

Alterações leucocitárias ocasionadas pelo estresse toxicológico agudo do óleo diesel em juvenis de tilápia-do-nilo

Change in leukocyte by acute toxicological stress of diesel oil in juveniles of Nile tilapia

Marcia Valeria Silva do Couto¹, Elias Fernandes de Medeiros Junior², Cleoni Virginio da Silveira², Natalino da Costa Sousa^{1*}

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo avaliar o estresse e as alterações no leucograma dos juvenis de *Oreochromis niloticus* submetidos à toxicidade aguda do óleo diesel. A toxicidade foi avaliada em um delineamento inteiramente casualizado com cinco diluições (20, 25, 30, 35 e 40%) e um controle, ambos com três repetições. Para a avaliação dos níveis glicêmicos e alteração no leucograma, foi retirado sangue por punção caudal dos peixes moribundos. Dessa forma, conclui-se que o óleo diesel pode apresentar riscos ao ecossistema aquático, provocando toxicidade aos organismos aquáticos e alterações fisiológicas.

PALAVRAS-CHAVE: alteração fisiológica; peixe; derivado de petróleo; leucograma.

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the stress and changes in white blood cell count of juveniles *Oreochromis niloticus* subjected to acute toxicity of diesel oil. The toxicity was evaluated in a completely randomized design with five dilutions (20, 25, 30, 35 and 40%) and one control, both with three replicates. For the assessment of blood glucose levels and changes in white blood cell count, blood was drawn by caudal puncture of the dying fish. It was concluded that diesel oil can present risks to aquatic ecosystem, causing toxicity and physiological changes to fish.

KEYWORDS: physiological changes; fish; derived oil; leukogram.

¹Universidade Federal do Pará (UFPA) – Belém (PA), Brasil.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, *Campus* São Gabriel da Cachoeira – São Gabriel da Cachoeira (AM), Brasil.

*Autor correspondente: natal.engpesca@gmail.com

Recebido em: 31/12/2016 . Aceito em: 16/10/2017

INTRODUÇÃO

A pesca extrativista é uma importante atividade econômica na região Norte e apresenta crescimento contínuo, alcançando 13,2% em 2011, sendo uma das principais fontes de renda para os ribeirinhos na região amazônica (BRASIL, 2011). Essa atividade é composta das frotas industrial e artesanal (DORIA *et al.*, 2012), constituídas por embarcações motorizadas, as quais utilizam óleo diesel como o principal combustível (ALCÂNTARA *et al.*, 2015).

O óleo diesel é um derivado de petróleo, que contém em sua composição uma complexa mistura de substâncias químicas, com cadeias longas de hidrocarbonetos aromáticos, enxofre, nitrogênio e oxigênio (SIMONATO *et al.*, 2008; EGRES *et al.*, 2012). O descarte ou escape desse combustível no ambiente aquático pode afetar severamente os organismos existentes, ocasionando alterações teciduais e hematológicas, podendo levar à morte das espécies mais sensíveis (SIMONATO *et al.*, 2008; SIMONATO *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2010).

A toxicidade dos derivados de petróleo está relacionada ao tamanho da cadeia de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA) e monocíclicos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno-BTEX), que em meio aquático podem ocasionar danos mutagênicos e carcinogênicos, além de bioacumulação tecidual e alta mortalidade dos organismos atingidos (SIMONATO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010).

Os riscos gerados por esses compostos remetem à preocupação com o seu derramamento ou descarte residual no meio hídrico (KUBACH *et al.*; EGRES *et al.*, 2012), principalmente os oriundos das embarcações pesqueiras, que, mesmo quando descartados em pequena quantidade, por ocorrer de maneira contínua, atuam de forma crônica nos organismos aquáticos (SIMONATO *et al.*, 2008; SIMONATO *et al.*, 2013). Essa exposição toxicológica pode alterar o comportamento, a morfologia, o metabolismo, o crescimento, a reprodução e o sistema imunológico dos peixes (RODRIGUES *et al.*, 2010; SIMONATO *et al.*, 2013).

Nesse contexto, faz-se necessário conhecer os efeitos desse xenobiótico em organismos aquáticos, sendo os ensaios toxicológicos uma ferramenta de avaliação que, associada aos parâmetros hematológicos, pode determinar as concentrações que ocasionam a mortalidade dos organismos e gerar diagnósticos sobre as principais alterações fisiológicas ocorrentes.

Diante desse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o estresse e as alterações no leucograma dos juvenis de *Oreochromis niloticus* submetidos à toxicidade aguda ao óleo diesel.

MATERIAL E MÉTODOS

Os juvenis de tilápia-do-nylo (*O. niloticus*) foram adquiridos de um fornecedor local e aclimatados por sete dias no

Instituto Federal do Amazonas, em São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, visando diminuir o estresse de captura. Os espécimes foram mantidos em caixas-d'água de 500 L, com aeração constante e alimentados com ração extrusada duas vezes ao dia, submetidos a fotoperíodo de 12 horas e densidade de 0,18 peixes por litro. Após esse período, foram realizados os testes toxicológicos preliminares, para determinar as diluições de óleo diesel que causariam 0 e 100% de mortalidade. Posteriormente, foi feito o teste definitivo, seguindo recomendações do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 1987).

Para a concretização do teste definitivo, foi utilizada uma solução estoque contendo 400 mL de óleo diesel para 600 mL de água destilada, homogeneizada constantemente por 2 horas. O bioensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com cinco diluições da solução estoque (20, 25, 30, 35 e 40% v/v) e uma controle, todos com três repetições, por 96 h e com observação da mortalidade a cada hora. Em cada recipiente com volume útil de 3 L, foram adicionados cinco peixes ($3,19 \pm 0,39$ g). No período experimental, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados e mantidos nas seguintes condições: oxigênio dissolvido ($6,54 \pm 0,49$ mg.L⁻¹), temperatura ($28,6 \pm 0,62$ °C), pH ($6,42 \pm 0,52$) e condutividade ($182 \pm 29,3$ µS.cm⁻¹).

O valor de concentração letal média CL_{50-96h} foi determinado pelo método de Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1977) e classificado de acordo com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 1987), a qual divide os xenobióticos em: muito tóxicos (quando a CL₅₀ é menor que 25%), tóxicos (25 a 50%), moderadamente tóxicos (51 a 75%), levemente tóxicos (acima de 75%) e praticamente não tóxicos (100%).

Os índices glicêmicos e a contagem do leucograma foram realizados após coleta por punção do vaso caudal com seringas umedecidas com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (5%). Os níveis de glicose sanguínea foram determinados por meio do aparelho Accu-check Performa® (Roche Diagnostics, Basileia, Suíça). Uma alíquota de sangue foi usada para as confecções de extensões sanguíneas, secas ao ar e coradas pancromicamente (ROSENFELD, 1947), para a contagem total de trombócitos e leucócitos, além da contagem diferencial de leucócitos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de normalidade (Shapiro-Wilk) e posteriormente ao teste ANOVA. Em presença de diferença significativa, foram submetidos ao teste de Tukey (5%) para comparação de médias.

Os autores declararam não terem submetido o projeto que originou esses dados ao Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará, para avaliação. Porém, estão cientes do conteúdo das resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, caso envolva animais. Os autores assumem total responsabilidade pelos dados apresentados e colocam-se à disposição para possíveis questionamentos, caso necessário.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Durante o período experimental, foi observada 100% de mortalidade na maior diluição testada (40%) em menos de 24 horas de exposição (Fig. 1), sendo notado aumento da mortalidade com o aumento das diluições. A CL_{50-96h} foi de 30,01%, com limite inferior de 28,08% e limite superior de 32,05%, assim classificado como um produto tóxico, de acordo com a CETESB (1987).

Escassos são os estudos sobre a toxicidade dos derivados de petróleo para os peixes dulcícolas. A toxicidade do óleo diesel para juvenis de tilápia já foi relatada por NOGUEIRA *et al.* (2011), que constataram a exposição dos juvenis de *O. niloticus* nas diluições de 0,01 e 0,05% por sete dias, verificando mortalidade de 100% dos peixes no sexto dia de experimento para a maior diluição testada. Já SCHEIN *et al.* (2009), realizando ensaios crônicos com alevinos de truta-arco-íris (*Oncorhynchus Mykiss*) e usando duas diluições da fração solúvel em água de óleo diesel (0,01 e 1%) ao longo de nove dias, determinaram concentração média de 0,05%. No presente estudo, a concentração letal média a 50% encontrada foi maior que os achados de NOGUEIRA *et al.* (2011) e SCHEIN *et al.* (2009), com mortalidade de 100% em menos de 24 horas.

O risco ambiental ocasionado pelos derivados de petróleo e a toxicidade aos organismos aquáticos podem estar relacionados com as partes solúveis desses produtos na água (SCHEIN *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2010). SIMONATO *et al.* (2008) e RODRIGUES *et al.* (2010) apontam que é possível que a mortalidade decorrente da toxicidade do óleo diesel esteja associada com as alterações fisiológicas e morfológicas, tais como hiperplasia, aneurisma e necrose nos tecidos, podendo afetar o comportamento dos peixes.

No presente estudo foram observadas alterações comportamentais como natação errática, agitação e posicionamento dos peixes na superfície da água. Essas alterações comportamentais são uma das respostas ao estresse ocasionado pela exposição dos animais ao produto tóxico, causando alterações nos valores glicêmicos, que é uma resposta secundária utilizada como indicador de estresse em peixes (WINKALER *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2012; CHAGAS *et al.*, 2012). Neste estudo foi visto aumento ($p < 5\%$) na glicemia (Fig. 2) dos peixes a partir da terceira diluição (30%), e na diluição de 40% houve acréscimo de 73,52% no nível glicêmico dos juvenis de tilápia-do-nylo em relação ao controle ($42,5 \pm 2,51 \text{ mg.dL}^{-1}$).

SIMONATO *et al.* (2008) observaram aumento de 120% nos níveis glicêmicos em juvenis de *Prochilodus lineatus* após 96 horas de exposição dos animais à fração solúvel em água do óleo diesel em comparação ao controle ($22,00 \pm 1,00 \text{ mg.dL}^{-1}$). ROSTAM; SOLTANI (2016) apontaram aumento nos níveis glicêmicos de *Huso huso* na exposição crônica nas concentrações de petróleo 0,218; 0,327 e 0,436 mg.L^{-1} e registraram aumento na glicemia de 12,06; 17,24 e 25,86%, respectivamente, em relação ao tratamento controle ($58 \pm 3,00 \text{ mg.dL}^{-1}$) durante 14 dias de experimento. Assim, o aumento nos valores glicêmicos dos peixes expostos aos xenobióticos pode ter ocorrido pela estimulação

das catecolaminas, mobilizando o aumento à glicogenólise, de forma a gerar energia para uma ação rápida dos animais a um agente estressor (MOREIRA *et al.*, 2011; CHAGAS *et al.*, 2012).

Quanto aos parâmetros sanguíneos, o trombócito é um tipo de célula que apresenta funções importantes no sistema imune dos peixes, atuando na homeostasia, realizando fagocitose e até mesmo migrando para sítios inflamatórios (GARCIA *et al.*, 2012). Ocorreu aumento ($p < 5\%$) no número de trombócitos nas diluições de 35 e 40%, registrando $40,01 \pm 4,09 \text{ células} \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e $38,40 \pm 5,45 \text{ células} \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente, em relação ao grupo controle (Fig. 3).

A exposição dos peixes aos derivados de petróleo pode ocasionar inflamação dos órgãos que estão em contato direto com esses derivados, como as brânquias. Portanto, o aumento de trombócitos nos peixes pode ter ocorrido em busca do retorno homeostático, com a migração dessas células para o local afetado (SCHALCH *et al.*, 2015), pois a inflamação é uma resposta dos organismos com o intuito de aumentar o fluxo de sangue para a migração de células fagocíticas e com função de coagulação para o local danificado por meio da vasodilatação (SALIU; SALAMI, 2013).

No tocante aos leucócitos totais, foi observado aumento ($p < 5\%$) na última diluição (40%), com contagem média de 58,4

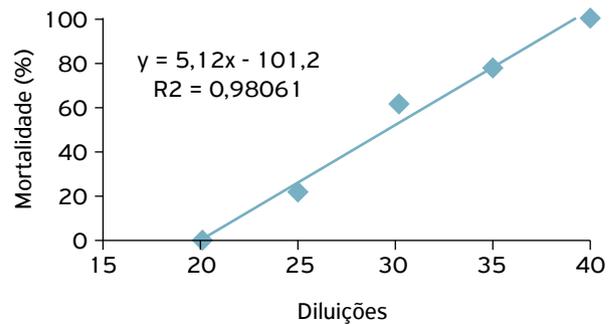


Figura 1. Mortalidade de juvenis de tilápia-do-nylo expostos a diferentes diluições de óleo diesel.

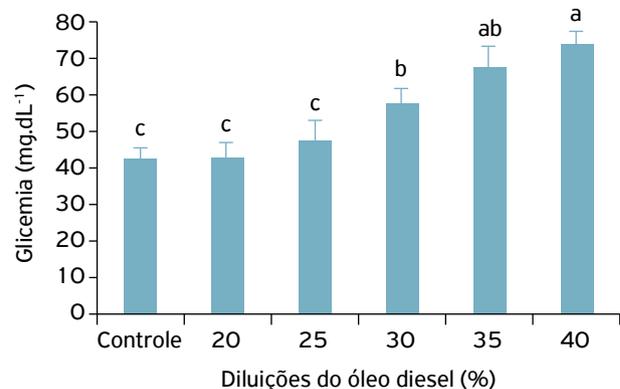


Figura 2. Valores glicêmicos de juvenis de tilápia-do-nylo expostos a diferentes diluições de óleo diesel. Valores nas barras (média \pm desvio padrão) seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 5\%$).

$\pm 6,82$ células $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ em relação ao controle ($42,8 \pm 4,57$ células $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Essas células são responsáveis pela defesa do organismo, que pode ser modulada de acordo com o estímulo aos quais os animais estão submetidos (MARINHO *et al.*, 2015).

No presente estudo foi observada redução ($p < 5\%$) de linfócitos nas diluições de 35 e 40%, com contagem média de $24,3 \pm 3,37$ células $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e $24,1 \pm 2,44$ células $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente. Em contrapartida, houve aumento ($p < 5\%$) no número de monócitos na maior diluição (40%), com valor médio de $24,08 \pm 3,15$ células $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ em relação ao controle (Tabela 1).

Os linfócitos são células responsáveis pela produção de anticorpos e pela parte humoral em peixes (SILVA *et al.*, 2012). Pode-se inferir, neste estudo, que a sua redução está associada com o estresse ocasionado pelo óleo diesel, tendo em vista que o estresse prolongado pode provocar imunossupressão, debilitando o sistema imunológico dos organismos submetidos a xenobióticos (FUJIMOTO *et al.*, 2012). Similaridade foi percebida por ALI *et al.* (2014), que observaram redução no número de linfócitos do tecido sanguíneo de *Fundulus grandis* expostos ao petróleo.

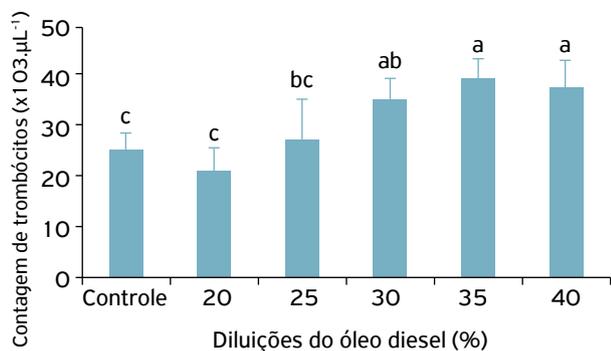


Figura 3. Contagem de trombócitos em juvenis de tilápia expostos a diferentes diluições de óleo diesel. Valores nas barras (média \pm desvio padrão) seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 5\%$).

O aumento de monócitos possivelmente ocorreu pelo estímulo dos órgãos hematopoiéticos em resposta à inflamação ocasionada pela exposição ao óleo diesel, sendo uma célula com funções fagocitárias importantes no sistema imune dos peixes (DIAS *et al.*, 2011), podendo migrar do tecido sanguíneo para o tecido de órgãos danificados. Logo, o aumento dessa célula possivelmente dá-se com o intuito de agir como macrófago nos tecidos danificados, concordando com ALI *et al.* (2014), que constataram aumento de monócito *F. grandis*.

No presente estudo não foi observada diferença na contagem de neutrófilos nem de basófilos entre os tratamentos. HEDAYATI; JAHANBAKHSI (2013), que observaram o efeito do óleo diesel em juvenis de *H. buso*, registraram a presença de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos no tecido sanguíneo, mostrando que a exposição dos juvenis por 48 horas ao xenobiótico ocasionou redução de linfócitos e aumento de neutrófilos. Logo, o derramamento ou descarte inadequado dos derivados de petróleo no ambiente aquático pode ocasionar inflamação nos organismos, alterando possivelmente os parâmetros hematológicos dos peixes (RODRIGUES *et al.*, 2010; SIMONATO *et al.*, 2013). Assim, o aumento da glicemia com a crescente adição de óleo diesel é uma resposta fisiológica dos peixes ao desequilíbrio homeostático, na tentativa de se adaptar às condições adversas às quais estão submetidos.

CONCLUSÕES

O estresse ocasionado pelo óleo diesel apresenta-se como um risco ambiental para os organismos aquáticos, por se tratar de um produto tóxico para a tilápia.

A exposição dos peixes ao xenobiótico provoca desequilíbrio homeostático capaz de reduzir o número de linfócitos e aumentar o de monócitos nos peixes, ocasionado pela toxicidade ao óleo diesel.

Tabela 1. Contagem total e diferencial de leucócitos de juvenis de tilápia-do-nilo submetidos a diferentes diluições de óleo diesel.

	Diluições de óleo diesel (média \pm DP)					
	Controle	20%	25%	30%	35%	40%
Leucócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	42,80 \pm 4,57b	42,60 \pm 6,35b	47,70 \pm 9,93ab	49,90 \pm 3,99ab	50,90 \pm 5,04ab	58,40 \pm 6,82 ^a
Linfócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	31,20 \pm 4,41a	31,4 \pm 3,84a	30,40 \pm 3,51a	27,90 \pm 2,06ab	24,30 \pm 3,37b	24,10 \pm 2,44b
Monócitos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	5,60 \pm 1,24d	4,75 \pm 1,81d	8,54 \pm 3,84cd	12,50 \pm 1,99bc	16,60 \pm 2,60b	24,00 \pm 3,15 ^a
Neutrófilos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	6,92 \pm 0,81a	6,33 \pm 4,46a	8,62 \pm 3,15a	9,40 \pm 4,20a	9,75 \pm 3,57a	8,77 \pm 3,43a
Basófilos ($\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0,09 \pm 0,07a	0,09 \pm 0,07a	0,13 \pm 0,10a	0,09 \pm 0,05a	0,15 \pm 0,10a	0,14 \pm 0,06a

DP: desvio padrão; letras diferentes nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (5%).

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, N.C.; GONÇALVES, G.S.; BRAGA, T.M.P.; SANTOS, S.M.; ARAÚJO, R.L.; PANTOJA-LIMA, J.; ARIDE, P.H.R.; DE OLIVEIRA, A.T. Avaliação do desembarque pesqueiro (2009-2010) no município de Juruá, Amazonas, Brasil. *Biota Amazônia (BioteAmazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, v.5, n.1, p.37-42, 2015.
- ALI, A.O.; HOHN, C.; ALLEN, P.J.; FORD, L.; DAIL, M.B.; PRUETT, S.; PETRIE-HANSON, L. The effects of oil exposure on peripheral blood leukocytes and splenic melano-macrophage centers of Gulf of Mexico fishes. *Marine Pollution Bulletin*, v.79, n.1-2, p.87-93, 2014.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Boletim Estatístico da pesca e aquicultura*. Brasília, 2011. 60p.
- CHAGAS, E.C.; ARAÚJO, L.D.D.; GOMES, L.D.C.; MALTA, J.C.D.O.; VARELLA, A.M.B. Effect of sodium chloride on physiological responses and monogenean control in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Acta Amazonica*, v.42, n.3, p.439-444, 2012.
- COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). *Apliação de microrganismos e culturas celulares na avaliação da toxicidade de efluentes industriais na região da grande São Paulo*. São Paulo: CETESB, 1987. 146p.
- DIAS, D.D.C.; TACHIBANA, L.; SERIANI, R.; SANTOS, A.A.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ROMAGOSA, E. Macrophagic migration time in matrinxã, *Brycon amazonicus*, through inoculation of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, technique. *Acta Amazonica*, v.41, n.3, p.421-424, 2011.
- DORIA, C.R.D.C.; RUFFINO, M.L.; HIJAZI, N.C.; CRUZ, R.L.D. A pesca comercial na bacia do rio madeira no estado de Rondônia, Amazônia brasileira. *Acta Amazonica*, v.42, n.1, p.29-40, 2012.
- EGRES, A.G.; MARTINS, C.C.; DE OLIVEIRA, V.M.; DA CUNHA LANA, P. Effects of an experimental in situ diesel oil spill on the benthic community of unvegetated tidal flats in a subtropical estuary (Paranaquá Bay, Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, v.64, n.12, p.2681-2691, 2012.
- FUJIMOTO, R.Y.; GABBAY, M.I.; ANJOS, E.C.S.; CARRASCHI, S.P.; CRUZ, C. Toxicidade e risco ambiental da oxitetraciclina e efeito em leucócitos de Mato Grosso (*Hyphessobrycon eques*). *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, v.7, n.2, p.11-15, 2012.
- GARCIA, F.; SCHALCH, S.H.C.; ONAKA, E.M.; FONSECA, F.S.; BATISTA, M.P. Hematology of Nile tilapia fed supplementation with algae challenged by acute and chronic stress. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.1, p.198-204, 2012.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed spearman-kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, v.11, n.7, p.714-719, 1977.
- HEDAYATI, A.; JAHANBAKHSI, A. Hematotoxic effects of direct infusion of crude diesel oil on juvenile great sturgeon *Husohuso*. *Comparative Clinical Pathology*, v.22, n.6, p.1117-1122, 2013.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Avaliação da toxicidade aguda para peixes. parte d.3. In: IBAMA. *Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos*. Brasília: IBAMA, 1987. 23p.
- KUBACH, K.M.; SCOTT, M.C.; BULAK, J.S. Recovery of a temperate riverine fish assemblage from a major diesel oil spill. *Freshwater Biology*, v.56, n.3, p.503-518, 2011.
- MARINHO, R.D.G.B.; TOSTES, L.V.; BORGES, M.; YOSHIOKA, E.T.O.; TAVARES-DIAS, M. Respostas hematológicas de Arapaima gigas (Pisces: Arapaimidae) parasitados naturalmente por protozoários e metazoários. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, v.5, n.1, p.105-108, 2015.
- MOREIRA, A.G.L.; TEIXEIRA, E.G.; MOREIRA, R.L.; FARIAS, W.R.L. Glicose plasmática em juvenis de tilápia do Nilo anestesiados com óleo de cravo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.12, n.3, p.794-804, 2011.
- NOGUEIRA, L.; RODRIGUES, A.C.F.; TRÍDICO, C.P.; FOSSA, C.E.; DE ALMEIDA, E.A. Oxidative stress in Niletilapia (*Oreochromis niloticus*) and armoredcatfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil. *Environmental monitoring and assessment*, v.180, n.1-4, p.243-255, 2011.
- RODRIGUES, R.V.; MIRANDA-FILHO, K.C.; GUSMÃO, E.P.; MOREIRA, C.B.; ROMANO, L.A.; SAMPAIO, L.A. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerreyodontesthesargentinis larvae. *Science of the Total Environment*, v.408, n.9, p.2054-2059, 2010.
- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan*, v.20, n.1, p.329-334, 1947.
- ROSTAM, H.A.K.; SOLTANI, M. The effect of chronic crude oil exposure on some hematological and biochemical parameters of juvenile Beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1758). *International Journal of Aquatic Science*, v.7, n.2, p.73-86, 2016.
- SALIU, J.K.; SALAMI, A.S. Drilling fluid and diesel fuel induced histopathological alterations in the gill and liver tissue of *Oreochromis niloticus*. *Research in Environment and Life Sciences*, v.6, n.3, p.73-78, 2013.

SCHALCH, S.H.C.; ABIMORAD, E.G.; ONAKA, E.M.; FONSECA, F.S.; GARCIA, F.; CASTELLANI, D. Parâmetros hematológicos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dieta suplementada de cogumelo *Agaricus blazei*. *Bioikos*, v.29, n.1, p.29-34, 2015.

SCHEIN, A.; SCOTT, J.A.; MOS, L.; HODSON, P.V. Oil dispersion increases the apparent bioavailability and toxicity of diesel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.28, n.3, p.595-602, 2009.

SILVA, R.D.D.; ROCHA, L.O.; FORTES, B.D.A.; VIEIRA, D.; FIORAVANTI, M.C.S. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) sob estresse por exposição ao ar. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.1, p.99-107, 2012.

SIMONATO, J.D.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B. Physiological effects of gasoline on the fresh water fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotropical Ichthyology*, v.11, n.3, p.683-691, 2013.

SIMONATO, J.D.; GUEDES, C.L.; MARTINEZ, C.B. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.69, n.1, p.112-120, 2008.

WINKALER, E.U.; DAS GRAÇAS SILVA, A.; GALINDO, H.C.; DOS REIS MARTINEZ, C.B. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v.23, n.2, p.507-514, 2001.