

EFEITOS DO FENOL SOBRE A SAÚDE DE MACHOS DO GÊNERO *Astyanax* (TELEOSTEI, CHARACIDAE)

Lilian dos Santos¹
Atsler Luana Lehun^{2(*)}
Deise Borchhardt Moda³
Ana Carolina de Deus Bueno Krawczyk⁴

RESUMO: Constantemente o ambiente aquático é impactado com a intensa atividade antrópica, uma vez que constitui o depósito final de vários resíduos domésticos e industriais. O fenol é um poluente potencial destes ambientes que pode alterar o metabolismo dos organismos expostos, podendo causar diminuição na diversidade e alterações na cadeia alimentar. O objetivo deste trabalho foi utilizar machos do gênero *Astyanax* como modelo biológico no bioensaio com diferentes concentrações de fenol, a fim de verificar quais poderiam causar danos à saúde dos animais. Os peixes foram mantidos em aquários de 30 L contendo as seguintes concentrações para os grupos experimentais: 0,003 mg/L; 0,01 mg/L; 0,03 mg/L; 0,88 mg/L e 1,7 mg/L e um grupo controle sem fenol para as comparações. A redução dos valores médios para o índice gonadossomático ocorreu conforme aumento da concentração do fenol, sugerindo que os peixes machos tendem a apresentar redução na produção espermática. O índice hepatossomático aumentou na mesma proporção do aumento da concentração nos grupos experimentais, destacando aumento na atividade de detoxificação do fígado. Embora não tenham sido encontradas evidências correlacionadas entre os índices, o fenol pode ser considerado tóxico aos animais.

PALAVRAS-CHAVE: Ecotoxicologia; Índice hepatossomático; Compostos aromáticos.

EFFECTS OF PHENOL ON MALE HEALTH OF GENUS *Astyanax* (TELEOSTEI, CHARACIDAE)

ABSTRACT: Aquatic environment is always impacted with intense anthropic activity, even it represents final deposition of several domestic and industrial residues. Phenol is an aromatic compound with potential to alter exposed organism metabolisms, reducing diversity and altering trophic chain. The objective of this research was to use males from the genus *Astyanax* as biologic model to bioassay with different phenol concentrations, in order to verify which ones can cause damage to organism's health, considering that concentration higher than permitted by Brazilian Law was already registered to Iguazu River. Fish were kept in aquariums of 30 L with the followed concentrations to experimental groups: 0,003 mg/L; 0,01 mg/L; 0,03 mg/L; 0,88 mg/L e 1,7 mg/L and a control groups without phenol to comparisons. The reduction of the mean values to gonadossomatic index when the phenol concentration increased suggested that, in chronically exposition, male fish tend to reduce spermatid production. Hepatossomatic index increased in the same proportion of concentration increased in experimental groups, highlighting increase in liver detoxification. Although we did not find correlated evidences among the indexes, phenol can be considered toxic to animals.

KEY WORDS: Ecotoxicology; Hepatossomatic Index; Aromatic compounds.

¹ Bióloga; Universidade Estadual do Paraná, Paraná, Brasil. lilian-santos@live.com

² Bióloga; Mestranda em Ecologia de Ambientes Aquáticos e Continentais; Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. atslerluana@gmail.com (*) Autor para correspondência.

³ Química; Doutora em Química, Professora Adjunta na Universidade Estadual do Paraná, Paraná, Brasil. deise_ziza@hotmail.com

⁴ Bióloga; Doutora em Ecologia e Conservação, Professora Adjunta na Universidade Estadual do Paraná, Paraná, Brasil. anackrawczyk@gmail.com

INTRODUÇÃO

Muitos ambientes aquáticos de água doce estão poluídos por representarem o despejo final dos resíduos químicos originados nas diversas atividades industriais que, em sua maioria, visam suprir a demanda do aumento do crescimento populacional e dos centros urbanos, e estes resíduos líquidos e/ou sólidos apresentam alto teor tóxico e não biodegradáveis (MALMQVIST; RUNDLE, 2002; WAKE, 2005).

Anualmente, por meio dos efluentes industriais e das estações de tratamento de esgoto (ETEs), o ambiente aquático recebe mais de 80.000 compostos químicos sintetizados, assim como os seus produtos de degradação (KOLPIN et al., 2002; LEE; PEART; SVOBODA, 2005), sendo os xenobióticos encontrados principalmente entre classes de compostos com origem em produtos ou subprodutos químicos industriais, como pesticidas e biocidas, e em produtos naturais e sintéticos, como o fenol (NOGUEIRA, 2003).

Dentre os xenobióticos, o fenol é um composto aromático orgânico, derivado do benzeno por hidroxilação, possui uma ou mais hidroxilas ligadas diretamente ao anel benzênico (LINS et al., 2010). Por se tratar de composto lipofílico, a absorção se dá, principalmente, por difusão passiva de forma não dissociada (KISHINO; KOBAYASHI, 1995), podendo causar danos celulares como oxidação da membrana celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001) e danos às proteínas (SALVI et al., 2000), bioacumulação nos tecidos (RICE et al., 2000; HELLOU; LEONARD, 2004), redução da fertilidade e redução do peso corporal, pela diminuição do consumo de alimentos (SAHA; BHUNIA; KAVIRAJ, 1999) e morte (ARINÇ; SEN; BOZCAARMUTLU, 2000).

Os organismos aquáticos, por apresentarem um ciclo reprodutivo com desenvolvimento embrionário não protegido, em geral, tornam-se expostos diretamente aos produtos químicos presentes (EERTMANS et al., 2003). Quando presentes no ambiente, os xenobióticos, reduzem a qualidade ambiental, a diversidade de espécies, e, conseqüentemente, alteram a cadeia alimentar, os padrões de fluxo de energia e ciclagem de nutrientes, influenciando nas funções básicas do ambiente aquático levando a alterações na estabilidade e resistência do ecossistema (PÉREZ; VERA; MIRANDA, 2011).

O uso de peixes como bioindicadores dos efeitos da poluição é de suma importância e permite a detecção de problemas ambientais (FRENZILI et al., 2004). Os bioensaios realizados em laboratórios com esses organismos e em condições controladas são extremamente importantes para avaliar a contaminação das águas, permitindo prever os possíveis impactos e

efeitos de xenobióticos sobre as diferentes espécies aquáticas (ESPÍNDOLA; BRIGANTE; DORNFELD, 2003; RAMSDORF, 2007).

Na região do Médio Rio Iguaçu, a captação de água para abastecimento da população é direta, seguida de tratamento simplificado e liberação às residências. Nesta região foi verificado que a disponibilidade de fenol na água do rio é maior (KOSERA, 2014) do que o permitido pela legislação brasileira (CONAMA, 2011). Esta concentração mais alta do que o permitido se dá pelas constantes entradas de fenol no ambiente aquático, visto que este composto está presente em produtos químicos utilizados constantemente nas atividades humanas. Assim, assume-se que ele representa um risco à biota aquática.

A fim de verificar se o fenol apresenta efeitos ecotoxicológicos, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de efeitos letais e subletais das concentrações de fenol em peixes do gênero *Astyanax* visando analisar os efeitos que podem ser encontrados no ambiente aquático. O uso desta espécie como modelo biológico se deu porque são animais amplamente utilizados no consumo humano na região de União da Vitória-PR, possuem grande valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975), o que viabiliza que seja um dos gêneros mais utilizados em bioensaios para estudos ecotoxicológicos (CARRASCO-LETELIER et al., 2006; ROSSI et al., 2011).

MATERIAL E MÉTODOS

Os peixes do gênero *Astyanax* (n=10 machos para cada aquário) foram distribuídos em aquários de 30 L, mantendo-se um aquário controle e os grupos experimentais, durante exposição aguda de 96 horas. As concentrações de fenol utilizadas nos grupos experimentais foram: 0,003 mg/L; 0,01 mg/L; 0,03 mg/L, 0,88 mg/L e 1,7 mg/L. A cada 24 horas foi feita reposição de 20% da água no aquário controle e nos aquários experimentais contendo as respectivas concentrações de fenol. Durante todo o período de bioensaio, a cada 24 horas foram aferidas as variáveis da água: oxigênio dissolvido, temperatura, pH, condutividade e dureza.

A escolha das concentrações baseou-se na análise da resolução do CONAMA nº 430 de 2011, onde se estabelece para o valor máximo de fenóis totais 0,003 mg/L em águas doces, de classe I. Nesta mesma resolução o valor máximo de fenóis totais para águas doces, classe III, é de 0,01 mg/L. Portanto as concentrações mais baixas 0,003 mg/L, 0,01 mg/L escolhidas para os testes são as citadas na referida resolução.

Em um estudo de avaliação da qualidade da água do Rio Iguaçu, na Bacia do Médio Iguaçu, a concentração média de fenol encontrada foi de 0,88 mg/L (KOSERA, 2014).

Atualmente no Brasil o padrão de lançamento de fenóis de efluentes permitido é de 0,5 mg/L. Assim, as concentrações mais altas estão sendo propostas devido à quantidade de fenol detectada no rio Iguaçu na região.

Após a realização do bioensaio, os peixes machos foram anestesiados com óleo de cravo e aferidos seu comprimento total (cm) e peso (g) para avaliação da saúde pelo fator de condição (LE CREN, 1951). Considerou-se os peixes como um grupo e calculou-se o fator de condição com base na curva de regressão a partir dos dados de massa (g) e comprimento padrão (cm) seguindo a fórmula $CF = M \cdot SL^b$, onde b é o ângulo da curva.

Após os procedimentos, os organismos foram sacrificados pelo método de secção medular, sendo retiradas as gônadas e fígado para cálculo dos índices somáticos. Os cálculos para o índice gonadossomático e para o índice hepatossomático foram efetuados conforme Vazzoler (1981, 1996), sendo para o índice gonadossomático: $IGS = Wg/Wt \cdot 100$; (Wg: peso da gônada; Wt: peso total do peixe); e para o índice hepatossomático: $IHS = Wf/Wt \cdot 100$; (Wf: peso do fígado; Wt: peso total do peixe).

Análise de dados

As variáveis que não apresentaram distribuição normal ou homogeneidade entre as variâncias foram analisadas através do teste Kruskal-Wallis e as diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Dunn. O nível de significância estatística utilizado foi de 5% ($p < 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistica 7.1 (Statsoft Inc 2005).

RESULTADOS

Durante as 96 horas de bioensaio, foram mensuradas as variáveis limnológicas da água do grupo controle e dos grupos experimentais, que não apresentaram variação em seus valores, mantendo-se adequados durante todo o período de estudo.

Para o índice gonadossomático, as diferenças observadas entre os grupos testados não foram estatisticamente significativas ($KW-H(5;65) = 5,6571$; $p=0,3410$), mas foi observada uma maior média na concentração de 1,7 mg/L de fenol.

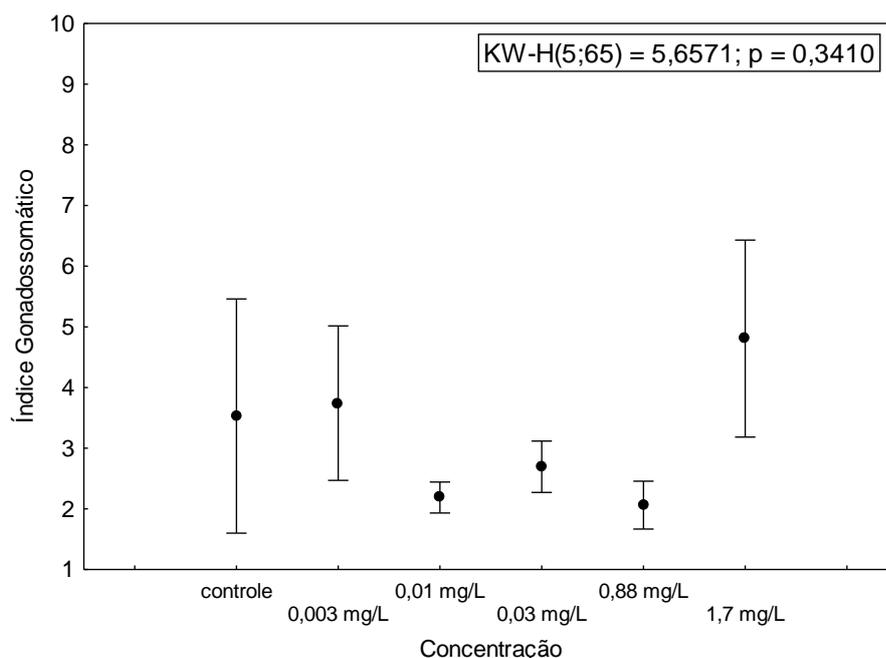


FIGURA 1 - Valores médios do índice gonadosomático para o controle e os demais grupos testados.

No índice hepatossomático (Figura 2), não foi observada diferença estatisticamente significativa ($KW-H(5;65) = 8,3321$; $p=0,1389$), entretanto foi observado uma tendência no aumento da média do valor do índice à medida que a concentração do fenol aumentava.

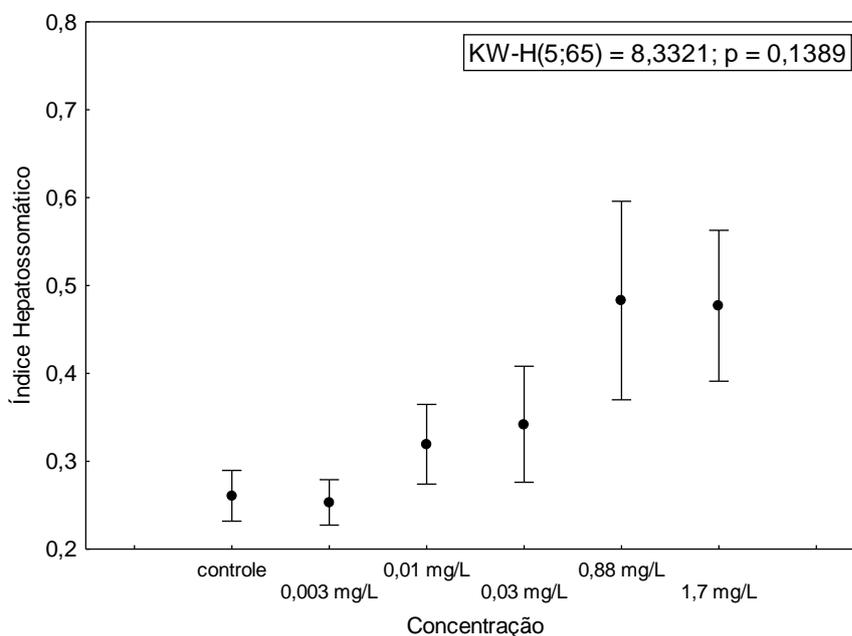


FIGURA 2 - Valores médios do índice hepatossomático para o controle e os demais grupos testados.

Ao comparar o fator de condição entre os grupos testados (Figura 3) não foi observada diferença significativa ($KW-H(5;65) = 5,4119$; $p=0,3677$), entretanto a concentração mais alta de 1,7 mg/L apresentou a maior média em relação as demais concentrações.

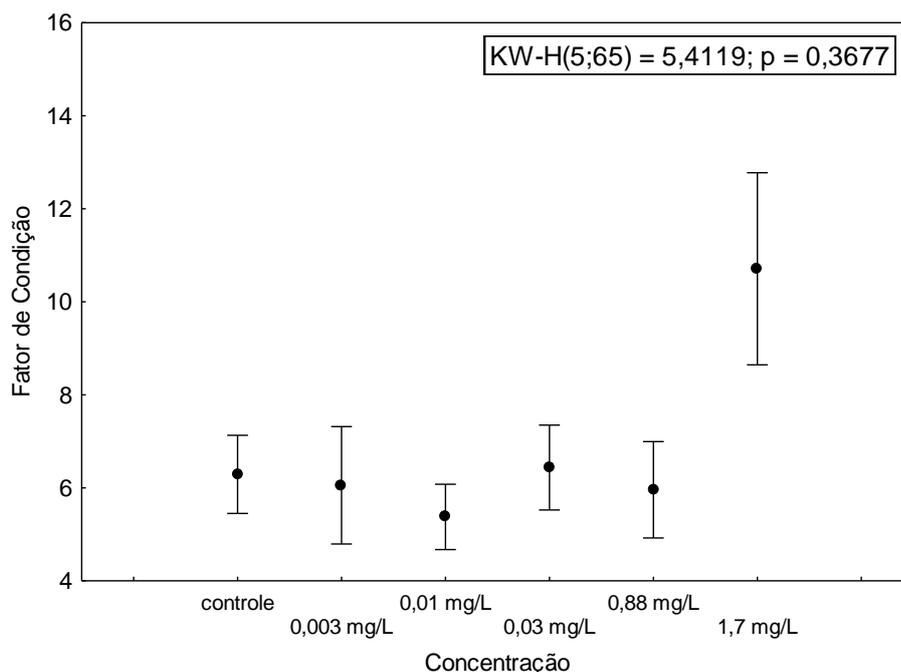


FIGURA 3 - Valores médios do fator de condição para o controle e os demais grupos testados.

DISCUSSÃO

Para o índice gonadossomático, o grupo controle e o grupo experimental com a concentração de 0,003 mg/L de fenol apresentaram valores com pouca diferença. Já os grupos com as concentrações de 0,01 mg/L, 0,03 mg/L e 0,88 mg/L apresentaram diminuição no índice comparado ao grupo controle, o que sugere danos nas funções gonadais, especialmente com efeito na redução no número de espermatozoides (ORLANDO et al., 1999; KINNBERG et al. 2000).

Na concentração de 1,7 mg/L, houve um aumento no índice, sugerindo que seja decorrente a um aumento no volume citoplasmático das células ou no número de células germinativas. O índice gonadossomático em peixes é uma ferramenta importante para avaliar e determinar as fases do ciclo reprodutivo, devido à maturação das células reprodutivas ocorrerem simultaneamente ao aumento da massa das gônadas, as alterações que ocorre no índice gonadossomático são as consequências mais comuns observadas em peixes expostos a poluentes (KIME, 1995).

No índice hepatossomático houve um aumento progressivo nos grupos experimentais, quando comparados ao grupo controle. Isto demonstra o quanto o fígado é fundamental no metabolismo dos xenobióticos e detoxificação, e, com isso, pode sofrer alterações estruturais e funcionais quando exposto a xenobióticos que nele se acumulam (FONTAÍNHAS-

FERNANDES 2005; FIGUEIREDO-FERNANDES et al. 2006; FERNANDES et al. 2007; CARROLA et al. 2009). Peixes expostos a poluentes podem apresentar modificações como hipertrofia do fígado e deslocamento lateral do núcleo, vacuolização e degeneração do citoplasma (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008). Segundo Laidley et al. (1988), os diferentes valores do índice supõem que seja o resultado do acúmulo excessivo de gordura no fígado, devido ao distúrbio metabólico, ou acréscimo da gliconeogênese, induzidos por um possível estresse.

No fator de condição a concentração de 1,7 mg/L de fenol foi o que demonstrou o maior valor, e isto é contrário ao que já se observou na literatura, visto que, de modo geral, um valor reduzido do fator de condição é associado a locais com maior índice de poluição (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2013). Desta forma, o fator de condição não se mostrou conclusivo em relação à contaminação aguda por fenol, sendo mais interessante e sensível nos estudos com exposição crônica (GOMIERO; BRAGA, 2003), e mudanças sazonais no ambiente (BRAGA; BRAGA; GOITEIN, 1985).

Os índices não apresentaram valores significativos durante o bioensaio, mas demonstraram a importância de um melhor controle na poluição aquática para a saúde dos indivíduos expostos. Dessa maneira, uma avaliação da qualidade desses ambientes que muitas vezes são utilizados pelas populações humanas a jusante é extremamente necessária (BARBIERI; BONDIOLI, 2013; DAMATO; BARBIERI, 2012).

CONCLUSÕES

O entendimento dos efeitos do fenol disponível no ambiente aquático para a biota é essencial, visto que um padrão de alteração de saúde foi verificado nos peixes expostos. Este entendimento favorecerá melhor controle e tratamento nos efluentes industriais e esgoto doméstico para mitigar a ocorrência do resíduo deste composto no ambiente aquático. Além disso, é essencial a revisão da concentração permitida pela legislação no ambiente, pois as menores concentrações demonstraram efeitos no índice hepatossomático tanto quanto nas maiores concentrações.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária, pela bolsa de Iniciação Científica concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARINÇ, E.; SEN, A.; BOZCAARMUTLU, A. Cytochrome P4501A and associated mixed function oxidase induction in fish as a biomarker for toxic carcinogenic pollutants in the aquatic environment. **Pure and Applied Chemistry**, v.72, n.6, p.985–994, 2000.

BARBIERI, E.; BONDIOLI, A.C.V. Acute toxicity of ammonia in Pacufish (*Piaractusmesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. **Aquaculture Research**, v.44, n.3, p.326-37, 2013.

BRAGA, F.M. de S.; BRAGA, M.A. de S.; GOITEIN, R. Fator de condição e alimentação de *Paralichthys brasiliensis* (Osteichthyes, Sciaenidae) na região da ilha Anchieta (lat. 23 33'S-long. 45 05'W) Ubatuba, Estado de São Paulo. **Naturalia**, v.10, p.1-11, 1985.

CARRASCO-LETELIER, L.; EGUREN, G.; MELLO, F.T. de.; GROVES, P.A. Preliminary field study of hepaticporphyrin profiles of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characiformes) to define anthropogenic pollution. **Chemosphere**, v.62, n.8, p.1245-1252, 2006.

CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; MATOS, P.; ROCHA, E. Liver histopathology in brown trout (*Salmo trutta* f. fario) from the Tinhela River, subjected to mine drainage from the abandoned Jales Mine (Portugal). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v.83, n.1, p.35-41, 2009.

CONAMA. **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.

DAMATO, M.; BARBIERI, E. Estudo da toxicidade aguda e alterações metabólicas provocadas pela exposição do cádmio sobre o peixe *Hyphessobryconcallistus* utilizado como indicador de saúde ambiental. **Mundo Saúde**, v.36, n.4, p.574-581, 2012.

EERTMANS, F.; DHOOGHE, W.; STUYVAERT, S.; COMHAIRE, F. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. **Toxicology in Vitro**, v.17, n.5, p.515-524, 2003.

ESPÍNDOLA, E.L.G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C.B. Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu. São Carlos: Rima, 2003. p.129–148.

FERNANDES, R. **Adsorventes Alternativos para Remoção de Fenol em Solução Aquosa**. 2005, 91 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; MONTEIRO, R.; REIS-HENRIQUES, M.A.; ROCHA, E. Effects of the fungicide mancozeb on liver structure of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: assessment and quantification of induced cytological changes using qualitative histopathology and the stereological point-sample intercept method. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.76, n.2, p.249-255, 2006.

FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. The use of biomarkers in aquatic toxicology studies. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, p.67-86, 2005.

FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I.; NIGRO, M.; FÖRLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. DNA damage in eelpout (*Zoarcesviviparus*) from Goteborg harbor. **Mutation Research**, v.552, n.1-2, p.187-195, 2004.

GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Bryconopalinus* (Pisces, Characiformes) no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia, Mata Atlântica, Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Scientiarum**, v.28, n.2, p.135-141, 2003.

GODOY, M. P. de. **Peixes do Brasil, subordem Characoidei**: bacia do rio Mogí Guassú. Editora Franciscana, 1975.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015. 905 p.

HELLOU, J.; LEONARDD, J. Polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation and biotransformation products in trout exposed through food pellets. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v.24, n.4-5, p.697-712, 2004.

KIME, D. E. The effects of pollution on reproduction in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.5, n.1, p. 52-95, 1995.

KINNBERG, K.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P.; JESPERSEN, A. Effects of nonylphenol and 17 β -estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish, *Xiphophorus maculatus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, no. 2, p. 171-181, 2000.

KISHINO, T.; KOBAYASHI, K. Relation between toxicity and accumulation of chloro phenols at various pH, and their absorption mechanism in fish. **Water Research**, v.29, n.2, p.431-442, 1995.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; THURMAN, E.M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B.; BUXTON, H.T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. **Environment Science Technology**, v.36, n.6, p.1202-1211, 2002.

KOSERA, V. S. **Determinação de fenóis através do método espectrofotométrico direto em amostras de água do rio Iguaçu**. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura plena em Química) – Universidade Estadual do Paraná-Campus União da Vitória, União da Vitória, 2014.

LAIDLEY, C.W.; WOO, P.T.K.; LEATHERLAND, J.F. The stress response of rainbow trout to experimental infection with the blood parasite *Cryptobiasalmositica* Katz, 1951. **Journal of Fish Biology**, v.32, n.2, p.253-261, 1988.

LE CREN, E.D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Percafluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, v.20, p.201-219, 1951.

LEE, H.B.; PEART, T.E.; SVOBODA, M.L. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography - mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v.11, n.1094, p.122-129, 2005.

LINS, J.A.P.N.; KIRSCHNIK, P.G.; QUEIROZ, V.S.; CIRIO, S.M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v.8, n.4, p.469-484, 2010.

MALMQVIST, B.; RUNDLE, S. Threats to the running water ecosystems of the world. **Environmental Conservation**, v. 29, n.2, p.134-153, 2002.

NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitoração dos Sistemas Aquáticos. **Química Nova**, v. 88, p. 65-71, 2003.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; KATSUMITI, A.; FRANÇA, P.; MASCHIO, J.; ZANDONÁ, E.; CESTARI, M.M.; VICARI, T.; ROCHE, H., SILVA DE ASSIS, H.C.; FILIPAK NETO, F. Biomarkers responses in fish (*Atherinella brasiliensis*) of Paranaguá bay, southern Brazil, for assessment of pollutant effects. **Brazilian Journal of Oceanography**, v.61, n.1, p.1-11, 2013.

ORLANDO, E.F.; DENSLOW, N.D.; FOLMAR, L.C.; GUILLETTE, L.J. A comparison of the reproductive physiology of largemouth bass, *Icropterussalmoides*, collected from the Escambia and Blackwater rivers in Florida. **Environmental Health Perspectives**, v.107, p.199-204, 1999.

PÉREZ, G.L.; VERA, M.S.; MIRANDA, L. Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. In: KORTEKAMP, A. (Ed.). **Herbicides and Environment**, 2011. p.343 – 368.

RAMSDORF, W.A. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* sp B e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR)**. 2007. 127 f. Dissertação (Mestrado em Genética), Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RICE, C.A.; MYERS, M.S.; WILIS, M.L.; FRENCH, B.L.; CASILLAS, E. From sediment bioassay to fish biomarker connecting the dots using simple trophic relationships. **Marine environmental research**, v.50, n.1-5, p.527-533, 2000.

ROSSI, S.C.; DREYER da SILVA, M., PIANCINI, L.D., OLIVEIRA, R.C.A.; CESTARI, M.M.; SILVA de ASSIS, H.C. Sublethal effects of waterborne herbicides in tropical freshwater fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.87, n.6, p.603-607, 2011.

SAHA, N.C.; BHUNIA, F.; KAVIRAJ, A. Toxicity on phenol to fish and aquatic ecosystems. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.63, n.2, p.195-202, 1999.

SALVI, A.; CARRUPT, P.A.; TILLEMENT, J.P.; TESTA, B. Structural damage to proteins caused by free radicals: acesment, protection by antoxydants and influence of protein binding. **Biochemical pharmacology**, v.61, n.10, p.1237-1242, 2001.

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

STATSOFT INC. **Statistica: data analysis software system**. Version 7.1. Palo Alto: TIBCO Software Inc. 2005.

VAZZOLER, A.E.A. de M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos**: teoria e prática. Maringá: Eduem, 1996. 169p.

VAZZOLER, A. E. A. de M. **Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes**: reprodução e crescimento. Brasília: CNPq, 1981. 106p.

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, 2005.