



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

ROMULO NEPOMUCENO ALVES

**Análise de risco e ecotoxicologia dos efluentes de postos
revendedores de combustíveis de Recife**

RECIFE

2017

ROMULO NEPOMUCENO ALVES

**Análise de risco e ecotoxicologia dos efluentes de postos
revendedores de combustíveis de Recife**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: **Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho**

RECIFE

2017

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Alves, Romulo Nepomuceno

Análise de risco e ecotoxicologia dos efluentes de postos revendedores de combustíveis de Recife / Romulo Nepomuceno Alves- Recife: O Autor, 2017.

81 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Animal, 2017.

Inclui referências

1. Toxicologia ambiental 2. Resíduos 3. Postos de gasolina I. Carvalho, Paulo Sérgio Martins de (orientador) II. Título

571.95

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-192

ROMULO NEPOMUCENO ALVES

**Análise de risco e ecotoxicologia dos efluentes de postos
revendedores de combustíveis de Recife**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Aprovado em 16/02/2017.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Giovanni Amadeu Paiva dos Santos (1º Titular)
Departamento de Zoologia – UFPE

Profa. Dra. Lilia Pereira de Souza Santos (2º Titular)
Departamento de Oceanografia – UFPE

Profa. Dra. Mônica Lúcia Adam (3º Titular)
Departamento - CAV – UFPE

Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres (Suplente Interno)
Departamento de Zoologia – UFPE

Profa. Dra. Daniele Claudino Maciel (Suplente externo)
Departamento de Oceanografia - UFPE

RECIFE
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a minha família (irmãs, avós, tios...) e amigos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, tanto na parte acadêmica, quanto nos momentos extra lab.

Agradeço especialmente a minha mãe, por ter me incentivado desde o início da graduação a seguir atrás do meu sonho, por mais difícil, árduo e doloroso que ele possa ser.

Agradeço a minha esposa Amanda, pela companheira que vem sendo a incontáveis anos, pelo exemplo de pessoa humilde e que transcende uma luz enorme a cada sorriso. Obrigado por não me deixar fraquejar, por tornar meus dias sempre especiais e por ter me presenteado com nossa filha, a pequena Júlia.

Agradeço ao meu orientador Paulo Carvalho por sempre acreditar em mim e no meu potencial, pelas inúmeras ajudas, aconselhamentos e orientações, tanto profissionais como pessoais. Obrigado por me mostrar os caminhos, mesmo que estreitos algumas vezes, para ser um bom pesquisador e não menos importante, uma boa pessoa. Tenha certeza que por onde o senhor passa marcas de gratidão são fincadas.

Agradeço a todos os meus amigos de laboratório (LABECO), Laurinha, Ju, Luiz, Aline, Gaby, e Helena, pelas inúmeras ajudas na minha chegada no Lab, nas dúvidas e erros. Agradeço a Driele, pelos momentos de descontração e de trabalho, aguentando sempre nossas piadas para consigo. Agradeço aos estagiários que hoje estão no Lab e os que passaram, mas que contribuíram com a realização deste trabalho (Raíssa, Maria, Adélia, Lícia...) e especialmente a Célio, que fez com que a preparação e conclusão de muitos testes fossem realizadas de forma menos cansativa, estando sempre disponível para qualquer solicitação minha. Você tem futuro garoto... não que os demais não tenham (risos).

Agradeço aos amigos do PPGBA, Lira, Jaire, Celina, Rodolfo, Cori, Tarci, Diego, Rodrigo, Philippe, Leo, Helô, Éder e a agregada Ana, que mesmo estando dispersos se fazem presentes nos meus dias.

Aos amigos mais que especiais que fiz na graduação e que se conservam até então, sabendo eu que essa amizade será lembrada por toda a vida, Jhon, Rai, Bruna, Paulinha, Íkaro e Arthur. Ter vocês como amigos é um privilégio para poucos.

E por fim, agradeço aos órgãos que possibilitaram a execução deste trabalho, a UFPE e FACEPE.

RESUMO

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos derivados do petróleo que são conhecidos pelo seu potencial tóxico para diversos tipos de organismos, principalmente os que vivem em ambientes aquáticos. Dentre as principais fontes de HPAs em áreas urbanas estão os postos revendedores de combustíveis, por armazenarem grande quantidade de combustíveis fósseis e se encontrarem dispersos em todo o mundo. Além dos impactos causados pelos vazamentos nos tanques de armazenamento desses postos, os resíduos gerados nas atividades de abastecimento também de apresentam como uma possível fonte de HPAs para os ecossistemas aquáticos, já que esses resíduos são armazenados em sistemas de separação de água e óleo (SSAO) e, em geral, são descartados em galerias de águas pluviais. Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar a toxicidade desses efluentes para embriões e larvas do peixe *Danio rerio* (zebrafish), e analisar a concentração química de HPAs dos efluentes das caixas separadoras de água e óleo de postos de combustíveis (ECSPC), através de análises de fluorescência fixa. Além disso, o trabalho também avaliou diferenças na sensibilidade entre os estágios iniciais de desenvolvimento de embriões e larvas do zebrafish, expostos aos ECSPCs. As coletas dos efluentes foram realizadas em 6 postos de gasolina da cidade do Recife. Após filtração para obtenção da fração solúvel, embriões com 4 horas após a fertilização (hpf) foram expostos em placas de 24 poços, por 96 horas, segundo OECD 236 (2013), e analisados os efeitos causados no desenvolvimento integrados pelo índice morfológico geral (GMS) e na mortalidade. Para avaliação de diferenças na sensibilidade, embriões 4 hpf e larvas 72 hpf foram expostos em placas e béqueres por 96 h, e a sensibilidade determinada a partir da mortalidade dos indivíduos e cálculo da concentração letal a 50% dos organismos (CL50). Todos os efluentes se mostraram teratogênicos para os embriões do zebrafish, causando decréscimos significativos no GMS, incluindo patologias como cardiotoxicidade, ausência de bexiga natatória, edema pericárdico, hemorragia, e malformação da boca. A CL50_{96h} atingiu 8.9% (v/v) nos efluentes mais tóxicos, com concentração de HPAs de 11 µg fenantreno equivalente L⁻¹. Embriões se mostraram mais sensíveis que larvas para todos os efluentes utilizados, apresentando CL50_{96h} de 3,5%, 5,2%, 7,6% e 10% (v/v) de diluição dos ECSPCs, enquanto que para larvas não foi possível calcular as CL50, visto que a mortalidade não passou de 30%. A partir dos resultados encontrados ficou evidente a toxicidade dos ECSPCs para estágios iniciais de desenvolvimento de *Danio rerio*, sendo necessário um controle adequado do descarte desse resíduo. Além disso, o presente estudo concluiu que

a fase de desenvolvimento que envolve desde embriões 4 hpf até a fase inicial de larva é o estágio de desenvolvimento mais sensível para os ECSPCs que contem HPAs na sua constituição, e deve ser priorizado para avaliações deste tipo de efluente.

Palavras-chave: *Danio rerio*. HPA. Embriões. Larvas. Toxicidade. Efluentes. Postos de gasolina.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are compounds derived from petroleum that are known for their toxic potential for various types of organisms, especially those living in aquatic environments. Gasoline stations are among the main sources of PAHs in urban areas, where large amounts of fossil fuels are stored, and are scattered around the world. In addition to the impacts caused by the leaks in the storage tanks of these stations, the waste generated in the supply activities also present as a possible source of PAHs for aquatic ecosystems, since these wastes are stored in water and oil separation systems (WOSS) and are generally discarded in rainwater galleries. The objective of this study was to evaluate the toxicity of these effluents to embryos and larvae of the fish *Danio rerio* (zebrafish), and to analyze the chemical concentration of PAHs of effluents from water separators and oil from fuel stations (ECSPC) through Fixed fluorescence analyzes. In addition, the study also evaluated differences in sensitivity between the early embryo development stages and zebrafish larvae exposed to ECSPCs. The effluents were collected at 6 gas stations in the city of Recife. After filtration to obtain the soluble fraction, embryos with 4 hours after fertilization (hpf) were exposed in 24-well plates for 96 hours, according to OECD 236 (2013), and analyzed the developmental effects integrated by the general morphological score (GMS) and mortality. To evaluate differences in sensitivity, embryos 4 hpf and larvae 72 hpf were exposed in plates and beakers for 96 h, and the sensitivity determined from the mortality of the individuals and calculation of the lethal concentration at 50% of organisms (LC50). All effluents were teratogenic to zebrafish embryos, causing significant decreases in GMS, including pathologies such as cardiotoxicity, lack of swimming bladder, pericardial edema, hemorrhage, and malformation of the mouth. The LC50_{96h} reached 8.9% (v/v) in the most toxic effluents, with a concentration of PAHs of 11 µg phenanthrene equivalent L-1. Embryos were more sensitive than larvae to all effluents used, with LC50_{96h} of 3.5%, 5.2%, 7.6% and 10% (v/v), whereas for larvae it was not possible to calculate LC50, since mortality did not exceed 30%. From the results found, the toxicity of ECSPCs to early stages of development of *Danio rerio* was evident, and an adequate control of the disposal of this residue was necessary. In addition, the present study concluded that the development phase from 4 hpf embryos to the initial larval phase is the most sensitive stage of development for ECSPCs containing PAHs in their constitution and should be prioritized for evaluations of this type of effluent.

Key words: *Danio rerio*. PAF. Embryo. Larvae. Toxicity. Effluents. Gasoline station.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características fundamentais das respostas biológicas dos organismos aos contaminantes em diferentes níveis de organização biológica.....	16
Figura 2. Estrutura molecular dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos considerados prioridade em pesquisa pela agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA).....	18
Figura 3. Modelo de exposição em placa de 24 poços.....	23
Figura 4. Ovo de zebrafish mostrando sinais de coagulação 4h pós-fertilização (hpf) (B) e embrião normal 4 hpf (A).....	24
Figura 5. General Morfology Score, com os marcos morfológicos avaliados a cada 24 horas de exposição.....	25
Figura 6. Desenvolvimento e pontuação da cauda em um embrião controle de <i>Danio rerio</i>	27
Figura 7. Presença dos somitos.....	27
Figura 8. Desenvolvimento dos olhos.....	28
Figura 9. Pigmentação da cabeça e do corpo, e da cauda.....	29
Figura 10. Desenvolvimento da nadadeira peitoral.....	30
Figura 11. Desenvolvimento da boca.....	30
Figura 12. Eclosão.....	31
Figura 13. Extensão do saco vitelínico quase vazia após 96 h de exposição.....	32
Figura 14. Modelo de caixa separadora de água e óleo (CSAO) ZEPPINI comumente utilizada em postos revendedores de combustível.....	34

Manuscrito I

Figura 1. Valores do “General Morphology Score” (GMS) para embriões expostos a frações solúveis em água de efluentes dos postos de gasolina 1, 2, 3 e 4.....	51
Figura 2. Relação concentração-resposta (modelo probito) entre a porcentagem de larvas sem inflação da bexiga (y) e concentrações equivalentes de HPAs por fluorescência fixa (x).....	52

Manuscrito II

Figura 1. Taxas de mortalidade de embriões expostos aos efluentes dos postos 1 e 2 utilizando béqueres.....	65
Figura 2. Taxas de mortalidade de embriões expostos aos efluentes dos postos 3 e 4 utilizando placas de cultivo de células.....	66

Figura 3. Taxas de mortalidade de larvas expostas aos efluentes dos postos 1 e 2 utilizando béqueres.....	67
Figura 4. Taxas de mortalidade de larvas expostas aos efluentes dos postos 3 e 4 utilizando placas de cultivo de células.....	68
Figura 5. Taxas de mortalidade (média \pm desvio padrão) de embriões e larvas expostos em béqueres aos efluentes testados.....	68

LISTA DE TABELAS

Manuscrito I

Tabela 1. Concentrações de equivalentes de fenantreno, naftaleno e criseno dos ECS dos postos 1, 2, 3 e 4.....53

Tabela 2. Frequência (%) de anomalias registradas em larvas do zebrafish expostas à fração solúvel de efluentes de postos de gasolina (GS) após uma exposição de 96 horas.....53

Manuscrito II

Tabela 1. Concentrações de equivalentes de fenantreno, naftaleno e criseno dos ECS dos postos 1, 2, 3 e 4.....69

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT: Agência Brasileira de Normas Técnicas

AhR: Receptor Ah

ANP: Agência Nacional do Petróleo

CENO: Concentração de efeito não observado

CEO: Concentração de efeito observado

CL50: Concentração letal para 50% dos indivíduos expostos

CRY: Chrysene

CSAO: Caixa separadora de água e óleo

ECSPC: Efluente de caixa separadora de postos de combustíveis

EPA: Environmental Protection Agency

EROD: Etoxiresorufina orto-deetilase

FET: Fish embryo test

FF: Fixed fluorescence

GMS: General morphology score

GS: Gasoline station

HPA: Hidrocarboneto policíclico aromático

HPF: Horas pós-fertilização

IMG: Índice morfológico Geral

NAP: Naphthalene

OWS: oil-water separators

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development

PCB: Bifenilos policlorados

PHE: Phenanthrene

RFU: Relative fluorescence units

SSAO: Sistema de separação de água e óleo

WSF: Water soluble fraction

ZET: Zebrafish embryotoxicity test

Sumário

I FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
I.1 ECOTOXICOLOGIA	15
I.2 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs).....	17
I.2.1 Fontes e composição	17
I.2.2 Naftaleno, fenantreno e criseno.....	19
I.3 ECOTOXICOLOGIA DE HPAs EM PEIXES	20
I.3.1 Efeitos moleculares e bioquímicos.....	21
I.3.2 Efeitos no desenvolvimento	22
I.3.2.1 Índices morfológicos	22
I.3.2.1.1 Desenho experimental	23
I.3.2.1.2 Destacamento da cauda	26
I.3.2.1.3 Formação dos somitos	27
I.3.2.1.4 Desenvolvimento dos olhos	27
I.3.2.1.5 Movimento	28
I.3.2.1.6 Circulação.....	28
I.3.2.1.7 Batimento Cardíaco.....	29
I.3.2.1.8 Pigmentação da cabeça e do corpo, e da cauda.....	29
I.3.2.1.9 Nadadeira peitoral	30
I.3.2.1.10 Protrusão da boca	30
I.3.2.1.11 Eclosão	31
I.3.2.1.12 Extensão do saco vitelínico quase vazia	32
I.3.2.1.13 Análise estatística do GMS	33
I.4 EFLUENTES DE POSTOS REVENDEDORES DE COMBUSTÍVEIS.....	33
I.5 Danio rerio COMO MODELO PARA TESTES ECOTOXICOLÓGICOS	34
I.6 OBJETIVOS.....	36
I.6.1 Manuscrito I	36

I.6.1.1 Objetivo Geral	36
I.6.1.2 Objetivos Específicos	36
I.6.2 Manuscrito II	36
I.6.2.1 Objetivo Geral	36
I.6.2.2 Objetivo Específico	36
I.7 REFERÊNCIAS	37
II MANUSCRITO I	42
ABSTRACT	42
1. INTRODUCTION	43
2. MATERIALS AND METHODS	44
2.1 Effluent sampling	44
2.2 Danio rerio cultivation and embryo exposure	45
2.3 Experimental design	45
2.4 Global Morphology Score	45
2.5 Frequency of abnormalities after the 96 h exposure.....	46
2.6 Fixed fluorescence quantification of PAHs in effluents.....	46
2.7 Analysis of ammonia	47
2.8 Statistical Analysis	47
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	47
4. CONCLUSION	50
ACKNOWLEDGEMENTS.....	50
REFERENCES	55
III MANUSCRITO II	59
RESUMO.....	59
1. INTRODUÇÃO.....	60
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
2.1 Obtenção das Amostras	62

2.2 Cultivo e Obtenção dos embriões e larvas.....	62
2.3 Testes de toxicidade com Danio rerio	63
2.3.1 Teste de toxicidade com embriões.....	63
2.3.2 Teste de toxicidade com larvas.....	64
2.4 Quantificação da concentração dos HPAs presentes nas amostras	64
2.5 Análise dos dados	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4. CONCLUSÕES	71
5. REFERÊNCIAS	73
1.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81

I FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

I.1 ECOTOXICOLOGIA

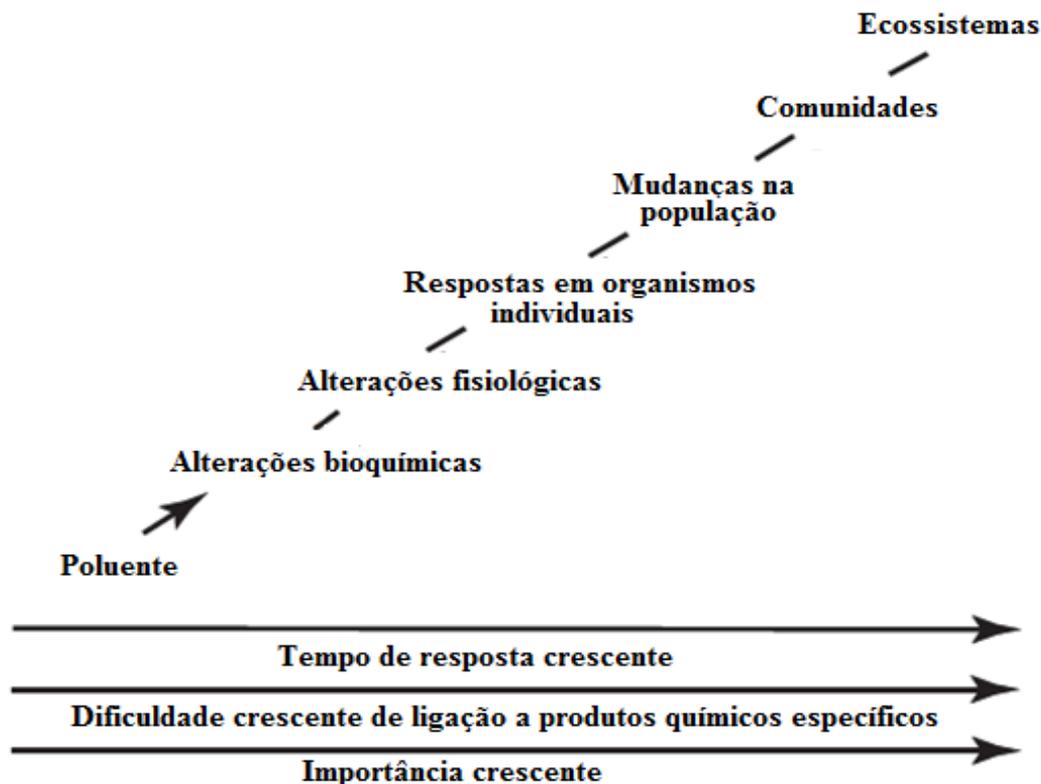
O século XX foi marcado por grandes avanços tecnológicos, os quais proporcionaram uma maior produção industrial, petroquímica, na agricultura, saúde, dentre outras, possibilitando, assim, um maior e mais rápido crescimento econômico dos países desenvolvidos e subdesenvolvidos. No entanto, esse crescimento econômico junto com o crescimento exponencial da população humana a partir da revolução industrial aumentou consideravelmente a busca por recursos naturais e, conseqüentemente, a pressão exercida sobre o ambiente natural. À medida que a humanidade aumenta sua capacidade tecnológica de intervir na natureza para satisfazer suas necessidades e desejos crescentes, surgem os conflitos quanto ao uso do espaço, dos recursos e da disposição dos resíduos no ambiente (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Com o crescimento da utilização de compostos químicos nas atividades agrícolas e nas indústrias, começou a surgir uma preocupação sobre os possíveis impactos que esses compostos e seus resíduos poderiam causar ao homem. Muitos dos compostos que ocorrem naturalmente exercem ações inseticidas e essa propriedade foi aproveitada comercialmente, sendo comercializando como inseticidas ou usando-os como modelos para o desenvolvimento de novos inseticidas (BEASLEY e LEVENGOOD, 2012). Então, em 1962, o livro “Silent Spring” de Rachel Carson é publicado, tendo uma grande repercussão mundial, pois relatava estudos de inúmeros cientistas da época que demonstravam como o uso em larga escala de pesticidas organoclorados poderia causar efeitos tóxicos em espécies de vida selvagem vivendo em ambientes contaminados por estes compostos. Isto levanta imediatamente a questão de que qual concentração deve ser considerada normal. Para a maioria das substâncias químicas orgânicas sintéticas, como os pesticidas, qualquer nível detectável é anormal, porque os compostos não existiam no ambiente até que os seres humanos os liberassem. Por outro lado, produtos químicos como metais, dióxido de enxofre, óxidos de nitrogênio, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e metilmercúrio ocorrem naturalmente e existiam no ambiente antes que os seres humanos aparecessem. (BEASLEY e LEVENGOOD, 2012).

Dessa forma, em 1969, o termo Ecotoxicologia foi proposto por René Truhaut, conceituado como um ramo da toxicologia que investiga os efeitos tóxicos de poluentes químicos nos ecossistemas, abrangendo desde sua entrada no ambiente até suas implicações nos organismos, populações e comunidades expostos (TRUHAUT, 1977). Atualmente, a Ecotoxicologia pode ser conceituada como a ciência que estuda os efeitos deletérios não-

intencionais causados por contaminantes químicos nos ecossistemas e organismos que os constituem de forma não intencional (WALKER, 2005), tendo como paradigma central a relação entre a dose ou concentração na qual o organismo é exposto e a resposta acarretada por essa exposição (relação dose-resposta), onde a resposta pode ser desde a nível bioquímico até a nível ecossistêmico (figura 1). Devido à sua importância ecológica, os efeitos causados nos níveis mais altos de organização biológica são de maior interesse para os estudos ecotoxicológicos. Dessa forma, os efeitos de agentes químicos estressores sobre os organismos aquáticos estão sendo determinados de forma integradora em indivíduos e, em alguns casos, estão sendo estendidos aos níveis populacionais e comunitários de organização biológica (DI GIULIO e HINTON, 2008). No entanto, correlacionar os efeitos causados em níveis mais baixos da organização biológica com efeitos a níveis populacionais e ecossistêmicos é um desafio, visto que muitas substâncias químicas existem em diferentes formas, devido a reações químicas e bioquímicas, onde as concentrações e identificações variam com a localização e o tempo, diferindo assim entre os componentes dentro do ecossistema aquático (DI GIULIO e HINTON, 2008).

Figura 1. Características fundamentais das respostas biológicas dos organismos aos contaminantes em diferentes níveis de organização biológica



Fonte: TRUHAUT (1977).

Dentre os ecossistemas suscetíveis à poluição, os ambientes aquáticos se apresentam como sistemas altamente vulneráveis, possuindo uma cadeia alimentar bem delimitada, e sem muita influência da cadeia alimentar terrestre, aumentando a tendência de acumulação de contaminantes persistentes nos níveis mais altos, como predadores aquáticos (DI GIULIO e HINTON, 2008). O consumo total de hidrocarbonetos de petróleo no meio marinho foi estimado em 3,2 milhões de toneladas por ano e embora as catástrofes de petroleiros possam causar grandes danos, as quantidades que libertam são muito menores do que os derrames das operações normais dos navios-tanque, e as descargas dos resíduos industriais e municipais (BEASLEY e LEVENGOOD, 2012).

Por ser o principal receptor dos resíduos municipais e industriais, e pela importância econômica e ecológica, a contaminação de ecossistemas aquáticos continentais se tornaram uma grande preocupação para os estudos ecotoxicológicos, tendo hoje uma vasta literatura sobre impactos causados na biota por diversos tipos de contaminantes. Esses contaminantes variam de acordo com a operação ali exercida, podendo ser metais, fertilizantes, fungicidas e inseticidas, além de uma grande variedade de produtos químicos orgânicos, como hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, que são presença constante nos ecossistemas de águas continentais. Dessa forma, os ensaios ecotoxicológicos se apresentam como uma importante ferramenta para análise do risco ambiental das substâncias químicas e no monitoramento desses ecossistemas.

I.2 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs)

I.2.1 Fontes e composição

O petróleo é composto basicamente por hidrocarbonetos (97%) (NRC, 2003), formado pela decomposição de matéria orgânica, em terrenos sedimentares de áreas marítimas e terrestres. O petróleo é extraído a partir de plataformas, separado dos demais fluidos (água e gás) e depois é transportado para as refinarias. Para que haja o seu aproveitamento energético adequado, o petróleo passa por diversos processos nas refinarias até que seus produtos finais, como gasolina, diesel, óleo combustível, querosene, entre outros, sejam distribuídos para os revendedores e por fim chegue ao consumidor final.

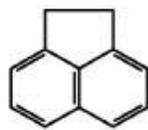
Dentre os hidrocarbonetos que compõem o petróleo e seus derivados, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são considerados como os mais problemáticos para o meio ambiente por apresentarem um potencial de toxicidade elevado para diversos

grupos de animais aquáticos, como moluscos (NAHRGANG *et al.*, 2013), crustáceos (REN *et al.*, 2015) e peixes (PAYNE *et al.*, 2003), causando anormalidades como disfunção cardíaca, anemia, morte neuronal e defeitos no sistema vascular periférico (NETTO *et al.*, 2000). Além desses grupos, os HPAs também se apresentam como potencialmente tóxicos para aves (LUZARDO *et al.*, 2014) e mamíferos (SIDDENS *et al.*, 2015), incluindo humanos (GENKINGER *et al.*, 2015), sendo precursores de ações mutagênicas e tumorais (WHO, 1983). Os HPAs são distinguidos pela presença de um ou mais anéis benzênicos (estruturas insaturadas formadas por seis carbonos) em sua composição (BEASLEY e LEVENGOOD, 2012). O aumento no número de anéis benzênicos (2 a 6) torna a molécula mais estável, menos solúvel em água e com maior tendência de bioconcentrar ou bioacumular em organismos (ERICKSON *et al.*, 2008).

Embora os hidrocarbonetos não aromáticos predominem nos depósitos de petróleo e gás natural, os óleos brutos contêm também quantidades significativas de HPAs. Os HPAs são formados pela combustão incompleta de materiais orgânicos e são assim gerados quando o carvão, óleo e gasolina são queimados, quando árvores ou casas queimam, e quando as pessoas fumam cigarros. As principais fontes de poluição por hidrocarbonetos são os derrames de óleos brutos e a combustão de combustíveis fósseis (BEASLEY e LEVENGOOD, 2012), tendo os postos distribuidores de combustíveis como alvo de significativa preocupação, por apresentarem uma grande quantidade de combustíveis fósseis estocada e estão distribuídos mundialmente.

Para esse grupo, 16 hidrocarbonetos poliaromáticos são considerados importantes no monitoramento ambiental de acordo com a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos da América (EUA) (CRISTALE *et al.*, 2008) (Figura 2). Dentre eles, o naftaleno, o fenantreno e o criseno se tornaram altamente relevantes ambientalmente por constituírem uma grande parte dos HPAs presentes nos óleos brutos que podem contaminar os ambientes aquáticos (CARLS *et al.*, 2002), sendo o criseno indicador relevante de áreas impactadas por petróleo e seus derivados, e utilizado em testes padrões para detecção de HPAs totais em água (LEMOS *et al.*, 2014).

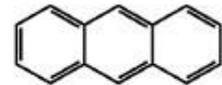
Figura 2. Estrutura molecular dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos considerados prioridade em pesquisa pela agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA).



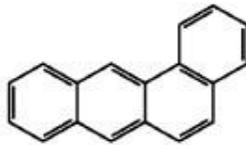
Acenafteno



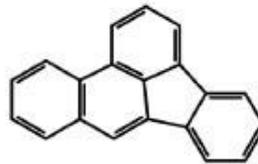
Acenaftileno



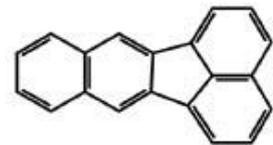
Antraceno



Benzo[a]antraceno



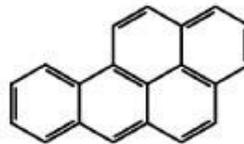
Benzo[e]acefenantrileno



Benzo[k]fluoranteno



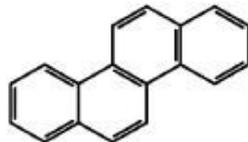
Benzo[g,h,i]perileno



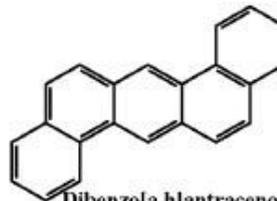
Benzo[a]pireno



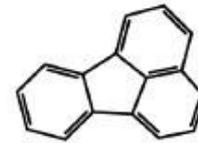
Pireno



Criseno



Dibenzo[a,h]antraceno



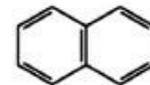
Fluoranteno



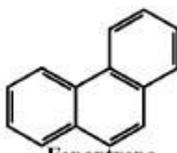
Fluoreno



Indeno[1,2,3-cd]pireno



Naftaleno



Fenantreno

Fonte: USEPA

I.2.2 Naftaleno, fenantreno e criseno

O naftaleno é um HPA formado por dois anéis aromáticos, com solubilidade em água de $31,7 \text{ mg L}^{-1}$, densidade $1,14 \text{ g cm}^{-3}$, baixa massa molecular (128 g mol^{-1}), $\log K_{ow}$ de 3,36 (MIRANDA, 2008; CCME, 2014). É considerado o principal HPA encontrado em diversos ambientes contaminados por petróleo bruto (RADKE *et al.*, 1994; FAKSNESS *et al.*, 2015), também sendo utilizado na preparação de ácido salicílico, antraquinona, índigo e do inseticida

1-naftil-N-metilcarbamato (MIRANDA, 2008). Entre os efeitos causados em ecossistemas aquáticos, pela exposição ao naftaleno, estão o aumento da lipoperoxidação (AHMAD *et al.*, 2003) e da atividade de enzimas de estresse oxidativo (ALI e LIU, 2013).

O fenantreno apresenta em sua estrutura molecular três anéis aromáticos, massa molecular de $178,22 \text{ g mol}^{-1}$, solubilidade em água de $1,15 \text{ mg L}^{-1}$ e $\log K_{ow}$ de 4,46 (CCME, 2014), sendo também, um dos principais hidrocarbonetos encontrados em amostra de petróleo bruto (UNEP, 1991). Este HPA é altamente tóxico para diversos organismos, incluindo gastrópodes, mexilhões, crustáceos e peixes (CORREIA *et al.*, 2007). Dentre os efeitos causados em peixes estão letargia (TORREIRO-MELO *et al.*, 2015), diminuição da acuidade visual e da captura de presas (CARVALHO *et al.*, 2008), cardiotoxicidade, edemas, hemorragias, malformação e mortalidade em estágios iniciais de desenvolvimento (INCARDONA *et al.*, 2006; CARLS *et al.*, 2008; WOLINSKA *et al.*, 2011; SEILER *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2017).

O criseno é formado por quatro anéis aromáticos, massa molecular de $228,3 \text{ g mol}^{-1}$, solubilidade em água de 2 a $6,3 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ e $\log K_{ow}$ 5,7 (CCME, 2014). O criseno é considerado um HPA de alto peso molecular, e devido ao seu alto valor de K_{ow} , tende a bioacumular nos organismos, apresentando um alto potencial carcinogênico (CCME, 2014). Este HPA é oriundos principalmente da combustão incompleta de combustíveis fósseis e biomassa vegetal, e dentre os possíveis efeitos causados em organismos aquáticos está a genotoxicidade (MEYER *et al.*, 2014).

I.3 ECOTOXICOLOGIA DE HPAS EM PEIXES

Ambientes aquáticos são altamente vulneráveis a poluição e contaminação por agentes tóxicos oriundos de indústrias e da área urbana, fazendo com que estudos ecotoxicológicos nessas áreas se mostrassem como uma ferramenta importante para analisar, alertar e prevenir possíveis impactos causados na biota ali presente. Dessa forma, devido ao papel ecológico desempenhado no ecossistema aquático e sua relevância econômica, o uso de peixes na ecotoxicologia cresceu consideravelmente (TORREIRO-MELO, 2015), onde os efeitos causados por contaminantes em peixes podem ser desde níveis celulares, como alterações enzimáticas, imunológicas e genéticas, até efeitos em níveis mais elevados de organização biológica, como alterações histopatológicas, reprodutivas, comportamentais, no crescimento e recrutamento, podendo comprometer as populações (PAYNE *et al.*, 2003).

I.3.1 Efeitos moleculares e bioquímicos

A principal via de exposição de peixes aos contaminantes é a absorção direta da água através das brânquias, podendo também ser feita pela ingestão de alimentos e/ou resíduos adsorvidos nos sedimentos (BEASLEY e LEVENGOOD, 2012) e para facilitar a excreção desse contaminantes os mesmos são metabolizados no fígado (SCHLENK *et al.*, 2008). Neste processo de metabolização há a participação de enzimas de biotransformação de fases I e II, as quais podem ser induzidas ou reprimidas pela exposição a HPAs. Essas reações de metabolização produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), que promovem lipoperoxidação e oxidação, de proteínas e do DNA (LUSHCHAK, 2011), podendo ocasionar inclusive a morte celular. Um exemplo de enzima que participa do processo de desintoxicação de organismos expostos a HPAs é a enzima de biotransformação de fase I, CYP1A, etoxiresorufina-orto-deetilase (EROD). A EROD tem como substrato a 7-etoxiresorufina, e através de uma O-desalquilação, ocorre a formação de resorufina, que pode ser medida por espectrofluorimetria (RAMSDORF, 2011). O aumento da atividade da EROD é um indicador da indução da CYP1A, o que caracteriza a exposição a HPAs, além de outros contaminantes, como as dioxinas, furanos e bifenilas policloradas (WHYTE *et al.*, 2000).

Estudos anteriores demonstraram que o mecanismo de toxicidade dos HPAs varia de acordo com o número de anéis presentes em sua estrutura (INCARDONA *et al.*, 2004; INCARDONA *et al.*, 2005; LAETZ *et al.*, 2015). Devido a esses mecanismos não serem bem compreendidos, o receptor Ah (AhR) ganhou ênfase nos últimos anos, após a descoberta de sua elevada afinidade com compostos planares, tais como HPAs e dioxinas, e ligação com a toxicidade dos HPAs, a qual é semelhante à cardiotoxicidade causada pelas dioxinas (INCARDONA *et al.*, 2005; LAETZ *et al.*, 2015). No núcleo, o receptor Ah forma um complexo com o translocador nuclear do receptor Ah (ARNT), que subsequentemente se liga ao elemento de resposta xenobiótica (XRE, ou elemento de resposta à dioxina DRE) na região 5'- à montante dos genes CYP1A e CYP1B (UNO *et al.*, 2012). Após essa ligação se inicia o processo de transcrição do mRNA que será traduzido em aminoácidos e formará as proteínas P450.

Após o derramamento de óleo do Exxon Valdez alguns estudos demonstraram que os embriões de peixes expostos a níveis baixos de HPAs e a misturas de petróleo bruto desenvolvem edema pericárdico, e defeitos craniofaciais e de morfogênese (INCARDONA *et al.*, 2005; INCARDONA *et al.*, 2014). Uma variedade de anomalias da função cardíaca foi observada tanto com os HPAs tricíclicos como com o óleo bruto, o que sugere vários potenciais

alvos no miocárdio que, além dos canais de potássio, incluem canais sarcoplasmáticos ou de cálcio na membrana plasmática, bem como junções gap (INCARDONA *et al.*, 2005).

I.3.2 Efeitos no desenvolvimento

Nos testes ecotoxicológicos com peixes uma medida que é amplamente utilizada é a concentração letal para 50% dos indivíduos expostos. Essa medida foi e ainda é de grande valia para a ecotoxicologia, principalmente quando se faz necessária alguma tomada de decisão rápida pelos órgãos ambientais. No entanto, estudos ecotoxicológicos baseados apenas na mortalidade podem mascarar alguns efeitos subletais que comprometam o desenvolvimento normal do peixe, os quais podem culminar na morte do indivíduo posteriormente. Dessa forma, muitas investigações sobre os efeitos subletais causados em peixes por diversos contaminantes, foram sendo realizados, tendo hoje uma vasta literatura sobre tais efeitos em diversas espécies (CARVALHO e TILLITT, 2004; CARVALHO *et al.*, 2008; COLLIER *et al.*, 2013; TORREIRO-MELO *et al.*, 2015).

No final da década de 1980 e início da década de 1990, alguns pesquisadores começaram a investigar os efeitos causados principalmente por PCBs e HPAs em peixes da espécie *Fundulus heteroclitus* residentes no Rio Elizabeth, sudeste da Virgínia, Estados Unidos da América, encontrando evidências de que os estágios iniciais de vida são bastante sensíveis a estes contaminantes, apresentando alterações significativas no desenvolvimento, como malformação do corpo e cardiotoxicidade (DI GIULIO e CLARK, 2015). Alguns estudos realizados com embriões do zebrafish mostraram que os edemas pericárdicos e no saco vitelínico, formados após a exposição ao petróleo, são decorrentes de efeitos cardiotóxicos e que a exposição ao petróleo ou a HPAs tricíclicos causa defeitos específicos na taxa cardíaca, ritmo e contratilidade logo após o coração se formar, resultando em múltiplos impactos secundários na morfogênese cardíaca, tais como a falha na realização do looping, além de reduções da mandíbula e defeitos esqueléticos, como lordose ou escoliose (curvatura dorsal) (INCARDONA *et al.*, 2004; INCARDONA *et al.*, 2005; CARLS *et al.*, 2008).

I.3.2.1 Índices morfológicos

Uma grande variedade de ensaios alternativos para testes de toxicidade ligados ao desenvolvimento em animais foi desenvolvida ao longo dos anos. Por ser um teste rápido, barato e aplicável a várias classes de contaminantes, o ZET ganhou popularidade e teve um

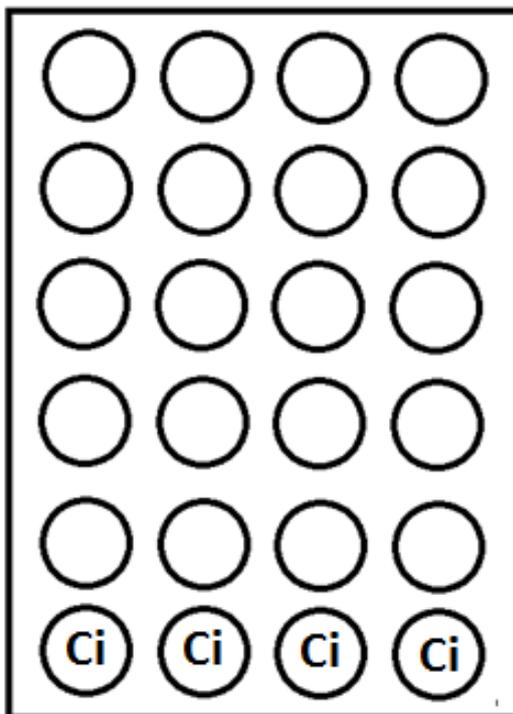
crescimento significativo em sua utilização a partir do ano 2000. Então, para padronizar a utilização do ZET, de forma a tornar sua aplicabilidade com uma maior uniformidade, foi proposto em 2011 o “General Morfology Score” (GMS) ou índice morfológico geral (IMG) (HERMSEN *et al.*, 2011). A partir do ano de 2013 o interesse pelo ZET para avaliar toxicidade sobre o desenvolvimento de embriões teve um crescimento exponencial, fazendo com que Beekhuijzen e colaboradores (2015) propusessem algumas alterações no GMS para deixá-lo ainda mais padronizado em sua utilização.

O “General Morfology Score” ou GMS consiste numa pontuação dada para alguns “*endpoints*”, ou marcos morfológicos, no desenvolvimento do embrião de *Danio rerio* em seu desenvolvimento normal, tendo assim, um padrão de marcos morfológicos medidos em determinados tempos durante o desenvolvimento do embrião e larva. Dessa forma, espera-se que embriões expostos a algum contaminante apresente alteração e/ou retardo no seu desenvolvimento, de forma que sua pontuação ao final da exposição seja diferente (menor) do que a pontuação de um embrião controle que se desenvolve perfeitamente.

I.3.2.1.1 Desenho experimental

Como modelo de exposição foi adotada a norma europeia para o teste de toxicidade aguda para embriões de peixe “Fish Embryo acute Toxicity (FET) test” (OECD, 2013a), que consiste na exposição a contaminantes em placas de poliestireno de 24 poços, por 96 horas, onde vinte indivíduos são expostos ao contaminante a ser testado e quatro são mantidos em água (controle interno) (figura 3). Além das placas de exposição, é prevista uma placa para controle com todos os embriões mantidos em água e uma placa com todos os embriões expostos a solvente, quando houver (controle do solvente).

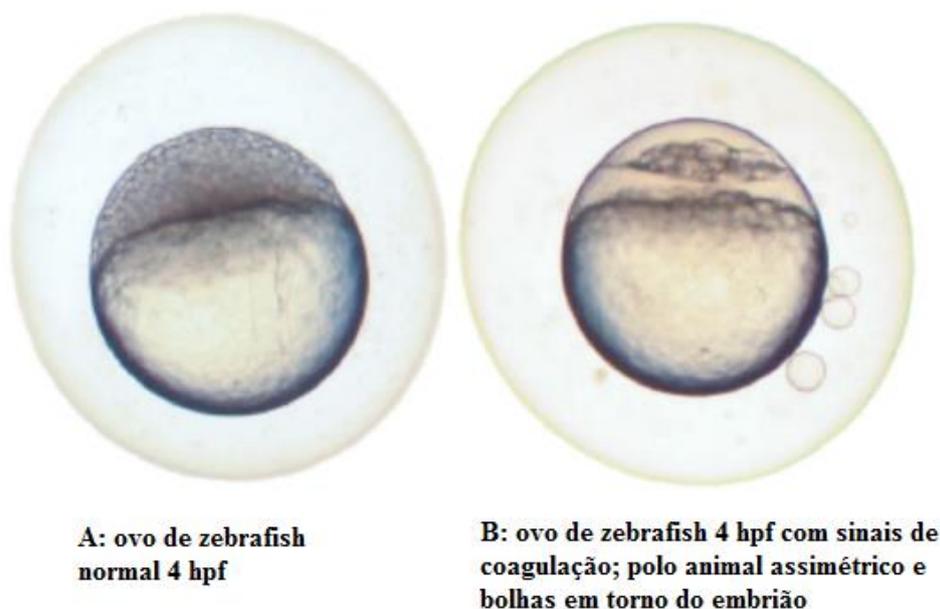
Figura 3. Modelo de exposição em placa de 24 poços, com 20 embriões expostos ao contaminante e 4 mantidos em água de cultivo, controle interno (CI), utilizada no GMS, como previsto na Norma OECD 236 (2013).



Fonte: OECD 236 (2013).

Antes de iniciar o teste, os ovos devem ser previamente selecionados, para que apenas ovos fertilizados mostrando um córion redondo e transparente, sem sinais de coagulação sejam utilizados. Os primeiros sinais de coagulação incluem formação de bolhas no ovo (especialmente em torno do polo animal) e assimetria do polo animal ou do vitelo (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015) (figura 4). Essa pré-seleção deve ser feita, preferencialmente, entre 3 e 4 horas pós-fertilização (hpf), de forma que a exposição dos embriões se inicie em no máximo 4 hpf, cobrindo o estágio de gastrulação precoce. Isto facilita a extrapolação dos resultados obtidos a partir de estudos de toxicidade de desenvolvimento de roedores, uma vez que a exposição cobriria os mesmos estágios de desenvolvimento (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015). Sendo assim, selecionar os embriões viáveis garante a validação inicial do teste e assegura que apenas os efeitos causados neles sejam oriundos do contaminante presente na solução.

Figura 4. Ovo de zebrafish mostrando sinais de coagulação 4h pós-fertilização (hpf) (B) e embrião normal 4 hpf (A). Bolhas e assimetria podem ser observadas no embrião (B), que estão ausentes no embrião normal (A)



Fonte: BEEKHUIJZEN *et al.* (2015).

Após a seleção dos embriões viáveis e montagem das placas com as concentrações escolhidas o teste é iniciado, com a avaliação do desenvolvimento dos embriões a 24, 48, 72 e 96h de exposição, utilizando um estereomicroscópio. Os pontos a serem computados no índice morfológico GMS são avaliados para cada aspecto da morfologia esperada do embrião em desenvolvimento que caracteriza os diferentes critérios ou “*endpoints*”, em relação ao seu estágio de desenvolvimento em dias e horas. Todos os desvios ou anomalias morfológicas em relação ao esperado, por exemplo, desprendimento incompleto da cauda ou falta de pigmentação, resultarão num menor número de pontos sendo computados e num índice GMS mais baixo. Uma pontuação mais baixa corresponderá a um certo grau de atraso no desenvolvimento ou malformações no embrião e larva (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

Nas primeiras 24 horas de exposição os marcos do desenvolvimento que são observados e pontuados são o destacamento da cauda, a formação dos somitos, o desenvolvimento dos olhos, movimentos e circulação (figura 5).

Figura 5. Tabela resumida do General Morfology Score, com os marcos morfológicos avaliados a cada 24 horas de exposição.

Hours of exposure	Reference in case of retardation	24	48	72	96
Detachment of the tail	 0	 2	 3	 3	 3
Somite formation	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
Eye development	 1	 2	 2 + 1 for pigment	 2 + 1 for pigment	 2 + 1 for pigment
Movement	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
Circulation	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
Heartbeat	No = 0	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
Pigmentation of the head and the body	0	 0	 1	 1	 1
Pigmentation of the tail	0	 0	 1	 1	 1
Yolk extension nearly empty					Yes = 1 No = 0
Pectoral fin	0	0	 0	 1	 1
Protruding mouth	0	0	 0	 1	 2
Hatching	No = 0	No = 0	No = 0	Yes = 1	Yes = 1
GMS		7	12	15	17

Fonte: BEEKHUIJZEN *et al.* (2015).

I.3.2.1.2 Destacamento da cauda

O destacamento da cauda é marcado com 1 se a cauda foi destacada até a extensão do saco vitelínico, pontuação 2 é dada quando a extensão do saco vitelínico também é destacada e

3 pontos são dados para desprendimento total da cauda a partir de 48 horas pós exposição (figura 6).

Figura 6. Desenvolvimento e pontuação da cauda em um embrião controle de *Danio rerio*.

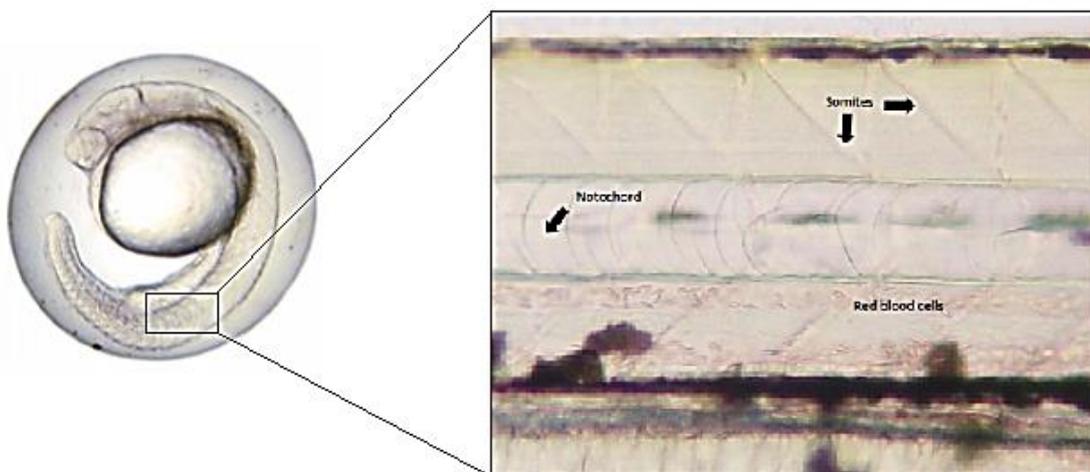


Fonte: BEEKHUIJZEN *et al.* (2015).

I.3.2.1.3 Formação dos somitos

A formação de somitos no embrião é pontuada com 0 ou 1, sendo 1 quando o somito é visível e 0 quando não estão visíveis (figura 5).

Figura 7. Somito presente. Pontuação 1.



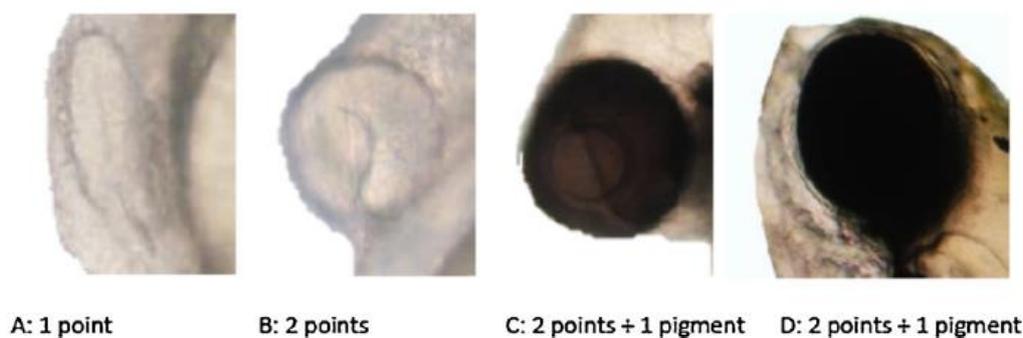
Fonte: HERMSEN *et al.* (2011) e BEEKHUIJZEN *et al.* (2015).

I.3.2.1.4 Desenvolvimento dos olhos

Quando não há olhos visíveis, o embrião leva pontuação 0. Quando os olhos são visíveis, mas planos, pontuação 1. Após o aparecimento de uma esfera, o desenvolvimento do olho é

marcado com 2 pontos (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015) (figura 7). A partir das 48 horas pós exposição, se os olhos apresentarem pigmentação, será acrescido 1 ponto extra para esse “*endpoint*” (figura 5).

Figura 8. Desenvolvimento dos olhos. A e B com desenvolvimento normal nas primeiras 24 horas; C com desenvolvimento normal após 48 de exposição; D com desenvolvimento normal 96 horas pós exposição.



Fonte: BEEKHUIJZEN *et al.* (2015).

I.3.1.2.5 Movimento

O movimento será marcado quando o embrião/larva mover a cauda ou o corpo inteiro. Quando as nadadeiras peitorais se desenvolverem, o movimento das mesmas também é considerado como movimento. O movimento pode ser espontâneo, ou após estimulação com pipeta pasteur de plástico, mas sem tocar no embrião. O estímulo deve ser feito com a inserção de ar no volume da solução do poço, criando um fluxo e bolhas no poço. Movimento pode ser marcado como ausente com 0 pontos, ou presente com 1 ponto (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015) (figura 5).

I.3.2.1.6 Circulação

Circulação sanguínea é pontuada com 0 quando ausente, e com 1 ponto quando presente. Uma circulação sanguínea existente de algumas células já é marcada com 1 ponto nas primeiras 24 horas de exposição. No entanto, este ponto de desenvolvimento ficará mais evidente após a observação do batimento cardíaco nas 48 horas de exposição (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

No período de 48 horas pós exposição o batimento cardíaco, a pigmentação da cabeça e do corpo, e a pigmentação da cauda são acrescentados no GMS (figura 5).

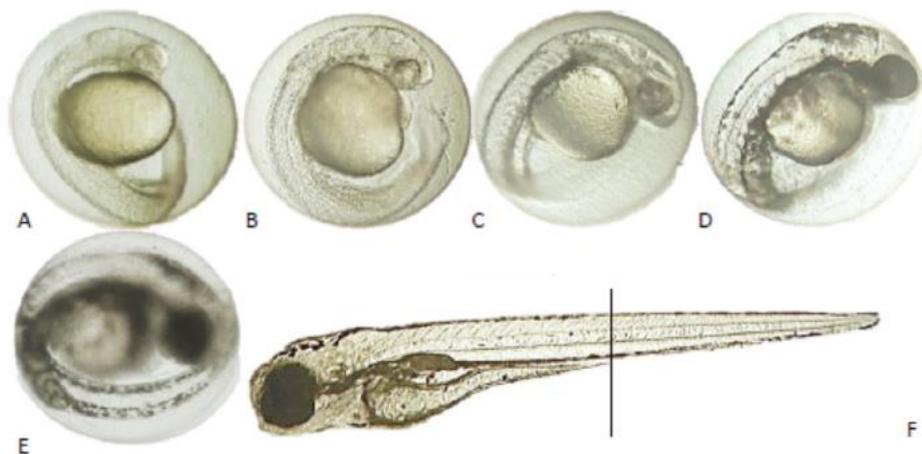
I.3.2.1.7 Batimento Cardíaco

O batimento cardíaco também é pontuado com 0 ou 1 de acordo com a ausência ou presença, respectivamente. Quando não for possível visualizar o batimento cardíaco, uma maior ampliação (de cerca de 100x) deve ser usada para melhor visualizar a região do coração para procurar a presença de um batimento cardíaco muito fraco. Isto é feito durante pelo menos 1 minuto até que um ou mais batimentos cardíacos distintos sejam anotados (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015) (figura 5).

I.3.2.1.8 Pigmentação da cabeça e do corpo, e da cauda

Assim como o batimento cardíaco a pigmentação da cabeça e do corpo, e da cauda é pontuada com 1 ponto quando presente e 0 pontos quando ausente. Durante o desenvolvimento normal, estes pontos do desenvolvimento aparecem após 48 de exposição (figura 5), tendo pontuações semelhantes. A pigmentação da cabeça e do corpo é avaliada como presente quando o pigmento é visível entre a cabeça e a extremidade do saco vitelínico. Já a pigmentação da cauda é avaliada como presente quando um padrão distinto de pigmento é visível a partir da extremidade da extensão do saco vitelínico para a cauda (figura 8). A pigmentação da cabeça e do corpo, é muitas vezes, visível mais cedo do que a pigmentação da cauda (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

Figura 9. Pigmentação da cabeça e do corpo, e da cauda. A: 0 pontos. B, C, D: 1 ponto para a cabeça e o corpo. E: 1 ponto para pigmentação da cauda. F: diferenciação entre corpo e cauda



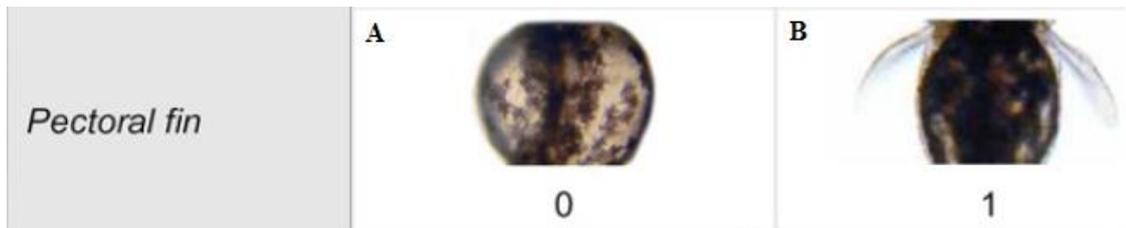
(BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

Após 72 horas de exposição, o desenvolvimento das nadadeiras peitorais, a protrusão da boca e a eclosão são acrescentados nas análises a serem feitas. Dessa forma, além dos “*endpoints*” previstos para análise nos tempos de exposição anteriores (24 e 48 h), mais três marcos morfológicos são acrescentados, tendo um embrião com seu desenvolvimento normal uma pontuação total de 15 pontos, nesse tempo de exposição (figura 15).

I.3.2.1.9 Nadadeira peitoral

A visibilidade das nadadeiras peitorais é pontuada com 0 pontos quando ausente e com 1 ponto de desenvolvimento quando presente, mesmo que apenas uma nadadeira esteja visível. As nadadeiras peitorais originam-se aproximadamente entre o coração e o fígado, estendendo-se posteriormente ao longo de cada lado da larva (figura 9).

Figura 10. Desenvolvimento da nadadeira peitoral. Em A nadadeira peitoral ausente, pontuação 0; em B nadadeira peitoral presente, pontuação 1.

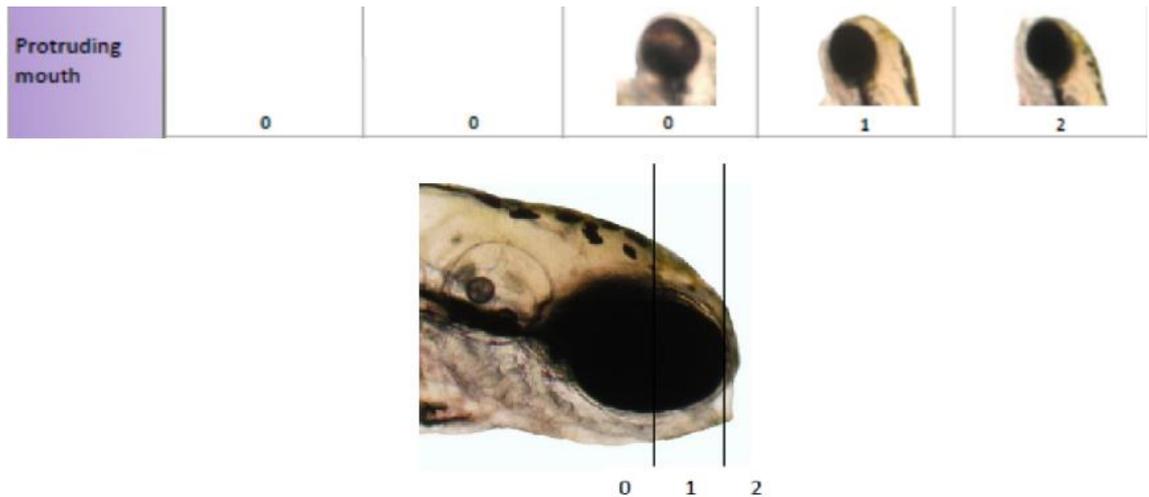


Fonte: HERMSEN *et al.* (2011).

I.3.2.1.10 Protrusão da boca

Uma boca protrusa está ausente (pontuação é 0) quando não é observada mandíbula inferior ou quando a mandíbula inferior atinge apenas cerca de metade do olho (ao nível da pupila). A presença de uma boca protrusa é marcada com 1 ponto de desenvolvimento quando a mandíbula inferior do embrião/larva atinge toda a extensão do olho e pontuação 2 quando a mandíbula inferior atinge a frente do olho ou mais (figura 10).

Figura 11. Desenvolvimento da boca. 0 pontos quando a mandíbula inferior não está presente ou quando a mandíbula inferior atinge somente até a metade do olho. 1 Ponto é dado quando a mandíbula inferior atinge de metade do olho para a frente do olho. 2 Pontos são dados quando a mandíbula inferior atinge pelo menos até a frente do olho.

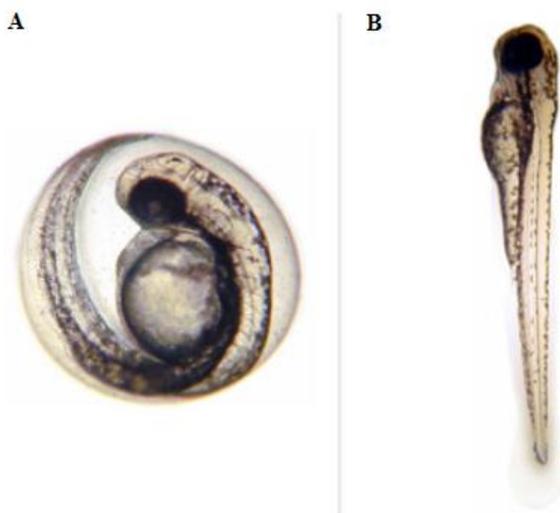


Fonte: BEEKHUIJZEN *et al.* (2015).

I.3.2.1.11 Eclosão

A eclosão é pontuada com 0 pontos quando não aplicável, e com 1 ponto quando aplicável. A eclosão é considerada aplicável quando o corpo do embrião não está mais cercado pelo córion, sendo considerado larva a partir deste momento (figura 11). Quando há eclosão antes ou depois das 72 horas pós exposição não haverá pontuação, mas essa observação deverá ser anotada, pois o tempo de exposição da larva (sem o córion) ao contaminante poderá ser influenciado (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

Figura 12. Eclosão. Em A embrião não eclodido ainda envolto pelo córion. Em B larva eclodia sem a proteção do córion. Em A pontuação 0, em B pontuação 1 em 72 hpf.



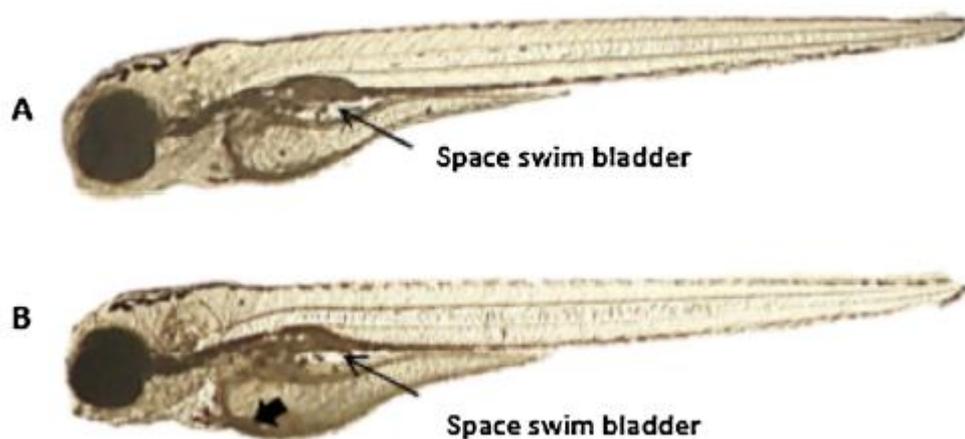
Fonte: HERMSEN *et al.* (2011).

Por fim, em 96 horas pós exposição, acrescenta-se o último “*endpoint*” para análise (extensão do saco vitelínico quase vazio), totalizando 12 marcos morfológicos a serem analisados nesse tempo de exposição, tendo um embrião com desenvolvimento normal uma soma total de 17 pontos (figura 5).

I.3.2.1.12 Extensão do saco vitelínico quase vazia

Esse marco morfológico é pontuado com 1 quando a extensão do saco vitelínico estiver quase vazia e com 0 para não aplicável. A avaliação deste “*endpoint*” é feita observando se a espessura do saco vitelino não excede o coração, permitindo a visualização de um espaço onde a bexiga natatória será situada (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015) (figura 12). Um embrião que apresente problema na absorção do vitelo, provavelmente não irá pontuar neste item, visto que o saco vitelínico estará cheio e sua espessura excederá o coração, comprimindo assim a extensão do saco vitelínico de forma que não haverá espaço para desenvolvimento da bexiga natatória.

Figura 13. Extensão do saco vitelínico quase vazia após 96 h de exposição. A: 1 ponto para extensão do saco vitelínico vazia. B: 0 pontos para extensão do saco vitelínico quase vazia. O saco vitelínico em B excede o coração (seta grossa). Ambos mostram espaços onde a bexiga natatória será situada.



Fonte: BEEKHUIJZEN *et al.* (2015).

I.3.2.1.13 Análise estatística do GMS

Após a análise de todos os “*endpoints*” e dada as devidas pontuações para cada embrião, pode-se verificar se houve retardo no desenvolvimento de alguns embriões e se esse retardo é estatisticamente significativo a partir de uma análise de variância (ANOVA). No entanto, mesmo que não haja diferença estatisticamente significativa entre algumas concentrações testadas, qualquer efeito causado sobre algum desses marcos do desenvolvimento pode prejudicar a sobrevivência do embrião/larva, devendo considerar o contaminante testado como teratogênico.

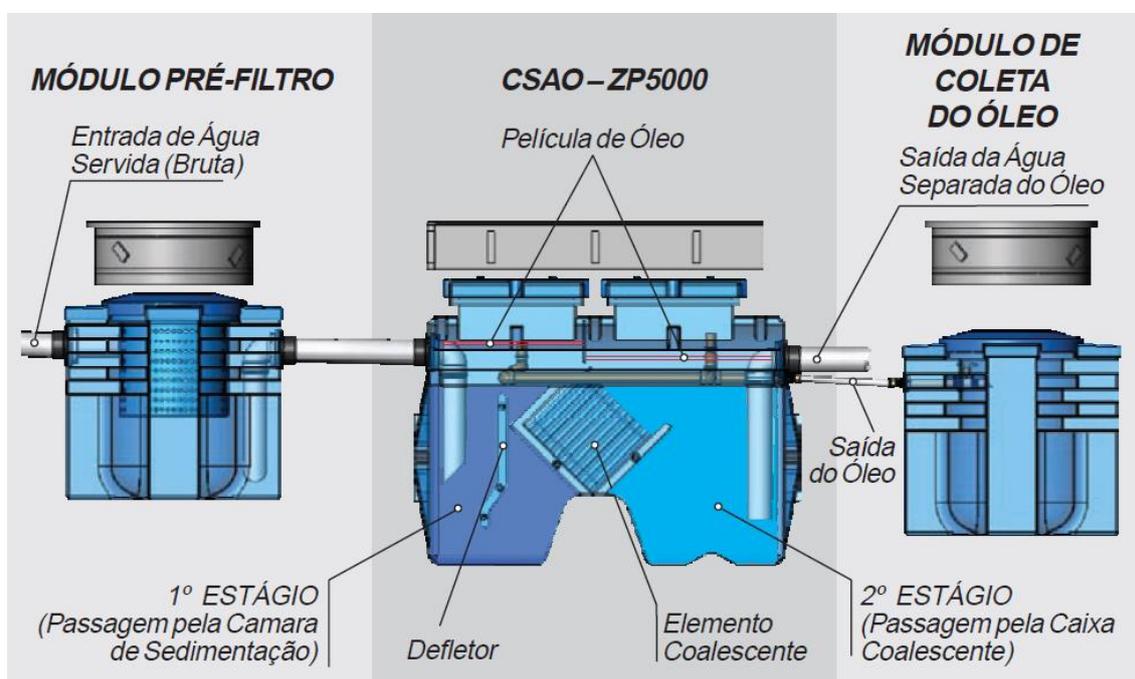
I.4 EFLUENTES DE POSTOS REVENDEDORES DE COMBUSTÍVEIS

No Brasil, existem mais de 40.000 postos de combustíveis instalados, segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP), destes, 226 estão localizados no Recife. Estes postos podem provocar impacto sobre os recursos aquáticos, principalmente envolvendo águas subterrâneas, a partir de vazamentos nos tanques de armazenamento, e nas águas superficiais, a partir de destinações incorretas dos resíduos de abastecimento. Além dos postos, outras empresas manipulam produtos derivados do petróleo, como oficinas mecânicas e lava jatos, as quais devem, assim como os postos, se adequarem à legislação vigente e possuir um sistema de canaletas em suas dependências ligadas a caixas separadoras de água e óleo (CSAO).

Caixas separadoras de água e óleo são sistemas usados para receber águas e efluentes provenientes das atividades desenvolvidas no estabelecimento. No caso dos postos revendedores de combustível estes efluentes são compostos principalmente de resíduos de combustíveis, (álcool, gasolina e óleo diesel) de óleo de motor, aditivos para combustíveis, lubrificantes, fluidos hidráulicos, provenientes das atividades de abastecimento e deposição seca de escape de automóvel (KHAN *et al.*, 2004), que são liberados dentro das áreas de abastecimento, as quais são circundadas por calhas que direcionam esses resíduos para as CSAO. Muitos são os modelos de CSAO utilizadas em postos de gasolina, sendo as da marca ZEPPINI as mais utilizadas. De acordo com o manual de instruções da CSAO ZEPPINI (figura 13), o primeiro estágio recebe a água contaminada e um defletor realiza a primeira separação entre a água e os óleos mais livres, além de reter os sólidos minerais mais pesados (areia, pedras). O defletor direciona o fluxo da água uniformemente para os elementos coalescentes, onde no segundo estágio da separação o fluxo é submetido a um regime de escoamento controlado através dos elementos coalescentes, fazendo com que pequenas gotas de óleo se

agrupem e se desloquem para a superfície da água, formando um filme oleoso. Após esta fase, o filme oleoso é coletado por um sistema de tubulação interna por onde segue até o módulo de coleta de óleo para posterior descarte conforme a legislação vigente. A água tratada, por sua vez, segue pela tubulação de saída de efluentes de 4" existente na CSAO, que geralmente desemboca nas galerias da rede pluvial. No entanto, o sistema visa separar as águas servidas dos óleos livres e as porções de óleo quimicamente emulsionadas na água não são separadas, gerando dessa forma um efluente rico em derivados de petróleo, compostos basicamente por HPAs e que se apresentam como uma possível fonte de contaminação dos sistemas hídricos continentais, já que o escoamento da estação de serviço é uma das principais fontes que contribuem com óleo e graxa para as águas receptoras (KHAN *et al.*, 2004).

Figura 14. Modelo de caixa separadora de água e óleo (CSAO) ZEPPINI comumente utilizada em postos revendedores de combustível.



Fonte: Manual ZEPPINI.

I.5 *Danio rerio* COMO MODELO PARA TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

Danio rerio, também conhecido por paulistinha e peixe-zebra, é uma espécie de peixe tropical, ovípara, omnívora, com adultos medindo entre 4 cm e 5 cm, consumidor secundário nos ecossistemas límnicos, originário do Sul da Ásia (Índia e Paquistão), apresentando dimorfismo sexual e reprodução fotoperiódica (ENGESZER *et al.*, 2007; SEILER *et al.*, 2014).

Por serem de fácil manutenção e reprodução em laboratórios, a baixo custo, existir um conhecimento abrangente sobre sua fisiologia e biologia, permitindo o monitoramento contínuo do seu desenvolvimento, desde a embriogênese precoce até a eclosão, além do fato de seu genoma estar sequenciado, o zebrafish surgiu como um modelo animal alternativo promissor para detectar a teratogenicidade na avaliação da toxicidade no desenvolvimento, além de estar em conformidade com o quadro ético dos 3R's (redução, refinamento e reposição) da experimentação com animais (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015). Dessa forma, alguns testes padronizados com *D. rerio* foram sugeridos, existindo no Brasil a norma ABNT 15499 (2015), focada na exposição por 168h de larvas recém eclodidas 72 horas após a fecundação (hpf). Por outro lado, na comunidade internacional a norma OECD 236 (2013), focada na exposição de embriões recém fertilizados de 4 hpf por 96h, tem ganhado crescente destaque pela possibilidade de execução de testes em larga escala, e da ampla gama de critérios morfológicos passíveis de serem avaliados nesta fase de desenvolvimento, como descrito acima.

Diversos trabalhos evidenciaram a sensibilidade tanto de larvas quanto de embriões a diversos tipos de contaminantes, incluindo metais pesados e HPAs (INCARDONA *et al.*, 2004; JEZIERSKA *et al.*, 2009; SEILER *et al.*, 2014). Bertoletti (2000) e Ansari and Ansari (2015) demonstraram que o estágio larval pode ser mais sensível a cobre, cádmio, níquel, fenol, zinco e cromo, quando comparados com o estágio embrionário. Entretanto, pouco ainda se sabe da real diferença de sensibilidade entre esses dois estágios, quando expostos a contaminantes orgânicos, como por exemplo os HPAs. Testes com estágios iniciais de desenvolvimento são cada vez mais utilizados como uma alternativa aos ensaios de toxicidade padronizados com peixes juvenis e adultos, minimizando a experimentação com estas fases de vida que requerem adequação a estatutos que regulamentam a utilização de animais em experimentos. Os embriões de peixe são úteis para estudos toxicológicos envolvendo petróleo porque são externamente simples, têm área de superfície mínima em contato com água, não ingerem alimento e, além do córion, membrana que envolve os embriões, eles não têm estruturas externas, como brânquias ou penas que podem ser sujados (CARLS *et al.*, 2008). Além disso, os primeiros estágios de desenvolvimento dos peixes, incluindo quando os embriões são protegidos pelo córion, são particularmente vulneráveis aos efeitos nocivos dos contaminantes químicos (JEZIERSKA *et al.*, 2009; MCINTYRE *et al.*, 2014), sendo os embriões de peixe altamente sensíveis aos HPAs dissolvidos em óleo, sendo que os efeitos biológicos dos HPAs petrogênicos em peixes em desenvolvimento foram descritos em detalhes (CARLS *et al.*, 1999; HEINTZ *et al.*, 1999; INCARDONA *et al.*, 2004; INCARDONA *et al.*, 2005).

I.6 OBJETIVOS

I.6.1 Manuscrito I

Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*

I.6.1.1 Objetivo Geral

Caracterizar e avaliar a toxicidade a nível letal e subletal de efluentes de caixas separadoras de água e óleo de postos revendedores de combustível (ECSPCs) para embriões de *Danio rerio*

I.6.1.2 Objetivos Específicos

- Coletar amostras de ECSPCs e caracterizar quanto à presença de fenantreno, naftaleno e criseno

- Realizar a exposição controlada de embriões de *Danio rerio* aos ECSPCs para avaliar a concentração letal para 50% (CL50) dos indivíduos expostos e os efeitos sobre o desenvolvimento.

I.6.2 Manuscrito II

Sensibilidade de embriões e larvas do peixe *Danio rerio* a efluentes de postos revendedores de combustível

I.6.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a sensibilidade de embriões e larvas do peixe *Danio rerio* expostos a efluentes de caixas separadoras de água e óleo de postos revendedores de combustível (ECSPCs).

I.6.2.2 Objetivo Específico

- Realizar exposição controlada de embriões e de larvas de *D. rerio* a concentrações dos ECSPCs para avaliar a concentração letal para 50% (CL50) dos indivíduos expostos.

I.7 REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Naphthalene-induced differential tissue damage association with circulating fish phagocyte induction. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 1, p. 7-15, 2003/1 2003.
- ALI, S.; LIU, G. Antioxidant enzyme activities in *Exopalaemon carinicauda*, holthuis, 1950, (Decapoda: Palaemonidae) in response to naphthalene. **Advanced Science Letters** **19**, p. 3655-3659, 2013.
- 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.
- BEASLEY, V. R.; LEVENGOOD, J. M. Chapter 66 - Principles of ecotoxicology A2 - Gupta, Ramesh C. In: (Ed.). **Veterinary Toxicology (Second Edition)**. Boston: Academic Press, 2012. p.831-855. ISBN 978-0-12-385926-6.
- 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 08906238 (ISSN).
- CARLS, M. G. et al. Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 2, p. 121-127, 2008.
- CARLS, M. G.; MARTY, G. D.; HOSE, J. E. Synthesis of the toxicological impacts of the Exxon Valdez oil spill on Pacific herring (*Clupea pallasii*) in Prince William Sound, Alaska, U.S.A. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 59, p. 153-172, 2002 2002.
- CARLS, M. G.; RICE, S. D.; HOSE, J. E. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval Pacific herring (*Clupea pallasii*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 481-493, 1999/3/1 1999.
- CARVALHO, P. S. et al. Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus Brasiliensis*. **Mar Environ Res**, v. 66, p. 205–207, 2008 Feb 26 2008. ISSN 0141-1136 (Print).
- CARVALHO, P. S.; TILLITT, D. E. 2,3,7,8-TCDD effects on visual structure and function in swim-up rainbow trout. **Environ Sci Technol**, v. 38, n. 23, p. 6300-6, 2004 Dec 1 2004. ISSN 0013-936X (Print).
- CCME. Canadian Soil Quality Guidelines for Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Environmental and Human Health Effects). Scientific Supporting Document. **Canadian Council of Ministers of the Environment**, p. 218, 2014.
- COLLIER, T. K. et al. **Effects on Fish of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS) and Naphthenic Acid Exposures**. *Fish Physiology*. **33**: 195-255 p. 2013.

- CORREIA, A. D. et al. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 347, n. 1–2, p. 109-122, 8/24/ 2007. ISSN 0022-0981.
- CRISTALE, J.; SILVA, F. S.; MARCHI, M. R. R. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. **Eclética Química**, v. 33, p. 69-78, 2008.
- DI GIULIO, R. T.; CLARK, B. W. The Elizabeth River Story: A Case Study in Evolutionary Toxicology. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 18, n. 6, p. 259-298, 2015.
- DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **Toxicology of Fishes**. Boca Raton: Academic Press, 2008. 1101
- ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History and New Notes from the Field. **ZEBRAFISH**, 2007.
- ERICKSON, R. J. et al. Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems. **The Toxicology of Fishes**, p. 9-54, 2008.
- FAKSNESS, L.-G. et al. Chemical comparison and acute toxicity of water accommodated fraction (WAF) of source and field collected Macondo oils from the Deepwater Horizon spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 91, n. 1, p. 222-229, 2/15/ 2015. ISSN 0025-326X.
- 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, 7// 2015. ISSN 0013-9351.
- HEINTZ, R. A.; SHORT, J. W.; RICE, S. D. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus orbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 494–503, 1999 1999.
- HERMSEN, S. A. B. 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, 4// 2011. ISSN 0887-2333.
- 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, 2004/4/15 2004.
- INCARDONA, J. P. et al. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 217, n. 3, p. 308-321, 2006.

- INCARDONA, J. P. et al. Deepwater horizon crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 15, p. E1510-E1518, 2014.
- JEZIERSKA, B.; ŁUGOWSKA, K.; WITESKA, M. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 625-640, 2009. ISSN 09201742 (ISSN).
- KHAN, E.; VIROJNAGUD, W.; RATPUKDI, T. Use of biomass sorbents for oil removal from gas station runoff. **Chemosphere**, v. 57, n. 7, p. 681-689, 11// 2004. ISSN 0045-6535.
- LAETZ, C. A. et al. Chapter 18 - Ecotoxicological Risk of Mixtures A2 - Amiard-Triquet, Claude. In: AMIARD, J.-C. e MOUNEYRAC, C. (Ed.). **Aquatic Ecotoxicology**: Academic Press, 2015. p.441-462. ISBN 978-0-12-800949-9.
- LEMOS, R. T. D. O.; CARVALHO, P. S. M. D.; 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, 5/15/ 2014. ISSN 0025-326X.
- LUSHCHAK, V. I. Environmentally Induced Oxidative Stress in Fish. In: ABELE, D.; V´AZQUEZ-MEDINA, J. P., et al (Ed.). **Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems**. UK: Wiley-Blackwell, 2011. p.295-307.
- LUZARDO, O. P. et al. Assessment of the exposure to organochlorine pesticides, PCBs and PAHs in six species of predatory birds of the Canary Islands, Spain. **Science of The Total Environment**, v. 472, p. 146-153, 2/15/ 2014. ISSN 0048-9697.
- MCINTYRE, J. K. et al. Zebrafish and clean water technology: Assessing soil bioretention as a protective treatment for toxic urban runoff. **Science of The Total Environment**, v. 500-501, p. 173-180, 12/1/ 2014. ISSN 0048-9697.
- MEYER, W. et al. Mutagenicity, dioxin-like activity and bioaccumulation of alkylated picene and chrysene derivatives in a German lignite. **Science of The Total Environment**, v. 497-498, p. 634-641, 11/1/ 2014. ISSN 0048-9697.
- MIRANDA, V. J. M. Degradação de naftaleno, fenantreno e benzo(a)pireno em solos e sedimentos de ambientes costeiros, oceânicos e antárticos. 2008.
- NAHRGANG, J. et al. Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*)—Implications for environmental monitoring in the Barents Sea. **Aquatic Toxicology**, v. 127, p. 21-35, 2// 2013. ISSN 0166-445X.
- NETTO, P. A. D. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova** v. 23, p. 765 - 773, 2000.
- NRC. Oil in the Sea – Inputs, Fates and Effects. **National Academy Press, Washington**, v. Second ed., 2003.

- OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 2013.
- 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.
- RADKE, M.; RULLKÖTTER, J.; VRIEND, S. P. Distribution of naphthalenes in crude oils from the Java Sea: Source and maturation effects. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 58, n. 17, p. 3675-3689, 9// 1994. ISSN 0016-7037.
- RAMSDORF, W. A. Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes., 2011.
- 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, 4// 2015. ISSN 0147-6513.
- SCHLENK, D. et al. Biomarkers. In: DI GIULIO, R. T. e HINTON, D. E. (Ed.). **The Toxicology of Fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. p.684-713.
- 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, 10// 2014. ISSN 0045-6535.
- SIDDENS, L. K. et al. Cytochrome P450 1b1 in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-induced skin carcinogenesis: Tumorigenicity of individual PAHs and coal-tar extract, DNA adduction and expression of select genes in the Cyp1b1 knockout mouse. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 287, n. 2, p. 149-160, 9/1/ 2015. ISSN 0041-008X.
- TORREIRO-MELO, A. G. A. G. **Biomarcadores Ecotoxicológicos em *Poecilia vivipara* para o Monitoramento de Ecossistemas Aquáticos**. 2015. 118 Universidade Federal de Pernambuco Recife - PE.
- TORREIRO-MELO, A. G. A. G. et al. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. **Chemosphere**, v. 132, p. 17-23, 2015.
- TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, n. 2, p. 151-173, 9// 1977. ISSN 0147-6513.
- UNEP. **Determinations of petroleum hydrocarbons in sediment**. Reference methods for marine pollution studies. PROGRAMME, U. N. E. 20: 97 p. 1991.
- UNO, T.; ISHIZUKA, M.; ITAKURA, T. Cytochrome P450 (CYP) in fish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 1-13, 7// 2012. ISSN 1382-6689.
- WALKER, G. H., HOPKIN, S.P., SIBLY, R.M. & PEAKALL, D.B., Ed. **Principles of Ecotoxicology**: Taylor and Francis, London, UK, Third Edition.ed. 2005.
- WHO. **Guidelines for Assessing the Nutritional Impact of Supplementary Feeding Programmes for Vulnerable Groups**. ORGANIZATION, W. H.: 257 p. 1983.

WHYTE, J. J. et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 347-570, 2000.

WOLINSKA, L. et al. Preliminary study on adverse effects of phenanthrene and its methyl and phenyl derivatives in larval zebrafish, *Danio rerio*. **Environmental Biotechnology**, v. 7, p. 26-33, 2011.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2. São Paulo: 2006.

II MANUSCRITO I

Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*

ABSTRACT

Used petroleum hydrocarbons and gasoline stations runoff are significant sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to aquatic ecosystems. Samples of the final effluent of oil-water-separators were collected at gasoline stations in the metropolitan region of Recife, Brazil, before release to sewage or rainwater systems. Effluent soluble fractions (ESF) were prepared and bioassays were performed according to the Fish Embryo Toxicity Test. The test involved exposing zebrafish *Danio rerio* embryos to dilutions of the ESFs for 96 hours, with daily examination of lethality and sublethal morphological effects integrated through the General Morphology Score (GMS), based on the achievement of developmental hallmarks. Frequencies of abnormalities were recorded after exposures. ESF LC50-96h (lethal concentration to 50% of exposed embryos) in the most toxic effluent achieved 8.9% (v/v), equivalent to 11 µg phenanthrene equivalents L⁻¹. GMS scores indicated significantly delayed embryo-larval development at ESF dilutions of 10% and 20% from effluents of all gas stations. Major abnormalities detected after the 96 h exposure included the presence of a yolk sac not fully absorbed coupled with the lack of an inflated swim bladder, lack of both pectoral fins, and the failure to develop a protruding mouth. Effective equivalent PAH concentrations that induce a 50% frequency of larvae without an inflated swim bladder (EC50) were 4.9 µg phenanthrene L⁻¹, 21.8 µg naphthalene L⁻¹, and 34.1 µg chrysene L⁻¹. This study shows that PAHs in ESFs from gas stations oil water separators are toxic to zebrafish, contributing to the toxicity of urban storm waters.

Keywords: gas station runoff; effluent soluble fraction; polycyclic aromatic hydrocarbons; fixed fluorescence; developmental toxicity

1. INTRODUCTION

Petroleum is a complex mixture composed mostly by saturated and unsaturated hydrocarbons, as well as aromatic hydrocarbons and other minor components. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) consist of a variety of molecules of at least two benzene rings and may represent up to 7 % in crude oils. Sources of PAH contamination include leaks during extraction, transportation and consumption of oil products, the latter comprising the single largest inputs from land based sources to coastal waters and estuaries (NRC, 2003).

Used petroleum hydrocarbons are an environmental and human health hazard if not disposed of correctly, which can further result in economic losses to recreation and fishing industries (GUERIN, 2008). Gasoline stations are significant sources of oil derived contaminants and gas station runoff is composed of engine oil, gasoline spills, additives to fuels, lubricants, hydraulic fluids, and dry deposition of automobile exhaust. It is common practice worldwide to use onsite oil–water separators (OWS) to collect runoff from gas stations wastewater, before it goes to rainwater or sewage treatment pipelines. However, oil may escape from the system due to peak flows during severe storm events (KHAN *et al.*, 2004), and the effluent water itself may be contaminated with dissolved hydrocarbons. In Brazil, there are more than 40,000 gas stations (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2016), while in the United States the number is estimated at 114,000 (ECONOMIC CENSUS OF THE UNITED STATES, 2012) and 100,000 in China (CHINA FILLING STATION AND GAS STATION INDUSTRY REPORT, 2015). Effluents from these facilities can significantly contribute to storm water runoff, which is an important source of PAHs to aquatic ecosystems (MENZIE *et al.*, 2002).

PAHs are contaminants of environmental concern due to their toxicity to aquatic animals such as mollusks (BAUSSANT *et al.*, 2009), crustaceans (LANDRUM *et al.*, 2003), birds (TROIISI *et al.*, 2016) and mammals (SCHWACKE *et al.*, 2014). Field and laboratory studies with marine, freshwater, temperate and tropical fishes have been extensively used to assess and understand mechanisms of single and mixture PAH toxicity at different levels of biological organization, including biochemical, histopathological, genetic, immunological, reproductive, developmental and behavioral effects (PAYNE *et al.*, 2003; LOGAN, 2007), and also population and community level effects (PETERSON *et al.*, 2003).

PAHs are toxic to fishes through different mechanisms of action, including nonpolar narcosis, aryl hydrocarbon receptor (AhR) binding, CYP1A expression and induction of phase 1 biotransformation enzyme ethoxyresorufin-ortho-deethylase (EROD), coupled with

mutagenicity, carcinogenicity and teratogenesis, immunotoxicity, reproductive and developmental toxicity, as well as behavioral effects (KENNEDY, 2014).

The zebrafish *Danio rerio* was used to describe a suite of abnormalities caused by three ringed PAHs dibenzothiophene and phenanthrene, characterized by disruption of cardiac function and morphogenesis, pericardial and yolk sac edema, jaw reductions, and curvature of the body axis (Incardona et al., 2004). Furthermore, it has been demonstrated that crude oil mixtures can disrupt cardiac function and morphogenesis of fish embryos in different species (INCARDONA *et al.*, 2014). Although knowledge about which isolated or combined mechanisms lead to PAH toxicity, four to six ringed PAHs exert their toxicity mediated by the aryl hydrocarbon receptor (AhR), similar to dioxin cardiotoxicity, whereas tricyclic PAH toxicity is not AhR dependent (INCARDONA *et al.*, 2005).

Early stages of development of the zebrafish *Danio rerio* have become an important model to evaluate the toxicity of chemicals and whole effluents to fish due to their sensitivity, possibility of high throughput testing of chemicals with small sample volumes, ease of reproduction, high fecundity, a well described development (MCINTYRE *et al.*, 2014; JEFFRIES *et al.*, 2015), and the availability of mechanism- and endpoint-specific methods for the identification of important classes of contaminants (DI PAOLO *et al.*, 2015). In the present study, we evaluated the toxicity of the effluent soluble fraction of gas station OWS effluents collected in the metropolitan region of Recife, Brazil, to zebrafish embryos. We analyzed dose response relationships between the concentration of PAHs in effluents, embryolarval survival and sublethal morphological effects from fertilization to early larval stages of the zebrafish.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Effluent sampling

Samples of the final effluent were collected at the final compartment of the underground oil water separation system, from where the final effluent is released to the sewage or rainwater system. Effluents from 4 gasoline stations in the metropolitan region of Recife were sampled, named gas station 1 (GS1; 8° 6' 54.8" S, 34° 54' 48.2" W), GS2 (8° 6' 55.4" S, 34° 54' 46.4" W), GS3 (8° 6' 29.2" S, 34° 55' 36.6" W) and GS4 (8° 7' 16.8" S, 34° 55' 7.9" W). 6 L of effluent were immediately put into 1 L amber bottles, refrigerated with ice and brought to the laboratory in Styrofoam boxes. Samples were sequentially filtered through cellulose filters of 25 µm, 8 µm and 2µm, and then through a cellulose membrane of 0.45 µm, using an oil free vacuum

pump Tecnal TE-0581. These effluent soluble fractions (ESF) were stored in 1 L amber glass bottles, wrapped in aluminum foil and kept in the refrigerator at 4 ° C until used in the exposure experiments, which were performed during the next 2 weeks.

2.2 *Danio rerio* cultivation and embryo exposure

Water used for *Danio rerio* culture and exposure experiments at the Aquatic Ecotoxicology Laboratory (UFPE) were analyzed with a YSI Professional Plus multiparameter meter. pH varied from 7.1 to 8.2, dissolved oxygen from 5 to 7 mg L⁻¹, and temperature was kept at 26 ± 0.5 °C (mean ± standard deviation). Breeding adult *Danio rerio* were fed *Artemia* nauplii and commercial fish food with 40% protein. A group of 3 males and 6 females were separated the previous afternoon in a 15 L aquarium, and after early morning spawning and fertilization, selection of fertilized and viable eggs was made by direct observation in a stereomicroscope at 50 x magnification. Eggs that showed coagulation or opacity were discarded. Fertilization rate was higher than 90%. Animal handling and embryo exposures were performed in accordance with protocol approved by the Ethics Committee for Animal Experiments from Federal University of Pernambuco (UFPE).

2.3 Experimental design

Bioassays were performed according to the Fish Embryo Toxicity Test (FET) (OECD, 2013b). The test involved exposing zebrafish embryos at 3 hours post fertilization (hpf), to five concentrations of the effluents ESF (0.1%, 1%, 5%, 10% and 20% v/v) and clean water controls, during 96 hours. Exposure of embryos was performed in 24 well microtiter plates, one embryo per well with a 2.5 mL total water volume. In each plate, 20 embryos were exposed to appropriate concentrations of the effluent and 4 embryos were kept in clean water as plate internal controls (OECD, 2013b). Effluent dilution samples were renewed at a rate of 60 % every day in each well where embryos were kept. Death was assigned to any of the exposed embryos through stereomicroscopic inspection and detection of egg coagulation, lack of heart beat, and lack of movement.

2.4 Global Morphology Score

Sublethal effects or delays in embryonic and larval development were evaluated using the General Morphology Score (GMS), as proposed by BEEKHUIJZEN *et al.* (2015) and HERMSEN *et al.* (2011). The GMS is based on the computation of partial scores for each

embryo or larvae as they develop basic morphological structures considered developmental hallmarks. Every 24 hours up to 12 types of developmental hallmarks were evaluated and alterations recorded as sublethal indicators of effects on embryos or larvae, during the 96 h exposure period. Thus, embryos exposed to effluents were compared with a reference clean water embryo (control). Both controls and treated embryos receive points for each morphological or developmental hallmark achieved. These hallmarks and respective time points include: detachment of the tail during early embryo development (24 h); somite formation (24 and 48 h); eye development and pigmentation (24 to 96 h); presence of movement of the embryo or larva (24 to 96 h); presence of blood circulation (24 to 96 h); presence of heartbeat (48 to 96 h); pigmentation of the head and body (48 to 96 h); pigmentation of the tail (48 to 96 h); presence of a nearly empty yolk sac extension, related to an almost completely resorbed yolk sac (96 h), allowing for a space where the swimming bladder will be situated; presence of pectoral fins (72 to 96 h), presence of protruding mouth (72 to 96 h), hatching (72 to 96 h).

2.5 Frequency of abnormalities after the 96 h exposure

Abnormality endpoints assessed for presence or absence in each larva included: lack of larval eclosion (live larva inside the egg); pericardial edema; cranial or cardiac hemorrhage; total absence of pigmentation in head and body; absence of tail pigmentation; lack of both pectoral fins; lack of protrusible mouth; yolk sac thickness exceeding the heart; swim bladder not inflated. Frequencies of these endpoints were calculated, dividing the total number of larvae presenting these abnormalities by the total number of live larvae in the respective group.

2.6 Fixed fluorescence quantification of PAHs in effluents

Samples of the five concentrations of each gas station effluent, 0.1%, 1%, 5%, 10% and 20% v/v, were analyzed in triplicates by the fixed fluorescence method (FF) in a spectrofluorometer (model Spectramax M3, Molecular Devices). 300 μ L of the effluent ESF samples were pipetted into each well using 96-well black fluorescence plates (model Fluotrac 200, Greiner). The excitation/emission wavelengths used for naphthalene (NAP), phenanthrene (PHE) and chrysene (CHR) were 290/335, 260/380 and 310/360, respectively (AAS *et al.*, 2000; PATHIRATNE *et al.*, 2010; LEMOS *et al.*, 2014; TORREIRO-MELO *et al.*, 2015). The results were expressed in relative fluorescence units (RFUs). The sample fluorescence units

relative to clean water blanks were converted to PAH equivalent concentrations based on calibration curves built from 11 concentrations of isolated NAP, PHE and CRY dissolved in clean water. The calibration curves relating the concentration of dissolved PAH in clean water and their RFUs were expressed by the following linear equations:

$RFU = 0.936 X + 10.844$ NAP; ($R^2 = 0.99$), concentrations ranging from 1.9 to 2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$;

$RFU = 6.3653x + 6.2407$ PHE; ($R^2 = 0.99$), concentrations ranging from 1.9 to 2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$;

$RFU = 1.9463x - 9.395$ CRY; ($R^2 = 0.99$), concentrations ranging from 1.9 to 2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.7 Analysis of ammonia

Total ammonia was analysed in all effluent dilutions tested based on the indophenol method (KOROLEFF, 1976) adapted to 96 well microplates. A calibration curve was prepared with 5 concentrations of total ammonia (0; 0.1; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg L^{-1}) from solutions of $\text{NH}_4\text{-Cl}$ ACS reagent (Sigma-Aldrich). Absorbance of indophenol was measured at 673 nm in a spectrophotometer (model Spectramax M3, Molecular Devices). Toxic ammonia NH_3 was calculated from total ammonia concentrations in effluent dilutions, pH and temperature, according to EMERSON *et al.* (1975).

2.8 Statistical Analysis

Lethal effects and $\text{LC}_{50_{96\text{h}}}$ were calculated using the Probit Program software version 1.5 (USEPA, 1993) or Trimmed Spearman-Kärber (USEPA, 2002). Mean GMS indexes obtained from embryos at different effluent exposure concentrations were analyzed by one-way ANOVA at a significance level of 0.05, and Dunnett a posteriori tests to detect significant differences compared to control. When normality (Kolmogorov–Smirnov test) or homoscedasticity (Levene median test) was not accepted, the nonparametric Kruskal-Wallis test (KW) followed by Dunn's multiple comparison test was applied. Sigmaplot software version 12 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany) was used for ANOVA and KW. MedCalc for Windows, version 17.2 (MedCalc Software, Ostend, Belgium) was used for probit analysis of dose responses between ESF PAH concentrations and frequency of swimbladder effects.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Evidence of lethal and sublethal morphological effects were detected in embryos exposed to the effluent soluble fraction of all gas station effluents analyzed. Mean fixed fluorescence equivalent concentrations in the undiluted ESFs analyzed varied from 28.9 to 124 $\mu\text{g NAP L}^{-1}$, 103 to 681 $\mu\text{g PHE L}^{-1}$, and 57 to 954 $\mu\text{g CHR L}^{-1}$ (min-max), respectively (Table 1). ESF LC50-96h (lethal concentration to 50% of exposed embryos after a 96 h exposure) from GS1 and GS2 was 10% and 8.9% (v/v), equivalent to 5.3 and 11 $\mu\text{g phenanthrene equivalents L}^{-1}$, respectively. Although no mortality was detected in GS3 and GS4-ESF embryo exposures after 96 h, 30% of embryos did not hatch until the end of the 96 h exposures at 20% (v/v) GS4-ESF. Additionally, 45% and 100% of embryos or larvae exposed to GS3 and GS4, respectively, died at 144 hpf, both at 20% ESF (v/v).

Sublethal morphological effects integrated through the general morphology score (GMS) indicated significantly delayed embryo-larval development at ESF dilutions of 10% and 20% from effluents of all gas stations (Fig. 1A - D). Major morphological effects detected in all effluent dilutions from all gas stations included a yolk sac not fully absorbed (indicated by its thickness exceeding the heart) usually coupled with the lack of an inflated swim bladder, lack of both pectoral fins, and the failure to develop a protruding mouth after 96 h (Table 2). Other effects included absence of pigmentaton in head and body and absence of tail pigmentation in GS1, GS3 and GS4 effluents, no eclosion, presence of pericardial edema, and cranial or cardiac hemorrhage (Table 2). Probit dose response modeling, using data from all gas station effluents analyzed, indicated effective equivalent PAH concentrations that induce a 50% frequency of larvae without an inflated swim bladder (EC50) of 4.9 $\mu\text{g FEN L}^{-1}$ (95% lower and upper confidence intervals of 3.3 and 7.8), 21.8 $\mu\text{g NAP L}^{-1}$ (95% lower and upper confidence intervals of 16.5 and 29.9), and 34.1 $\mu\text{g CHR L}^{-1}$ (95% lower and upper confidence intervals of 22.7 and 57.1) (Fig. 2A, B and C). Delayed or no inflation of the swim bladder was detected in zebrafish exposed to high concentrations of PAHs in different experiments with naphthalene, phenanthrene, chrysene, fluorene, dibenzothiophene, anthracene or pyrene, regardless of the co-occurrence of other morphological defects like pericardial edema (INCARDONA *et al.*, 2004). Although this study is focused on an effluent complex mixture, the estimated EC50s suggests that FEN is a more potent inducer of problems in swimbladder inflation, followed by NAP and CHR. Endothelial cells and blood circulation are necessary for the differentiation of mesenchymal smooth muscle and organization of the outer mesothelium in the swimbladder, and essential for proper functioning and swim bladder inflation to occur (WINATA *et al.*, 2010). It is important to investigate if cardiotoxic PAHs like phenanthrene

may affect swim bladder later stages of development and inflation through disruption of blood circulation related to cardiotoxicity.

Toxic ammonia NH_3 concentrations in tested effluents were below $0.01 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$ in GS4 effluent at 20% (v/v), below $0.002 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$ in GS3 and GS1 effluents, and below $0.001 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$ in GS1 effluent. The average of the mean acute toxicity values for 32 freshwater species is $2.79 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (RANDALL e TSUI, 2002), and NH_3 is not a significant source of toxicity in these effluents.

In general, the abnormalities detected in this study are typical of fish embryos exposed to complex mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and it is plausible that the detected morphological effects in this study are related to PAHs present in the tested effluents (INCARDONA *et al.*, 2004; INCARDONA *et al.*, 2005; INCARDONA *et al.*, 2006; CARLS *et al.*, 2008).

Lack of pigmentation was detected in embryos and larvae exposed to GS3 and GS4 ESFs, and failure in development of the pectoral fins was detected in larvae exposed to GS2, GS3 and GS4 ESFs. Pectoral fin defects were also observed in zebrafish embryos exposed to beta-cypermethrin (XU *et al.*, 2013), and may be related to blockage of retinoic acid signaling during early embryonic development (JIANG *et al.*, 2016). The ESFs tested in this study are complex mixtures where PAHs are relevant contaminants. However, it is important to emphasize that other contaminants may be contributing to the overall toxicity of the mixture, including monoaromatic hydrocarbons benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX). However, due to the high volatility of these molecules their concentrations are typically lower, even in groundwater from monitoring wells of gasoline stations (REGO e PEREIRA NETTO, 2007). The effluents analyzed in this study can be contaminated by spills and are composed of water runoff from the gas stations pumping and working areas, where air and sunlight exposure would further facilitate BTEX volatilization. Additionally, the direct contact with sunlight could be photoactivating the PAHs that contaminate these effluents draining into the oil-water separators. The $\text{LC}_{50-96\text{h}}$ for zebrafish larvae exposed to isolated phenanthrene or pyrene photoactivated by ultraviolet light was estimated at 271 and $3.7 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively (WILLIS e ORIS, 2014). These concentrations are within the same order of magnitude of our quantified PAH equivalent concentrations.

Storm water runoff in urban areas is a relevant and potentially toxic source of a complex mixture of contaminants, including PAHs (STEIN *et al.*, 2006; OROS *et al.*, 2007). The exposure of zebrafish embryos to stormwater runoff caused acute lethality and sublethal developmental abnormalities including hatch delay, pericardial edema, and lack of swim

bladder inflation, at a concentration of total PAHs ranging from 2 to 23 $\mu\text{g L}^{-1}$, dominated by 3-ring (phenanthrenes) and 4-ring (chrysenes and fluoranthenes) compounds (MCINTYRE *et al.*, 2014). Additionally, transcription of cytochrome P450-1a (cyp1A) and heart-related genes were used to show that PAHs present in the dissolved phase of stormwater runoff were cardiotoxic, and also that soil bioretention protects against these harmful effects (MCINTYRE *et al.*, 2016).

Although urban stormwater runoff is a potentially more complex mixture than the gas station effluents analyzed in this study, the developmental effects detected in both studies are very similar, and correlated with PAH contamination. It has been shown that changes in heart function during early stages of fish development reduce swimming performance later in life, which can lead to the death of the individual (HICKEN *et al.*, 2011; INCARDONA *et al.*, 2014). The detected lack of swim bladder inflation in a large proportion of surviving larvae in this study is ecologically relevant and concentration dependent on 2, 3 and 4 ring PAHs estimated in this study (Figure 2), and will probably affect swimming, feeding and recruitment of the hatched zebrafish larvae.

4. CONCLUSION

This study shows that ESFs of effluents from gas stations oil water separators can be toxic to zebrafish embryos and larvae due to PAH contamination. This information highlights the importance of legal and enforcement actions regarding monitoring and inspection of these effluents by environmental agencies, especially in cases when they reach water bodies through the rainwater drainage systems, contributing to the toxicity of urban storm waters.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq”, “Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática – INCT-TA” (Brazilian Ministry of Science and Technology, Brasília, DF, Brazil), CNPq Grant 479773/2010-6, a MSc fellowship from “Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco - FACEPE”. Paulo S M Carvalho is a research fellow from the Brazilian CNPq (Grant 312308/2016-7). Authors are very grateful to all students who contributed during experimental exposures and testing, and to unknown reviewers who helped to increase the quality of this publication.

Fig. 1. General morphology score (GMS) values for embryos exposed to effluent soluble fractions (ESF) from gas stations 1 (GS1-A), 2 (GS2-B), 3 (GS3-C) and 4 (GS4-D).

ESF concentrations are given in dilution % (v/v) and PAH equivalents in $\mu\text{g L}^{-1}$.

* statistically significant differences compared to control.

GS1 (n = 20; KW $H_5 = 80$, $p < 0.001$; Dunn $p < 0.05$), GS2 (n = 20; KW $H_5 = 53$, $p < 0.001$; Dunn $p < 0.05$); GS3 (n = 20; KW $H_5 = 37$, $p < 0.001$; Dunn $p < 0.05$), GS4 (n = 20; KW $H_5 = 60$, $p < 0.001$; Dunn $p < 0.05$).

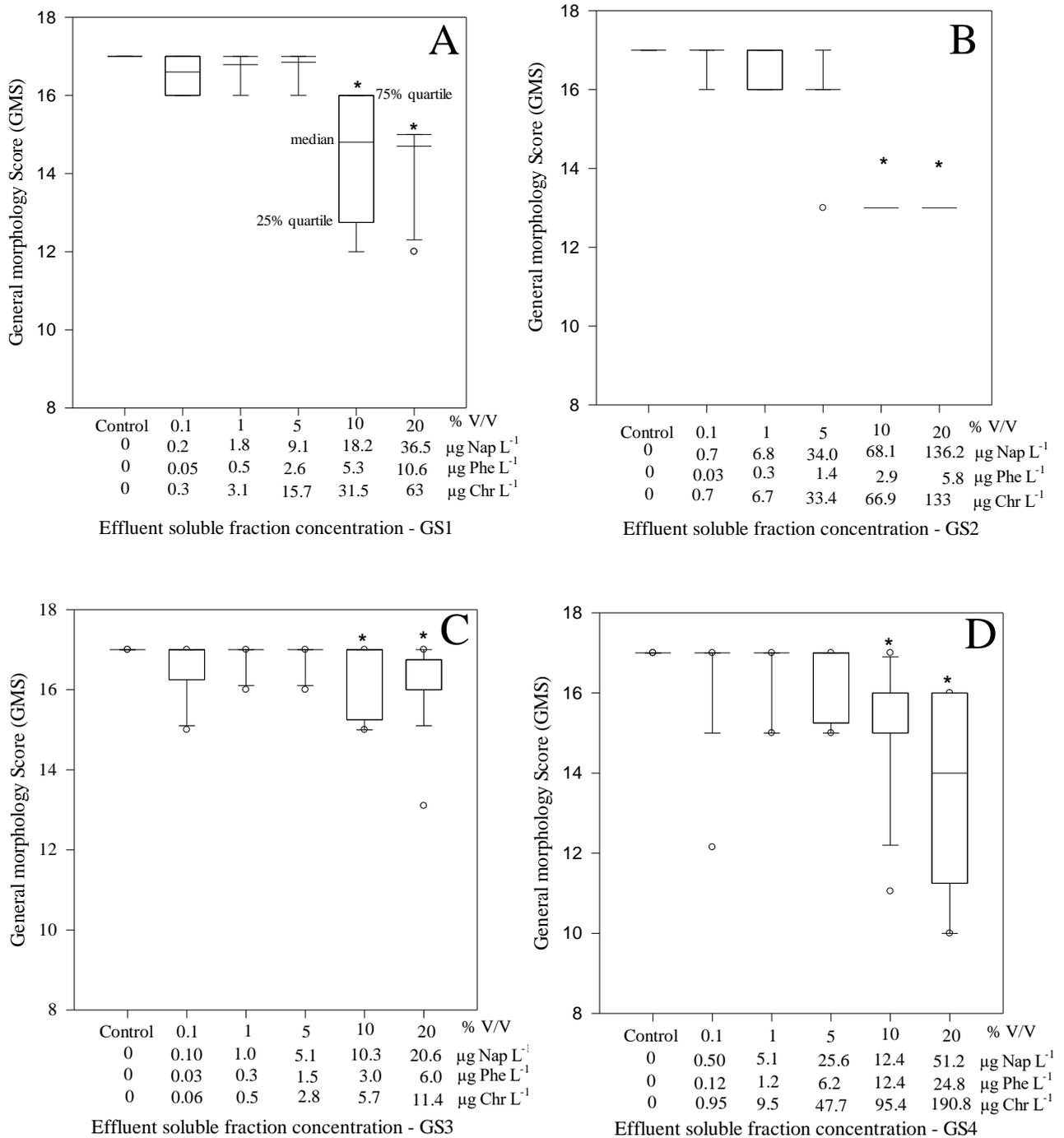
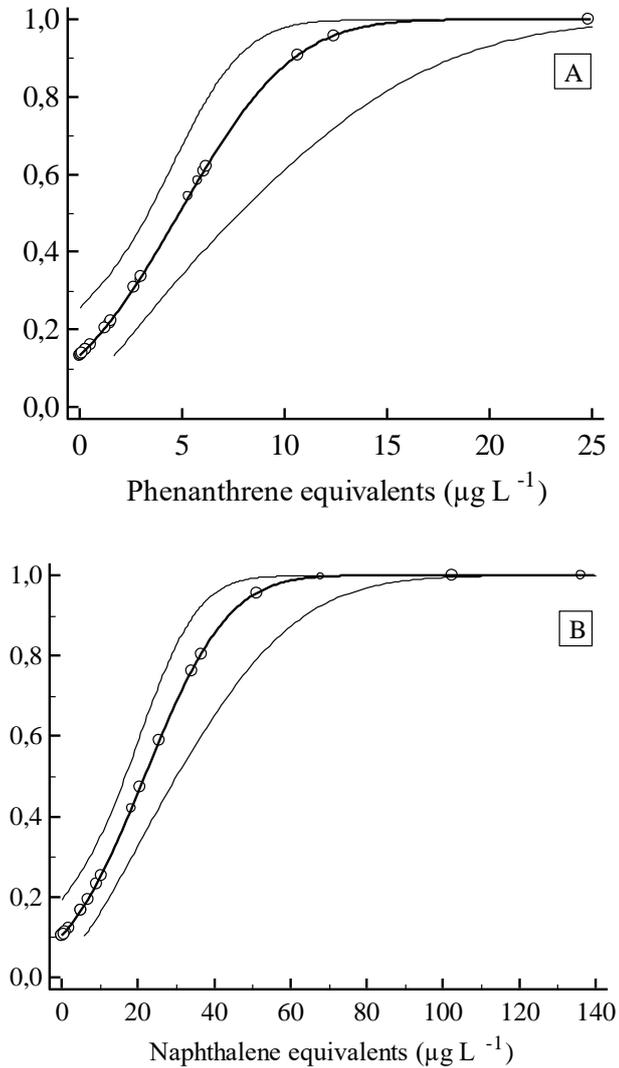


Fig. 2. Concentration response relationships (probit model) between the percentage of larvae without swimbladder inflation (y) and fixed fluorescence PAH equivalent concentrations (x) for phenanthrene (A), naphthalene (B) and chrysene (C) in effluent soluble fractions from oil-water separator systems from all 4 gas stations analysed. Naphthalene EC50 = 21.8 $\mu\text{g L}^{-1}$, 95% confidence limits of 16.5 and 29.9; Phenanthrene EC50 = 4.8 $\mu\text{g L}^{-1}$; 95% confidence limits of 3.3 and 7.7; Chrysene EC50 = 34.0 $\mu\text{g L}^{-1}$; 95% confidence limits of 22.7 and 57.1.



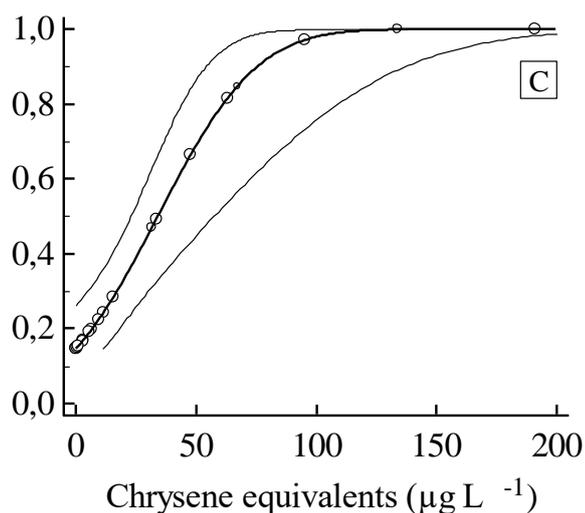


Table 1. Mean fixed fluorescence equivalent concentrations of the PAHs naphthalene, phenanthrene and chrysene in undiluted water soluble fraction of effluents from gas stations 1, 2, 3 and 4.

PAH	Mean PAH equivalent concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	Gas Station 1	Gas Station 2	Gas Station 3	Gas Station 4
Naphthalene	182.52	681.01	103.19	512.52
Phenanthrene	53.19	28.96	30.22	124.06
Crysene	315.30	669.79	57.26	954.04

Table 2. Frequency (%) of recorded abnormalities in zebrafish larvae exposed to gasoline station (GS) effluents soluble fraction after a 96 h exposure.

*: Frequency of all abnormalities in control larvae was 0%.

Effluent dilution (% v/v)	No eclosion of larva	Pericardial edema	Cranial or cardiac hemorrhage	Absence of pigmentaton in head and body	Absence of tail pigmentation	Lack of both pectoral fins	Non protrusible mouth	Yolk sac exceeding the heart	Swim bladder not inflated
GS1-0.1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	35%	35%
GS1-1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	21%	21%
GS1-5%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	15%	15%
GS1-10%	30%	0%	0%	0%	0%	30%	30%	90%	100%
GS1-20%	100%	0%	0%	5%	5%	10%	90%	90%	100%

GS2-0.1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	20%	20%
GS2-1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	26%	21%
GS2-5%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	5%	75%	70%
GS2-10%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	100%
GS2-20%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	100%
GS3-0.1%	0%	0%	0%	10%	10%	0%	5%	5%	5%	5%
GS3-1%	0%	0%	0%	10%	10%	0%	5%	0%	0%	0%
GS3-5%	0%	0%	0%	5%	5%	0%	0%	0%	0%	0%
GS3-10%	0%	0%	0%	20%	25%	0%	10%	20%	20%	25%
GS3-20%	0%	5%	0%	5%	5%	5%	10%	65%	65%	65%
GS4-0.1%	0%	0%	0%	20%	20%	5%	5%	5%	5%	5%
GS4-1%	0%	0%	0%	20%	20%	0%	0%	0%	0%	5%
GS4-5%	0%	25%	0%	25%	0%	0%	0%	40%	40%	40%
GS4-10%	10%	5%	10%	15%	5%	10%	25%	90%	85%	85%
GS4-20%	30%	0%	20%	30%	35%	40%	50%	100%	100%	100%

REFERENCES

- AAS, E.; BEYER, J.; GOKSØYR, A. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in fish: An evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. **Biomarkers**, v. 5, n. 1, p. 9-23, 2000.
- BAUSSANT, T. et al. Enzymatic and cellular responses in relation to body burden of PAHs in bivalve molluscs: A case study with chronic levels of North Sea and Barents Sea dispersed oil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 12, p. 1796-1807, 12// 2009. ISSN 0025-326X.
- 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 08906238 (ISSN).
- CARLS, M. G. et al. Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 2, p. 121-127, 2008.
- DI PAOLO, C. et al. The value of zebrafish as an integrative model in effect-directed analysis - a review. **Environmental Sciences Europe**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2015.
- EMERSON, K. et al. Aqueous Ammonia Equilibrium Calculations: Effect of pH and Temperature. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 12, p. 2379-2383, 1975/12/01 1975. ISSN 0015-296X.
- GUERIN, T. F. Environmental liability and life-cycle management of used lubricating oils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 160, n. 2-3, p. 256-264, 12/30/ 2008. ISSN 0304-3894.
- HERMSEN, S. A. B. 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, 4// 2011. ISSN 0887-2333.
- HICKEN, C. E. et al. Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 17, p. 7086-7090, 2011.
- 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, 2004/4/15 2004.
- INCARDONA, J. P. et al. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 217, n. 3, p. 308-321, 2006.
- INCARDONA, J. P. et al. Deepwater horizon crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 15, p. E1510-E1518, 2014.

- JEFFRIES, M. K. S. et al. The fish embryo toxicity test as a replacement for the larval growth and survival test: A comparison of test sensitivity and identification of alternative endpoints in zebrafish and fathead minnows. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 6, p. 1369-1381, 2015.
- JIANG, L.-L. et al. Gambogic acid causes fin developmental defect in zebrafish embryo partially via retinoic acid signaling. **Reproductive Toxicology**, v. 63, p. 161-168, 8// 2016. ISSN 0890-6238.
- KENNEDY, C. J. Multiple Effects of Oil and Its Components in Fish. In: (Ed.). **Impacts of Oil Spill Disasters on Marine Habitats and Fisheries in North America**: CRC Press, 2014. p.3-34. (Marine Biology). ISBN 978-1-4665-5720-8.
- KHAN, E.; VIROJNAGUD, W.; RATPUKDI, T. Use of biomass sorbents for oil removal from gas station runoff. **Chemosphere**, v. 57, n. 7, p. 681-689, 11// 2004. ISSN 0045-6535.
- KOROLEFF, F. Determination of ammonia. In: GRASSHOFF, K. (Ed.). **Methods of seawater analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, 1976.
- LANDRUM, P. F. et al. Bioaccumulation and critical body residue of PAHs in the amphipod, *Diporeia* spp.: Additional evidence to support toxicity additivity for PAH mixtures. **Chemosphere**, v. 51, n. 6, p. 481-489, 2003.
- LEMOS, R. T. D. O.; CARVALHO, P. S. M. D.; 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, 5/15/ 2014. ISSN 0025-326X.
- LOGAN, D. T. Perspective on Ecotoxicology of PAHs to Fish. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 13, n. 2, p. 302-316, 2007/03/20 2007. ISSN 1080-7039.
- MCINTYRE, J. K. et al. Zebrafish and clean water technology: Assessing soil bioretention as a protective treatment for toxic urban runoff. **Science of The Total Environment**, v. 500–501, p. 173-180, 12/1/ 2014. ISSN 0048-9697.
- MCINTYRE, J. K. et al. Confirmation of Stormwater Bioretention Treatment Effectiveness Using Molecular Indicators of Cardiovascular Toxicity in Developing Fish. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 1561-1569, 2016.
- MENZIE, C. A. et al. Urban and suburban storm water runoff as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to Massachusetts estuarine and coastal environments. **Estuaries**, v. 25, n. 2, p. 165-176, 2002. ISSN 0160-8347.
- NRC. Oil in the Sea – Inputs, Fates and Effects. **National Academy Press, Washington**, v. Second ed., 2003.
- OECD. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. Paris: OECD Publishing, 2013.

- OROS, D. R. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in San Francisco Bay: A 10-year retrospective of monitoring in an urbanized estuary. **Environmental Research**, v. 105, n. 1, p. 101-118, 2007.
- PATHIRATNE, A.; HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, K. A. S. Assessment of bile fluorescence patterns in a tropical fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to naphthalene, phenanthrene, pyrene and chrysene using fixed wavelength fluorescence and synchronous fluorescence spectrometry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, n. 5, p. 554-558, 2010.
- 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.
- PETERSON, C. H. et al. Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. **Science**, v. 302, n. 5653, p. 2082-2086, 2003/12/19 2003.
- RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1–12, p. 17-23, 9// 2002. ISSN 0025-326X.
- REGO, E. C. P.; PEREIRA NETTO, A. D. PAHs and BTEX in groundwater of gasoline stations from Rio de Janeiro City, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, n. 6, p. 660-664, 2007.
- SCHWACKE, L. H. et al. Health of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Barataria Bay, Louisiana, following the Deepwater Horizon oil spill. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 93-103, 2014.
- STEIN, E. D.; TIEFENTHALER, L. L.; SCHIFF, K. Watershed-based sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban storm water. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 373-385, 2006.
- TORREIRO-MELO, A. G. A. G. et al. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. **Chemosphere**, v. 132, p. 17-23, 2015.
- TROISI, G.; BARTON, S.; BEXTON, S. Impacts of oil spills on seabirds: Unsustainable impacts of non-renewable energy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 16549-16555, 2016.
- USEPA. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268. EPA/600/4-90/027F.: 1993.
- _____. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T) 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460, EPA/821/R-02/012.: 2002.

- WILLIS, A. M.; ORIS, J. T. Acute photo-induced toxicity and toxicokinetics of single compounds and mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 9, p. 2028-2037, 2014.
- WINATA, C. L. et al. The role of vasculature and blood circulation in zebrafish swimbladder development. **BMC Developmental Biology**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2010. ISSN 1471-213X.
- XU, Y. X. et al. Developmental toxicity of insecticide beta-cypermethrin on zebrafish embryos. **Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 27, n. 2, p. 256-262, 2013.

III MANUSCRITO II

Sensibilidade de embriões e larvas do peixe *Danio rerio* a efluentes de postos revendedores de combustível

RESUMO

Os primeiros estágios de desenvolvimento dos peixes, embriões e larvas, são particularmente sensíveis à poluição da água, se mostrando vulneráveis aos efeitos nocivos de contaminantes químicos e sendo há muito tempo o foco para a detecção da toxicidade de diversas substâncias químicas. A sensibilidade de embriões e de larvas recém eclodidas do zebrafish (*Danio rerio*) foi avaliada utilizando-se efluentes de sistemas de separação de água e óleo (SSAO) de quatro postos revendedores de combustível. As exposições dos embriões aos efluentes foram iniciadas 4 horas pós-fecundação, e se estenderam por mais 96 h, fase de vida utilizada como modelo no protocolo OECD 236, (2013). A exposição das larvas recém-eclodidas foi iniciada 72 horas pós-fecundação, e se estenderam por mais 96 h, fase de vida utilizada como modelo no protocolo ABNT 15499, (2015). O tipo de recipiente utilizado durante a exposição também foi testado, e tanto os embriões quanto as larvas foram mantidos isoladamente em poços individuais de placas plásticas para cultivo de células, ou mantidos em grupo em béqueres de vidro com 100 mL de volume. O parâmetro de efeito avaliado foi a mortalidade. As concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) nas amostras foram quantificadas pelo método de fluorescência fixa, e as diluições das amostras também foram expressas em equivalentes do HPA fenantreno em $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados mostraram uma maior sensibilidade dos embriões tanto nos testes com exposição em placas multi-poços quanto nas exposições em béqueres. A CL50-96 h (concentração letal a 50 % dos organismos após 96 horas de exposição) de efluentes dos postos 1 e 2 para embriões expostos em béqueres foi igual a 5,2 % e 3,5 % (V/V), respectivamente, e igual a 10% e 7,6% (V/V) para efluentes dos postos 3 e 4, respectivamente. Não foi possível calcular a CL50 dos efluentes para as larvas, pois as taxas de mortalidade não ultrapassaram 30% mesmo nas maiores concentrações dos efluentes de 20 % e 25 % (V/V). Além disso, as CEO (concentrações de efeito observado) dos efluentes foram iguais a 10 % (V/V) para embriões expostos em béqueres e 25 % para larvas expostas em béqueres, corroborando uma maior sensibilidade da fase inicial de desenvolvimento de *Danio rerio* que inclui o desenvolvimento embrionário inicial. Sendo

assim, o presente estudo sugere a utilização de embriões em testes ecotoxicológicos com HPAs e a inclusão de embriões na norma ABNT 15499, (2015).

1. INTRODUÇÃO

O estado e a saúde do ambiente aquático são constantemente monitorados para que os efeitos da poluição possam ser melhor compreendidos e o seu impacto reduzido, tendo essa poluição muitas fontes, tais como a deposição de esgotos domésticos, a lixiviação de terras, a precipitação atmosférica e os resíduos industriais (WAKE, 2005). Essas fontes lançam diferentes tipos de efluentes nos sistemas aquáticos e dentre estes, alguns se destacam pelo seu alto poder tóxico, como os metais pesados (JEZIERSKA *et al.*, 2009), as dioxinas (CARVALHO, 2002), bifenilos policlorados (PCBs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (INCARDONA *et al.*, 2004; DI GIULIO e CLARK, 2015; ALVES *et al.*, 2016). Com isso, especialistas em toxicologia aquática observaram que os organismos aquáticos podem ser indicadores sensíveis dos efeitos deletérios dos tóxicos químicos (SPRAGUE, 1977). Neste sentido, os estágios iniciais de vida dos peixes têm sido um modelo sensível e rápido para elucidar os efeitos tóxicos de misturas de hidrocarbonetos (BILLIARD *et al.*, 2007).

Os HPAs são contaminantes ambientais derivados do petróleo e gerados pela combustão incompleta de compostos orgânicos, sendo lançados no ambiente através de fontes naturais, tais como exsudações de petróleo e incêndios florestais, e através de uma variedade de atividades antropogênicas (BILLIARD *et al.*, 2007), tais como despejo de esgoto doméstico, acidentes com petroleiros (INCARDONA *et al.*, 2013), escoamento de águas superficiais (MCINTYRE *et al.*, 2014) e efluentes de postos de gasolina (KHAN *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2016). Além do seu alto potencial carcinogênico para humanos e animais selvagens (DOUBEN, 2003), uma exposição crônica de espécies de peixes a alguns HPAs leva à indução do gene CYP1A e de sua respectiva enzima de biotransformação de fase 1 etoxiresorufina-orto-deetilase (EROD), edemas, hemorragias, disfunção cardíaca, mutações, alterações hereditárias na progênie, deformidades morfológicas, morte celular neuronal, anemia, crescimento reduzido e taxas de mortalidade aumentadas (BILLIARD *et al.*, 2007). Devido ao aumento da urbanização e utilização cada vez maior de combustíveis fósseis, os HPAs se tornaram contaminantes constantemente presentes nos ambientes aquáticos, sendo hoje um dos principais focos dos estudos ecotoxicológicos em organismos aquáticos (CARLS *et al.*, 2008; INCARDONA *et al.*, 2014; SEILER *et al.*, 2014).

Dentre as principais fontes de HPAs em áreas urbanas estão os postos revendedores de combustíveis, que além de armazenarem uma grande quantidade de combustíveis fósseis em seus tanques geram resíduos a partir das atividades de abastecimento dos automóveis. Para evitar que esses resíduos sejam lançados diretamente no solo, esses estabelecimentos instalam canaletas regulamentadas pelos órgãos fiscalizadores no entorno das áreas de abastecimento, criando assim as “ilhas de bombas”. As canaletas coletam todo o combustível derramado durante as atividades de abastecimento, como gasolina e óleo diesel, e destinam esses resíduos para sistemas de separação de água e óleo (SSAO). No SSAO há uma separação física da água e do óleo, sendo o efluente final dessa separação destinado para tratamento por empresas especializadas ou descartado nas galerias de águas pluviais, culminando no carreamento desses efluentes para os corpos hídricos receptores e conseqüentemente na exposição da biota aquática aos HPAs existentes nesses efluentes.

Em sua revisão, (MCKIM, 1977) verificou que os estágios embrio-larval e juvenil de quatro espécies de peixes (*Pimephales promelas*, *Jordanella floridae*, *Salvelinus fontinalis* e *Lepomis macrochirus*) foram mais sensíveis quando comparados com indivíduos adultos em 76 % dos 56 testes de toxicidade envolvendo diversas fases do ciclo de vida destas espécies após exposição a 34 diferentes tipos de contaminantes, 76,7% apresentaram. Nos testes realizados com metais pesados 76% também apresentaram os estágios embrio-larval e juvenil como os mais sensíveis, 19% adultos como mais sensíveis e mesma sensibilidade para todos os estágios de desenvolvimento em apenas um teste. Já para os 4 testes realizados com PCBs os estágios embrio-larval e juvenil se mostraram os mais sensíveis. Além disso, foi observada uma maior sensibilidade de larvas (10 ± 2 dias pós eclosão), quando comparados com indivíduos pós-larva (60 ± 4 dias pós eclosão), expostos a Sulfato de Cobre (CuSO_4), Cloreto de Sódio (NaCl) e Cloreto de Potássio (KCl), por até 48 horas (FREIRY *et al.*, 2014). Esses dados fortalecem a hipótese de que os estágios iniciais de desenvolvimento de peixes, incluindo embriões e larvas, se apresentam como mais sensíveis para testes ecotoxicológicos, além de necessitar de menos tempo de exposição e volume dos contaminantes para realizar tais testes, quando comparados com indivíduos jovens ou adultos.

Em anos recentes, os bioensaios com embriões e larvas do zebrafish (*Danio rerio*) ganharam aceitação crescente como métodos de avaliação da toxicidade de contaminantes, devido à facilidade de seu cultivo e reprodução em laboratório, da fisiologia bem descrita deste peixe, a um genoma sequenciado e a um conhecimento abrangente em relação à biologia do desenvolvimento (CARLSSON *et al.*, 2014). O zebrafish possui ovos e embriões transparentes, o que facilita a visualização de lesões ou atrasos no desenvolvimento. Embriões do zebrafish

são hoje um dos principais modelos biológicos utilizados em testes ecotoxicológicos, proporcionando um modelo de organismo completo para rastreio de embriotoxicidade de alto rendimento (CARLSSON *et al.*, 2014). Dentre os testes padronizados com o zebrafish se destacam a norma OECD 236 (2013), que prevê a exposição a partir de embriões com até 4 horas pós-fertilização, e a norma ABNT 15499 (2015) que prevê exposição a partir do estágio de larvas recém eclodidas, 72 horas pós-fertilização. Alguns autores afirmam que os embriões do zebrafish estão protegidos pelo córion e dessa forma seriam menos sensíveis a diversas substâncias químicas, a exemplo do metal pesado chumbo, que larvas após a eclosão (STOUTHART *et al.*, 1994; HENN e BRAUNBECK, 2011).

Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar diferenças na sensibilidade de embriões e larvas, baseadas na taxa de mortalidade de indivíduos expostos a partir do estágio embrionário inicial 4 hpf e a partir do estágio larval inicial 72 hpf a concentrações controladas de efluentes de postos revendedores de combustíveis por 96 horas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção das Amostras

As coletas foram realizadas em quatro postos revendedores de combustíveis da cidade do Recife/PE, Brasil, sendo dois localizados na Avenida Recife (Posto 1 e Posto 2) e dois na Avenida Mascarenhas de Moraes (Posto 3 e Posto 4). As amostras foram coletadas no último compartimento do sistema de separação de água e óleo (SSAO) com o auxílio de uma garrafa âmbar de 1 litro acoplada a uma cesta de alumínio fixada a uma vara de mesmo material. Em cada posto foram coletados seis litros de efluente. Após a coleta as garrafas foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo, para melhor conservação das amostras. Para retirar as partículas sólidas dispersas nos efluentes coletados, foram realizadas filtrações em sequência em papéis filtro de porosidade 25, 8 e 2 μm , e por último numa membrana de celulose filtrante de 0,45 μm . No processo foi utilizada uma bomba a vácuo isenta de óleo Tecnal TE-0581. Após a bateria de filtração, os efluentes foram guardados em frascos de vidro âmbar de um litro, envoltos por papel alumínio e acondicionados em refrigerador a 4 °C até serem utilizados no experimento.

2.2 Cultivo e Obtenção dos embriões e larvas

A água doce utilizada para o cultivo dos peixes, realização dos experimentos e diluição dos efluentes foi esterilizada utilizando um sistema de esterilização por luz ultravioleta (UV). As características físico-químicas da água durante os experimentos foram medidas com sonda YSI Professional Plus. O pH variou de 7,2 a 8,25, a condutividade variou de 2,1 a 3,0 mS/cm, o oxigênio dissolvido variou de 5,5 a 7 mg/L e a temperatura variou de 26,2 a 26,8 °C.

Os ovos e larvas de *Danio rerio* utilizados nos experimentos foram oriundos de reprodutores cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da UFPE. A seleção dos ovos foi feita por observação em lupa, e somente ovos viáveis com membrana de fertilização aparente e até 4 horas após a fecundação (hpf) foram selecionados. Ovos que apresentaram coagulação, opacidade e/ou infestação por fungos foram descartados. As larvas para realização do experimento foram obtidas a partir dos ovos viáveis pré-selecionados, eclodindo tipicamente entre 48 e 72 horas após a fecundação. Somente larvas saudáveis foram utilizadas, selecionadas com base na capacidade de se movimentar e pela aparência geral sem anomalias.

2.3 Testes de toxicidade com *Danio rerio*

A toxicidade foi avaliada com base na taxa de mortalidade de embriões e lavas expostos por 96 horas aos efluentes coletados. Os embriões foram considerados mortos quando pôde-se observar uma ou mais patologia descrita na OECD 236 (coagulação, ausência de somitos, não destacamento da cauda e ausência de batimento cardíaco). Para as larvas, foi considerada mortalidade quando pôde-se observar ausência de movimento, ausência de circulação e/ou ausência de batimento cardíaco.

A exposição dos embriões e das larvas aos efluentes foi feita utilizando-se béqueres de vidro sugeridos pela norma ABNT 15499 (2015) e placas de cultivo de células conforme norma OECD 236 (2013). Para todos os testes as amostras de efluentes nas diferentes concentrações foram renovadas diariamente em 70% do volume num sistema semi-estático. As diluições dos ECSPCs foram realizadas utilizando-se recipientes volumétricos de vidro apropriados para se preparar as concentrações desejadas de 0,1%, 1%, 10%, 20% e 25% V/V.

2.3.1 Teste de toxicidade com embriões

Os embriões pré-selecionados com no máximo 4 hpf foram expostos em béqueres por 96 h a quatro concentrações dos ECSPCs (0,1%, 1%, 10% e 25% V/V) mais o controle, em réplicas. Foram adicionados 10 embriões em cada béquer com um volume total de solução de 100 mL, perfazendo um total de 30 embriões por tratamento. As mortalidades foram contabilizadas diariamente até o término do teste, sendo os embriões mortos retirados do béquer a cada dia. Para os testes utilizando placas de 24 poços, os embriões foram expostos por 96h a quatro concentrações dos ECSPCs (0,1%, 1%, 10% e 20%) mais o controle. Foi adicionado um

embrião em cada poço, com um volume total de solução de 3 mL, totalizando 20 embriões em cada placa, uma para cada concentração dos ECSPCs (0,1%, 1%, 10% e 25% V/V). Cada placa tinha 4 embriões mantidos em água de cultivo como controles internos, conforme OECD 236, 2013.

2.3.2 Teste de toxicidade com larvas

As larvas pré-selecionados com no máximo 72 hpf foram expostas em béqueres por 96 h a quatro concentrações dos ECSPCs (0,1%, 1%, 10% e 25% V/V) mais o controle, em trélicas. Foram adicionados 10 larvas em cada béquer com um volume total de solução de 100 mL, perfazendo um total de 30 larvas por tratamento. As mortalidades foram contabilizadas diariamente até o término do teste, sendo as larvas mortas retiradas do béquer a cada dia. Para os testes utilizando placas de 12 poços, as larvas foram expostas por 96h a quatro concentrações dos ECSPCs (0,1%, 1%, 10% e 20%) mais o controle. Foi adicionado uma larva em cada poço, com um volume total de solução de 6 mL, totalizando 10 larvas em cada placa, duas para cada concentração dos ECSPCs (0,1%, 1%, 10% e 25% V/V), totalizando 20 larvas expostas para cada concentração. Cada placa tinha 2 larvas mantidas em água de cultivo como controles internos, conforme OECD 236, 2013. As larvas não foram alimentadas durante o teste.

2.4 Quantificação da concentração dos HPAs presentes nas amostras

Amostras das diferentes concentrações dos efluentes, 0,1%, 1%, 10%, 20% e 25%, foram analisadas no espectrofluorímetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA), em trélicas, pelo método de Fluorescência Fixa (FF). 300µL das amostras diluídas concentrações foram pipetadas em placas de fluorescência pretas de 96 poços, modelo Fluotrac 200 (Greiner BioOne, Americana, Brasil). Os resultados foram expressos em Unidades Relativas de Fluorescência (URFs). Os pares de excitação/emissão usados para naftaleno (NAF), fenantreno (FEN) e criseno (CRI) foram 290/335, 260/380 e 310/360, respectivamente (AAS *et al.*, 2000; PATHIRATNE *et al.*, 2010; LEMOS *et al.*, 2014). As URFs das amostras foram convertidas para concentrações em equivalentes dos HPAs baseadas em curvas de calibração construídas a partir de 11 concentrações isoladas de NAF, FEN e CRI dissolvidos em água limpa. Tais curvas foram expressas pelas equações lineares abaixo:

1. $URF = 0.936 X + 10.844$ NAF; ($R^2 = 0.99$), concentrações variando de 1,9 a 2,000 µg L⁻¹;

2. $URF = 6.3653x + 6.2407$ FEN; ($R^2 = 0.99$), concentrações variando de 1.9 a 2000 μg L-1;
3. $URF = 0.513x + 5.1062$ CRI; ($R^2 = 0.99$), concentrações variando de 1.9 a 2000 μg L-1.

2.5 Análise dos dados

As taxas de mortalidade de embriões e larvas foram utilizadas para calcular a concentração letal para 50% dos indivíduos após 96 horas de exposição ($CL_{50_{96h}}$). O cálculo da CL_{50} foi feito utilizando-se o programa USEPA Trimmed Spearman-Kärber (USEPA, 2002). Para os testes realizados em réplicas nos béqueres, a concentração de efeito não observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO) foi calculada por análise de variância (ANOVA), seguida do teste a posteriori de Dunnett.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram uma maior sensibilidade dos embriões tanto nos testes com exposição em béqueres quanto em placas multi-poços. A $CL_{50-96\text{ h}}$ (concentração letal a 50% dos organismos após 96 h de exposição) de efluentes dos postos 1 e 2 para embriões expostos em béqueres foi igual a 5,2 % e 3,5 % (V/V), respectivamente (Figura 1), e igual a 10% e 7,6% (V/V) para efluentes dos postos 3 e 4 para embriões expostos em placas, respectivamente (Figura 2).

Para larvas expostas em béqueres não foi possível calcular a CL_{50} , pois a mortalidade máxima foi igual a 17% e 27% na concentração de 25% dos efluentes dos postos 1 e 2, respectivamente (Figura 3). Também não foi possível calcular a CL_{50} para as larvas expostas em placas, sendo que as maiores taxas de mortalidade foram iguais a 5% e 30% na concentração 20% dos efluentes dos postos 3 e 4, respectivamente (Figura 4). Estes dados indicam uma sensibilidade superior a 5 vezes para os embriões expostos em béqueres quando comparados com as larvas, e superior a 2 vezes para os embriões expostos em placas de poliestireno quando comparados com as larvas nas mesmas condições.

Figura 1. Taxas de mortalidade de embriões expostos aos efluentes dos postos 1 e 2 utilizando béqueres. P1: posto 1; P2: posto 2. Fen: fenantreno; Naf: naftaleno; Cri: criseno. $CL_{50_{96h}}$:

concentração letal para 50% dos embriões expostos. N: total de embriões expostos por concentração.

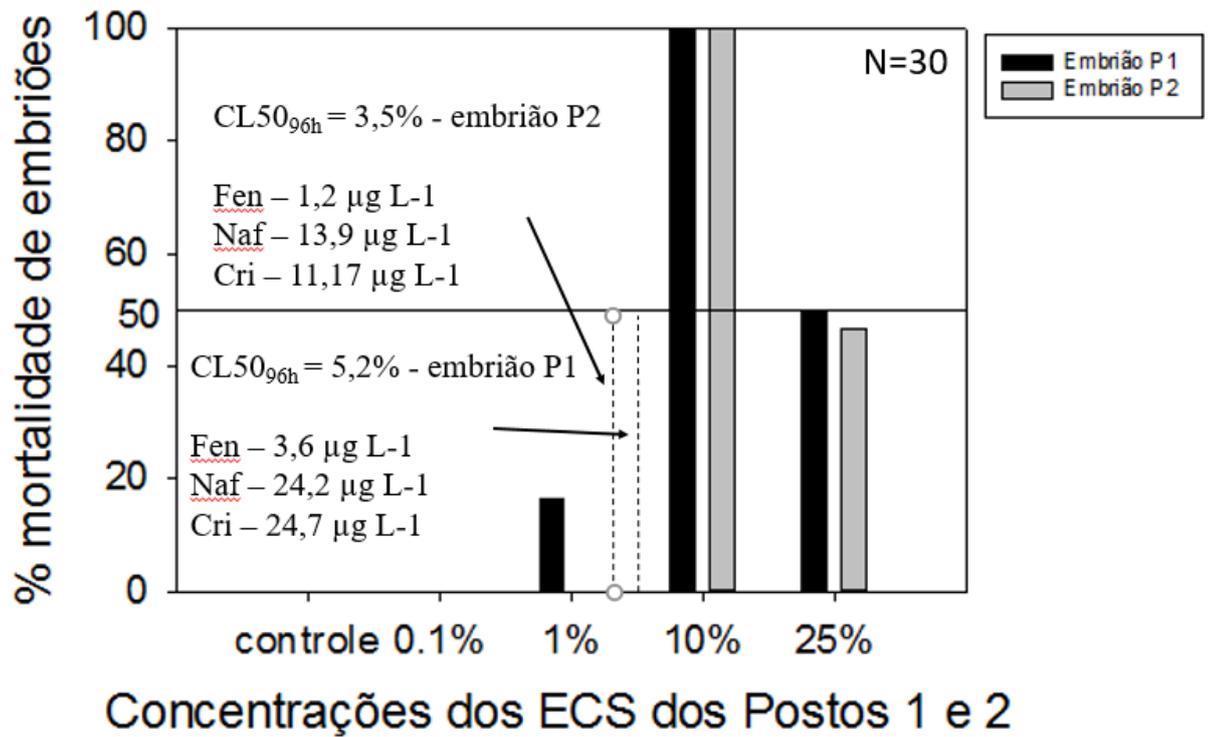


Figura 2. Taxas de mortalidade de embriões expostos aos efluentes dos postos 3 e 4 utilizando placas de cultivo de células. P3: Posto 3. P4: Posto 4. Fen: fenantreno; Naf: naftaleno; Cri: criseno. CL50_{96h}: concentração letal para 50% dos embriões expostos. N: total de embriões expostos por concentração.

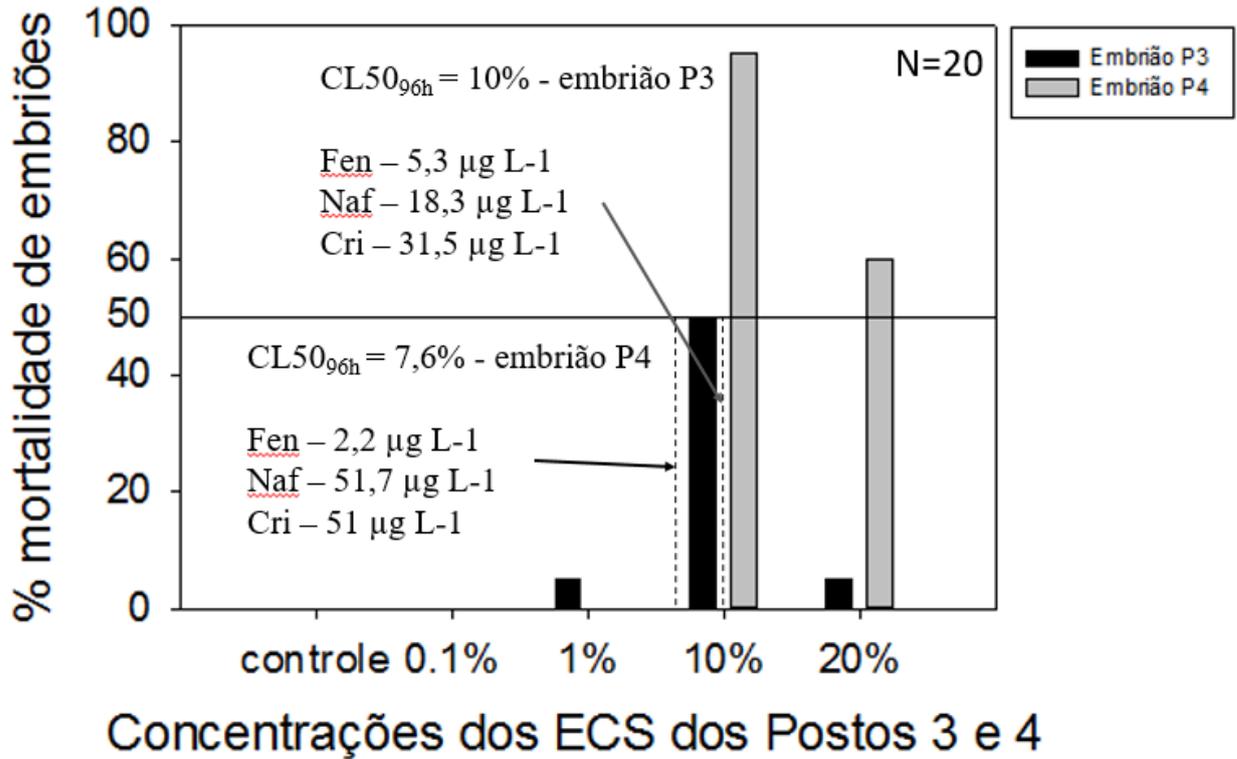


Figura 3. Taxas de mortalidade de larvas expostas aos efluentes dos postos 1 e 2 utilizando béqueres. P1: posto 1; P2: posto 2. N: total de larvas expostas por concentração.

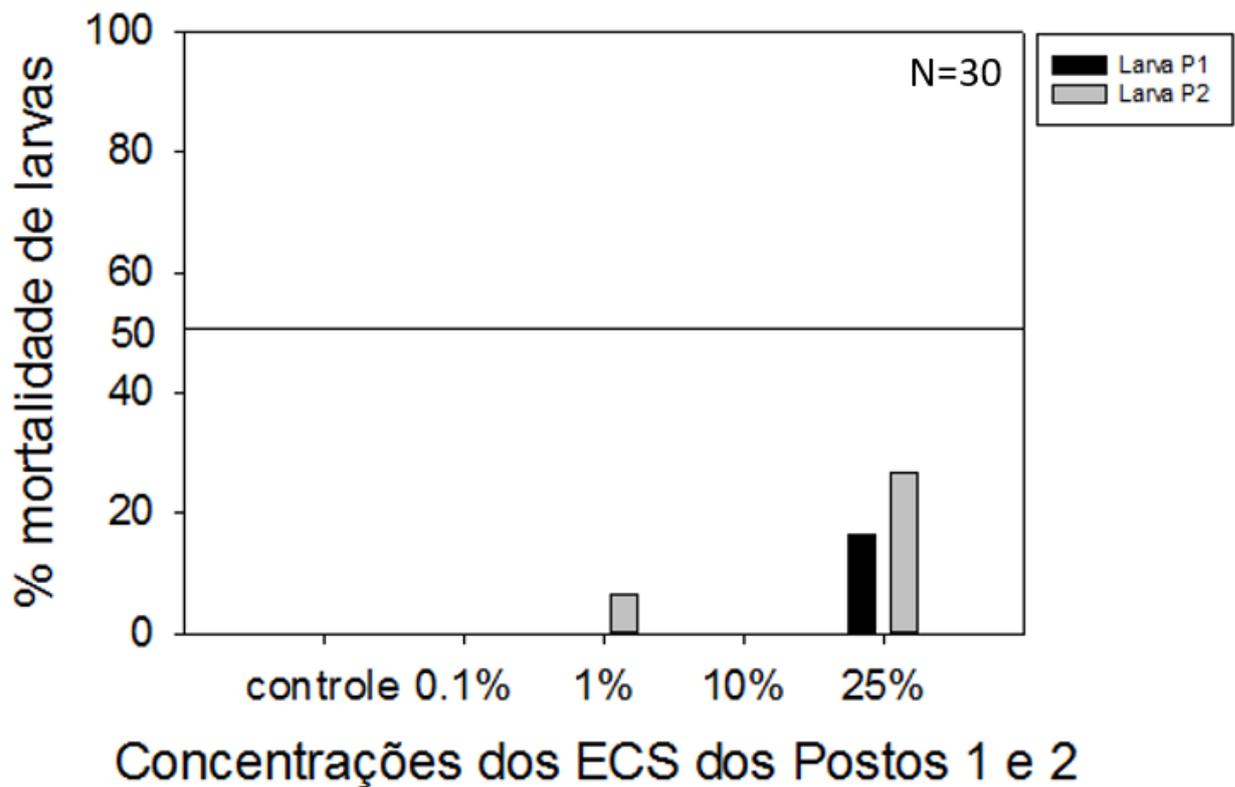
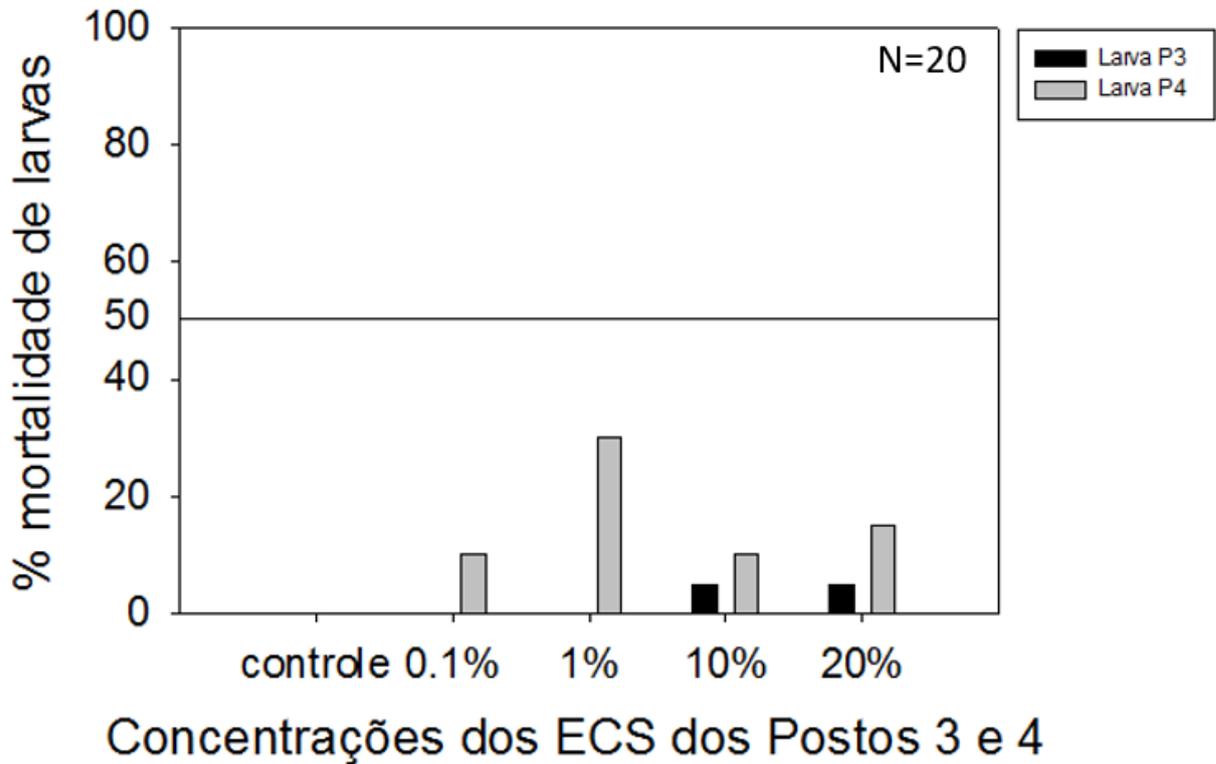


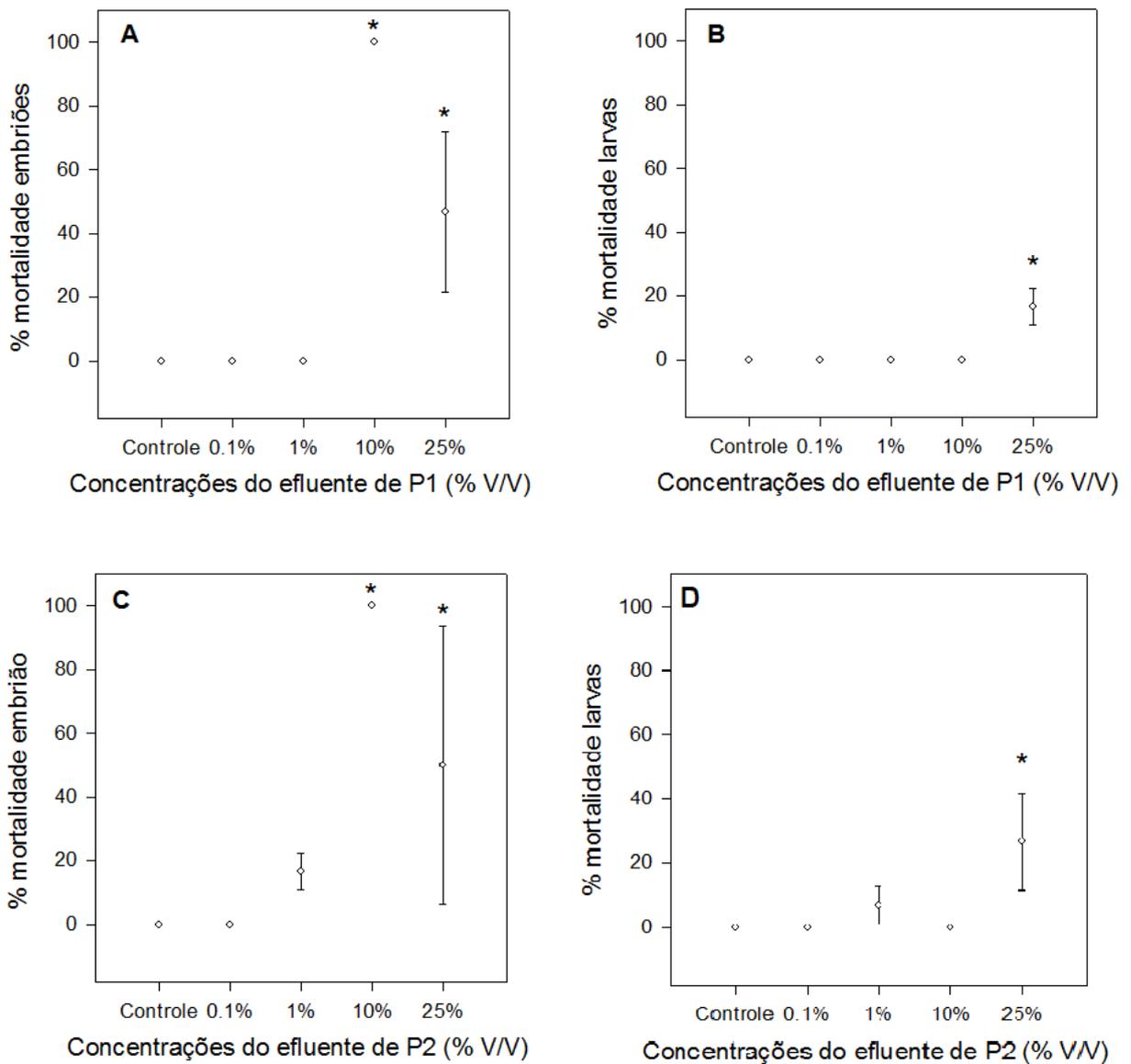
Figura 4. Taxas de mortalidade de larvas expostas aos efluentes dos postos 3 e 4 utilizando placas de cultivo de células. P3: Posto 3. P4: Posto 4. N: total de larvas expostas por concentração.



As concentrações de efeito observado (CEOs) para embriões e para larvas expostos em béqueres aos efluentes foram iguais a 10% e 25%, respectivamente (Figura 5), indicando também uma maior sensibilidade dos embriões.

Figura 5. Taxas de mortalidade (média \pm desvio padrão) de embriões e larvas expostos em béqueres aos efluentes testados. A e B: embriões e larvas expostos a efluentes do posto 1. C e D: embriões e larvas expostos a efluentes do posto 2.

* diferença estatisticamente significativa relativa ao controle (ANOVA seguida de teste de Dunnett, $p < 0,05$)



As concentrações médias de equivalentes de naftaleno, fenantreno e criseno para cada posto estão dispostas na tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações de equivalentes de fenantreno, naftaleno e criseno dos ECS dos postos 1, 2, 3 e 4.

Concentração média em equivalentes ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
HPA	Posto 1	Posto 2	Posto 3	Posto 4
Fenantreno	139	276	53	29
Naftaleno	1584	1863	183	681
Criseno	1278	1903	315	670

Os resultados encontrados neste estudo indicam claramente uma maior sensibilidade da fase inicial de desenvolvimento, indo desde o estágio de embriões com até 4 hpf até larvas com 96 hpf, comparado com o outro estágio testado, iniciando a exposição com larvas recém eclodidas com 72 hpf, e se estendendo por mais 96 h. Estes resultados contrastam com resultados de BERTOLETTI (2000), que verificou que as larvas foram mais sensíveis do que os embriões para o cobre (2,5 vezes), cádmio (7,4 vezes), níquel (3,0 vezes) e fenol (3,7 vezes), em termos de CL_{50}_{168h} . BERTOLETTI (2000) iniciou a exposição dos embriões com 20 hpf, e se estendeu por mais 7 dias, e a exposição das larvas se iniciou com larvas 72 hpf, e se estendeu por 7 dias também. Resultado semelhante foi encontrado por ANSARI e ANSARI (2015), onde os autores expuseram, embriões e larvas a concentrações de níquel, zinco e cromo, por 72h e 96h, respectivamente, e observaram uma maior sensibilidade de larvas quando comparados com embrião. No entanto, não fica claro o período no qual foi iniciada a exposição dos embriões. Vale salientar que Bertoletti (2000) verificou uma maior sensibilidade dos embriões (2,1 vezes) quando expostos ao surfactante dodecil-sulfato de sódio (DSS), e sensibilidade similar entre os estágios de desenvolvimento mencionados para mercúrio, prata, zinco, NaCl e amônia. Sensibilidade maior de embriões também foi observada para a espécie *Trichogaster fasciata* expostos a chlorpyrifos (SUMON *et al.*, 2016).

Outro fator que pode influenciar nos efeitos dos contaminantes é o período no qual se inicia a exposição. Em seu trabalho, Bertoletti (2000) expôs embriões a partir de 20h após a fecundação, quando os mesmos já estão em estágio avançado de desenvolvimento, o que pode ter prevenido efeitos embriotóxicos nestas fases iniciais de desenvolvimento, mascarando a sensibilidade dos mesmos, já que o período inicial de desenvolvimento embrionário, logo após a fertilização incluindo o período de gastrulação precoce, e provavelmente o período que abrange o rompimento do córion e a eclosão da larva são os mais sensíveis à intoxicação (HEN CHOW e CHENG, 2003; JEZIERSKA *et al.*, 2009; BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015). Também vale salientar que de 15 a 20% de mortalidade de embriões de *Danio rerio* ocorrem nas primeiras 8 h após a fertilização em embriões expostos ao metilmercúrio (SAMSON e SHENKER, 2000) e ao cádmio (HALLARE *et al.*, 2005) o que evidencia a sensibilidade deste período inicial de desenvolvimento do embrião a contaminantes metálicos e organometálicos

Outra possível explicação para essa discrepância inclui a diferença nos tempos de exposição utilizados, e também possíveis diferenças nos mecanismos de toxicidade, uma vez que neste trabalho foram utilizados efluentes compostos por misturas complexas incluindo HPAs, não testados por Bertoletti (2000) e ANSARI e ANSARI (2015), que focaram principalmente em metais. KONING *et al.* (2015) mostraram que a exposição de embriões a

substâncias com valores mais elevados de Kow resultam numa maior absorção e que mais de 90% dos compostos lipofílicos utilizados nas exposições são absorvidos pelo embrião, como pode ser o caso dos HPAs presentes nos efluentes utilizados neste trabalho (figura 1). Por outro lado, os metais pesados parecem ser bloqueados pelo córion através da acumulação no ou dentro do mesmo (Henn and Braunbeck, 2011), sendo sugerido sua remoção antes da exposição dos embriões para obter uma efetiva exposição do embrião, já que o córion pode atenuar a captação destes metais pelo embrião. Estas considerações sobre a absorção de contaminantes através do córion justificaria a sensibilidade maior de embriões expostos aos ECSPCs contendo HPAs, que apresentariam uma maior facilidade de adentrarem no córion e serem absorvidos pelos embriões, quando comparados com os metais pesados.

Apesar dessa possível dificuldade de ultrapassar o córion, trabalhos anteriores expõem o zebrafish a partir do período de gastrulação, evidenciaram uma alta sensibilidade dos embriões a cádmio e zinco (JEZIERSKA *et al.*, 2009), retardo na eclosão de embriões expostos por até 16 dias, iniciando a exposição no estágio de blástula, causado pela exposição a cobre e zinco (DAVE e XIU, 1991), hipopigmentação da cabeça e dos olhos, anomalias do saco vitelino, curvatura axial alterada e malformação da cauda de embriões expostos a partir de 5hpf ao cádmio (SHUK HAN *et al.*, 2000). Outros trabalhos evidenciaram uma alta sensibilidade de embriões de peixes a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos derivados do petróleo, onde embriões do zebrafish foram expostos a misturas compostas por HPAs (fenantreno, naftaleno, criseno, pireno, benzo(a)pireno, dentre outros), apresentando cardiotoxicidade, hemorragias, malformação da cauda, ausência de pigmentação, retardo na eclosão e mortalidade ainda quando envolvidos pelo córion, e edema pericárdico, ausência de bexiga natatória, não protrusão da boca e alto índice de mortalidade após a eclosão (INCARDONA *et al.*, 2006; CARLS *et al.*, 2008; INCARDONA *et al.*, 2011; MCINTYRE *et al.*, 2014; SEILER *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2016).

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstram que testes de toxicidade com *Danio rerio* envolvendo estágios de desenvolvimento que incluem todo o desenvolvimento embrionário são mais sensíveis do que os estágios larvais após a eclosão, mesmo estando envoltos pelo córion. Embriões do zebrafish se mostraram como o estágio de desenvolvimento ideal para testes ecotoxicológicos envolvendo HPAs, sendo a sua utilização fundamental para a detecção de toxicidade em efluentes líquidos e em ambientes aquáticos. Dessa forma, sugere-se a inclusão

de embriões de *Danio rerio* na norma ABNT 15499 (2015) tendo em vista que este estágio pode ser o mais sensível dependendo do tipo de contaminante envolvido e da fase exata de desenvolvimento abrangida durante a exposição.

5. REFERÊNCIAS

- AAS, E.; BEYER, J.; GOKSØYR, A. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: An evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. **Biomarkers**, v. 5, n. 1, p. 9-23, 2000.
- AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Naphthalene-induced differential tissue damage association with circulating fish phagocyte induction. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 1, p. 7-15, 2003/1 2003.
- ALI, S.; LIU, G. Antioxidant enzyme activities in *exopalaemon carinicauda*, holthuis, 1950, (Decapoda: Palaemonidae) in response to naphthalene. **Advanced Science Letters** **19**, p. 3655-3659, 2013.
- ALVES, R. N. et al. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to zebrafish *Danio rerio*. 2016.
- 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.
- ANSARI, S.; ANSARI, B. A. Effects of Heavy Metals on the Embryo and Larvae of Zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae). **Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB)**, 2015.
- BAUSSANT, T. et al. Enzymatic and cellular responses in relation to body burden of PAHs in bivalve molluscs: A case study with chronic levels of North Sea and Barents Sea dispersed oil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 12, p. 1796-1807, 12// 2009. ISSN 0025-326X.
- BEASLEY, V. R.; LEVENGOOD, J. M. Chapter 66 - Principles of ecotoxicology A2 - Gupta, Ramesh C. In: (Ed.). **Veterinary Toxicology (Second Edition)**. Boston: Academic Press, 2012. p.831-855. ISBN 978-0-12-385926-6.
- 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 08906238 (ISSN).
- BERTOLETTI, E. **Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio* (Pisces, CYPRINIDAE)**. 2000. 102 Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BILLIARD, S. M. et al. Nonadditive effects of PAHs on Early Vertebrate Development: Mechanisms and Implications for Risk Assessment. **Oxford University Press on behalf of the Society of Toxicology**, 2007.
- CARLS, M. G. et al. Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 2, p. 121-127, 2008.
- CARLS, M. G.; MARTY, G. D.; HOSE, J. E. Synthesis of the toxicological impacts of the Exxon Valdez oil spill on Pacific herring (*Clupea pallasii*) in Prince William Sound, Alaska, U.S.A. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 59, p. 153-172, 2002 2002.

- CARLS, M. G.; RICE, S. D.; HOSE, J. E. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval Pacific herring (*Clupea pallasii*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 481-493, 1999/3/1 1999.
- CARLSSON, G. et al. Toxicity screening of produced water extracts in a zebrafish embryo assay. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 77, n. 9-11, p. 600-615, 2014.
- CARVALHO, P. S. et al. Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus Brasiliensis*. **Mar Environ Res**, v. 66, p. 205–207, 2008 Feb 26 2008. ISSN 0141-1136 (Print).
- CARVALHO, P. S.; TILLITT, D. E. 2,3,7,8-TCDD effects on visual structure and function in swim-up rainbow trout. **Environ Sci Technol**, v. 38, n. 23, p. 6300-6, 2004 Dec 1 2004. ISSN 0013-936X (Print).
- CARVALHO, P. S. M. **Effects of 2,3,7,8-TCDD in swim-up rainbow trout. Evaluation at different levels of biological organization with a focus on visual function.** 2002. PhD Thesis. University of Missouri Columbia
- CCME. Canadian Soil Quality Guidelines for Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Environmental and Human Health Effects). Scientific Supporting Document. **Canadian Council of Ministers of the Environment**, p. 218, 2014.
- COLLIER, T. K. et al. **Effects on Fish of Polycyclic Aromatic HydrocarbonS (PAHS) and Naphthenic Acid Exposures.** *Fish Physiology*. 33: 195-255 p. 2013.
- CORREIA, A. D. et al. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 347, n. 1–2, p. 109-122, 8/24/ 2007. ISSN 0022-0981.
- CRISTALE, J.; SILVA, F. S.; MARCHI, M. R. R. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. **Eclética Química**, v. 33, p. 69-78, 2008.
- DAVE, G.; XIU, R. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 126-134, 1991. ISSN 1432-0703.
- DI GIULIO, R. T.; CLARK, B. W. The Elizabeth River Story: A Case Study in Evolutionary Toxicology. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 18, n. 6, p. 259-298, 2015.
- DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **Toxicology of Fishes.** Boca Raton: Academic Press, 2008. 1101
- DI PAOLO, C. et al. The value of zebrafish as an integrative model in effect-directed analysis - a review. **Environmental Sciences Europe**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2015.

- DOUBEN, P. E. T. **PAHs : an ecotoxicological perspective**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2003. 235
- EMERSON, K. et al. Aqueous Ammonia Equilibrium Calculations: Effect of pH and Temperature. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 12, p. 2379-2383, 1975/12/01 1975. ISSN 0015-296X.
- ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History and New Notes from the Field. **ZEBRAFISH**, 2007.
- ERICKSON, R. J. et al. Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems. **The Toxicology of Fishes**, p. 9-54, 2008.
- FAKSNESS, L.-G. et al. Chemical comparison and acute toxicity of water accommodated fraction (WAF) of source and field collected Macondo oils from the Deepwater Horizon spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 91, n. 1, p. 222-229, 2/15/ 2015. ISSN 0025-326X.
- FREIRY, R. et al. Sensitivity of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) during Two Stages of Development Based on Acute Toxicity Tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 4, p. 442-445, 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, 7// 2015. ISSN 0013-9351.
- GUERIN, T. F. Environmental liability and life-cycle management of used lubricating oils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 160, n. 2–3, p. 256-264, 12/30/ 2008. ISSN 0304-3894.
- HALLARE, A. V. et al. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, n. 1, p. 7-17, 1// 2005. ISSN 0306-4565.
- HEINTZ, R. A.; SHORT, J. W.; RICE, S. D. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus orbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 494–503, 1999 1999.
- HEN CHOW, E. S.; CHENG, S. H. Cadmium affects muscle type development and axon growth in zebrafish embryonic somitogenesis. **Toxicological Sciences**, v. 73, n. 1, p. 149-159, 2003. ISSN 10966080 (ISSN).
- HENN, K.; BRAUNBECK, T. Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 91-98, 2011. ISSN 1532-0456.
- HERMSEN, S. A. B. 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, 4// 2011. ISSN 0887-2333.

- HICKEN, C. E. et al. Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 17, p. 7086-7090, 2011.
- 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, 2004/4/15 2004.
- INCARDONA, J. P. et al. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 217, n. 3, p. 308-321, 2006.
- INCARDONA, J. P. et al. Deepwater horizon crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 15, p. E1510-E1518, 2014.
- INCARDONA, J. P.; LINBO, T. L.; SCHOLZ, N. L. Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 257, n. 2, p. 242-249, 2011.
- INCARDONA, J. P. et al. Exxon Valdez to Deepwater Horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. **Aquatic Toxicology**, v. 142-143, p. 303-316, 2013.
- JEFFRIES, M. K. S. et al. The fish embryo toxicity test as a replacement for the larval growth and survival test: A comparison of test sensitivity and identification of alternative endpoints in zebrafish and fathead minnows. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 6, p. 1369-1381, 2015.
- JEZIEWSKA, B.; ŁUGOWSKA, K.; WITESKA, M. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 625-640, 2009. ISSN 09201742 (ISSN).
- JIANG, L.-L. et al. Gambogic acid causes fin developmental defect in zebrafish embryo partially via retinoic acid signaling. **Reproductive Toxicology**, v. 63, p. 161-168, 8// 2016. ISSN 0890-6238.
- KENNEDY, C. J. Multiple Effects of Oil and Its Components in Fish. In: (Ed.). **Impacts of Oil Spill Disasters on Marine Habitats and Fisheries in North America**: CRC Press, 2014. p.3-34. (Marine Biology). ISBN 978-1-4665-5720-8.
- KHAN, E.; VIROJNAGUD, W.; RATPUKDI, T. Use of biomass sorbents for oil removal from gas station runoff. **Chemosphere**, v. 57, n. 7, p. 681-689, 11// 2004. ISSN 0045-6535.

- KONING, C. et al. Visualizing Compound Distribution during Zebrafish Embryo Development: The Effects of Lipophilicity and DMSO. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 104, n. 6, p. 253-72, Dec 2015. ISSN 1542-9733.
- KOROLEFF, F. Determination of ammonia. In: GRASSHOFF, K. (Ed.). **Methods of seawater analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, 1976.
- LAETZ, C. A. et al. Chapter 18 - Ecotoxicological Risk of Mixtures A2 - Amiard-Triquet, Claude. In: AMIARD, J.-C. e MOUNEYRAC, C. (Ed.). **Aquatic Ecotoxicology**: Academic Press, 2015. p.441-462. ISBN 978-0-12-800949-9.
- LANDRUM, P. F. et al. Bioaccumulation and critical body residue of PAHs in the amphipod, *Diporeia* spp.: Additional evidence to support toxicity additivity for PAH mixtures. **Chemosphere**, v. 51, n. 6, p. 481-489, 2003.
- LEMOS, R. T. D. O.; CARVALHO, P. S. M. D.; 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, 5/15/ 2014. ISSN 0025-326X.
- LOGAN, D. T. Perspective on Ecotoxicology of PAHs to Fish. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 13, n. 2, p. 302-316, 2007/03/20 2007. ISSN 1080-7039.
- LUSHCHAK, V. I. Environmentally Induced Oxidative Stress in Fish. In: ABELE, D.; V´AZQUEZ-MEDINA, J. P., *et al* (Ed.). **Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems**. UK: Wiley-Blackwell, 2011. p.295-307.
- LUZARDO, O. P. et al. Assessment of the exposure to organochlorine pesticides, PCBs and PAHs in six species of predatory birds of the Canary Islands, Spain. **Science of The Total Environment**, v. 472, p. 146-153, 2/15/ 2014. ISSN 0048-9697.
- MCINTYRE, J. K. et al. Zebrafish and clean water technology: Assessing soil bioretention as a protective treatment for toxic urban runoff. **Science of The Total Environment**, v. 500-501, p. 173-180, 12/1/ 2014. ISSN 0048-9697.
- MCINTYRE, J. K. et al. Confirmation of Stormwater Bioretention Treatment Effectiveness Using Molecular Indicators of Cardiovascular Toxicity in Developing Fish. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 1561-1569, 2016.
- MCKIM, J. M. Evaluation of Tests with Early Life Stages of Fish for Predicting Long-Term Toxicity. **J. Fish. Res. Board Can**, v. 34, p. 1148-1154, 1977.
- MENZIE, C. A. et al. Urban and suburban storm water runoff as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to Massachusetts estuarine and coastal environments. **Estuaries**, v. 25, n. 2, p. 165-176, 2002. ISSN 0160-8347.
- MEYER, W. et al. Mutagenicity, dioxin-like activity and bioaccumulation of alkylated picene and chrysene derivatives in a German lignite. **Science of The Total Environment**, v. 497-498, p. 634-641, 11/1/ 2014. ISSN 0048-9697.

- MIRANDA, V. J. M. Degradação de naftaleno, fenantreno e benzo(a)pireno em solos e sedimentos de ambientes costeiros, oceânicos e antárticos. 2008.
- NAHRGANG, J. et al. Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*)—Implications for environmental monitoring in the Barents Sea. **Aquatic Toxicology**, v. 127, p. 21-35, 2// 2013. ISSN 0166-445X.
- NETTO, P. A. D. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova** v. 23, p. 765 - 773, 2000.
- NRC. Oil in the Sea – Inputs, Fates and Effects. **National Academy Press, Washington**, v. Second ed., 2003.
- OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 2013a.
- _____. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. Paris: OECD Publishing, 2013b.
- OROS, D. R. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in San Francisco Bay: A 10-year retrospective of monitoring in an urbanized estuary. **Environmental Research**, v. 105, n. 1, p. 101-118, 2007.
- PATHIRATNE, A.; HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, K. A. S. Assessment of bile fluorescence patterns in a tropical fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to naphthalene, phenanthrene, pyrene and chrysene using fixed wavelength fluorescence and synchronous fluorescence spectrometry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, n. 5, p. 554-558, 2010.
- 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.
- PETERSON, C. H. et al. Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. **Science**, v. 302, n. 5653, p. 2082-2086, 2003/12/19 2003.
- RADKE, M.; RULLKÖTTER, J.; VRIEND, S. P. Distribution of naphthalenes in crude oils from the Java Sea: Source and maturation effects. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 58, n. 17, p. 3675-3689, 9// 1994. ISSN 0016-7037.
- RAMSDORF, W. A. Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes., 2011.
- RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1–12, p. 17-23, 9// 2002. ISSN 0025-326X.
- REGO, E. C. P.; PEREIRA NETTO, A. D. PAHs and BTEX in groundwater of gasoline stations from Rio de Janeiro City, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, n. 6, p. 660-664, 2007.

- 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, 4// 2015. ISSN 0147-6513.
- SAMSON, J. C.; SHENKER, J. The teratogenic effects of methylmercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio*. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 2-3, p. 343-354, 2000. ISSN 0166445X (ISSN).
- SCHLENK, D. et al. Biomarkers. In: DI GIULIO, R. T. e HINTON, D. E. (Ed.). **The Toxicology of Fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. p.684-713.
- SCHWACKE, L. H. et al. Health of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Barataria Bay, Louisiana, following the Deepwater Horizon oil spill. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 93-103, 2014.
- 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, 10// 2014. ISSN 0045-6535.
- SHUK HAN, C. et al. Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 3024-3031, 2000. ISSN 07307268 (ISSN).
- SIDDENS, L. K. et al. Cytochrome P450 1b1 in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-induced skin carcinogenesis: Tumorigenicity of individual PAHs and coal-tar extract, DNA adduction and expression of select genes in the Cyp1b1 knockout mouse. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 287, n. 2, p. 149-160, 9/1/ 2015. ISSN 0041-008X.
- SPRAGUE, J. B. Current status of sublethal tests of pollutants on aquatic organisms : SPRAGUE J. B., 1976. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 33 (9): 1988–1992. **Deep Sea Research**, v. 24, n. 4, Supplement 1, p. 299, // 1977. ISSN 0146-6291.
- STEIN, E. D.; TIEFENTHALER, L. L.; SCHIFF, K. Watershed-based sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban storm water. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 373-385, 2006.
- STOUTHART, A. J. H. X. et al. Effects of low water pH on lead toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquatic Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 137-151, 1994/10/01 1994. ISSN 0166-445X.
- SUMON, K. A. et al. Acute toxicity of chlorpyrifos to embryo and larvae of banded gourami *Trichogaster fasciata*. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, p. 1-7, 2016.
- TORREIRO-MELO, A. G. A. G. **Biomarcadores Ecotoxicológicos em *Poecilia vivipara* para o Monitoramento de Ecossistemas Aquáticos**. 2015. 118 Universidade Federal de Pernambuco Recife - PE.
- TORREIRO-MELO, A. G. A. G. et al. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. **Chemosphere**, v. 132, p. 17-23, 2015.

- TROISI, G.; BARTON, S.; BEXTON, S. Impacts of oil spills on seabirds: Unsustainable impacts of non-renewable energy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 16549-16555, 2016.
- TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, n. 2, p. 151-173, 9// 1977. ISSN 0147-6513.
- UNEP. **Determinations of petroleum hydrocarbons in sediment**. Reference methods for marine pollution studies. PROGRAMME, U. N. E. 20: 97 p. 1991.
- UNO, T.; ISHIZUKA, M.; ITAKURA, T. Cytochrome P450 (CYP) in fish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 1-13, 7// 2012. ISSN 1382-6689.
- USEPA. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268. EPA/600/4-90/027F.: 1993.
- _____. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T) 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460, EPA/821/R-02/012.: 2002.
- WAKE, H. Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 62, n. 1–2, p. 131-140, 1// 2005. ISSN 0272-7714.
- WALKER, G. H., HOPKIN, S.P., SIBLY, R.M. & PEAKALL, D.B., Ed. **Principles of Ecotoxicology**: Taylor and Francis, London, UK, Third Edition.ed. 2005.
- WHO. **Guidelines for Assessing the Nutritional Impact of Supplementary Feeding Programmes for Vulnerable Groups**. ORGANIZATION, W. H.: 257 p. 1983.
- WHYTE, J. J. et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 347-570, 2000.
- WILLIS, A. M.; ORIS, J. T. Acute photo-induced toxicity and toxicokinetics of single compounds and mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 9, p. 2028-2037, 2014.
- WINATA, C. L. et al. The role of vasculature and blood circulation in zebrafish swimbladder development. **BMC Developmental Biology**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2010. ISSN 1471-213X.
- WOLINSKA, L. et al. Preliminary study on adverse effects of phenanthrene and its methyl and phenyl derivatives in larval zebrafish, *Danio rerio*. **Environmental Biotechnology**, v. 7, p. 26-33, 2011.
- XU, Y. X. et al. Developmental toxicity of insecticide beta-cypermethrin on zebrafish embryos. **Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 27, n. 2, p. 256-262, 2013.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2. São Paulo: 2006.

I.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho demonstram a alta toxicidade dos efluentes das caixas separadoras de água e óleo de postos de combustível para embriões de *Danio rerio*, mesmo em baixas concentrações. Estas informações são subsídios para que a legislação vigente seja reavaliada pelos órgãos fiscalizadores e possivelmente alterada para garantir a diminuição dos impactos causados pelos ECSPCs na biota aquática. Além disso ficou demonstrado que para amostras envolvendo misturas contendo HPAs como os ECSPCs, embriões são mais sensíveis do que larvas, sendo sugerido a possível inclusão de embriões de *Danio rerio* na ABNT 15499 (2015) tendo em vista que este estágio pode ser o mais sensível dependendo do tipo de contaminante envolvido.