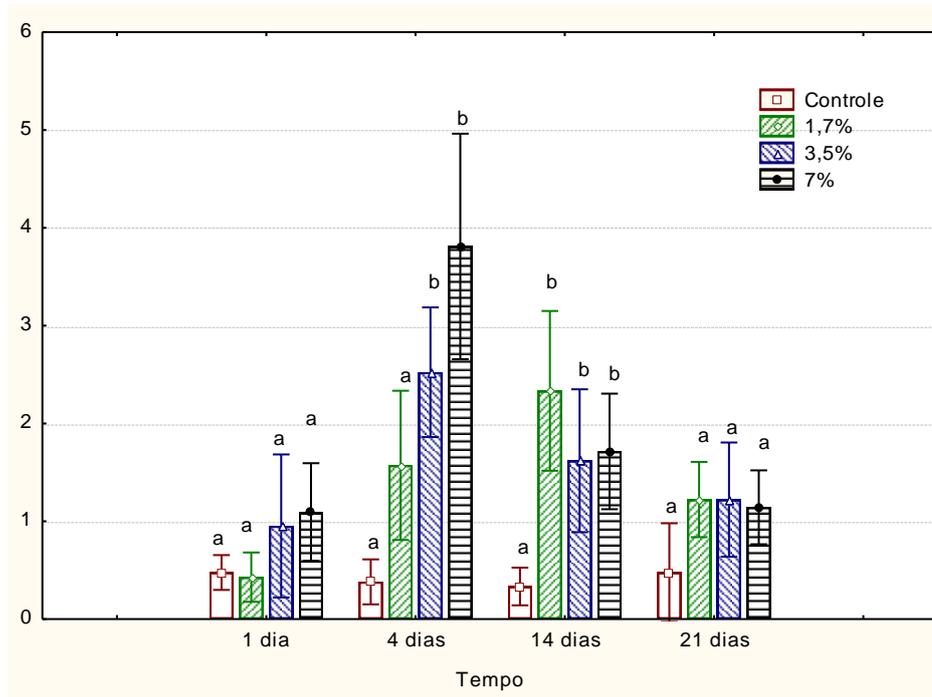


Fig. 2



*Letras representam diferenças ($p < 0,05$) estatísticas entres os tratamentos com o grupo controle.

Fig. 3

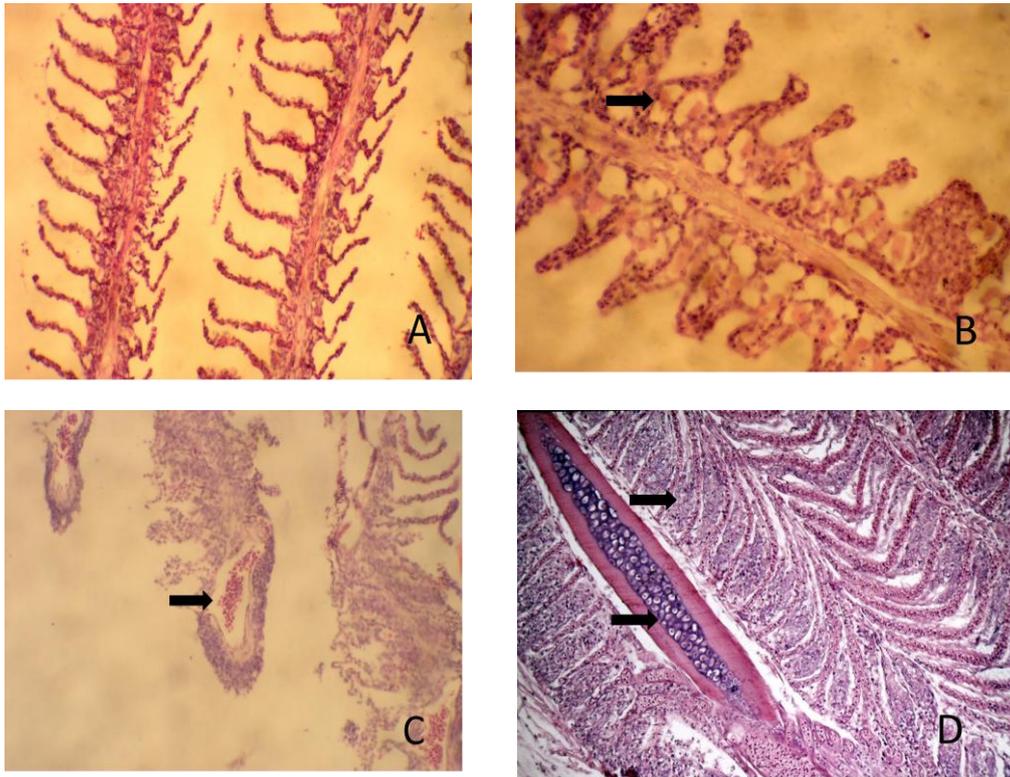
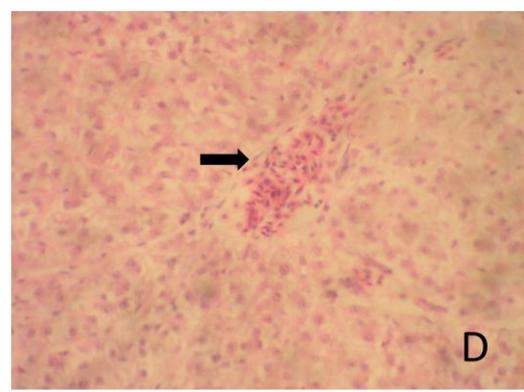
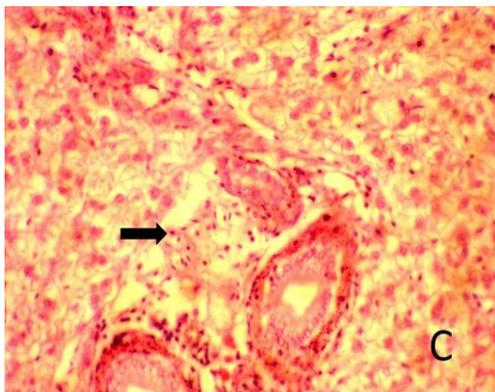
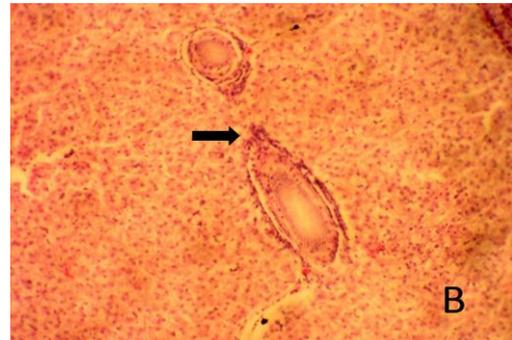
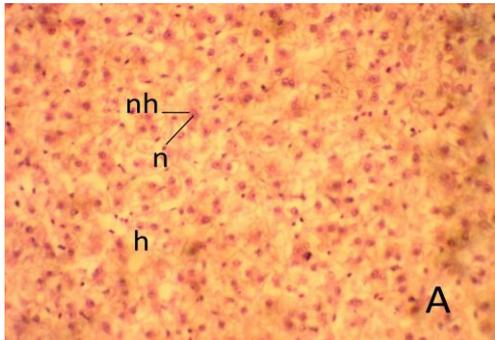
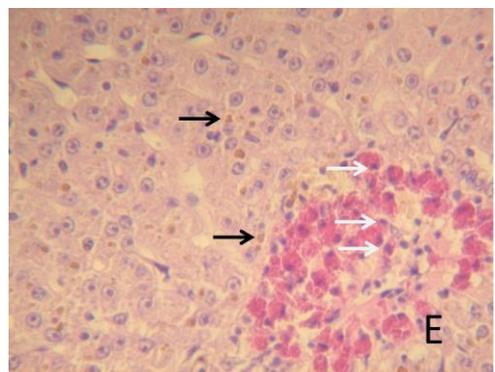


Fig. 4



.....



6. CONCLUSÃO

A partir dos efeitos encontrados após a exposição aguda e crônica à FSA do petróleo leve, nota-se uma toxicidade relativamente maior da FSA do petróleo leve sobre juvenis da tainha *Mugil platanus* comparado com o resultado obtido com outras espécies de peixes e com o petróleo pesado. Eritrócitos periféricos da presente espécie sofreram mutação com maior frequência a pós 96 horas de exposição. O período de sete dias posterior a exposição foi suficiente para que a frequência de micronúcleos retornassem a níveis equivalentes ao do grupo controle. A FSA do petróleo ocasionou uma série de histopatologias em tecidos hepáticos e brânquiais de juvenis da tainha *M. platanus*.