



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM ÊNFASE EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS

JOÃO VICTOR GOMES DO NASCIMENTO

**TOXICIDADE DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO EMULSIFICADO  
COLETADO NO COSTÃO ROCHOSO DA PRAIA DE PEDRA DO XARÉU PARA  
EMBRIÕES E LARVAS DE *Danio rerio***

2023  
RECIFE

JOÃO VICTOR GOMES DO NASCIMENTO

**TOXICIDADE DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO EMULSIFICADO  
COLETADO NO COSTÃO ROCHOSO DA PRAIA DE PEDRA DO XARÉU PARA  
EMBRIÕES E LARVAS DE *Danio rerio***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Paulo S. M. Carvalho.

Co Orientador: Me. Célio Freire Mariz Jr.

2023  
RECIFE

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Gomes do Nascimento, João Victor.

Toxicidade da Fração Solúvel do petróleo emulsificado coletado no costão rochoso da Praia de Pedra de Xaréu para embriões e larvas de *Danio rerio* / João Victor Gomes do Nascimento. - Recife, 2023.

77 : il., tab.

Orientador(a): Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Coorientador(a): Célio Freire Mariz Jr

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas / Ciências Ambientais - Bacharelado, 2023.

9.1.

Inclui referências, anexos.

1. Ecotoxicologia. 2. Zoologia. 3. Utilização de animais. 4. Conservação de animais. 5. Comportamento animal. I. Martins de Carvalho, Paulo Sérgio. (Orientação). II. Mariz Jr, Célio Freire. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

JOÃO VICTOR GOMES DO NASCIMENTO

**TOXICIDADE DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO EMULSIFICADO  
COLETADO NO COSTÃO ROCHOSO DA PRAIA DE PEDRA DO XARÉU PARA  
EMBRIÕES E LARVAS DE *Danio rerio***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Aprovada em: 22/09/2023

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
 PAULO SERGIO MARTINS DE CARVALHO  
Data: 30/09/2023 12:01:00-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho (Orientador)

Departamento de Zoologia- UFPE

Documento assinado digitalmente  
 ROMULO NEPOMUCENO ALVES  
Data: 01/10/2023 20:41:36-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Rômulo Nepomuceno Alves/ UFPE

(1ºTitular)

Documento assinado digitalmente  
 FIAMMA EUGENIA LEMOS ABREU  
Data: 27/09/2023 13:27:45-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dra. Fiamma Eugênia Lemos Abreu/UFPE

(2ºTitular)

RECIFE  
2023

## AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter conseguido chegar até aqui, gostaria também de agradecer a minha mãe que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu já não mais acreditava, queria dedicar essa conquista a ela, pois parte significativa da minha motivação para encerrar esse ciclo está no orgulho que eu quero lhe dar. Gostaria de agradecer a meus avós que mesmo sem estudos, sempre acreditaram no poder da educação e no quanto o conhecimento pode transformar vidas e a meus sobrinhos Kael e Kaleb por me trazerem sentido e um belo motivo para continuar evoluindo enquanto profissional e ser humano.

Gostaria também de agradecer a meu coorientador Célio Freire, por sempre se fazer presente e me ajudar durante toda essa caminhada na pesquisa, parte significativa da contribuição desse trabalho é dele. A meu Orientador Paulo Carvalho, os meus mais sinceros agradecimentos, por primeiramente, ter me aceitado no laboratório, quando eu nem ao menos cumpria o pré-requisito mínimo e a todos esses anos de troca e ajuda durante minha jornada na pesquisa. Agradeço também ao LABECOTOX como um todo, pois cada pessoa individualmente, mesmo que indiretamente me ajudou e contribuiu para esse projeto, principalmente por fazer do nosso ambiente de trabalho um local acolhedor e de grande companherismo.

Aos amigos que a graduação me deu, em especial, Duda, Cau, Leo, Ju, Maju, Lau, Blito, Brenno e Marcos, eu só tenho a agradecer, vocês fizeram toda essa experiência ter um pouco mais de sentido. Sou extremamente grato por ter compartilhado essa jornada com vocês. Foram 5 anos e muitas histórias acadêmicas e particulares compartilhadas e tenho certeza que o fim desse ciclo (a graduação), não é o fim do que a gente construiu e vem construindo.

Gostaria também de agradecer a minha prima Rhavenna por desde o início da graduação ser minha rede de apoio, me dando conselhos e me ajudando a decidir qual caminho seguir, mesmo de longe eu sou por tu e sei que tu também é por mim.

Por último, mas não menos importante, eu gostaria de agradecer a meu pai, que faleceu exatamente na semana que eu fui aprovado no vestibular. Sei que a nossa relação não foi das melhores, mas dedico essa e todas as minhas conquistas a ti. Parte significativa da minha integridade enquanto homem veio do senhor, obrigado por cuidar de mim, mesmo quando era para eu assumir esse papel pelo senhor.

## RESUMO

Em 2019 uma grande quantidade de petróleo intemperizado atingiu o litoral brasileiro e sua fração solúvel em água FSA tipicamente rica em Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos HPAs tende a ser tóxica para organismos aquáticos, incluindo peixes em sua fase embriolarval. Os estágios iniciais de vida do “Zebrafish” *Danio rerio* se tornaram modelos ecotoxicológicos de destaque e foram utilizados para avaliar a toxicidade das moléculas solubilizadas do óleo intemperizado coletado no costão rochoso da Praia de Pedra de Xaréu. Para isso, ovos fertilizados foram expostos durante 7 dias a FSA do óleo nas concentrações 1,65, 3,3, 6,6, 13,2, 26,4  $\mu\text{gL}^{-1}$ . Somatório da concentração dos HPAs Totais presentes na FSA  $\Sigma\text{HPAT}$  e parâmetros bioquímicos, morfológicos e comportamentais foram avaliados ao longo do desenvolvimento até 168 horas após a fertilização (hpf). A acetilcolinesterase foi inibida em todos os tratamentos, a peroxidação lipídica (POL) e a atividade de Catalase (CAT) apresentaram redução no tratamento 26,4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$ , e a glutathiona (GSH) teve sua concentração elevada em 26,4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$ . O General Morphology Score (GMS) indicou um atraso significativo no desenvolvimento embriolarval das larvas em 96 hpf expostas as concentrações de FSA quando comparadas ao controle. Frequências de larvas com anormalidades no desenvolvimento embriolarval e patologias após 96h de exposição apresentaram aumento de modo concentração dependente. A análise morfométrica do comprimento total, área do olho e da bexiga natatória em 168 hpf apresentou uma diminuição de modo concentração dependente. Foi verificada uma diminuição da velocidade natatória das larvas em 168 hpf expostas a FSA em 26,4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$  quando comparadas ao controle. O processo de insuflamento da bexiga natatória em larvas do *Danio rerio* entre 72 hpf e 168 hpf foi avaliado por filmagens logo após a eclosão. O tempo transcorrido até atingir a flutuabilidade neutra (TTFN), que acontece após o efetivo insuflamento da bexiga natatória das larvas, e a quantidade de vezes que as larvas repetem o movimento superfície fundo (MSF) aumentou nos tratamentos 3,3 e 6,6  $\mu\text{gL}^{-1}$  para TTFN e em 3,3  $\mu\text{gL}^{-1}$  para MSF, respectivamente. Os resultados obtidos indicam que a exposição à FSA do óleo intemperizado em concentrações ambientalmente relevantes pode afetar a viabilidade das larvas de *Danio rerio*.

**Palavras chave:** Desenvolvimento embriolarval, HPAs, bexiga natatória, óleo

### ABSTRACT

In 2019, a large amount of weathered oil reached the Brazilian coast and its water-soluble fraction FSA Typically rich in Polycyclic Aromatic Hydrocarbons PAHs tend to be toxic to aquariums, including fish in their embryolarval stage. The initial life projects of the Zebrafish *Danio rerio* became prominent ecotoxicological models and were used to assess the toxicity of solubilized molecules from weathered oil collected on the rocky shore of Xareu stone beach. For this, fertilized eggs were exposed for 7 days to oil ASF at concentrations 1.65, 3.3, 6.6, 13.2, 26.4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma$ HPAT and biochemical, morphological and behavioral parameters were evaluated at throughout development up to 168 hours after fertilization (hpf). Acetylcholinesterase was inhibited in all treatments, lipid peroxidation (POL) and Catalase activity (CAT) showed a reduction in the treatment 26.4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma$ HPAT, and glutathione (GSH) had its concentration increased by 26.4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma$ HPAT. The General Morphology Score (GMS) indicated a significant delay in the embryolarval development of larvae at 96 hpf exposed to FSA concentrations when compared to the control. Frequencies of larvae with abnormalities in embryolarval development and pathologies after 96 hours of exposure increased in a concentration-dependent manner. Morphometric analysis of total length, eye area and swim bladder at 168 hpf showed a concentration-dependent decrease. There was a decrease in the swimming speed of the larvae at 168 hpf exposed to ASF at 26.4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma$ HPAT when compared to the control. The swim bladder inflation process in *Danio rerio* larvae between 72 hpf and 168 hpf was evaluated by filming right after hatching. The time elapsed until reaching neutral buoyancy (TTFN), which occurs after the effective inflation of the larval swim bladder, and the number of times the larvae repeat the surface-to-bottom movement (MSF) increased in treatments 3.3 and 6.6  $\mu\text{gL}^{-1}$  for TTFN and 3.3  $\mu\text{gL}^{-1}$  for MSF, respectively. The results obtained indicate that exposure to ASF from weathered oil at environmentally relevant concentrations can affect the viability of *Danio rerio* larvae.

**Keywords:** Embryolarval development, PAHs, swim bladder, oil

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Hierarquia das possíveis respostas biológicas dos organismos expostos a contaminantes .....	19
Figura 2 Estrutura molecular dos 16 HPAs considerados prioritários pela Agência ambiental dos EUA, USEPA .....	23
Figura 3 localização geológica da camada pré-sal .....	24
Figura 4 Origem dos acidentes informados a ANP em 2014 .....	25
Figura 5 Descolamento da cauda do peixe zebra entre 12 e 72 hpf o qual o A é um organismo por volta de 10hpf; B- Organismo com 16hpf; C- Organismo com 24hpf; D- Organismo com 48hpf e E- Organismo com 72hpf.....	31
Figura 6 Estrutura do somito .....	32
Figura 7 Desenvolvimento dos olhos e pigmentação .....	33
Figura 8 Pigmentação na cabeça, corpo e cauda do <i>Danio rerio</i> .....	34
Figura 9 Processo do desenvolvimento da nadadeira peitoral 48 e 96hpf. A: Nadadeira peitoral ausente; B: Nadadeira peitoral presente. ....	35
Figura 10 Desenvolvimento da boca protrusível no desenvolvimento do <i>Danio rerio</i> .....	35
Figura 11 Desenvolvimento embrionário e eclosão da larva do <i>Danio rerio</i> .....	36
Figura 12 Extensão do saco vitelínico em 96hpf . A: Extensão do saco vitelínico vazio; B: Vitelo excede a linha do coração e não está vazio. ....	37
Figura 13 Bexiga natatória em ciprinídeos. A: Diagrama esquemático mostrando a Câmara anterior (AC), câmara posterior (PC), ducto comunicante (CD) e ducto pneumático (PD) ligados ao esôfago (E). B: Radiografia de um <i>Danio rerio</i> mostrando a bexiga natatória <i>in situ</i> . Barra de escala = 4 mm. ....	39
Figura 14 A: Embrião normal em 4hpf B: Embrião com sinais de coagulação, assimetria no polo animal e bolhas em seu entorno. ....	41
Figura 15 Modelo de exposição em placas de 24 poços, onde 4 poços servem de Controle Interno (CI), utilizada no GMS, como sugere a norma da (Oecd, 2013a).....	43
Figura 16 Vista das câmeras durante a observação das larvas entre 72hpf e 168hpf e ilustração do esquema da influência da FPC e da FEB. A: FPC>FEB = Flutuabilidade negativa B: FPC<FEB= Flutuabilidade positiva C: FPC=FEB= Flutuabilidade neutra. ....	48

Figura 17 Atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) em larvas de <i>Danio rerio</i> expostas durante 96h a concentrações crescentes da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu. ....	51
Figura 18 Biomarcadores bioquímicos em larvas de <i>Danio rerio</i> expostas durante 96 h a concentrações crescentes da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu.....	52
Figura 19 GMS da fase embriolarval do <i>Danio rerio</i> exposto durante 96h as diluições da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu. (Kruskal-Wallis H=58,598, $P \leq 0,001$ , Dunn $P < 0,05$ ); (*) Diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle. $\sum$ HPAT: Somatório de HPAs totais $\sum$ HPAP: Somatório de 16 HPAs parentais prioritários. ....	54
Figura 20 Contrações ventriculares observadas em 48hpf e 72hpf de larvas do <i>Danio rerio</i> expostas a diferente concentrações da FSA 48 hpf (Kruskal-Wallis H = 3,708, p = 0.59); 72 hpf (Kruskal-Wallis H = 38,604 p $\leq$ 0.001; Dunn, p < 0.05). (*) Diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle. As linhas horizontais tracejadas do box plot indicam valores médios e as linhas horizontais contínuas do box plot (inferior, médio e superior) indicam quartis de 25, 50 (mediana) e 75%, respectivamente. ....	54
Figura 21 Efeitos subletais morfométricos no comprimento total e na área da bexiga natatória e do olho de larvas de <i>Danio rerio</i> 168 horas após a fertilização expostas durante 96h a concentrações crescentes da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu.....	58
Figura 22 Velocidade natatória média e velocidade natatória máxima média de larvas de <i>Danio rerio</i> 168 horas após a fertilização expostas durante 96h a concentrações crescentes da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu. ....	60
Figura 23 Tempo necessário para atingir a flutuabilidade neutra e número de tentativas de subidas até a superfície de larvas de <i>Danio rerio</i> expostas durante 96h a concentrações crescentes da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu. A-Insuflamento da bexiga natatória: TTFN (Kruskal-Wallis, H = 12,846, p $\leq$ 0,005, Dunn p < 0,05) B- MSF (ANOVA F= 3,128 P $\leq$ 0,038, Dunnet P < 0,038). (*) Diferença estatisticamente significativa comparada ao controle. As linhas horizontais tracejadas do box plot indicam valores médios e as linhas horizontais contínuas do box plot (inferior, médio e superior) indicam quartis de 25,50 (mediana) e 75%, respectivamente. ....	61

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 Concentração total de HPAs parentais e alquilados presentes na solução bruta (100%) de Fração Solúvel em água do óleo coletado no costão rochoso da Praia de Pedra de Xaréu.....	49
Tabela 2 Frequência de patologias entre 24 e 96 hpf da fase embriolarval do <i>Danio rerio</i> exposto durante 96 hpf a concentrações crescentes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos totais ( $\Sigma$ HPAT) da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu.....	56

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Ach	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
CAT	Catalase
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Efeito observado
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CPRH	Agência Pernambucana de Meio Ambiente
dpf	Dias pós-fertilização
DTNB	Ditiobisnitrobenzato
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GMS	General Morphology Score
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione Reduzida
GST	Glutathione-S-Transferase
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HPAT	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos totais
HPAP	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Parentais
hpf	Horas pós-fertilização
hpe	Horas Pós Eclosão.
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
LPO	Peroxidação Lipídica
MDA	Malondialdeído
MSF	Movimento Superfície Fundo
FEB	Força de Empuxo da Bexiga natatória.
FSA	Fração Solúvel em Água
FSOE	Fração Solúvel do óleo em Água
FPC	Força do Peso Corporal.
FET	Fish embryo test

TTFN Tempo transcorrido até atingir a flutuabilidade neutra  
ZET Zebrafish embryotoxicity test

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>17</b>
2.1	ECOTOXICOLOGIA .....	17
2.1.1	<b>Ecotoxicologia aquática.....</b>	<b>20</b>
2.2	DESASTRES COM PETRÓLEO .....	21
2.2.1	<b>Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs).....</b>	<b>22</b>
2.3	DESASTRES COM PETRÓLEO NA COSTA BRASILEIRA.....	23
2.3.1	<b>Desastres com petróleo na costa pernambucana .....</b>	<b>26</b>
2.4	ORGANISMO TESTE- <i>Danio rerio</i> .....	27
2.5	BIOMARCADORES .....	28
2.5.1	<b>Biomarcadores bioquímicos.....</b>	<b>28</b>
2.5.1.1	Biomarcadores de neurotoxicidade.....	28
2.5.1.2	Biomarcadores de estresse oxidativo .....	29
2.5.1.3	Biomarcadores de biotransformação fase I e II .....	30
2.5.2	<b>Biomarcadores morfológicos .....</b>	<b>31</b>
2.5.2.1	General Morphology Score (GMS) .....	31
2.5.2.2	Descolamento da cauda .....	31
2.5.2.3	Formação dos somitos .....	32
2.5.2.4	Formação dos olhos .....	33
2.5.2.5	Movimento.....	33
2.5.2.6	Circulação .....	33
2.5.2.7	Batimento cardíaco .....	34
2.5.2.8	Pigmentação da cabeça, corpo e cauda .....	34
2.5.2.9	Nadadeira peitoral.....	35
2.5.2.10	Boca protrusível .....	35
2.5.2.11	Eclosão .....	36
2.5.2.12	Extensão do saco vitelínico .....	36
2.5.2.13	Insuflamento da bexiga natatória .....	37

	13
<b>2.5.3 Biomarcadores comportamentais .....</b>	<b>37</b>
2.5.3.1 A importância da bexiga natatória em peixes em sua fase larval .....	38
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	40
<b>3.1.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>40</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 CULTIVO DE <i>Danio rerio</i> E OBTENÇÃO DE OVOS FERTILIZADOS .....	41
4.2 PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO EM ÁGUA E CARACTERIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HPAS.....	41
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL E AVALIAÇÃO DE EFEITOS LETAIS .....	42
4.4 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS APÓS 96 HORAS DE EXPOSIÇÃO....	43
<b>4.4.1 Catalase (CAT) .....</b>	<b>43</b>
<b>4.4.2 Acetilcolinesterase (AChE) .....</b>	<b>44</b>
<b>4.4.3 lipoperoxidação lipídica (POL) .....</b>	<b>44</b>
<b>4.4.4 Glutathione - S - Transferase (GST).....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.5 Glutathione (GSH).....</b>	<b>45</b>
4.5 EFEITOS SUBLETAIS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS .....	46
<b>4.5.1 Avaliação de atrasos no desenvolvimento embrionário .....</b>	<b>46</b>
<b>4.5.2 Contrações Ventriculares.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5.3 Efeitos subletais em frequências de patologias observadas .....</b>	<b>46</b>
<b>4.5.4 Efeitos subletais em parâmetros morfométricos 7 dias após a fertilização</b> <b>46</b>	
4.6 EFEITOS SUBLETAIS COMPORTAMENTAIS .....	47
<b>4.6.1 Comportamento natatório espontâneo 168hpf .....</b>	<b>47</b>
<b>4.6.2 Efeitos subletais no processo de insuflamento da bexiga natatória .....</b>	<b>47</b>
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	48
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>

	14
5.1	QUANTIFICAÇÃO DE HPAs NA AMOSTRA DE FSA..... 49
5.2	EFEITOS LETAIS ..... 51
5.3	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS ..... 51
<b>5.3.1</b>	<b>Biomarcadores de neurotoxicidade..... 51</b>
5.3.1.1	Atividade da Acetilcolinesterase – AchE ..... 51
<b>5.3.2</b>	<b>Biomarcadores de estresse oxidativo ..... 52</b>
5.3.2.1	Peroxidação lipídica POL ..... 52
5.3.2.2	Espécies reativas de oxigênio – ROS ..... 52
5.3.2.3	Atividade de defesa antioxidante catalase – CAT ..... 52
5.3.2.4	Glutationa- GSH ..... 52
5.3.2.5	Glutationa-S-transferase – GST..... 52
5.4	EFEITOS SUBLETAIS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS ..... 53
<b>5.4.1</b>	<b>Índice de Desenvolvimento Morfológico (GMS)..... 53</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Contrações ventriculares ..... 54</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Frequência de anormalidades no desenvolvimento e de patologias..... 56</b>
<b>5.4.4</b>	<b>Efeitos subletais morfométricos ..... 57</b>
5.4.4.1	Comprimento Total ..... 57
5.4.4.2	Área da bexiga natatória ..... 57
5.4.4.3	Área do globo ocular..... 57
5.5	EFEITOS SUBLETAIS COMPORTAMENTAIS ..... 60
<b>5.5.1</b>	<b>Velocidade natatória em 168hpf..... 60</b>
5.5.1.1	Velocidade média e velocidade máxima média..... 60
<b>5.5.2</b>	<b>Insuflamento da bexiga natatória 72hpf a 168hpf..... 61</b>
5.5.2.1	Tempo para atingir a flutuabilidade neutra..... 61
5.5.2.2	Tentativas de subidas até a superfície..... 61
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO ..... 63</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO ..... 66</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS ..... 67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No ano de 2019 houve um derramamento de petróleo bruto em mar aberto distante da costa brasileira, a qual segundo inquérito concluído pela Polícia Federal, sua origem foi em decorrência de um vazamento do navio petroleiro de bandeira grega denominado “Bouboulina”, pertencente a empresa Delta Talkers. Aproximadamente 5.379 toneladas de resíduos de óleo foram coletados, principalmente nos estados de Alagoas e Pernambuco que foram os mais afetados (Soares, Teixeira *et al.*, 2022)

Ao entrar em contato com o mar, o petróleo sofre uma série de transformações físicas, químicas e biológicas e a soma dessas transformações é denominado de intemperismo (Szewczyk, 2006). O óleo que chegou na costa pernambucana em 2019, estava na sua forma emulsificada, que é quando as gotículas do óleo estão em uma solução aquosa, podendo assim, aumentar o volume desse óleo, em relação ao volume inicial do derrame (Szewczyk, 2006).

A permanência de massas não removidas e resíduos do petróleo que chegou predominantemente emulsificado nas áreas costeiras podem ter gerado, por meio de dissolução, misturas complexas de hidrocarbonetos nestes ecossistemas impactados. O impacto biológico do óleo imediatamente após sua chegada à costa, foi medido através da abundância populacional e riqueza de espécies bentônicas, as quais dois meses após a chegada das primeiras manchas tiveram recuperação parcial (Craveiro, De Almeida Alves *et al.*, 2021). O derramamento de petróleo é extremamente prejudicial à biota que é exposta ao contaminante (Belmejo e Martos, 2008) e vários derramamentos de óleo bruto marcam a história da humanidade, como o do navio Exxon Valdez que ocorreu em 1989 no Alasca (Barron, Vivian *et al.*, 2020), o do navio Prestige a 50km da costa da Galícia (Albaigés, Morales-Nin *et al.*, 2006) e da plataforma de petróleo Deepwater Horizon no Golfo do México (Barron, Vivian *et al.*, 2020).

Apesar do petróleo ser ainda a principal fonte energética da atualidade, gerando a partir do seu refino, gasolina, óleo diesel e querosene, ele é composto basicamente por hidrocarbonetos (97%), dos quais se destacam os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), moléculas com dois ou mais anéis aromáticos na composição, sendo contaminantes centrais das análises de risco emergencial tanto para a saúde humana (Genkinger, Stigter *et al.*, 2015), quanto para a saúde das espécies de vida selvagem

impactadas pelo óleo, como vertebrados, incluindo peixes (Payne, Mathieu *et al.*, 2003) e invertebrados, como os crustáceos (Ren, Pan *et al.*, 2015).

Existem aproximadamente mais de 100 moléculas de HPAs conhecidas, porém 16 delas são consideradas prioritárias, pela sua onipresença em ambientes contaminados e pelo seu potencial de toxicidade, os quais têm sido amplamente estudados e avaliados no monitoramento de áreas contaminadas (Altenburger, Segner *et al.*, 2003). Além desses HPAs prioritários, se tem também os seus derivados alquilados, que surgem através de processos químicos onde um grupo alquila é ligado a uma molécula orgânica por meio da adição ou substituição. Os principais HPAs os quais estão presentes no petróleo bruto são o naftaleno com dois anéis aromáticos e o Fenantreno com três anéis aromáticos e seus derivados alquilados.

A fração solúvel em água (FSA) do óleo é bastante tóxica a biota marinha, especialmente para os estágios embriolarvais de peixes, devido a sensibilidade desses organismos aos HPAs presentes na mesma (Jung, Hicken *et al.*, 2013; Xu, Mager *et al.*, 2016; Pasparakis, Esbaugh *et al.*, 2019). O paulistinha ou “zebrafish” *Danio rerio* é um peixe teleósteo que vem sendo utilizado a nível mundial para o desenvolvimento de metodologias de biomonitoramento de ambientes aquáticos e avaliação ecotoxicológica de contaminantes na forma isolada ou em misturas complexas (Embry, Belanger *et al.*, 2010). Esse peixe é de fácil cultivo laboratorial e sua fase embriolarval é extremamente sensível à presença de contaminantes, fazendo assim, com que essa espécie seja bastante utilizada para estudos do gênero. Além disso, o fato deles possuírem a fecundação externa e os embriões serem translúcidos durante toda a fase embrionária e larval, facilita a análise morfológica durante as 96 horas pós fertilização (hpf) desses organismos expostos ao contaminante. Os efeitos tóxicos dos HPAs na fase inicial de desenvolvimento do zebrafish incluem anormalidades como disfunção cardíaca, anemia, morte neuronal, defeitos no sistema vascular periférico e teratogênese (Incardona, Carls *et al.*, 2005; Alves, Mariz Jr *et al.*, 2017), e a espécie tem sido usada inclusive para a avaliação da toxicidade de amostras da fração solúvel de petróleo bruto (Li, Ding *et al.*, 2018).

Desta forma, a simulação de lixiviação de HPAs do óleo emulsificado em laboratório, com a subsequente separação da fração solúvel gerada, e a caracterização da potencialidade tóxica desta fração solúvel remete a importantes questões sobre o potencial de moléculas tóxicas que foram e podem ser solubilizadas nos ambientes afetados, e

eventualmente gerando concentrações de HPAs na água suficientes para gerar efeitos tóxicos no desenvolvimento de peixes.

Parte do óleo que chegou à costa pernambucana impregnou superfícies rochosas, onde sofreram intemperismo devido a mudança do nível do mar e da exposição solar. Com o movimento das ondas parte desse óleo intemperizado impregnado nas rochas pôde se dissolver e ser bioacumulado pelos organismos aquáticos. Essa lixiviação pode ser simulada em laboratório pela preparação de FSA do óleo, como proposto por Singer, Aurand *et al.* (2000). Portanto, este estudo utilizou o *Danio rerio* como espécie modelo para avaliar o potencial tóxico da FSA feita a partir do óleo intemperizado coletado impregnado nas rochas da Praia de Pedra de Xaréu. Os dados obtidos podem ser úteis no desenvolvimento de metodologias de biomonitoramento da contaminação de ambientes aquáticos e na caracterização dos possíveis efeitos tóxicos no desenvolvimento embriolarval de peixes teleósteos.

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 ECOTOXICOLOGIA**

O século XIX foi importante por trazer à tona um modelo de civilização marcado pela industrialização como forma de otimizar a produção. Com a industrialização, deu-se início ao processo de urbanização, decorrente do êxodo rural. Essa migração dos habitantes do campo para a cidade ocorreu mediante a necessidade dos agricultores de subsistência irem em busca de melhores condições de vida, ocupando assim, espaços nos arredores das grandes fábricas onde trabalhavam. Para otimizar a produção, se fez necessário a utilização de compostos químicos potencialmente tóxicos.

Paralelamente a este fator, as cidades industriais eram marcadas pela ausência de saneamento básico, o qual contribui com a proliferação de doenças, como a cólera.

Um exemplo de ausência de cuidado no descarte de efluentes ocorreu em 1956, devido ao descarte indevido do efluente líquido de uma indústria que utilizava mercúrio como catalisador na fabricação de acetaldeído somado a ineficiência dos métodos de reparação das condições normais da água que se foi possível observar um dos casos mais clássicos de contaminação por metilmercúrio em humanos, a disseminação da doença de Minamata que ocorreu no Japão e levou várias pessoas a óbito e deixou sequelas em muitas outras (Ekino, Susa *et al.*, 2007).

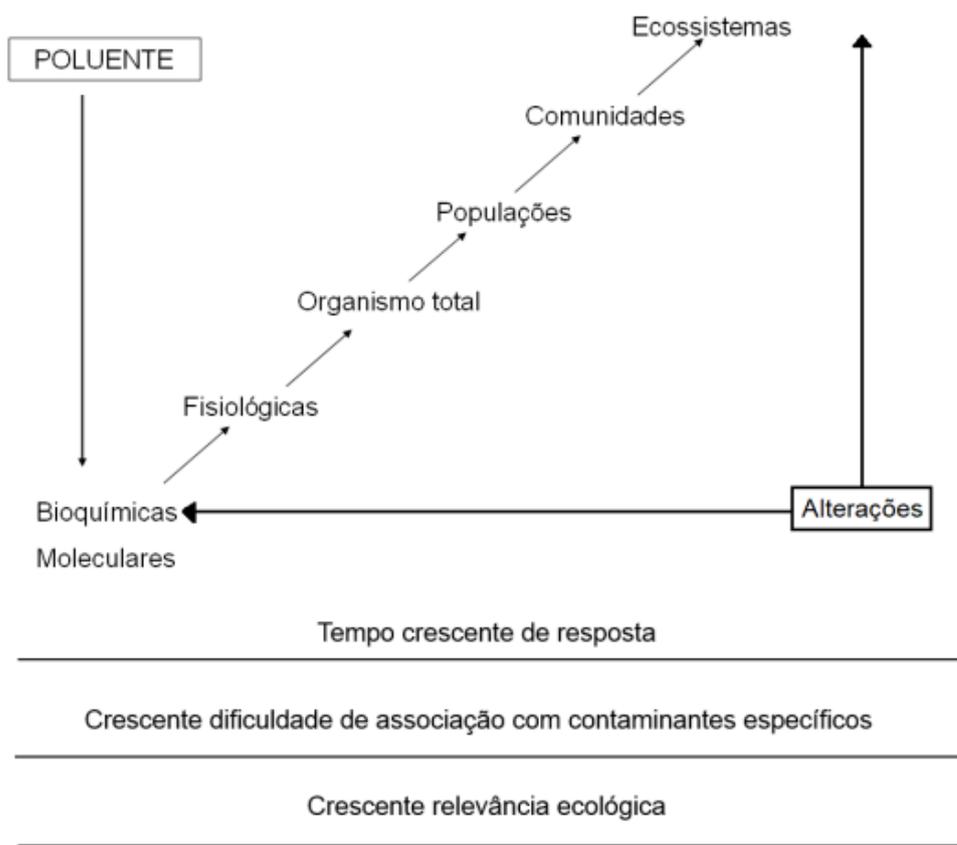
Apesar desse acontecimento, só a partir de 1960 que a poluição começa a de fato ganhar a atenção da sociedade, principalmente pelo fato de que o autor supracitado acima percebeu que partes das enfermidades da época eram em decorrência da toxicidade de alguns poluentes, além da contaminação por metilmercúrio, pois em decorrência de todo processo de industrialização a contaminação por poluentes químicos em decorrência de uma otimização no processo de produção, se tornou cada vez mais comum. Em 1962, Rachel Carson, com seu livro *Silent Spring* denunciou os impactos causados pelo diclorodifeniltricloroetano (DDT), que inicialmente foi criado na intenção de controlar insetos vetores de doenças como malária, dengue e tifo, mas logo em seguida se tornou um pesticida agrícola bastante utilizado nos EUA após a segunda guerra mundial (Dunn, 2012). Paralelamente a contenção de espécies indesejadas na agricultura, houve um declínio em espécies benéficas, tanto de invertebrados, como de vertebrados após o início de pulverizações aéreas frequentes, após a regularização do uso de inseticidas na agricultura na década de 1950. Esse inseticida organoclorado bioacumula, fazendo assim, com que seus efeitos mais graves se concentrassem em organismos do topo alimentar. No livro da Rachel Carson, ela denuncia o declínio populacional das aves, após a utilização do DDT na agricultura, 20 anos mais tarde, (Krebs, Wilson *et al.*, 1999) identifica que o passeriforme *Emberiza calandra* vem tendo um declínio de aproximadamente 5% ao ano.

Em 1969 o termo ecotoxicologia foi proposto por René Truhaut, como um ramo da toxicologia que analisa os efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos em animais, vegetais e em microrganismos, observando seus possíveis efeitos letais e subletais (Truhaut, 1977).

Hoje a ecotoxicologia é conhecida como um ramo da toxicologia e da ecologia o qual analisa os efeitos deletérios não-intencionais de substâncias químicas naturais ou artificiais sobre os organismos vivos (Walker, Sibly *et al.*, 2005), tendo como foco a análise da relação dose-resposta. Esta análise consiste em testar diferentes concentrações de um determinado contaminante e avaliar a resposta do organismo exposto a cada concentração, a fim de saber se está ocorrendo uma relação dose-dependente, que é quando a dose utilizada está relacionada com os efeitos causados no organismo. Identificar esse tipo de relação é importante, pois faz com que se possa prever as consequências da exposição de determinados organismos a contaminantes, e saber a partir de que concentração o mesmo pode começar a apresentar efeitos letais e subletais no organismo.

Alterações bioquímicas tendem a acontecer a organismos expostos a poluentes e determinadas alterações possuem impacto direto na fisiologia e comportamento do organismo (Figura 1), fazendo com que o mesmo apresente alterações morfológicas e alterações no desempenho ecológico. No ambiente, respostas em organismos individuais de uma mesma espécie, pode configurar em mudanças na dinâmica populacional no organismo do local contaminado, fazendo assim, com que dependendo do nível da contaminação e do potencial tóxico do poluente, as dinâmicas de comunidades e do ecossistema como um todo, seja comprometido.

Figura 1 Hierarquia das possíveis respostas biológicas dos organismos expostos a contaminantes



Fonte: (Bertoletti, 2006)

Hoje se tem conhecimento que apesar das técnicas de química analítica serem bastantes precisas, as mesmas por si só não fornecem informações suficientes para fornecer informações acerca do potencial tóxico de contaminantes.

Dessa forma, se faz necessário a utilização de organismos testes para medir a toxicidade de determinado contaminante, levando em conta que o mesmo, caso seja sensível a presença de contaminantes no ambiente o qual ele está inserido, tenda a responder negativamente apresentando inicialmente alterações bioquímicas e fisiológicas (Figura 1).

### **2.1.1 Ecotoxicologia aquática**

O ambiente aquático apesar de ser um dos mais importantes é o ecossistema mais suscetível à poluição decorrente da ação antrópica (Mclachlan e Defeo, 2017). Esses ambientes são sistemas vulneráveis, pois sua cadeia alimentar é bem delimitada, aumentando assim a tendência de bioacumulação nos predadores de topo (Richard T, 2008). Devido a isso que o monitoramento desses ambientes é de extrema importância, pois segundo (Monitoring e Chapman, 1989) podem fornecer informações importantes sobre a proporção da poluição que afeta tanto a biota marinha e continental, quanto os humanos que ocasionalmente podem ter contato direta ou indiretamente pela contaminação desses ecossistemas. É estimado que o consumo de hidrocarbonetos de petróleo no ambiente marinho seja de aproximadamente 3,2 milhões de toneladas anualmente e os principais responsáveis pela contaminação do ambiente são os derrames das operações rotineiras de navios-tanque e descargas de resíduos urbanos (Beasley e Levengood, 2012).

Os ecossistemas aquáticos se tornaram centrais em estudos ecotoxicológicos devido ao fato de que eles são os principais receptores dos resíduos urbanos, além de possuírem importância econômica e ecológica. Paralelamente a isso, está também o fato de que as propriedades físicas e químicas desses ambientes podem alterar a composição de xenobióticos, podendo assim, fazer com que os mesmos talvez elevem o seu potencial de toxicidade inicial (Costa, Olivi *et al.*, 2008).

Vários estudos são realizados, a fim de medir os efeitos letais e subletais da exposição de poluentes químicos a organismos testes, que são organismos os quais apresentam sensibilidade a alterações ambientais em alguma fase do desenvolvimento. Dentre os contaminantes utilizados para medir o impacto em organismos aquáticos que sejam, de certa forma, representativos (Costa, Olivi *et al.*, 2008), estão os metais pesados, fertilizantes, fungicidas, inseticidas e os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos que são contaminantes facilmente encontrados neste ambiente.

Hoje os peixes são um dos grupos mais importantes na identificação de toxicidade nos ecossistemas aquáticos, sendo utilizados como organismo teste principalmente nos estágios iniciais, pois geralmente nesses estágios esses organismos tendem a ser mais sensíveis a substâncias tóxicas (Beekhuijzen, Manon, De Koning, Coco *et al.*, 2015). É importante enfatizar que ao escolher uma espécie para ser utilizada como organismo teste, deve-se saber a respeito da fisiologia do organismo, genética, comportamento e se o mesmo apresenta sensibilidade à presença de contaminantes em algum estágio da vida.

## 2.2 DESASTRES COM PETRÓLEO

Diversos acidentes causados por vazamentos de petróleo marcam a história da humanidade e devido a isso que muitos estudiosos focam nessa problemática, pois muito dos seus compostos, em especial os HPAs possuem potencial carcinogênico, sendo bastante prejudicial tanto para a biota marinha (Belmejo e Martos, 2008), quanto para os humanos (Genkinger, Stigter *et al.*, 2015).

Os avanços nos estudos nessa área foram motivados após o vazamento de petróleo do navio Torrey Canyon (Costa inglesa, 1967) e Amoco Cadiz (Costa francesa e inglesa, 1978). Em janeiro de 1991, houve um dos piores vazamentos de petróleo da história, tendo volume de 1 milhão e 360 mil toneladas de petróleo derramado durante a Guerra do Golfo, no Golfo Pérsico. A consequência desses derramamentos são observadas de forma imediata com a morte instantânea de alguns organismos após terem contato direto com o petróleo na sua forma densa ou a longo prazo com a parte do óleo que se mistura a água em uma FSA, facilitando assim, a absorção por parte dos organismos. Essa absorção pode acarretar efeitos tóxicos em peixes como disfunção cardíaca (Incardona e Scholz, 2016), anemia, morte neuronal, defeitos no sistema vascular periférico e teratogênese (Incardona, Carls *et al.*, 2005; Alves, Mariz Jr *et al.*, 2017).

Além do derramamento de petróleo no Golfo Pérsico, alguns outros marcaram a história, como o do Exxon Valdez (EVOS), no Alasca. O EVOS, liberou cerca de 40,8 milhões de litros (35.500 toneladas) de petróleo bruto em uma região do Alasca quase intocada (Barron, Vivian *et al.*, 2020). A ausência de ações antrópicas na região de Prince William Sound, fez com que fosse possível quantificar de forma mais fácil e assertiva o efeito direto desse derramamento no ecossistema. Além do impacto do derramamento em si, zonas entre-marés foram afetadas pela limpeza pesada a qual foi submetida, em alguns

casos sendo utilizado jatos de água quente para retirar o óleo, o que acabou afetando a cobertura de algas fucoides e diminuindo a comunidade de moluscos na área (Barron, Vivian *et al.*, 2020).

O derrame da plataforma Deepwater foi, até então, o maior derrame de petróleo do mundo, liberando aproximadamente 507 milhões de litros de petróleo bruto durante 87 dias. Diversos organismos da meiofauna e da megafauna foram diretamente afetados, apesar de não ter mortes documentadas de peixes, os efeitos subletais são bem documentados, sendo alterações na contração ventricular o que mais se destaca (Barron, Vivian *et al.*, 2020).

### **2.2.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)**

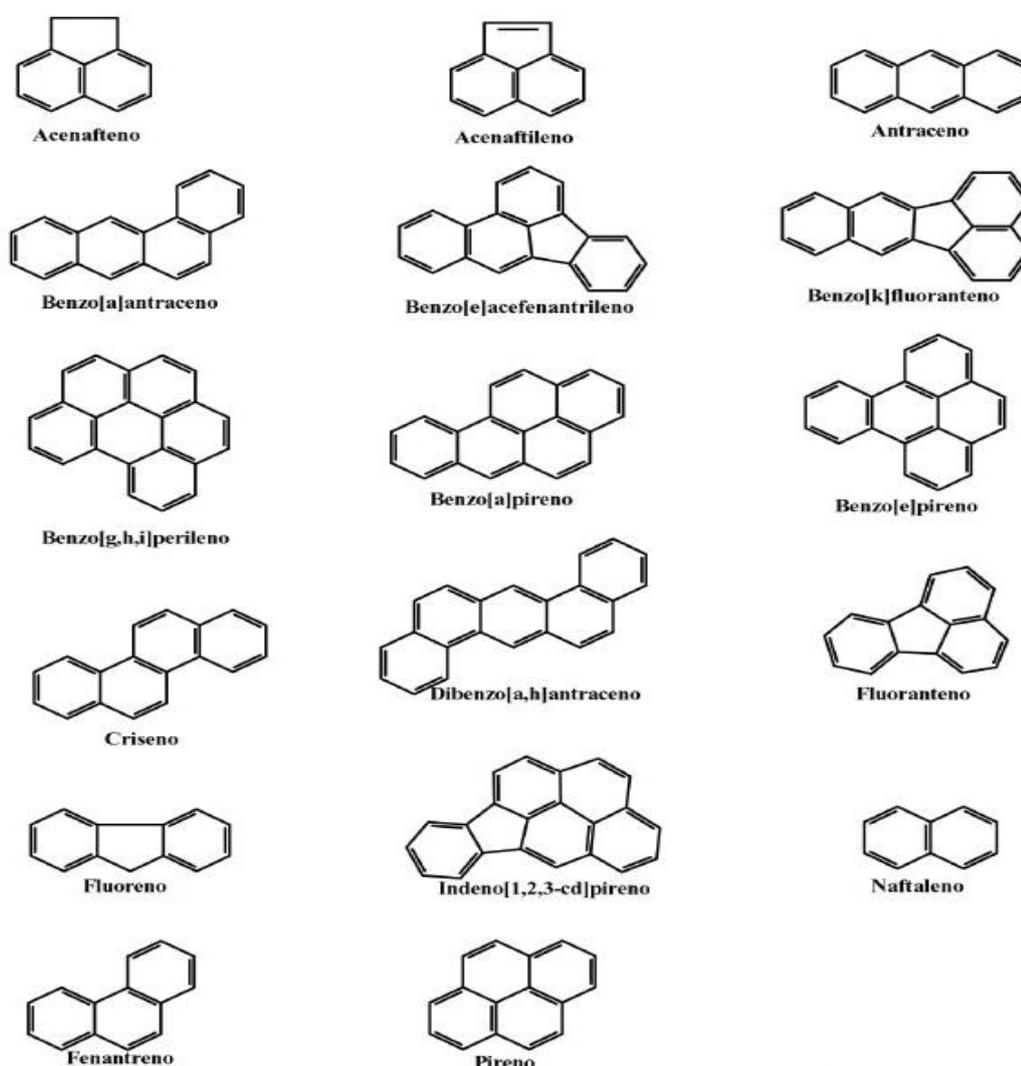
Ao entrar em contato com o mar o petróleo sofre uma série de processos físicos, químicos e biológicos que somados são chamados de intemperismo (Szewczyk, 2006). A partir de alguns dias após o derrame esse petróleo começa a se misturar a água e entrar mais facilmente pelas vias de acesso dos organismos aquáticos, fazendo com que esses organismos sejam ainda mais expostos aos HPAs.

Os HPAs são uma classe de compostos químicos que estão presentes no ar, solo e água e podem causar riscos tanto em humanos, quanto em organismos selvagens. Esses contaminantes são formados pela queima incompleta de matéria orgânica ou em decorrência de processos industriais (Johnson, Arkoosh *et al.*, 2008). Apesar de existirem mais de 100 moléculas de HPAs conhecidas, 16 delas são consideradas prioritárias, pela sua onipresença em ambientes contaminados e pela sua toxicidade, os quais têm sido bastante estudados e avaliados no monitoramento de áreas contaminadas (Altenburger, Segner *et al.*, 2003).

Seis destas moléculas possuem um potencial carcinogênico tanto para humanos quanto para espécies de vida selvagem, incluindo o benzo(a)pireno (5 anéis aromáticos), por outro lado, os outros dez HPAs desta lista, apesar de não apresentarem um potencial carcinogênico, são considerados contaminantes prioritários para estudos e avaliações por apresentarem um potencial de toxicidade elevado para a maioria dos animais aquáticos, incluindo peixes (Payne, Mathieu *et al.*, 2003).

Esses hidrocarbonetos possuem uma baixa solubilidade em água e são pouco voláteis, porém são um grupo de poluentes lipofílicos onipresentes no ambiente aquático (Dissanayake e Bamber, 2010). Esses poluentes são importantes indicadores de contaminação por petróleo no ambiente, levando em consideração que boa parte da composição do petróleo é de hidrocarbonetos, sejam eles os alifáticos ou os aromáticos.

Figura 2 Estrutura molecular dos 16 HPA's considerados prioritários pela Agência ambiental dos EUA, USEPA



Fonte: (Cristale, Silva *et al.*, 2008)

### 2.3 DESASTRES COM PETRÓLEO NA COSTA BRASILEIRA

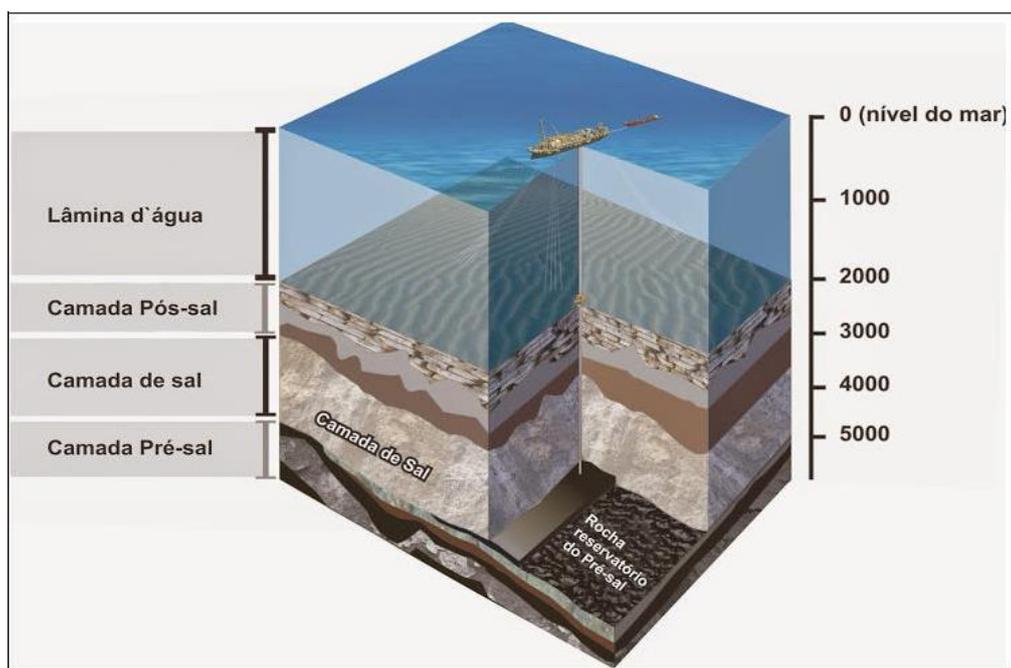
James Young foi o responsável por descobrir a respeito da extração e refino do petróleo em 1850, porém a primeira extração de petróleo só foi feita em 1859 nos EUA por

Edwin Laurentine Drake . A utilização do petróleo como fonte de energia e produto primário para diversos outros (Machado e De Carvalho, 2021), fez com que a extração e refino se popularizasse ao redor do mundo. No Brasil, só após a Primeira Guerra Mundial que o governo decidiu se incluir nas atividades de exploração.

Com a alta influência da Petrobrás na economia brasileira se foi possível a criação do programa de extração de petróleo em águas profundas – PROCAP, em 1968. Isso aumentou significativamente as atividades petrolíferas no país e fez do petróleo o mineral mais produzido do Brasil, com um comércio internacional (Thomas, 2001).

Em 2005 a Petrobrás fez uma descoberta que colocaram a extração em um patamar acima, que foi os poços localizados na camada da terra conhecida como pré-sal (Pereira, 2019).

Figura 3 localização geológica da camada pré-sal



Fonte: Petrobras (2017)

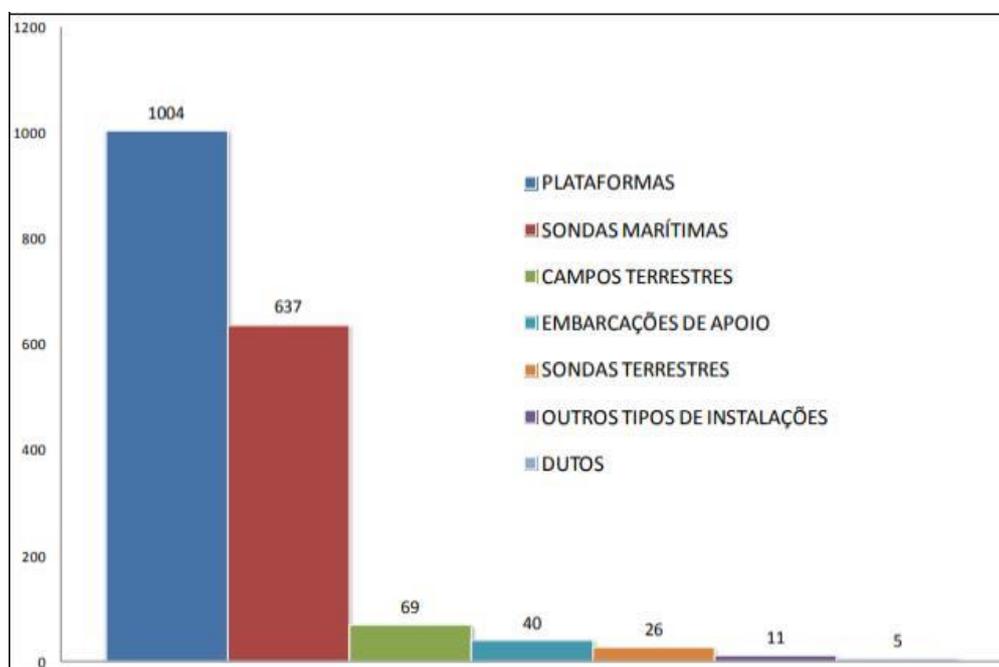
O pré-sal nada mais é do que rochas sedimentadas que foram formadas pela separação do continente Gondwana, especificamente pela separação dos continentes Americano e Africano, fazendo com que entre eles se formasse depressões as quais deram origem a lagos onde se foi depositado rochas geradoras de petróleo que ao longo dos anos

e dos processos termoquímicos a camada orgânica se transformou em hidrocarbonetos (petróleo e gás natural).

Acidentes com petróleo no país ocorrem desde o início da sua exploração, porém a grande maioria desses registros ficam restritos aos órgãos responsáveis, como ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) e o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis).

Graças ao Plano Nacional de Contingência de Derramamentos (PCN) foi possível observar que os acidentes ocorridos no ambiente aquático em sondas marítimas e plataformas são responsáveis por aproximadamente 90% dos acidentes comunicados a ANP (Anp, 2014). Essa tendência é bastante preocupante haja vista que o ambiente aquático é o ambiente mais impactado por acidentes com petróleo, já que parte significativa do petróleo pode se misturar a água e os HPAs presentes serem de mais fácil absorção em organismos que compõem a biota, fazendo assim, com que os mesmos sejam afetados a curto e longo prazo pelos hidrocarbonetos presentes.

Figura 4 Origem dos acidentes informados a ANP em 2014



Fonte: (Anp, 2014)

### 2.3.1 Desastres com petróleo na costa pernambucana

O desastre com petróleo no litoral brasileiro ocorreu em 2019 e foi o maior em extensão no país (Reddy, Nelson *et al.*, 2022). Dentre as praias afetadas, a grande maioria estavam situadas na costa pernambucana. As manchas de óleo chegaram a atingir mais de mil localidades nos nove estados do Nordeste. Hoje, sabe-se que o vazamento de petróleo cru veio do navio petroleiro Bouboulina de bandeira grega (Soares, Teixeira *et al.*, 2022).

O impacto biológico do óleo imediatamente após sua chegada à costa, foi medido através da abundância populacional e riqueza de espécies bentônicas, as quais dois meses após a chegada das primeiras manchas tiveram recuperação parcial (Craveiro, De Almeida Alves *et al.*, 2021). Aproximadamente 5.379 toneladas de resíduos de óleo foram coletados, principalmente nos estados de Alagoas e Pernambuco que foram os mais afetados (Soares, Teixeira *et al.*, 2022), porém parte significativa desse óleo intemperizado que ficou submerso ou se aderiu a rochas e recifes de corais podem ainda estar afetando o desenvolvimento e comportamento de organismos marinhos, principalmente em sua fase embriolarval, por apresentarem uma maior sensibilidade a presença de contaminantes.

Além dos impactos ambientais, impactos socioeconômicos também marcam esse acidente, pois a comunidade pesqueira foi extremamente afetada, pois por receio de comer frutos do mar e se contaminar com HPAs, a população parou de consumir, fazendo a venda dos produtos despencarem em 80% (Araújo, Ramalho *et al.*, 2020). Em 2010 o Instituto Oceanário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) fez um levantamento e estimou que aproximadamente 30 mil pessoas sobrevivem da pesca artesanal em Pernambuco, o que faz se ter uma noção do número aproximado de pessoas afetadas economicamente por esse desastre ambiental.

Hoje, alguns anos depois do acidente ambiental que afetou principalmente a costa pernambucana, já se tem diversos estudos sobre o impacto desse derramamento de óleo na biota marinha. Santana, Rios *et al.* (2022) em seu estudo identificou que houve uma diminuição no número de fêmeas coletadas em três pontos afetados pelo óleo do caranguejo *Pachygrapsus transversus*.

O conjunto de reações que ocorrem no óleo por processos bióticos ou abióticos, quando entra em contato com o ambiente marinho tende a mudar a sua composição (De

Oliveira, De S. Queiroz *et al.*, 2020). Esse intemperismo sofrido pelo óleo o qual atingiu a costa pernambucana abrange processos como adsorção, biodegração, dispersão (tanto horizontal, quanto vertical), dissolução, emulsão, espalhamento, evaporação e foto-oxidação (Ho, Wang *et al.*, 2015). A foto-oxidação atua principalmente nos HPAs alquilados e possui forte influência pela incidência de luz (Da Silva, Pragana *et al.*, 2021). O processo de intemperismo tende a ser diferente a depender do local o qual o óleo está localizado. No presente trabalho, o óleo intemperizado foi coletado no costão rochoso da praia de pedra de xáreu, então é possível supor que esse óleo foi mais exposto a processos como evaporação e foto-oxidação (Radović, Aeppli *et al.*, 2014).

#### 2.4 ORGANISMO TESTE- *Danio rerio*

O *Danio rerio* (Peixe-zebra) é um peixe teleósteo de água doce pertencente à família Cyprinidae, ovípara, com adultos que variam de 4 a 5 cm. Originário da Ásia, especificamente da Índia e Paquistão e é uma espécie modelo em estudos ecotoxicológicos, além de apresentarem dimorfismo sexual e fecundação externa (Engeszer, Patterson *et al.*, 2007; Seiler, Best *et al.*, 2014).

O fácil cultivo em laboratório, somado ao baixo custo, ao desenvolvimento embrionário facilmente observado e ao rápido desenvolvimento, fazem desse organismo um excelente bioindicador de efeitos ecotoxicológicos, principalmente por que eles possuem uma grande sensibilidade à presença de contaminantes em sua fase embriolarval. Além de possuir uma certa longevidade, quando comparado a outros organismos teste, a fêmea adulta em apenas uma desova pode colocar uma média de até 200 ovos (Siebel, Bonan *et al.*, 2015) o que é excelente para estudos laboratoriais, levando em consideração que se faz necessário a observação de vários organismos em um único experimento.

O *Zebrafish Embryotoxicity Test* (ZET) é um método bastante utilizado o qual utiliza o peixe-zebra em sua fase embriolarval como bioindicador de toxicidade de poluentes tradicionais ou emergentes. Além dos pontos já citados, outra coisa favorável a utilização desse organismo teste é o fato de que seu material genético é bastante semelhante ao humano, fazendo com que além de estudos ecotoxicológicos, eles também sejam usados em estudos biomédicos e farmacológicos (Hill, Teraoka *et al.*, 2005; Howe, 2013; Bambino e Chu, 2017).

## 2.5 BIOMARCADORES

Os biomarcadores são medidas que através de um experimento indicam uma função positiva ou negativa de um organismo referente a presença de algum contaminante ou qualquer outro agente (Van Der Oost, Iero *et al.*, 2000). Eles podem ser medidos a nível molecular, bioquímico, morfológico e comportamental. Suas alterações bioquímicas são medidas através de amostras de fluidos corporais ou de todo o organismo que forneçam alterações mediante a exposição a poluentes químicos (Depledge, Aagaard *et al.*, 1995).

As alterações comportamentais e todo desempenho ecológico pós exposição a algum contaminante, pode ter ligação direta com alterações moleculares em decorrência da exposição a algum xenobiótico. Os xenobióticos são compostos químicos estranhos ao organismo ou ao sistema biológico os quais podem ser produzidos pela indústria ou de forma natural o qual a depender da dose pode interagir de maneira deletéria ao organismo (Huber, Almeida *et al.*, 2008b). Dentro dos efeitos deletérios em peixes, estão redução no comprimento total, ocorrências de edemas pericárdicos e perivitelinos, atraso no desenvolvimento embriolarval etc.

Em peixes, o uso de biomarcadores é bastante relevante pois serve para medir alterações biológicas do organismo exposto a contaminação aquática, sendo bastante útil assim em trabalhos de monitoramento ambiental (Carvalho-Neta, 2010). A toxicidade do contaminante, começa causando efeitos suborganismos, gerando alterações enzimáticas e genéticas e devido a isso, alterações no órgão/tecido começam a ficar aparentes e conseqüentemente isso pode gerar uma série de complicações para o organismos, chegando a afetar o seu desempenho ecológico, que somado a vários organismos de uma mesma população, pode desencadear problemas a níveis populacionais.

### 2.5.1 Biomarcadores bioquímicos

#### 2.5.1.1 Biomarcadores de neurotoxicidade

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor produzido pelo sistema nervoso central e periférico. No cérebro ele pode alterar a excitabilidade neuronal, influenciando assim, a transmissão sináptica (Picciotto, Higley *et al.*, 2012). A ACh também é responsável por potencializar comportamentos adaptativos mediante alterações ambientais. Esse neurotransmissor atua no sistema nervoso autônomo, sinalizando através de duas classes de

receptores que estão divididos em muscarínicos e nicotínicos (Picciotto, Caldarone *et al.*, 2000; Wess, 2003).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima fundamental nos impulsos nervosos e desempenha um papel essencial na inativação da acetilcolina hidrolisando-o em acetato e colina (Mota e Fernandes, 2012). Essa enzima está presente principalmente em células nervosas e antes que venha a ocorrer uma nova liberação do neurotransmissor acetilcolina, a molécula liberada deve ser hidrolisada na fenda sináptica pela AChE. A atividade dessa enzima determina o fim de respostas sinápticas do receptor muscarínico e nicotínico (Picciotto, Higley *et al.*, 2012).

Essa enzima é bastante utilizada como indicador da contaminação por organofosforados, carbamatos e piretróides e sua atividade tende a ser alterada nos organismos expostos. Em peixes é possível observar uma alteração desta enzima quando os mesmos estão expostos a ambientes contaminados (Little, Milwain *et al.*, 2008; Gomes, De Paula *et al.*, 2021), pois a atividade dessa enzima além de variar de espécie para espécie, varia também entre a mesma espécie a depender do ambiente o qual o organismo está exposto (contaminado ou não contaminado) (Albuquerque, 2007). A redução na atividade do AChE pode causar problemas como alteração no desempenho natatório, mudanças comportamentais e perda de apetite (Johann, Nüßer *et al.*, 2020).

#### 2.5.1.2 *Biomarcadores de estresse oxidativo*

O termo estresse pode ser utilizado para caracterizar uma possível ameaça à homeostase, que pode ser causada pela presença de xenobióticos no ambiente o qual organismos como peixes estão inseridos (Wendelaar Bonga, 1997) ou a exposição a patógenos (Hellou, Ross *et al.*, 2012). Dentro dos principais causadores desse estresse oxidativo, incluem poluentes orgânicos, metais pesados e pesticidas, além, de alterações na temperatura e da disponibilidade de oxigênio na água (Hellou, Ross *et al.*, 2012).

A elevação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) pode ser caracterizado como um indicativo de indução do estado de estresse oxidativo, pois elas são capazes de causar danos oxidativos em macromoléculas, como peroxidação lipídica, oxidação da cadeia lateral de aminoácidos e quebra de fitas do DNA. A elevação das ERO são citotóxicas ao organismo e desencadeiam estresses e/ou doenças nos indivíduos (Li e Karin, 1999;

Barbosa, 2001). As ERO quando não elevadas no organismo desempenham papéis importantes como manutenção do equilíbrio metabólico e garantem uma proteção contra patógenos invasores (Hellou, Ross *et al.*, 2012).

Os antioxidantes agem na eliminação das ERO e das Espécies Reativas de Nitrogênio que estão associadas ao estresse oxidativo. Esses compostos são divididos em dois grupos, um de menor peso molecular o qual tem como representante as vitaminas A, C e E e um grupo com maior peso molecular onde se tem enzimas como o superóxido dismutase- SOD, a catalase- CAT, a glutatona peroxidase-GPx e a glutatona S-transferase GST (Hellou, Ross *et al.*, 2012). O estresse oxidativo pode ocasionar lesões teciduais e ameaçar a saúde do indivíduo (Gagné, 2014). A glutatona (GSH), é uma importante proteína não enzimática que auxilia na redução das EROs (Sies, 1999) A ação da GPx e da GST depende da redução do ciclo redox da GSH, por meio da relação de oxidação da GSH, fazendo com que essa proteína se torne GSSG (Glutatona dissulfeto) (Barbosa, Costa *et al.*, 2010). Esse processo tem que ser revertido e essa reversão ocorre no ciclo catalítico, o qual a enzima glutatona redutase (GR) converte o GSSG em GSH, na presença de NADPH que é o fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na sua forma reduzida, que após esse processo passa a ser oxidada (NADP+) (Huber, Almeida *et al.*, 2008a). Como resposta a esse estresse os organismos podem apresentar realocação de energia que antes poderia ser destinada para o seu melhor desenvolvimento morfológico e agora é alocada para desintoxicação (Pickering, 1981).

#### 2.5.1.3 *Biomarcadores de biotransformação fase I e II*

A detoxificação enzimática de contaminantes químicos é classificada em três fases. Sendo a fase I e II as responsáveis por solubilizar e diminuir a toxicidade dos xenobióticos e a fase III responsável por excretar esse contaminante do organismo exposto (Huber, Almeida *et al.*, 2008b). A biotransformação do composto através de reações de fase I e II é uma desintoxicação que transforma o composto em forma solúvel a qual tende a facilitar na excreção desses contaminantes xenobióticos, através da hidrofilição dele (Van Der Oost, Iero *et al.*, 2000; Hellou, Ross *et al.*, 2012).

Boa parte dos processos de fase I são mediados pelas enzimas do citocromo P450 as quais são responsáveis, sobretudo, pelas reações de oxidação dos xenobióticos (Huber, Almeida *et al.*, 2008b). Em peixes, a exposição aos HPAs de alto peso molecular causa

indução nos níveis de citocromo P450, especificamente na família CYP-1A, sendo um importante biomarcador para este tipo de contaminação (Ferreira, 2014).

As glutathiona-S-transferases (GST) são uma família de enzimas com múltiplas funções como a antioxidante, reduzindo assim, eletrófilos que são produzidos com a oxidação da membrana (Huber, Almeida *et al.*, 2008b). Esse processo ocorre a partir do momento que se tem uma conjugação dos xenobióticos oxidados na fase I com a glutathiona. Isso faz com que esses xenobióticos passem a ser mais hidrossolúveis e isso facilita sua excreção.

## **2.5.2 Biomarcadores morfológicos**

### *2.5.2.1 General Morphology Score (GMS)*

O General Morphology Score ou índice de desenvolvimento morfológico (GMS) atribui pontos ao Paulistinha em sua fase embriolarval, fazendo uma avaliação do desenvolvimento morfológico desses organismos em um recorte de 96 horas pós fertilização (hpf). Os pontos são atribuídos a cada marca de desenvolvimento normal e atraso no desenvolvimento morfológico reduzem o índice a uma pontuação inferior a 17 pontos que é a pontuação máxima (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015).

### *2.5.2.2 Descolamento da cauda*

Segundo (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015) após completar um dia de fertilizado os embriões devem apresentar o descolamento da cauda até o saco vitelínico garantindo assim um ponto no GMS (Figura 5B). Um outro ponto é acrescentado quando a cauda se destaca para além do saco vitelínico (Figura 5C) e por fim em 48hpf o organismo ganha mais um ponto se toda a cauda estiver destacada (Figura 5D) garantindo assim 3 pontos ao todo apenas relativos ao descolamento da cauda.

Figura 5 Descolamento da cauda do peixe zebra entre 12 e 72 hpf o qual o A é um organismo por volta de 10hpf; B- Organismo com 16hpf; C- Organismo com 24hpf; D- Organismo com 48hpf e E- Organismo com 72hpf.

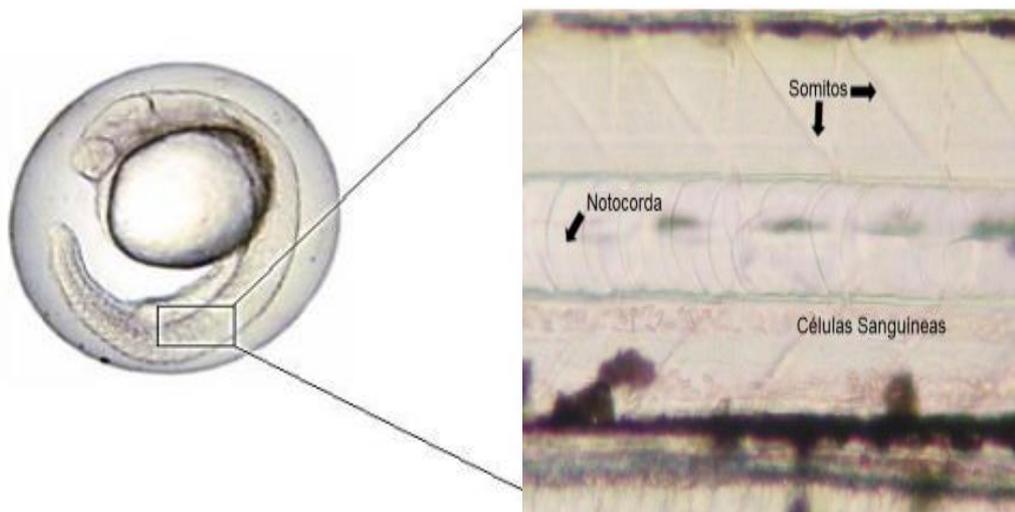


Fonte: (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015)- Adaptado

### 2.5.2.3 Formação dos somitos

A formação dos somitos é observada no segundo dia pós fertilização (dpf) no organismo em sua fase embrionária e gera um ponto no GMS segundo (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015).

Figura 6 Estrutura do somito



Fonte: (Hermsen, Van Den Brandhof *et al.*, 2011; Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015)- Adaptada



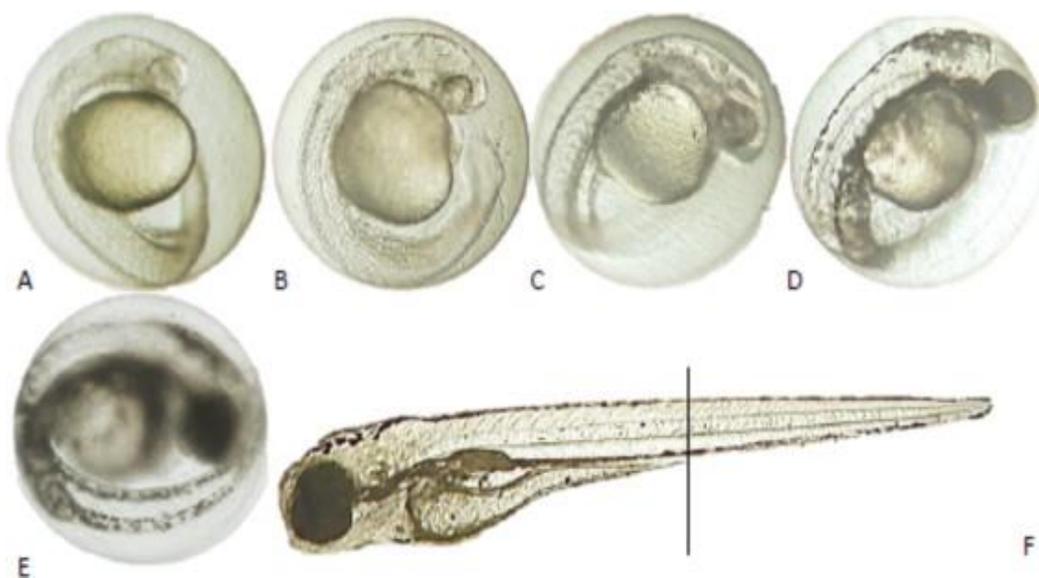
### 2.5.2.7 Batimento cardíaco

O batimento cardíaco é avaliado em 48 hpf e será atribuído mais um ponto ao GMS se for observado a presença do mesmo. Em caso de não percepção do batimento, faz-se necessário uma maior ampliação (de aproximadamente 80x) para melhorar a visualização da região a qual o coração está situado. Essa observação deve ser feita por alguns segundos, a fim de que mais de uma contração seja observada. A ausência de batimento indica a morte do embrião ou larva do peixe-zebra (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015).

### 2.5.2.8 Pigmentação da cabeça, corpo e cauda

No terceiro dia após as 48 hpf 1 ponto é atribuído quando for observado a presença de pigmentação da cabeça e do corpo e 1 ponto a mais é adicionado no GMS se for observado a presença de pigmentação na cauda. A pigmentação é considerada como presente no organismo avaliado quando o pigmento é perceptível entre a cabeça e o saco vitelínico. Já a pigmentação da cauda é tida como presente quando ocorre um padrão distinto de pigmento a partir da extremidade do vitelo até a cauda (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015).

Figura 8 Pigmentação na cabeça, corpo e cauda do *Danio rerio*



Fonte: (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015)

### 2.5.2.9 Nadadeira peitoral

Um ponto é atribuído em 72 hpf quando for possível a visualização de nadadeiras peitorais no organismo teste. As nadadeiras peitorais são estruturas originam-se entre o coração e o fígado e se estendem ao longo de cada lado da larva (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015).

Figura 9 Processo do desenvolvimento da nadadeira peitoral 48 e 96hpf. A: Nadadeira peitoral ausente; B: Nadadeira peitoral presente.



Fonte: (Hermsen, Van Den Brandhof *et al.*, 2011)- Adaptada

### 2.5.2.10 Boca protrusível

Esse marco morfológico é observado entre 72 e 96hpf e na ausência de uma mandíbula inferior visível ou quando a mesma atinge apenas cerca da metade do olho a pontuação é zero. Um ponto é atribuído no GMS quando há a presença da mandíbula inferior e ela atinge toda a região do olho e um segundo ponto é somado a esse marco quando a boca está mais saliente e seu maxilar inferior passa da região do olho (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015).

Figura 10 Desenvolvimento da boca protrusível no desenvolvimento do *Danio rerio*.



Fonte: (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015)

#### 2.5.2.11 Eclosão

Um ponto é atribuído em 72 hpf quando for observado a eclosão da larva (Figura 11) e zero pontos é atribuído aquelas que não eclodem ou eclodem de forma parcial tendo parte do seu corpo ainda dentro do córion. Em casos de eclosão antecipada ou atrasada nenhum ponto é atribuído (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015).

Figura 11 Desenvolvimento embrionário e eclosão da larva do *Danio rerio*



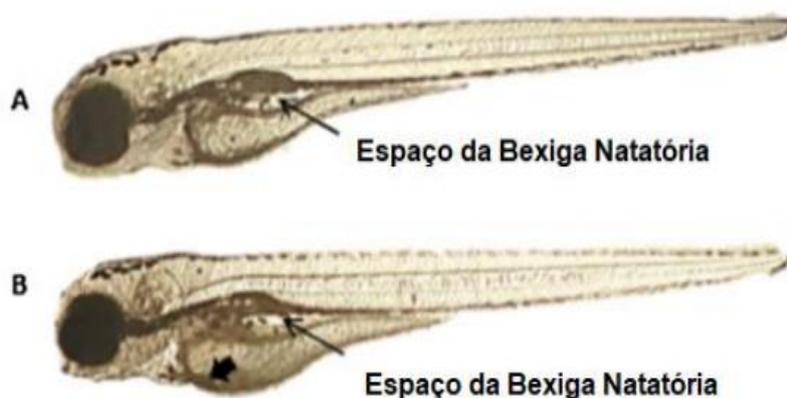
Fonte: (Hermsen, Van Den Brandhof *et al.*, 2011)- Adaptada

#### 2.5.2.12 Extensão do saco vitelínico

Esse marco morfológico é observado em 96hpf e é atribuído um ponto ao GMS quando a extensão do saco vitelínico estiver quase vazia (Figura 12A) e zero pontos é atribuído quando a mesma ainda estiver cheia (Figura 12B). Para este marco morfológico é

avaliado se a espessura do vitelo não excede o coração, sendo possível observar o espaço no qual a bexiga natatória irá inflar.

Figura 12 Extensão do saco vitelínico em 96hpf . A: Extensão do saco vitelínico vazio; B: Vitelo excede a linha do coração e não está vazio.



Fonte: (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015)

#### 2.5.2.13 Insuflamento da bexiga natatória

O insuflamento da bexiga natatória ocorre entre 72 e 96hpf (Hagenaars, Stinckens *et al.*, 2014) e seu insuflamento só ocorre se a absorção do vitelo acontecer, pois é com a absorção desta gema que se abre um espaço para o seu insuflamento. Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.* (2015) não avalia esse marco morfológico, nesse trabalho foi incluída a avaliação desse marco e um ponto é atribuído para a larva que tiver sua bexiga natatória inflada em 96hpf. Com a adição desse marco, uma larva com o desenvolvimento perfeito totaliza 18 pontos no GMS ao final das 96 horas de desenvolvimento.

#### 2.5.3 Biomarcadores comportamentais

(Stewart, Cardenas *et al.*, 2013) sugerem que um bom desempenho comportamental é crucial para o melhor desempenho ecológico individual e populacional, e em contrapartida um mau desempenho pode afetar tanto a sobrevivência quanto a reprodução de peixes. Além de alterações bioquímicas e morfológicas, a exposição a contaminantes pode causar alterações comportamentais observadas em organismos teste após serem expostos. Dentre as diversas consequências negativas da exposição de peixes a ambientes contaminados é importante mencionar também que essa exposição afeta diretamente na

habilidade natatória desse organismo, possivelmente comprometendo também o forrageio e a fuga de predadores (Scott e Sloman, 2004).

Algumas dessas alterações podem estar relacionadas a parâmetros bioquímicos alterados, como por exemplo o aumento da atividade da AChE, que está relacionado diretamente a hiperatividade dos peixes (Xie, Lu *et al.*, 2015)

A análise comportamental envolve parâmetros de fundamental relevância, pois através da análise do comportamento do organismo teste após exposição, é possível observar a relação do comportamento com a função fisiológica do mesmo. Os peixes são ótimos modelos para auxiliar na observação dessa relação, pois muitos dos comportamentos que eles reproduzem, podem ser facilmente observados e quantificados (Scott e Sloman, 2004). A exposição do *Danio rerio* a 2,4-diclorofenoxiacético no trabalho do (Dehnert, Karasov *et al.*, 2019) fez com que os pesquisadores hipotetizassem a possibilidade dessa exposição ao contaminante afetar a relação do organismo com a captura de presas, levando em consideração que no experimento deles houve uma diferença estatística nesse parâmetro de relação captura-presa, entre larvas expostas ao contaminante e larvas controle, sendo as últimas a que melhor desempenharam no teste.

#### 2.5.3.1 A importância da bexiga natatória em peixes em sua fase larval

O insuflamento da bexiga natatória é uma etapa essencial no sucesso ecológico de peixes em sua fase larval (Czesny, Graeb *et al.*, 2005), pois ela garante que esses organismos alcancem a flutuabilidade neutra e estejam aptos a exercer suas funções ecológicas. O não insuflamento da bexiga, pode comprometer todo o desempenho desses organismos que muito provavelmente morrerão por não conseguirem ir em busca de presas ou fugir de possíveis predadores.

A densidade corporal desses organismos na fase larval pode afetar a distribuição dos mesmos no aquário/tanque/cubeta o qual ele está sendo observado, fazendo com que eles fiquem com a flutuabilidade negativa, devido ao fato de que a força exercida por sua massa corporal é bastante significativa e sua densidade acaba sendo maior do que a da água (Woolley e Qin, 2010).

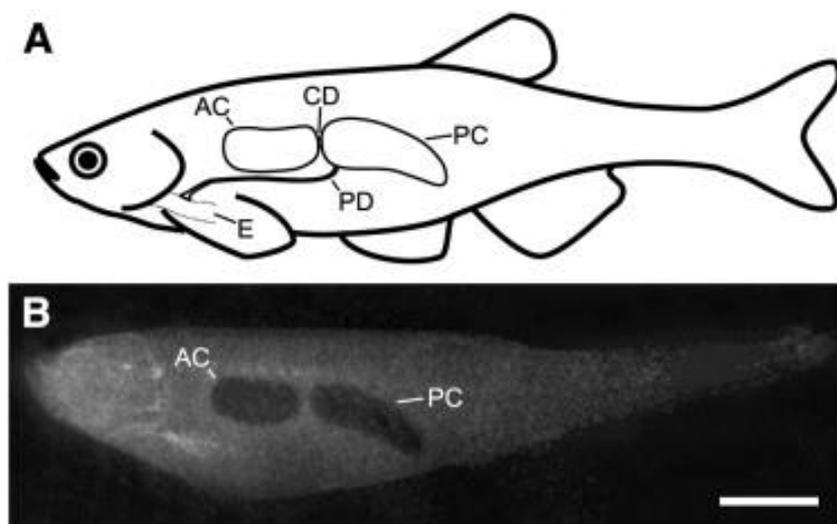
O não insuflamento da bexiga pode prejudicar o desempenho ecológico dos organismos, e está diretamente associada a complicações no desenvolvimento morfológico,

como possíveis torções na notocorda (Chatainb, 1994). O não insuflamento da bexiga e flutuabilidade negativa leva a uma maior demanda de energia para que a larva se mantenha na coluna d'água através da natação, e pode levar a uma redução do comprimento total da mesma (Goodsell, Wikeley *et al.*, 1996; Trotter, Pankhurst *et al.*, 2001)

Os peixes teleósteis possuem duas morfologias de bexiga natatória fisóclistos e os fisóstomos. Os peixes fisóclistos possuem uma bexiga natatória completamente fechada e isolada do trato digestivo e não possuem o ducto pneumático na fase adulta. Após a fase larval, esses organismos só conseguem regular a flutuabilidade a partir de uma glândula altamente vascularizada que secreta e absorve gases na bexiga (Fänge, 1966). Por outro lado, os peixes fisóstomos conseguem manter o insuflamento da bexiga através da ação de engolir ar na superfície que vai diretamente para a bexiga natatória através do ducto pneumático (Schmidt-Nielsen, 1997).

*O Danio rerio* é um peixe fisóstomo e na fase larval inicial precisa subir até a superfície na tentativa de abocanhar ar para que sua bexiga natatória infle. Assim que eles eclodem do ovo, em 72 hpf, sendo esse comportamento de nadar até a superfície um dos primeiros observados nesses organismos (Lindsey, Smith *et al.*, 2010). Esse insuflamento tende a acontecer quando o organismo engole ar e desvia para a bexiga natatória (Lindsey, Smith *et al.*, 2010; Smith e Croll, 2011), sendo que essa conexão do esôfago e a bexiga natatória se estende até a fase adulta do organismo, o insuflamento da bexiga natatória tende a acontecer entre 72hpf e 96hpf, o não insuflamento desse órgão compromete diretamente o desempenho ecológico das larvas desses organismos. A exposição a determinados contaminantes, a depender da sua concentração, tem como uma das alterações morfológicas a não insuflação dessa bexiga.

Figura 13 Bexiga natatória em ciprinídeos. A: Diagrama esquemático mostrando a Câmara anterior (AC), câmara posterior (PC), ducto comunicante (CD) e ducto pneumático (PD) ligados ao esôfago (E). B: Radiografia de um *Danio rerio* mostrando a bexiga natatória *in situ*. Barra de escala = 4 mm.



Fonte: (Smith e Croll, 2011)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade do petróleo coletado no costão rochoso da Praia de Ponta de Xaréu para embriões e larvas do *Danio rerio*, através da fração solúvel em água (FSA) do petróleo emulsificado. Esse petróleo foi diluído a diferentes concentrações, a fim de expor os espécimes embriolarvais a diferentes situações, tendo como foco identificar possíveis alterações bioquímicas, morfológicas e comportamentais.

##### 3.1.1 Objetivos específicos

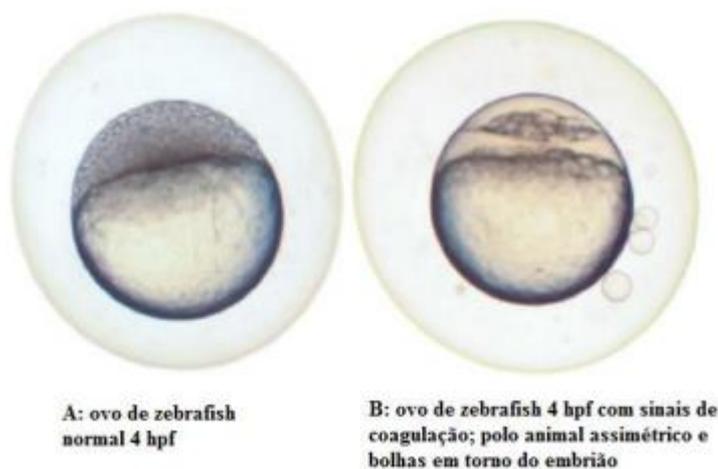
- Preparar e caracterizar os HPAs componentes da fração solúvel do óleo emulsificado
- Avaliar a toxicidade de diferentes diluições da fração solúvel a embriões e larvas de *Danio rerio* utilizando os seguintes parâmetros:
- Avaliação morfométrica dos organismos expostos ao contaminante, focando em medir o comprimento total, a área do globo ocular e a área da bexiga natatória
- Monitoramento do processo de insuflamento da bexiga natatória entre 72 hpe e 168 hpe.
- Analisar efeitos na natação das larvas 7 dias após a fertilização
- efeito em biomarcadores bioquímicos após 96h de exposição

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CULTIVO DE *Danio rerio* E OBTENÇÃO DE OVOS FERTILIZADOS

Parâmetros de qualidade de água foram avaliados durante o cultivo, e a manutenção dos reprodutores e obtenção de ovos fertilizados foram mantidas conforme padrões estabelecidos na norma (Oecd, 2013b). Os reprodutores foram cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da UFPE e para desova uma proporção de 2 machos:1 fêmea foram transferidos para um aquário no final da tarde. No dia seguinte, logo após a desova, os ovos foram sifonados cuidadosamente e a seleção dos ovos fertilizados viáveis foi feita utilizando lupa com um aumento mínimo de 30x, sendo selecionados apenas os ovos com membrana de fertilização aparente. Após a seleção dos ovos viáveis, estes foram posteriormente dispostos em placas de 24 poços, onde o volume da solução de cada FSA nos poços foi de 2,5ml, contendo 1 embrião por poço como proposto na norma OECD 236 (Oecd, 2013b), uma placa para cada diluição da fração solúvel a ser testada.

Figura 14 A: Embrião normal em 4hpf B: Embrião com sinais de coagulação, assimetria no polo animal e bolhas em seu entorno.



Fonte: (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015)- Adaptado

### 4.2 PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO EM ÁGUA E CARACTERIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HPAS

A preparação da fração solúvel do óleo (FSA) se baseou no protocolo “Chemically Enhanced Water Accommodated Fraction” (CEWAF)(Adams, 2017). Para tal foram utilizados 5L de água usada para o cultivo de *Danio rerio*, com os seguintes parâmetros

físico-químicos: pH  $7,2 \pm 0,2$ , oxigênio dissolvido  $7,0 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , e temperatura  $27,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , após prévia esterilização com luz ultravioleta. A FSA foi obtida a partir da mistura 1:100 (m/v)(óleo emulsificado/água), seguida de agitação média em frasco de vidro com haste inoxidável interna por 24 horas em temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Após separação da fração solúvel, o volume total foi filtrado em filtro com  $2 \mu\text{m}$ , sendo que 1 L do filtrado foi destinado a caracterização da composição de HPAs por cromatografia de gás (CG-MS), e os 4 L restantes foram utilizados para a exposição dos organismos em suas diluições 6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100% que possuem a quantidade de HPAs totais equivalentes a 1,65, 3,3, 6,6, 13,2, 26,4  $\mu\text{g L}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$  respectivamente. A amostra bruta de FSA não diluída foi analisada por cromatografia gasosa, e as concentrações de HPAs em cada diluição foram calculadas com base no fator de diluição respectivo.

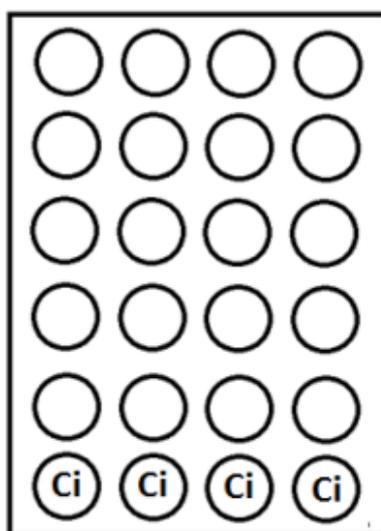
O método de análise cromatográfica envolveu inicialmente adicionar 4L da FSA preparada em laboratório, em um frasco de vidro âmbar de mesmo volume, a qual logo após seu preparo, foi adicionado 20 mL de n-hexano e agitado por 2 minutos, a fim de extrair a matéria orgânica solúvel neste reagente (De Oliveira Lemos, De Carvalho *et al.*, 2014; De Arruda-Santos, Schettini *et al.*, 2018). 100  $\mu\text{L}$  de um mix de HPAs deuterados contendo acenafteno-d10, fenantreno-d10 e criseno-d12, a  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$  foram adicionados a amostra como substitutos. Após o processo de extração da matéria orgânica solúvel ao n-hexano a amostra foi concentrada em evaporador rotativo até 1mL e 100  $\mu\text{L}$  de HPA deuterado, para calcular a recuperações de substitutos, foram adicionados fluoreno-d10, benzo[a]antraceno12 e benzo[a]pireno-d12 (Absolute Standards INC a  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Em seguida, tanto os HPAs parentais, quanto seus alquilados foram analisados em um cromatógrafo a gás (Agilent Technologies, modelo 7820A GC System) acoplado a um espectrômetro de massa (Agilent technologies 5975 series MSD), resultando em 33 analitos.

#### 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL E AVALIAÇÃO DE EFEITOS LETAIS

Os experimentos de exposição durante a fase embriolarval de *D. rerio* a FSA do petróleo foram executados utilizando-se 24 indivíduos em cada placa de 24 poços (Figura 15), uma placa para cada concentração a ser testada: controle e concentrações da fração solúvel a 1,65, 3,3, 6,6, 13,2, 26,4  $\mu\text{g L}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$ . A exposição teve duração de 168h, e houve troca de 80% da água de exposição a cada 24 horas.

A cada 24 horas, as patologias morfológicas abaixo foram avaliadas e registradas como indicadores de letalidade dos embriões, conforme OECD 236: 1. Coagulação de ovos fertilizados; 2. Falta de formação de somitos; 3. Falta de descolamento da cauda do saco vitelino; 4. Falta de batimentos cardíacos. Ao final do período de exposição, a toxicidade letal foi determinada com base na integração do número total de embriões mortos em cada tratamento/réplica.

Figura 15 Modelo de exposição em placas de 24 poços, onde 4 poços servem de Controle Interno (CI), utilizada no GMS, como sugere a norma da (Oecd, 2013a).



Fonte:(Oecd, 2013a).

#### 4.4 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS APÓS 96 HORAS DE EXPOSIÇÃO

Ao final de 96 horas de exposição foram separadas larvas dos diferentes tratamentos, que foram congeladas em  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior homogeneização e análise dos biomarcadores bioquímicos catalase (Habig, Pabst *et al.*, 1974), acetilcolinesterase (Ellman, Courtney *et al.*, 1961), a lipoperoxidação lipídica pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Utley, Bernheim *et al.*, 1967), Glutationa - S - Transferase (Habig e Jakoby, 1981) e Glutationa (Beutler, Duron *et al.*, 1963).

##### 4.4.1 Catalase (CAT)

A Catalase é uma enzima antioxidante a qual degrada o Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em água e oxigênio (Iwase, Tajima *et al.*, 2013), que atuam como defesa contra Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). Segundo (Beers e Sizer, 1952) a atividade

enzimática é proporcional à velocidade de decomposição do  $H_2O_2$ , e o método proposto por (Beers e Sizer, 1952) foi adaptado para microplacas por (Li e Schellhorn, 2007).

Em cada réplica amostral 10 larvas em 96 hpf de cada tratamento foram homogeneizadas em 100  $\mu$ L de tampão Tris- HCL em rotação lenta, após isso as amostras foram centrifugadas por 30 min a 4°C e 12000 g.

Para analisar a reação é adicionado 5 $\mu$ l de amostra já homogeneizada e centrifugada à placa UV, junto com o mix para reação da CAT onde é adicionado 25,0 mL de KPI 0,005M, pH 7,4 e 0,150mL de  $H_2O_2$ . A reação foi mensurada por leitura de absorbância a 240 nm. O cálculo foi feito através do coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon = 0,0436 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### **4.4.2 Acetilcolinesterase (AChE)**

A quantificação da atividade da AChE foi adaptada para microplacas a partir do trabalho do (Ellman, Courtney *et al.*, 1961). Em cada réplica amostral 4 larvas em 96hpf de cada tratamento foram homogeneizadas em 100  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio (KPI 0,1 M) e centrifugadas por 20min em centrífuga refrigerada a 4°C a 9000g.

O método se baseia na reação de tiocolina com o Ditiobisnitrobenzato (DTNB) produzindo TNB (Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) que tem cor amarela e sua absorção máxima em 415nm, que é quantificado pela absorbância no espectrofluorímetro SpectraMax®. O cálculo foi feito através do coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon = 14,15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), e a AChE expressa em nmol de TNB  $\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ .

#### **4.4.3 lipoperoxidação lipídica (POL)**

A LPO é um indicador do excesso de ERO que produz o malondialdeído (MDA) como subproduto bastante reativo (Maharajan, Muthulakshmi *et al.*, 2018) o qual é medido através da conjugação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para cada réplica amostral foi utilizado 20 larvas em 96 hpf de cada tratamento homogeneizadas com 100  $\mu$ L do tampão fosfato de sódio (PBS pH 7,4) e centrifugadas por 30 mim, 4°C a 12000g.

A leitura foi feita em microplacas pretas de 96 poços e em cada poço foi inserido 160  $\mu$ L de Tampão fosfato salino- PBS, 10  $\mu$ L de hidroxitolueno butilado 95% dissolvido

em etanol 95% (BHT), 20  $\mu\text{L}$  de amostra em duplicata, 50  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético TCA 50% e foi realizado uma leitura basal no espectrofluorímetro, SpectraMax® M3. Após a primeira leitura foi adicionado 75  $\mu\text{L}$  do ácido tiobarbitúrico (TBA) 1,3% e levado à estufa em 60°C por 1 h. A excitação foi de 535 e emissão de 590, para as duas leituras, onde os valores de fluorescência obtidos são aplicados à curva de concentração do MDA ( $R^2 > 0,99$ ).

#### 4.4.4 Glutathione - S - Transferase (GST)

A leitura da atividade da GST foi determinada por (Habig e Jakoby, 1981) e adaptada para microplacas por (Frasco e Guilhermino, 2002). Em cada réplica amostral 4 larvas em 96hpf de cada tratamento foram homogeneizadas em 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio (KPI 0,1 M), e centrifugadas por 20min em centrífuga refrigerada a 4°C a 9000g.

A atividade da GST foi medida a partir da conjugação da glutathione (GSH) com o substrato iniciador 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), onde foi adicionado em placa greiner de acrílico 5  $\mu\text{L}$  da amostra, 35  $\mu\text{L}$  de água, 200  $\mu\text{L}$  do Mix da GST o qual é preparado com Água pura, KPI 0,25M pH 7,4 e GSH 100mM, feito a leitura basal e por fim é adicionado O CDBN. A atividade enzimática é baseada no composto GS-CDNB que é detectado a 340nm no espectrofluorímetro SpectraMax® M3. O cálculo da atividade foi baseado no coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), e a GST expressa em nmol de CDBN  $\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ .

#### 4.4.5 Glutathione (GSH)

O método para quantificação do GSH foi adaptado para microplacas seguindo o método de (Beutler, Duron *et al.*, 1963). 40 embriões com 96 hpf foram homogeneizados em 100  $\mu\text{L}$  de tampão e centrifugada por 15min, 4°C a 12000g. Parte da amostra foi homogeneizada na proporção 1:2 total com tricloroacético (TCA 6%) e centrifugada a 4000 rpm, 4°C a 5min.

Após esse processo o homogenato foi lido junto ao ditiobisnitrobenzato (DTNB). A quantificação dessa proteína foi determinada a partir da conjugação da GSH com o DTNB 2,2 mM, formando o tiolato (TNB) o qual se detecta no comprimento de onda 412nm no

espectrofluorímetro, SpectraMax® M3. As concentrações foram expressas em  $\mu\text{g GSH mg proteína}^{-1}$ .

#### 4.5 EFEITOS SUBLETAIS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS

##### 4.5.1 Avaliação de atrasos no desenvolvimento embriolarval

O índice de desenvolvimento morfológico ou “General Morphology Score” (Beekhuijzen, M., De Koning, C. *et al.*, 2015), consiste numa pontuação dada para o aparecimento de alguns marcos morfológicos durante o desenvolvimento do embrião e larva de *Danio rerio* entre 0 até 96 horas após a fertilização (hpf). Uma série de marcos morfológicos foram avaliados diariamente em cada embrião ou larva, como, por exemplo, a formação de somitos, da cauda, do olho, das nadadeiras, e foram atribuídos pontos para cada marco atingido.

##### 4.5.2 Contrações Ventriculares

Foi quantificada a frequência cardíaca de 10 embriões de cada placa em 48 hpf e 72 hpf, em microscópio invertido com aumento de 100x. Essa medição foi realizada com o auxílio de um cronômetro e um contador e as contrações ventriculares foram observadas por um período de 30 s.

##### 4.5.3 Efeitos subletais em frequências de patologias observadas

Foram avaliados diferentes tipos de patologias em cada larva durante as 96h de exposição, incluindo alterações morfológicas caracterizadas pela presença de edema pericárdico (24-96hpf), presença de edema perivitelínico (24-96hpf), torção na notocorda (72-96hpf), boca não protusível (72-96hpf), ausência de bexiga natatória inflada (96hpf) e defeitos nos olhos (24-96hpf).

##### 4.5.4 Efeitos subletais em parâmetros morfométricos 7 dias após a fertilização

Foram avaliados efeitos através de análise morfométrica de fotografias obtidas em lupa (Zeiss®) Stemi 2000 C, utilizando aumento de 20x, para avaliação de efeitos no comprimento total das larvas, diâmetro dos olhos e área da bexiga natatória, com precisão de 0.1 mm com o software AxioVision (Zeiss). A fórmula  $(\text{Comprimento Horizontal}/2 + \text{Comprimento Vertical}/2 \times \pi)$  foi utilizada para calcular a área da bexiga natatória e do globo ocular.

## 4.6 EFEITOS SUBLETAIS COMPORTAMENTAIS

### 4.6.1 Comportamento natatório espontâneo 168hpf

As larvas sobreviventes com 7 dias (168 hpf) de cada tratamento foram transferidas individualmente para placas de cultura celular (arenas experimentais) com 3 mL de água limpa. Cada larva dos diferentes tratamentos foi filmada por 5 minutos em vista superior usando câmeras de vídeo, e os vídeos gravados foram analisados para calcular a velocidade média de natação em  $\text{cm s}^{-1}$ .

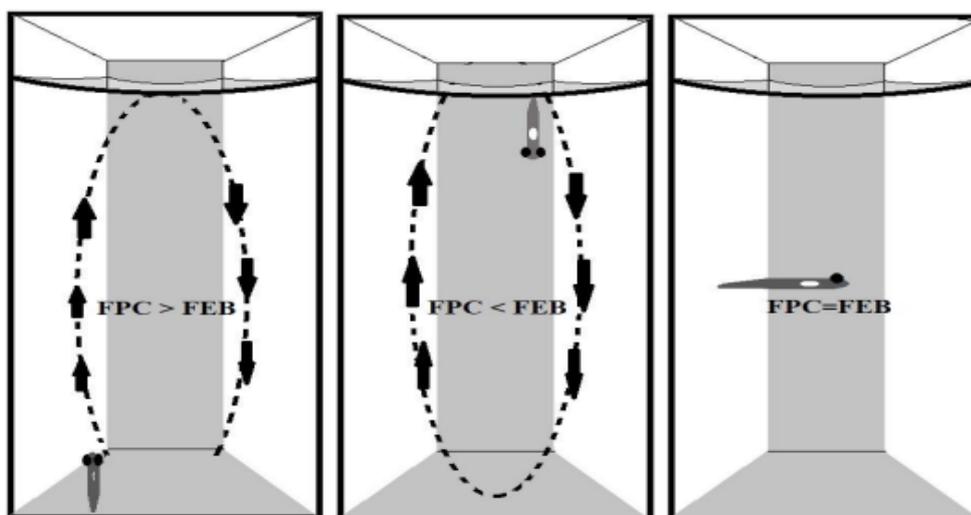
### 4.6.2 Efeitos subletais no processo de insuflamento da bexiga natatória

O processo de insuflamento da bexiga natatória em larvas do *Danio rerio* começou a ser avaliado por filmagens detalhadas de larvas a partir de 72 hpf, logo após a eclosão. A avaliação do insuflamento da bexiga natatória foi feita entre 72 hpf e 168 hpf. Para a execução da análise foram selecionadas 10 larvas de cada tratamento nas concentrações 1,65, 3,3 e 6,6  $\mu\text{g L}^{-1}$   $\Sigma$ HPAT, além das larvas do controle. Cada larva foi mantida em cubetas transparentes de 1 cm x 1 cm x 5 cm (largura x profundidade x altura), com um volume de 2,5 mL de água, gerando assim, uma coluna d'água de 22 mm. Em cada cubeta as larvas foram monitoradas por câmeras Intelbras modelo VP600H equipadas com lentes de distância focal 6-60mm, totalizando 40 larvas monitoradas individualmente durante 96h, entre 72hpf e 168hpf. A câmera fica posicionada lateralmente e nesse teste foi observado de forma ininterrupta o processo de tentativa de insuflamento da bexiga natatória, que necessariamente requer a subida da larva até a superfície da água (Figura 16).

Inicialmente as larvas se mantêm no fundo da cubeta, pois a força exercida pelo peso da sua massa corporal (FPC) é significativa o que faz com que a densidade da larva seja maior do que a da água, fazendo assim, com que ela fique em flutuação negativa. Nesse primeiro momento, a larva tende a realizar várias subidas até a superfície na tentativa de abocanhar um volume de ar e realocá-lo para a bexiga natatória, seguidas de descidas até o fundo, devido a FPC. Quando a larva consegue abocanhar ar atinge uma flutuabilidade positiva, que é quando a FPC se torna menor que a força de empuxo exercida pela bexiga (FEB). Nesse momento a FEB é maior do que a FPC o que faz com que a larva permaneça flutuando na coluna d'água da cubeta. A partir desse momento o

comportamento da larva se inverte e ao invés desse organismo fazer o movimento fundo-superfície, ele passa a fazer o movimento superfície-fundo, na tentativa de estabelecer o controle do volume interno da bexiga e assim atingir a flutuabilidade neutra. A flutuabilidade neutra pode ser observada pela capacidade da larva de permanecer estável na coluna de água da cubeta, e de se locomover para a superfície e vice-versa de forma suave e gradual, pois a FPC é igual a FEB. Para cada larva, foi possível medir o tempo decorrido para atingir a flutuabilidade neutra a partir de 72 hpf, e a quantidade de vezes que cada larva subiu até a superfície na tentativa de abocanhar ar e assim conseguirem inflar a bexiga natatória.

Figura 16 Vista das câmeras durante a observação das larvas entre 72hpf e 168hpf e ilustração do esquema da influência da FPC e da FEB. A:  $FPC > FEB$  = Flutuabilidade negativa B:  $FPC < FEB$  = Flutuabilidade positiva C:  $FPC = FEB$  = Flutuabilidade neutra.



Fonte: (Mariz, 2018)

#### 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os parâmetros foram analisados quanto à normalidade e homocedasticidade. ANOVA de 1 fator foi utilizada para os dados que apresentaram uma distribuição normal e homogeneidade de variância, para avaliar diferenças entre os tratamentos (controle e diluições ou concentrações de HPAs). Para os dados que não apresentaram os pré-requisitos da ANOVA, foi utilizada a análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis. Havendo diferença significativa entre os tratamentos a um nível de significância de 5%, foram aplicados testes de comparação múltipla apropriados para determinar diferenças

relativas ao controle, e foi calculada a concentração de efeito não observado (CENO) e de efeito observado (CEO) para todos os parâmetros quantificados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 QUANTIFICAÇÃO DE HPAs NA AMOSTRA DE FSA

A concentração total de HPAs ( $\sum\text{HPAT}$ ) na FSA bruta foi igual a 26.387 ng/L, sendo que dentre os HPAs parentais prioritários fenantreno, pireno e criseno apresentaram as maiores concentrações, iguais a 3529,6 ng L<sup>-1</sup>, 456,31 ng L<sup>-1</sup> e 234,22 ng L<sup>-1</sup> respectivamente.

A concentração dos 16 HPAs prioritários ( $\sum\text{HPAP}$ ) somados representa 19,94% da concentração total de HPAs, e 80% da concentração total de HPAs é representada por HPAs alquilados. Outro fato observado foi de que a % total dos HPAs alquilados foi de 80% enquanto que a % total dos HPAs parentais prioritários foi de aproximadamente 20%. Considerando-se HPAs parentais e alquilados conjuntamente, 29%, 48%, 23% e 0,74% da concentração total é representada por moléculas de 2, 3, 4 e 5 anéis aromáticos, respectivamente.

Tabela 1 Concentração total de HPAs parentais e alquilados presentes na solução bruta (100%) de Fração Solúvel em água do óleo coletado no costão rochoso da Praia de Pedra de Xaréu.

Tabela 1. Concentração total de HPAs parentais e alquilados presentes na solução bruta (100%) de Fração Solúvel em água do óleo coletado no costão rochoso da Praia de Pedra de Xáreu.

Analito de Interesse	número de anéis aromáticos	Concentração	% do total de HPAs
		(ng L <sup>-1</sup> )	
Naftaleno	2	20,54	0,08%
C1 Naftalenos	2	19,64	0,07%
C2 Naftalenos	2	255,09	0,97%
C3 Naftalenos	2	737,88	2,80%
C4 Naftalenos	2	594,49	2,25%
Acenaftileno	2	0	0,00%
Acenafteno	2	41,57	0,16%
Fluoreno	2	138,43	0,52%
C1 Fluorenos	2	1333,74	5,05%
C2 Fluorenos	2	2072,8	7,86%
C3 Fluorenos	2	2376,65	9,01%
Fenantreno	3	3529,6	13,38%
Antraceno	3	136,64	0,52%
C1 Fenantrenos + Antracenos	3	3094,16	11,73%
C2 Fenantrenos + Antracenos	3	2838,16	10,76%
C3 Fenantrenos + Antracenos	3	1812,03	6,87%
C4 Fenantrenos + Antracenos	3	1027,05	3,89%
Fluoranteno	3	121,68	0,46%
Pireno	4	456,31	1,73%
C1 Fluoranteno + Pireno	4	884,48	3,35%
C2 Fluoranteno + Pireno	4	1146,94	4,35%
C3 Fluoranteno + Pireno	4	1129,74	4,28%
Benzo[a]antroceno	4	182,06	0,69%
Criseno	4	234,22	0,89%
C1 Benzo[a]antraceno + Criseno	4	537,55	2,04%
C2 Benzo[a]antraceno + Criseno	4	790,63	3,00%
C3 Benzo[a]antraceno + Criseno	4	473,41	1,79%
Benzo[b]Fluoranteno	4	206,41	0,78%
Benzo[k]Fluoranteno	4	0	0,00%
Benzo[a]pireno	5	58,96	0,22%
Dibenzo[a,h]antraceno	5	60,22	0,23%
Indeno[1,2,3-cd]pireno	5	15,24	0,06%
Benzo[ghi]perileno	5	60,72	0,23%
soma dos 16 HPAs prioritários		5262,6	19,9%
soma dos HPAs Alquilados		21124,44	80,1%
Σ HPAs totais		26387,04	100%

## 5.2 EFEITOS LETAIS

Não foram observados efeitos letais significativos ao final das 168h de observação nos organismos expostos ao tratamento controle e nem nos tratamentos com a FSA nas concentrações 1,65, 3,3, 6,6, 13,2 e 26,4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$ ).

## 5.3 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

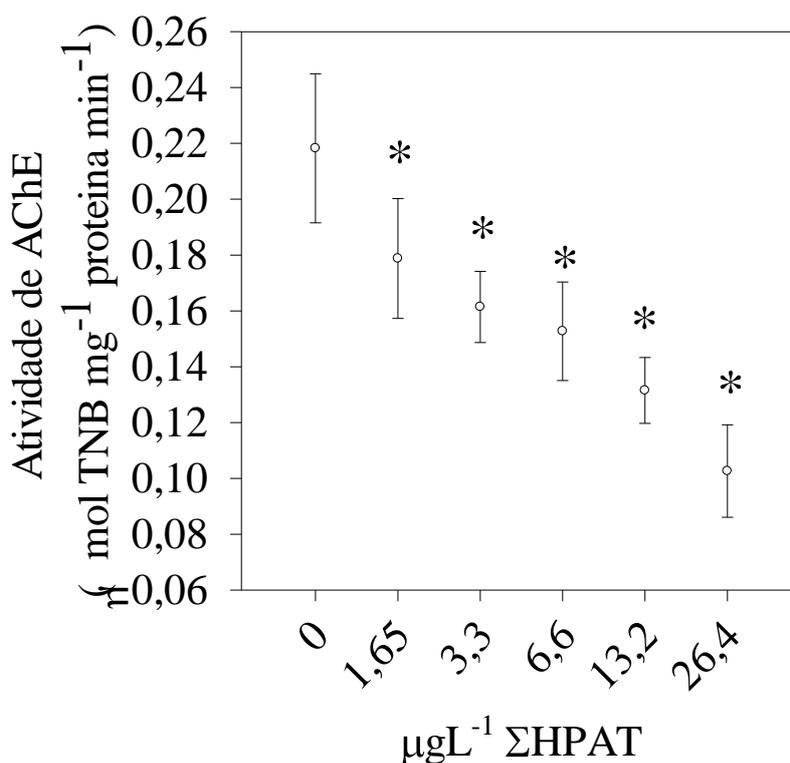
### 5.3.1 Biomarcadores de neurotoxicidade

#### 5.3.1.1 Atividade da Acetilcolinesterase – AChE

A acetilcolinesterase foi estatisticamente inibida nas larvas expostas a todos os tratamentos (Figura 17), quando comparadas as larvas do controle após 96h de exposição a FSA do óleo coletado no costão rochoso da praia de pedra de xaréu.

Figura 17 Atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) em larvas de *Danio rerio* expostas durante 96h a concentrações crescentes da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu.

(\*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle (ANOVA,  $F=18,314$   $P \leq 0,001$  Dunnett  $P < 0,001$ )



### 5.3.2 Biomarcadores de estresse oxidativo

#### 5.3.2.1 Peroxidação lipídica POL

A concentração de MDA foi estatisticamente menor em 6,6, 13,2 e 26,4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma$ HPAT quando comparados às larvas do tratamento controle (Figura 18A). A concentração de MDA média no maior tratamento apresentou redução de 71% comparado à média do controle.

#### 5.3.2.2 Espécies reativas de oxigênio – ROS

A presença de ROS foi expressa em unidades de fluorescência relativa ao controle, e não foram verificadas diferenças significativas entre as larvas de *Danio rerio* expostas a FSA e ao controle (ANOVA,  $F= 2,370$   $P \leq 0,083$  Dunnett  $P < 0,083$ ).

#### 5.3.2.3 Atividade de defesa antioxidante catalase – CAT

A atividade da CAT (Figura 18B) foi estatisticamente significativa em 13,2 e 26,4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma$ HPAT, indicando assim, que houve uma redução significativa na atividade dessa enzima nos organismos dos tratamentos menos diluídos.

#### 5.3.2.4 Glutathione- GSH

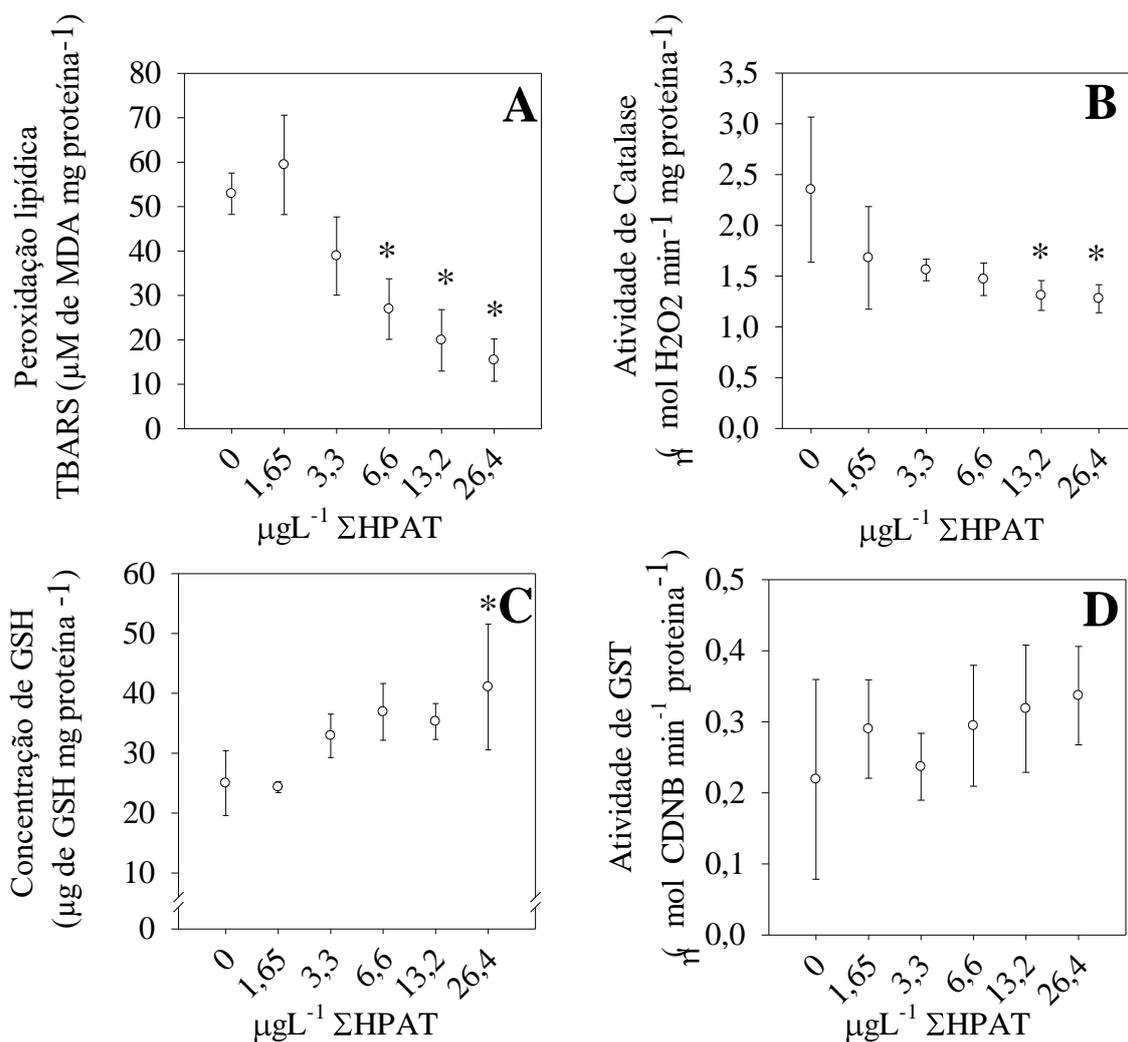
A concentração de GSH aumentou aproximadamente 67% nas larvas expostas a 26,4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma$ HPAT (Figura 18C) quando comparado ao tratamento controle.

#### 5.3.2.5 Glutathione-S-transferase – GST

Não foi verificada diferença estatística significativa na GST para as larvas expostas a FSA, quando comparadas ao controle.

Figura 18 Biomarcadores bioquímicos em larvas de *Danio rerio* expostas durante 96 h a concentrações crescentes da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu.

- A- Peroxidação Lipídica (ANOVA,  $F= 20,704$   $P \leq 0,001$  Dunnett  $P < 0,001$ )
  - B- Atividade da Catalase (Kruskal-Wallis,  $H = 13,080$   $p \leq 0,023$  Dunn  $p < 0,05$ )
  - C- Concentração de glutathione(GSH)(ANOVA,  $F= 4,143$   $P \leq 0,015$  Dunnett  $P < 0,015$ )
  - D- Atividade da GST (ANOVA,  $F= 0,939$   $P \leq 0,481$  Dunnett  $P < 0,481$ )
- (\*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle.

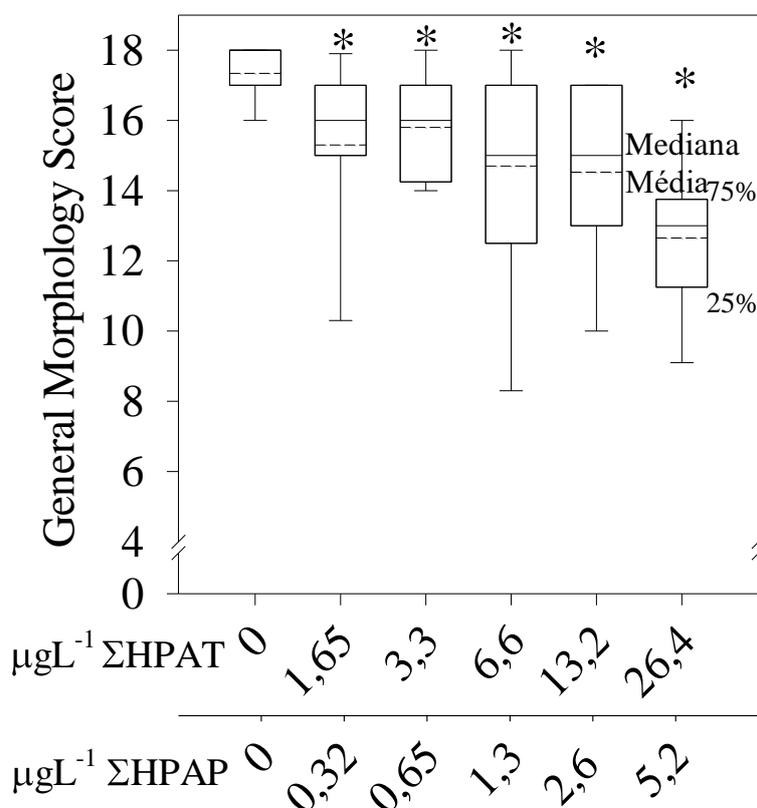


## 5.4 EFEITOS SUBLETAIS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS

### 5.4.1 Índice de Desenvolvimento Morfológico (GMS)

O índice GMS foi estatisticamente reduzido em todos os tratamentos quando comparados ao tratamento controle (Figura 19). A mediana do controle foi 18, enquanto que a mediana do tratamento 26,4  $\mu\text{gL}^{-1} \Sigma\text{HPAT}$  teve uma redução de 28% em comparação ao controle.

Figura 19 GMS da fase embriolarval do *Danio rerio* exposto durante 96h as diluições da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu. (Kruskal-Wallis  $H=58,598$ ,  $P\leq 0,001$ , Dunn  $P<0,05$ ); (\*) Diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle.  $\Sigma$ HPAT: Somatório de HPAs totais  $\Sigma$ HPAP: Somatório de 16 HPAs parentais prioritários.

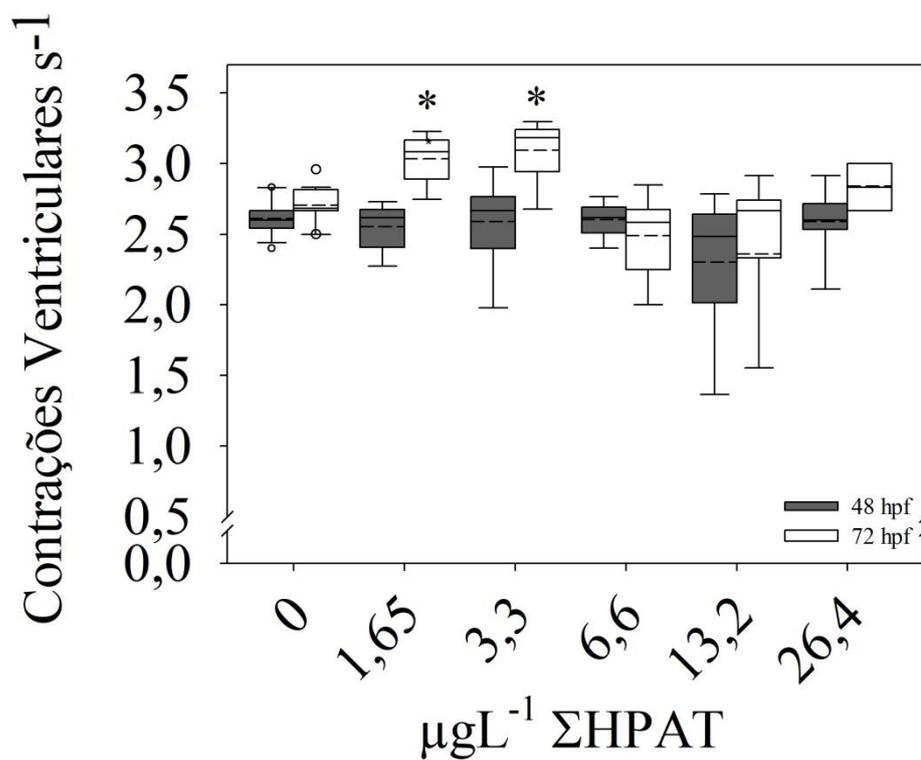


#### 5.4.2 Contrações ventriculares

Não houve diferença estatística significativa nas contrações ventriculares dos organismos expostos às diferentes concentrações da FSA em 48hpf, porém em 72hpf houve um aumento estatisticamente significativo nos organismos expostos a 1,65 e 3,3  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma$ HPAT (Figura 20).

Figura 20 Contrações ventriculares observadas em 48hpf e 72hpf de larvas do *Danio rerio* expostas a diferentes concentrações da FSA 48 hpf (Kruskal-Wallis  $H = 3,708$ ,  $p = 0,59$ );

72 hpf (Kruskal-Wallis  $H = 38,604$   $p \leq 0.001$ ; Dunn,  $p < 0.05$ ). (\*) Diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle. As linhas horizontais tracejadas do box plot indicam valores médios e as linhas horizontais contínuas do box plot (inferior, médio e superior) indicam quartis de 25, 50 (mediana) e 75%, respectivamente.



### 5.4.3 Frequência de anormalidades no desenvolvimento e de patologias

Os embriões apresentaram alterações morfológicas de modo concentração dependente. A não absorção do vitelo, ocorrência de edemas perivitelinicos e a ausência de bexiga natatória foram mais significativas no tratamento com o valor total de HPAs 26,4  $\mu\text{gL}^{-1}$ .

Tabela 2 Frequência de patologias entre 24 e 96 hpf da fase embriolarval do *Danio rerio* exposto durante 96 hpf a concentrações crescentes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos totais ( $\Sigma\text{HPAT}$ ) da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu.

$\mu\text{gL}^{-1}$ $\Sigma\text{HPAT}$	Nº	Edema pericárdico 24-96hpf	Edema perivitelinico 24-96-hpf	Vitelo não absorvido 96hpf	Coração deformado 96hpf	Torção na notocorda 72- 96hpf	Ausência de bexiga natatória 96hpf	Boca atrasada 72- 96hpf	Eclosão atrasada 72- 96hpf	Microfitalmia24- 96hpf
0	48	0%	4%	2%	0%	6%	6%	0%	0%	0%
1,65	20	5%	10%	10%	10%	20%	15%	15%	0%	10%
3,3	20	5%	10%	15%	10%	10%	10%	10%	0%	5%
6,6	20	5%	25%	35%	10%	10%	15%	30%	0%	15%
13,2	19	5%	32%	37%	5%	21%	32%	5%	5%	11%
26,4	20	50%	75%	85%	35%	55%	75%	55%	15%	70%

#### 5.4.4 Efeitos subletais morfométricos

##### 5.4.4.1 Comprimento Total

O comprimento total das larvas do *Danio rerio* ao final das 168 hpf diminuiu em todos os tratamentos comparados ao controle, sendo as larvas do tratamento 26,4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$  as que apresentaram a menor mediana (Figura 21A), igual a 3,38mm, enquanto a mediana no controle foi igual a 4,05mm.

##### 5.4.4.2 Área da bexiga natatória

A área da bexiga natatória também teve uma diferença estatística significativa nos tratamentos 1,65, 3,3 e 26,4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$  em comparação as larvas do controle (Figura 21C). A mediana no controle foi 67 $\mu\text{m}^2$ , enquanto que em 26,4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$  a mediana foi de 45  $\mu\text{m}^2$ .

##### 5.4.4.3 Área do globo ocular

A área do globo ocular teve uma diferença estatística significativa em 1,65, 3,3, 13,2 e 26,4  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$  comparados às larvas do controle (Figura 21B).

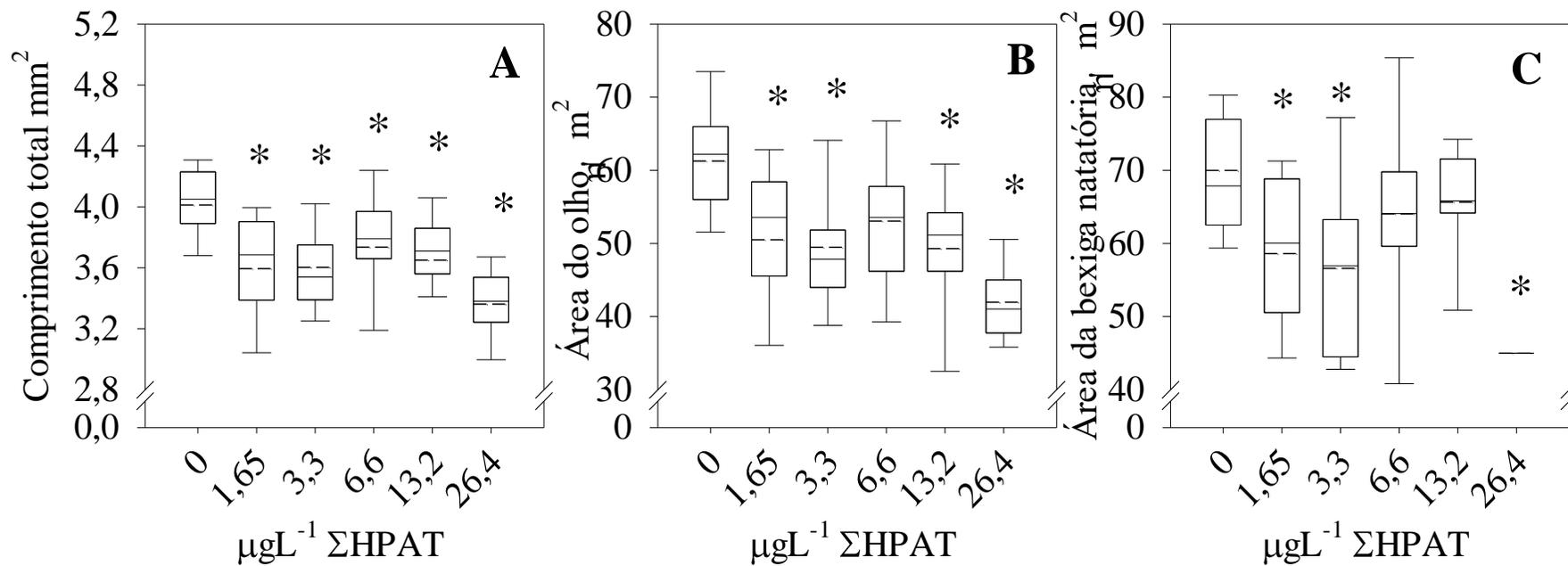
Figura 21 Efeitos subletais morfométricos no comprimento total e na área da bexiga natatória e do olho de larvas de *Danio rerio* 168 horas após a fertilização expostas durante 96h a concentrações crescentes da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu.

A (Kruskal-Wallis H = 58,7,  $p \leq 0,001$ , Dunn  $p < 0,05$ )

B (Kruskal-Wallis H = 45,8,  $p \leq 0,001$ , Dunn  $p < 0,05$ )

C (F = 5,681 ANOVA  $P \leq 0,001$ , Dunnet  $P < 0,001$ )

(\*) Diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle. As linhas horizontais tracejadas do box plot indicam valores médios e as linhas horizontais contínuas do box plot (inferior, médio e superior) indicam quartis de 25, 50 (mediana) e 75%, respectivamente.



## 5.5 EFEITOS SUBLETAIS COMPORTAMENTAIS

### 5.5.1 Velocidade natatória em 168hpf

#### 5.5.1.1 Velocidade média e velocidade máxima média

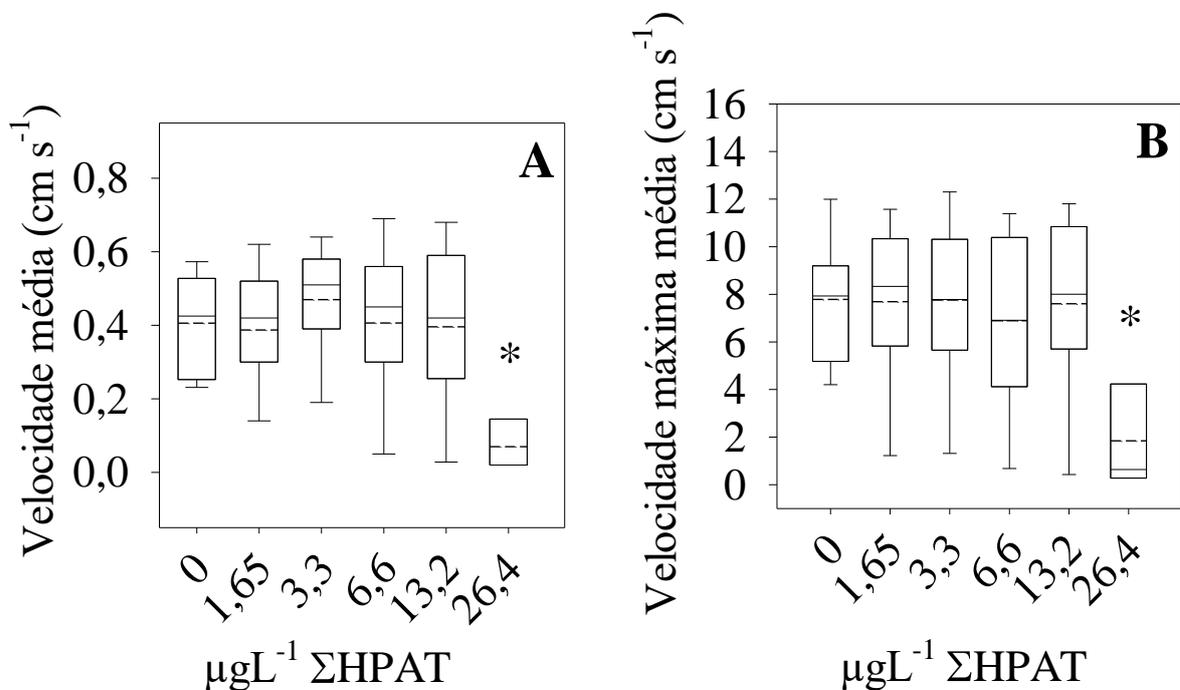
As larvas expostas a  $26,4 \mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$  apresentaram uma redução estatística significativa quando comparadas ao tratamento controle, tanto na velocidade média (Figura 22A), quanto na velocidade máxima média (Figura 22B).

Figura 22 Velocidade natatória média e velocidade natatória máxima média de larvas de *Danio rerio* 168 horas após a fertilização expostas durante 96h a concentrações crescentes da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu.

A: (Kruskal-Wallis  $H = 13,869$ ,  $p \leq 0,050$ , Dunn  $p < 0,05$ )

B: (Kruskal-Wallis  $H = 16,208$ ,  $p \leq 0,006$ , Dunn  $p < 0,05$ )

(\*) Diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle. As linhas horizontais tracejadas do box plot indicam valores médios e as linhas horizontais contínuas do box plot (inferior, médio e superior) indicam quartis de 25, 50 (mediana) e 75%, respectivamente.



## 5.5.2 Insuflamento da bexiga natatória 72hpf a 168hpf

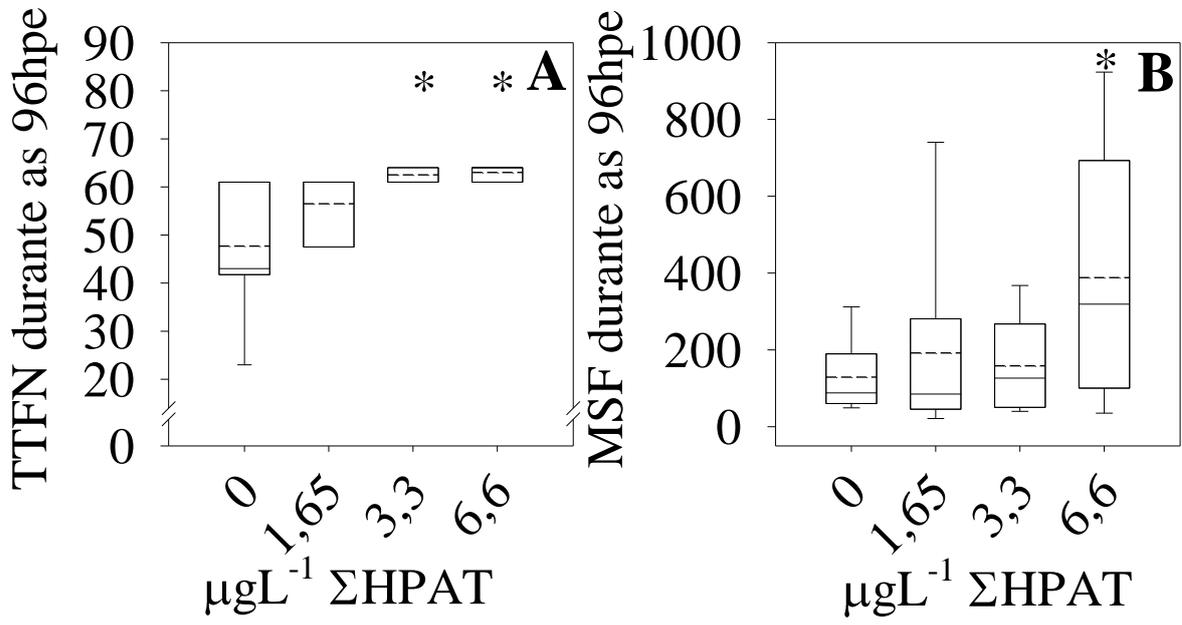
### 5.5.2.1 Tempo para atingir a flutuabilidade neutra

Foi verificado um aumento concentração dependente do tempo transcorrido até as larvas de *Danio rerio* atingirem a flutuabilidade neutra (TTFN), sendo este aumento estatisticamente significativo nas larvas expostas a 3,3 e 6,6  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$ , quando comparados às larvas do controle (Figura 23A). A mediana do tempo para atingir a flutuabilidade neutra a partir da eclosão das larvas controle foi igual a 43 h (horas pós eclosão), e aumentou para 61 h, 61 h e 64 h nas larvas expostas a 1,65, 3,3 e 6,6  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$  da FSA, respectivamente. Cabe salientar que em 6,6  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$  da FSA apenas três das dez larvas analisadas atingiram a flutuabilidade neutra.

### 5.5.2.2 Tentativas de subidas até a superfície

O número de vezes que as larvas expostas a 6,6  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$  da FSA necessitaram fazer o movimento superfície fundo (MSF) para abocanhar ar e assim conseguir inflar a bexiga natatória foi superior (Figura 23B). Em comparação as larvas do controle as larvas expostas em 6,6  $\mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma\text{HPAT}$ , apresentaram uma média de 319 MSF, enquanto que no controle essa média foi de 88 MSF.

Figura 23 Tempo necessário para atingir a flutuabilidade neutra e número de tentativas de subidas até a superfície de larvas de *Danio rerio* expostas durante 96h a concentrações crescentes da fração solúvel do óleo coletado no costão rochoso da praia de Pedra de Xaréu. A-Insuflamento da bexiga natatória: TTFN (Kruskal-Wallis,  $H = 12,846$ ,  $p \leq 0,005$ , Dunn  $p < 0,05$ ) B- MSF (ANOVA  $F = 3,128$   $P \leq 0,038$ , Dunnett  $P < 0,038$ ). (\*) Diferença estatisticamente significativa comparada ao controle. As linhas horizontais tracejadas do box plot indicam valores médios e as linhas horizontais contínuas do box plot (inferior, médio e superior) indicam quartis de 25,50 (mediana) e 75%, respectivamente.



## 6 DISCUSSÃO

As fases embriolarvais de *Danio rerio* expostas a FSA do óleo impregnado nas rochas da praia de Pedra do Xaréu 50 dias após o pico do derrame apresentaram alterações subletais bioquímicas, morfológicas e comportamentais em todas concentrações testadas.

A concentração total dos 16 HPAs parentais quantificada na FSA bruta foi igual a  $5,2 \mu\text{gL}^{-1}$ , que somados ao total de  $21,12 \mu\text{gL}^{-1}$  de HPAs alquilados também quantificados perfazem um total de  $26,4 \mu\text{gL}^{-1}$  de HPAs totais (parentais + alquilados). Neste estudo foi verificado um atraso no desenvolvimento embriolarval com base no GMS (Figura 19) em todas as concentrações testadas, sendo que a concentração de efeito observado (CEO) para o GMS foi igual a  $1,65 \mu\text{gL}^{-1} \sum\text{HPAT}$  (concentração expressa somatório de HPAs totais) ou  $0,33 \mu\text{gL}^{-1} \sum\text{HPAP}$  (concentração expressa em somatório de 16 HPAs parentais prioritários). Em outro estudo também avaliando o GMS em larvas de zebrafish expostas a FSA de óleo, as CEOs para as FSAs do petróleo bruto de Omã e do petróleo bruto de Merey foram iguais a  $2,5$  e  $3,2 \mu\text{gL}^{-1} \sum\text{HPAP}$ , respectivamente (Li, Xiong *et al.*, 2019). Desta forma, a CEO para o índice GMS deste estudo de  $0,33 \mu\text{gL}^{-1} \sum\text{HPAP}$  é aproximadamente 10x menor que a CEO para o GMS para ambos tipos de petróleo bruto de Omã e Merey. Estes resultados indicam que a FSA do óleo que chegou à costa brasileira, mesmo com o significativo grau de intemperismo sofrido durante pelo menos 50 dias aderido a rochas, é mais potente indutora de atrasos no desenvolvimento em *D. rerio* que a FSA de óleos brutos não intemperizados de Omã e Merey.

HPAs com dois anéis aromáticos (parentais + alquilados) representaram aproximadamente 29% da concentração total da FSA bruta (Tabela 1), e apresentam alta solubilidade comparado aos HPAs de alto peso molecular. Por outro lado, HPAs de 2 anéis como o naftaleno são bastante voláteis, logo, uma grande parcela evapora antes mesmo de se misturar a água. Apesar desta tendência, é interessante ressaltar que mesmo após 50 dias impregnado nas rochas, uma massa significativa destes HPAs de 2 anéis ainda pode ser liberada para a água.

Li, Xiong *et al.* (2019) verificou diminuição da frequência cardíaca em larvas de zebrafish expostas a FSA de petróleo bruto de Omã e do petróleo bruto de Merey, com CEOs iguais a  $3,8$  e  $3,25 \mu\text{gL}^{-1} \sum\text{HPAP}$ , respectivamente. Nosso estudo, por outro lado, verificou uma resposta não dose dependente com aumento da frequência cardíaca (taquicardia) em  $0,3$  e  $0,6 \mu\text{gL}^{-1} \sum\text{HPAP}$ , respectivamente (Figura 20). Incardona, Collier *et al.* (2004) verificou

reduções dose dependentes na frequência cardíaca de larvas de zebrafish expostas ao fenantreno.

Neste estudo foi verificado um aumento concentração dependente da frequência de patologias nas larvas expostas a FSA, incluindo edema pericárdico e perivitelínico, deformidades do coração e microftalmia (Tabela 2), patologias indicativas de cardiotoxicidade também verificadas em larvas de *D. rerio* expostas ao fenantreno puro numa solução de concentração nominal de  $9.980 \mu\text{gL}^{-1}$ , acima do limite de solubilidade de  $1.300 \mu\text{gL}^{-1}$  (Incardona, Collier *et al.*, 2004). Neste trabalho a concentração de fenantreno presente na mistura representada pela FSA atingiu  $3,5 \mu\text{gL}^{-1}$  na maior concentração testada, sendo bem menor que a concentração reportada por Incardona, Collier *et al.* (2004). É possível que outras moléculas como C1-, C2-, C3-fenantrenos alquilados presentes na FSA testada estejam contribuindo para a cardiotoxicidade como especulado por Incardona e Scholz (2017).

O vitelo é responsável por fornecer hormônios, nutrientes e energia para os peixes durante sua fase inicial (Hilton, Poortenaar *et al.*, 2008; Kamler e Fisheries, 2008), e foi verificado um aumento dose dependente na frequência de larvas com falha na absorção do vitelo (Tabela 2), o que pode ter contribuído na redução do comprimento total, área do olho e área da bexiga natatória desses organismos (Figura 21). O não insuflamento da bexiga natatória também pode estar diretamente associado a complicações no desenvolvimento morfológico, como possíveis torções na notocorda (Chatainb, 1994), patologias com frequência aumentada em larvas expostas a FSA neste estudo.

A bexiga natatória regula a densidade do corpo dos peixes teleósteos, fazendo com que essa força exercida pelo peso da massa corporal (FPC) seja igual a força empuxo exercida pela bexiga (FEB), fazendo assim com que esses organismos consigam se locomover sem ter uma perda energética grande (Smith e Croll, 2011). Em peixes fisóstomos como *Danio rerio*, a bexiga natatória possui uma conexão com o exôfago, a qual através do ducto pneumático regula o volume de gás presente no interior desse órgão (Dumbarton, Stoyek *et al.*, 2010). A partir de 72 hpf as larvas do *Danio rerio* começam a eclodir e iniciam subidas até a superfície da água na tentativa de abocanhar ar que através do ducto pneumático chegará até a câmara da bexiga natatória, inflando-a (Steen, 1970; Hagenaaars, Stinckens *et al.*, 2014). Esse processo requer um gasto energético relativamente grande, pois as tentativas de subida ocorrem inúmeras vezes, devido ao fato já supracitado acima de que a  $FPC > FEB$ . Neste estudo, foi verificado para larvas expostas a FSA um aumento concentração dependente no tempo

necessário (Figura 23A) e no número de subidas até a superfície necessárias (Figura 23B) para atingir a flutuabilidade neutra. A flutuabilidade neutra só é atingida se o sistema nervoso autônomo controlar o sistema de trocas gasosas (Finney, Robertson *et al.*, 2006), e este atraso ou deficiência da capacidade de atingir a flutuabilidade neutra pode estar ligado a um possível efeito deletério neste sistema nervoso autônomo, que pode inclusive estar associada a verificada inibição da AChE (Figura 17). O insuflamento da bexiga natatória é uma etapa essencial para a fase larval de peixes (Czesny, Graeb *et al.*, 2005), pois ela vem a garantir que esses organismos alcancem a flutuabilidade neutra e estejam aptos a nadar com eficiência e capturar presas ou fugir de potenciais predadores. O aumento concentração dependente no número de subidas à superfície provavelmente acarretou num maior gasto energético que pode ter influenciado na diminuição do comprimento total das larvas expostas a FSA.

A inibição dose dependente da atividade da AChE verificada neste estudo após exposição de larvas de zebrafish a FSA também foi verificada no peixe tropical *Astyanax sp.* exposto a FSA de óleo bruto (Akaishi, Silva De Assis *et al.*, 2004). A inibição da AChE pode resultar no acúmulo de acetilcolina nas sinapses centrais e periféricas, chegando a causar atividades fisiológicas e neuroendócrinas modificadas (Behra, Cousin *et al.*, 2002; Tilton, Bammler *et al.*, 2011). Essas modificações podem acarretar em mudanças comportamentais, como redução no desempenho de natação, o que conseqüentemente deixa o organismo mais suscetível a predação (Carlson, Bradbury *et al.*, 1998; Yang, Lauridsen *et al.*, 2011) e redução na capacidade de forrageamento do organismo (Sandahl, Baldwin *et al.*, 2005). Apesar da inibição da AChE ter sido verificada em larvas expostas a todas concentrações testadas, a diminuição na velocidade natatória média (Figura 22A), e na velocidade máxima média das larvas (Figura 22B) foi verificada somente na maior concentração de exposição. Hipoatividade natatória também foi observada após exposição de larvas de zebrafish a 49  $\mu\text{gL}^{-1}$  fenantreno (Vergauwen, Schmidt *et al.*, 2015).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que a fração solúvel do óleo intemperizado impregnado nas rochas da Praia de Pedra do Xaréu pode afetar a viabilidade das larvas de *Danio rerio*. Foram verificadas múltiplas alterações bioquímicas, morfológicas e comportamentais durante a fase embriolarval. Destacam-se efeitos tóxicos verificados nas menores concentrações avaliadas de  $1,65 \mu\text{gL}^{-1}$   $\Sigma$ HPAT, envolvendo atraso no desenvolvimento embriolarval, aumento das frequências de anormalidades do desenvolvimento, inibição da enzima acetilcolinesterase, além de alterações comportamentais no processo de insuflamento da bexiga natatória, e diminuição do crescimento das larvas. É razoável supor que os efeitos tóxicos observados em laboratório podem acontecer na natureza em teleósteos em sua fase embriolarval que tenham contato com a FSA desse petróleo no meio aquático.

## 8 REFERÊNCIAS

ADAMS, J., CHARBONNEAU, K., TUORI, D., BROWN, R.S. AND HODSON, P.V. **Review of Methods for Measuring the Toxicity to Aquatic Organisms of the Water Accommodated Fraction (WAF) and Chemically-Enhanced Water Accommodated Fraction (CEWAF) of petroleum.** DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc. 2017/064. xi + 110 p., 2017.

AKAISHI, F. et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. v. 46, p. 244-253, 2004. ISSN 0090-4341.

ALBAIGÉS, J.; MORALES-NIN, B.; VILAS, F. The Prestige oil spill: a scientific response. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, n. 5, p. 205-207, 2006.

ALBUQUERQUE, C. D. **Uso da acetilcolinesterase e metalotioneínas em peixes na avaliação do efeito da contaminação na Baía de Guanabara.** 2007. Fundação Oswaldo Cruz- Escola Nacional de Saúde Pública

ALTENBURGER, R.; SEGNER, H.; VAN DER OOST, R. Biomarkers and PAHs — Prospects for the Assessment of Exposure and Effects in Aquatic Systems. In: (Ed.). **PAHs: An Ecotoxicological Perspective**, 2003. p.297-328.

ALVES, R. N. et al. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 178, p. 224-230, 7// 2017. ISSN 0045-6535.

ANP. Relatório Anual de Segurança Operacional: das atividades de exploração e produção de petróleo e gás natural., 2014. Acesso em: 14 de março.

ARAÚJO, M. E. D.; RAMALHO, C. W. N.; MELO, P. W. D. Artisanal fishers, consumers and the environment: immediate consequences of the oil spill in Pernambuco, Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, 2020. ISSN 0102-311X.

BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in toxicology and environmental health. **Current topics in developmental biology**, v. 124, p. 331-367, 2017. ISSN 0070-2153.

BARBOSA, D. **Efeito do tratamento com Sulfassalazina e Acido graxos a-3 de óleo de peixe sobre o estresse oxidativo na retocolite ulcerativa inespecífica.** 2001. Tese Doutorado, UNESP-Faculdade de Medicina de Botucatu. Botucatu (SP)

BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev Nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-43, 2010.

BARRON, M. G. et al. Long-term ecological impacts from oil spills: comparison of Exxon Valdez, Hebei Spirit, and Deepwater Horizon. **Environmental science & technology**, v. 54, n. 11, p. 6456-6467, 2020. ISSN 0013-936X.

BEASLEY, V. R.; LEVENGOOD, J. M. Principles of ecotoxicology. In: (Ed.). **Veterinary Toxicology**: Elsevier Inc., 2012. p.831-855.

BEEKHUIJZEN, M. et al. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. **Reproductive Toxicology**, v. 56, p. 64-76, 2015. ISSN 0890-6238.

BEEKHUIJZEN, M. et al. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. **Reproductive Toxicology**, v. 56, p. 64-76, 2015.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J Biol chem**, v. 195, n. 1, p. 133-140, 1952. ISSN 0021-9258.

BEHRA, M. et al. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 111-118, 2002. ISSN 1546-1726.

BELMEJO, L.; MARTOS, H. Utilização de *Xiphophorus helleri* como bioindicador de poluição hídrica de derivados de petróleo em condições tropicais. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 1, n. 2, p. 1-17, 2008.

BERTOLETTI, P. A. Z. E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações RiMa ed.** 2006.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 61, p. 882-888, 1963. ISSN 0022-2143.

CARLSON, R. W. et al. Neurological effects on startle response and escape from predation by medaka exposed to organic chemicals. **Aquatic Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 51-68, 1998. ISSN 0166-445X.

CARVALHO-NETA, R. APA do Maracanã: subsídios ao manejo e à Educação Ambiental. **São Luís-MA: Café & Lápis/FAPEMA**, 2010.

CHATAINB. Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). **Aquaculture**, p. 119, 1994.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. v. 31, p. 1820-1830, 2008. ISSN 0100-4042.

CRAVEIRO, N. et al. Immediate effects of the 2019 oil spill on the macrobenthic fauna associated with macroalgae on the tropical coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 165, p. 112107, 2021. ISSN 0025-326X.

CRISTALE, J.; SILVA, F.; MARCHI, M. Development and application of GC-MS/MS method for simultaneous analysis of 17 PAHs in airborne particulate matter. **Eclética Química**, v. 33, p. 69-78, 2008. ISSN 0100-4670.

CZESNY, S. J.; GRAEB, B. D.; DETTMERS, J. M. Ecological consequences of swim bladder noninflation for larval yellow perch. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 134, n. 4, p. 1011-1020, 2005. ISSN 0002-8487.

DA SILVA, E. S.; PRAGANA, L. G.; VASCONCELOS, U. J. P. A. C. Photooxidation vs biodegradation: A short review on fate of heavy hydrocarbons after oil spill in sea water. v. 12, p. 13, 2021.

DE ARRUDA-SANTOS, R. H. et al. Sources and distribution of aromatic hydrocarbons in a tropical marine protected area estuary under influence of sugarcane cultivation. v. 624, p. 935-944, 2018. ISSN 0048-9697.

DE OLIVEIRA LEMOS, R. T.; DE CARVALHO, P. S. M.; ZANARDI-LAMARDO, E. Petroleum hydrocarbons in water from a Brazilian tropical estuary facing industrial and port development. **Marine Pollution Bulletin**, v. 82, n. 1-2, p. 183-188, 2014. ISSN 0025-326X.

DE OLIVEIRA, O. M. C. et al. Environmental disaster in the northeast coast of Brazil: Forensic geochemistry in the identification of the source of the oily material. **Marine Pollution Bulletin**, v. 160, p. 111597, 2020/11/01/ 2020. ISSN 0025-326X.

DEHNERT, G. K.; KARASOV, W. H.; WOLMAN, M. A. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid containing herbicide impairs essential visually guided behaviors of larval fish. **Aquatic Toxicology**, v. 209, p. 1-12, 2019. ISSN 0166-445X.

DEPLEDGE, M.; AAGAARD, A.; GYÖRKÖS, P. J. M. P. B. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. v. 31, n. 1-3, p. 19-27, 1995. ISSN 0025-326X.

DISSANAYAKE, A.; BAMBER, S. D. Monitoring PAH contamination in the field (South west Iberian Peninsula): Biomonitoring using fluorescence spectrophotometry and physiological assessments in the shore crab *Carcinus maenas* (L.)(Crustacea: Decapoda). **Marine environmental research**, v. 70, n. 1, p. 65-72, 2010. ISSN 0141-1136.

DUMBARTON, T. C. et al. Adrenergic control of swimbladder deflation in the zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 14, p. 2536-2546, 2010. ISSN 1477-9145.

DUNN, R. **In retrospect: silent spring**: Nature Publishing Group UK London 2012.

EKINO, S. et al. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. **Journal of the neurological sciences**, v. 262, n. 1-2, p. 131-144, 2007. ISSN 0022-510X.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961. ISSN 0006-2952.

EMBRY, M. R. et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquatic toxicology**, v. 97, n. 2, p. 79-87, 2010. ISSN 0166-445X.

ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, v. 4, n. 1, p. 21-40, 2007. ISSN 1545-8547.

FÄNGE, R. Physiology of the swimbladder. **Physiological reviews**, v. 46, n. 2, p. 299-322, 1966. ISSN 0031-9333.

FERREIRA, R. S. **Identificação do transcrito CYP1A no peixe *Phalloceros caudimaculatus* e resposta para a exposição a beta-naftoflavona e amostras ambientais de sedimento**. 2014.

FINNEY, J. L. et al. Structure and autonomic innervation of the swim bladder in the zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of comparative neurology**, v. 495, n. 5, p. 587-606, 2006. ISSN 0021-9967.

FRASCO, M.; GUILHERMINO, L. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 149-156, 2002. ISSN 0920-1742.

GAGNÉ, F. Oxidative stress. **Biochemical Ecotoxicology**, p. 103-115, 2014.

GENKINGER, J. M. et al. Prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure, antioxidant levels and behavioral development of children ages 6–9. **Environmental research**, v. 140, p. 136-144, 2015. ISSN 0013-9351.

GOMES, M. F. et al. Sublethal effects of triclosan and triclocarban at environmental concentrations in silver catfish (*Rhamdia quelen*) embryos. **Chemosphere**, v. 263, p. 127985, 2021. ISSN 0045-6535.

GOODSELL, A.; WIKLEY, D.; SEARLE, L. Histological investigation of swim-bladder morphology and inflation in cultured larval striped trumpeter (*Latris lineata*)(Teleostei, Latridae). **Marine and Freshwater Research**, v. 47, n. 2, p. 251-254, 1996. ISSN 1448-6059.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. [51] Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, v.77, 1981. p.398-405. ISBN 0076-6879.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, November 25, 1974 1974.

HAGENAARS, A. et al. PFOS affects posterior swim bladder chamber inflation and swimming performance of zebrafish larvae. **Aquatic toxicology**, v. 157, p. 225-235, 2014. ISSN 0166-445X.

HELLOU, J.; ROSS, N. W.; MOON, T. W. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 6, p. 2007-2023, 2012. ISSN 1614-7499.

HERMSEN, S. A. et al. Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 3, p. 745-753, 2011. ISSN 0887-2333.

HILL, A. J. et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological sciences**, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005. ISSN 1096-6080.

HILTON, Z.; POORTENAAR, C. W.; SEWELL, M. A. J. M. B. Lipid and protein utilisation during early development of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). v. 154, p. 855-865, 2008. ISSN 0025-3162.

HO, S.; WANG, C.; LUO, Y. J. M. P. B. GC-MS analysis of two types of mixed oils, a comparison of composition and weathering patterns. v. 96, n. 1-2, p. 271-278, 2015. ISSN 0025-326X.

HOWE, K. H., M.D. CLARK, C.F. TORROJA, J. TORRANCE, C. BERTHELOT, M. MUFFATO, J.E. COLLINS, S. HUMPHRAY, K. MCLAREN, L. MATHEWS, ET AL. The

zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498-503, 2013.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. D. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008a. ISSN 0100-4042.

\_\_\_\_\_. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008b. ISSN 0100-4042.

INCARDONA, J. P. et al. Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 12, p. 1755-62, 2005 Dec 2005. ISSN 0091-6765 (Print).

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 196, n. 2, p. 191-205, 2004. ISSN 0041-008X.

INCARDONA, J. P.; SCHOLZ, N. L. The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 515-525, 2016/08/01/ 2016. ISSN 0166-445X.

\_\_\_\_\_. 6 - Environmental Pollution and the Fish Heart. In: GAMPERL, A. K.; GILLIS, T. E., et al (Ed.). **Fish Physiology**: Academic Press, v.36, 2017. p.373-433. ISBN 1546-5098.

IWASE, T. et al. A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach. **Scientific reports**, v. 3, n. 1, p. 3081, 2013. ISSN 2045-2322.

JOHANN, S. et al. Differences in biomarker and behavioral responses to native and chemically dispersed crude and refined fossil oils in zebrafish early life stages. **Science of The Total Environment**, v. 709, p. 136174, 2020. ISSN 0048-9697.

JOHNSON, L. L. et al. **The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish from Puget Sound, Washington**: Boca Raton, Fla.: CRC Press: 877-923 p. 2008.

JUNG, J. H. et al. Geologically distinct crude oils cause a common cardiotoxicity syndrome in developing zebrafish. **Chemosphere**, v. 91, n. 8, p. 1146-1155, 2013.

KAMLER, E. J. R. I. F. B.; FISHERIES. Resource allocation in yolk-feeding fish. v. 18, p. 143-200, 2008. ISSN 0960-3166.

KREBS, J. R. et al. The second silent spring? , v. 400, n. 6745, p. 611-612, 1999. ISSN 0028-0836.

LI, N.; KARIN, M. Is NF- $\kappa$ B the sensor of oxidative stress? **The FASEB Journal**, v. 13, n. 10, p. 1137-1143, 1999. ISSN 0892-6638.

LI, X. et al. Toxicity of water-accommodated fractions (WAF), chemically enhanced WAF (CEWAF) of Oman crude oil and dispersant to early-life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 101, n. 3, p. 314-319, 2018. ISSN 1432-0800.

LI, X. et al. Exposure to water-accommodated fractions of two different crude oils alters morphology, cardiac function and swim bladder development in early-life stages of zebrafish. **Chemosphere**, v. 235, p. 423-433, 2019/11/01/ 2019. ISSN 0045-6535.

LI, Y.; SCHELLHORN, H. E. Rapid kinetic microassay for catalase activity. **Journal of biomolecular techniques: JBT**, v. 18, n. 4, p. 185, 2007.

LINDSEY, B. W.; SMITH, F. M.; CROLL, R. P. From Inflation to Flotation: Contribution of the Swimbladder to Whole-Body Density and Swimming Depth During Development of the Zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 7, n. 1, p. 85-96, 2010.

LITTLE, D.; MILWAIN, G.; PRICE, C. Pesticide contamination in farmed fish: assessing risks and reducing contamination. In: (Ed.). **Improving farmed fish quality and safety**: Elsevier, 2008. p.71-96.

MACHADO, J. D. D. O. A.; DE CARVALHO, R. A. Exploração de Petróleo no Brasil e Estados Unidos: história e relevância. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 52499-52515, 2021. ISSN 2525-8761.

MAHARAJAN, K. et al. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): a multi biomarker study. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 132-145, 2018. ISSN 0166-445X.

MARIZ, C. F. **Efeitos morfológicos e comportamentais do fenantreno no desenvolvimento embrionário de *Danio rerio***. 2018. Universidade Federal de Pernambuco

MCLACHLAN, A.; DEFEO, O. **The ecology of sandy shores**. Academic press, 2017. ISBN 0128096985.

MONITORING, G.; CHAPMAN, D. Concepts and Strategies for Biological Monitoring. 1989.

MOTA, W. M. B., M.L.; CUNHA, P.E.L.; SANTANA, M.V.A.; STEVAM, C.S.; LEOPOLDO, P.T.G.; FERNANDES, R. P. M. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. 2012.

OECD. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. **OECD guidelines for the testing of chemicals, section**, v. 2, p. 1-22, 2013a.

\_\_\_\_\_. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 2013b. Disponível em: < /content/book/9789264203709-em <http://dx.doi.org/10.1787/9789264203709-en> >.

PASPARAKIS, C. et al. Physiological impacts of Deepwater Horizon oil on fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 224, p. 108558, 2019. ISSN 1532-0456.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; COLLIER, T. K. Ecotoxicological Studies Focusing on Marine and Freshwater Fish. In: DOUBEN, P. E. T. (Ed.). **PAHs : an ecotoxicological perspective** England: John Wiley & Sons Ltd, 2003. p.191-224.

PEREIRA, A. D. S. A. **Geopolítica do petróleo brasileiro-a estratégia de internacionalização da Petrobras na América do Sul (2007-2017)**. 2019. Universidade de São Paulo

PETROBRAS. Pré-sal. 2017. Acesso em: 14 de março.

PICCIOTTO, M. R. et al. Nicotinic receptors in the brain: links between molecular biology and behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 5, p. 451-465, 2000. ISSN 0893-133X.

PICCIOTTO, M. R.; HIGLEY, M. J.; MINEUR, Y. S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 116-129, 2012. ISSN 0896-6273.

PICKERING, A. D. Stress and Fish. **Academic Press**, 1981.

RADOVIĆ, J. R. et al. Assessment of photochemical processes in marine oil spill fingerprinting. v. 79, n. 1-2, p. 268-277, 2014. ISSN 0025-326X.

REDDY, C. M. et al. Synergy of analytical approaches enables a robust assessment of the Brazil mystery oil spill. v. 36, n. 22, p. 13688-13704, 2022. ISSN 0887-0624.

REN, X.; PAN, L.; WANG, L. The detoxification process, bioaccumulation and damage effect in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to chrysene. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 114, p. 44-51, 2015. ISSN 0147-6513.

RICHARD T, D. G. M. C., NEWMAN. Ecotoxicology. In: PRESS, C. (Ed.). **The Toxicology of Fishes**, 2008. cap. 29, p.10.

SANDAHL, J. F. et al. Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in coho salmon exposed to chlorpyrifos. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 24, n. 1, p. 136-145, 2005. ISSN 0730-7268.

SANTANA, J. L. et al. Reef crab population changes after oil spill disaster reach Brazilian tropical environments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 183, p. 114047, 2022/10/01/ 2022. ISSN 0025-326X.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Animal physiology: adaptation and environment**. Cambridge university press, 1997. ISBN 0521570980.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic toxicology**, v. 68, n. 4, p. 369-392, 2004. ISSN 0166-445X.

SEILER, T.-B. et al. PAH toxicity at aqueous solubility in the fish embryo test with *Danio rerio* using passive dosing. **Chemosphere**, v. 112, p. 77-84, 2014. ISSN 0045-6535.

SIEBEL, A.; BONAN, C.; SILVA, R. D. Zebrafish como modelo para estudos comportamentais. **Resende RR, organizador. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações. São Paulo: Blucher**, p. 15-56, 2015.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 916-921, 1999. ISSN 0891-5849.

SINGER, M. et al. Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. v. 40, n. 11, p. 1007-1016, 2000. ISSN 0025-326X.

SMITH, F. M.; CROLL, R. P. Autonomic control of the swimbladder. **Autonomic Neuroscience**, v. 165, n. 1, p. 140-148, 2011. ISSN 1566-0702.

SOARES, M. O. et al. The most extensive oil spill registered in tropical oceans (Brazil): the balance sheet of a disaster. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 13, p. 19869-19877, 2022. ISSN 0944-1344.

STEEN, J. B. 10 The Swim Bladder as a Hydrostatic Organ. In: (Ed.). **Fish physiology**: Elsevier, v.4, 1970. p.413-443. ISBN 1546-5098.

STEWART, W. J.; CARDENAS, G. S.; MCHENRY, M. J. Zebrafish larvae evade predators by sensing water flow. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 3, p. 388-398, 2013. ISSN 1477-9145.

SZEWCZYK, S. B. O. Processos envolvidos em um derramamento de óleo no mar. Seminário e Workshop em Engenharia Oceânica (SEMENGO), 2006.

THOMAS, J. E. Fundamentos de engenharia de petróleo. In: INTERCIÊNCIA (Ed.), v.2, 2001. p.271

TILTON, F. A.; BAMMLER, T. K.; GALLAGHER, E. P. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 9-16, 2011. ISSN 1532-0456.

TROTTER, A.; PANKHURST, P.; HART, P. Swim bladder malformation in hatchery-reared striped trumpeter *Latris lineata* (Latridae). **Aquaculture**, v. 198, n. 1-2, p. 41-54, 2001. ISSN 0044-8486.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 1, n. 2, p. 151-173, 1977. ISSN 0147-6513.

UTLEY, H. G.; BERNHEIM, F.; HOCHSTEIN, P. Effect of sulfhydryl reagents on peroxidation in microsomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 118, n. 1, p. 29-32, 1967/01/01/ 1967. ISSN 0003-9861.

VAN DER OOST, R. et al. Validation of inland water pollution assessment using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1-5, p. 431-432, 2000. ISSN 0141-1136.

VERGAUWEN, L. et al. A high throughput passive dosing format for the Fish Embryo Acute Toxicity test. v. 139, p. 9-17, 2015. ISSN 0045-6535.

WALKER, C. H.; SIBLY, R.; PEAKALL, D. B. **Principles of ecotoxicology**. CRC press, 2005. ISBN 0429109512.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997. ISSN 0031-9333.

WESS, J. Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. **Trends in pharmacological sciences**, v. 24, n. 8, p. 414-420, 2003. ISSN 0165-6147.

WOOLLEY, L. D.; QIN, J. G. Swimbladder inflation and its implication to the culture of marine finfish larvae. **Reviews in Aquaculture**, v. 2, n. 4, p. 181-190, 2010. ISSN 1753-5123.

XIE, Z. et al. Behavioral and biochemical responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to sertraline. **Chemosphere**, v. 135, p. 146-155, 2015. ISSN 0045-6535.

XU, E. G. et al. Time- and Oil-Dependent Transcriptomic and Physiological Responses to Deepwater Horizon Oil in Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*) Embryos and Larvae. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 14, p. 7842-7851, 2016/07/19 2016. ISSN 0013-936X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02205> >.

YANG, D. et al. Chlorpyrifos-oxon disrupts zebrafish axonal growth and motor behavior. **Toxicological Sciences**, v. 121, n. 1, p. 146-159, 2011. ISSN 1096-6080.