

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**EFEITOS GENOTÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS DA
EXPOSIÇÃO AO PETRÓLEO EM *Centropomus parallelus***

LAILA CARINE CAMPOS MEDEIROS

**VILA VELHA
AGOSTO / 2012**

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**EFEITOS GENOTÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS DA
EXPOSIÇÃO AO PETRÓLEO EM *Centropomus parallelus***

Dissertação apresentada a
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ecologia de
Ecossistemas, para a obtenção do
grau de Mestre em Ecologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Adriana
Regina Chippari Gomes

LAILA CARINE CAMPOS MEDEIROS

VILA VELHA
AGOSTO / 2012

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M488e Medeiros, Laila Carine Campos.

Efeitos genotóxicos e histopatológicos da exposição ao petróleo em *Centropomus parallelus* / Laila Carine Campos Medeiros. – 2012.

84 f. : il.

Orientador: Adriana Regina Chippari Gomes.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2012.

Inclui bibliografias.

1. Poluição. 2. Toxicologia ambiental. 3. *Centropomus parallelus*. I. Gomes, Adriana Regina Chippari. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 363.7384

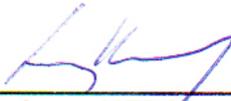
LAILA CARINE CAMPOS MEDEIROS

**EFEITOS GENOTÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS DA
EXPOSIÇÃO AO PETRÓLEO EM *Centropomus parallelus***

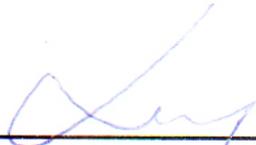
Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ecologia de
Ecossistemas, para a obtenção do
grau de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 27 de agosto de 2012,

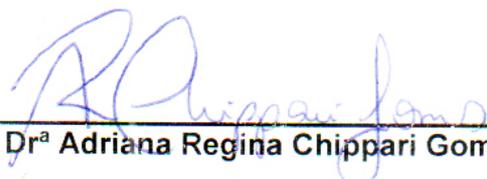
Banca Examinadora:



Drº Luiz Fernando Loureiro Fernandes - UFES



Drº Levy de Carvalho Gomes - UVV



Drª Adriana Regina Chippari Gomes - UVV

Orientadora

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e familiares pelo exemplo, amor, carinho, e apoio incondicional.

A Prof^a. Dr^a. Adriana Regina Chippari Gomes, agradeço mais uma vez por me guiar e amparar nesta luta tão árdua, possibilitando a realização deste trabalho, em mais uma importante etapa de minha formação profissional e pessoal.

Aos amigos, alunos: Larissa Simões, Lara Medeiros, Priscila Pavione, Vinícius Baroni, Lucas dos Santos, Felipe Domingues, Girlandia Brasil, Silas Ronchi, Henrique Pacheco, Lara Perini, Vinicius Azevedo, Talita Laurie, Marcelo Paulino, e Driele Tavares pelas horas depositadas no desenvolvimento das etapas desse trabalho, me fornecendo grande incentivo com companheirismo, entusiasmo e sabedoria.

Ao Prof^o. Dr^o. Levy de Carvalho Gomes confiança e grande apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES)

E com certeza a meus eternos e fiéis companheiros de lupa pela preservação da vida marinha: Renata Bhering, Luis Felipe Mayorga e Elaina Cruz. Quem me apoiaram e seguraram a barra em meio ao caos para permitir a realização desta minha conquista.

Aos amigos especiais, que ficaram no anonimato, mas que muito contribuíram durante toda esta jornada.

A todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e que passaram pela minha vida deixando algum tipo de ensinamento.

A TODOS, NOVAMENTE, MEU MUITO OBRIGADO!

**" Aprendi através da experiência amarga a
suprema lição: controlar minha ira e torná-la
como o calor que é convertido em energia.
Nossa ira controlada pode ser convertida
numa força capaz de mover o mundo."**

Mahatma Gandhi

APRESENTAÇÃO

O trabalho está estruturado em três partes, primeiramente uma introdução geral onde é abordada a fundamentação teórica da dissertação, um primeiro capítulo sobre a exposição de juvenis de *Centropomus parallelus* a concentração de fração solúvel do petróleo (FSP) além de uma avaliação da recuperação dos mesmos e um segundo capítulo onde foi avaliada as respostas de exemplares jovens de *C. parallelus* a concentrações de petróleo bruto.

Todo o trabalho está de acordo com as normas do periódico *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRAT.....	9
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	10
1.1 Contaminação do ambiente marinho.....	10
1.2 Efeitos tóxicos do petróleo.....	11
1.3 Biomonitoramento do ambiente aquático.....	12
1.4. Espécie estudada.....	15
REFERÊNCIAS.....	16
CAPITULO 1: AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS GENOTÓXICAS E HISTOPATOLÓGICAS EM <i>Centropomus parallelus</i> (ROBALO PEVA) EXPOSTOS À FRAÇÃO SOLÚVEL DE PETRÓLEO (FSP).	
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1 Aquisição e aclimação dos peixes.....	26
2.2 Delineamento experimental.....	26
2.3 Preparo da fração solúvel do petróleo.....	27
2.4 Coleta de sangue e tecido.....	28
2.5 Teste do Micronúcleo.....	28
2.6 Ensaio Cometa.....	28
2.7 Histologia Branquial.....	30
2.8 Análises estatísticas.....	31
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.1 Teste do micronúcleo.....	32
3.2 Ensaio cometa.....	35
3.3 Histopatologia Brânquial.....	41
4. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PETRÓLEO BRUTO EM JOVENS DE *Centropomus parallelus* (ROBALO PEVA).

RESUMO.....	58
ABSTRACT.....	59
1 INTRODUÇÃO.....	60
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1 Aquisição e aclimação dos peixes.....	62
2.2 Delineamento experimental.....	62
2.3 Coleta de sangue e tecido.....	62
2.4 Teste do Micronúcleo.....	63
2.5 Ensaio Cometa.....	63
2.6 Histologia Branquial.....	65
2.7 Células de cloreto (CC).....	66
2.8 Análises estatísticas.....	67
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
3.1 Teste do micronúcleo.....	68
3.2 Ensaio cometa.....	70
3.3 Histopatologia Brânquia.....	72
3.4 Células Cloreto (CC).....	75
4. CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84

RESUMO

A estrutura ecológica e o funcionamento dos ecossistemas naturais são perturbados frequentemente por descargas de compostos antropogênicos, que colocam em risco a vida de diversos organismos. O ambiente aquático é um desses ecossistemas que se encontra impactado por uma quantidade significativa de poluentes. As descargas de hidrocarbonetos de petróleo vindas de diversas fontes como acidentes com petroleiros e derramamentos tóxicos das indústrias são uma das principais fontes poluidoras desse ambiente. Diante disso os principais objetivos dessa dissertação foram: 1) avaliar as respostas genotóxicas e histopatológicas provocadas pela exposição a três concentrações de fração solúvel de petróleo (FSP) na espécie de peixe marinha *Centropomus parallelus* e sua possível recuperação; 2) avaliar através de respostas genotóxicas e histopatológicas os efeitos da exposição de exemplares de *Centropomus parallelus* a duas concentrações de petróleo bruto por 96 h. O primeiro objetivo foi alcançado com dois experimentos, no qual o primeiro consistiu na exposição de juvenis de robalo ($3,0 \pm 0,58$ g e $7,2 \pm 0,46$ cm) a quatro concentrações da FSP (0, 25, 50 e 75%), por 96 h, e o segundo experimento consistiu na exposição de dois grupos de animais à concentração de 50% de FSP por 168 h. E posteriormente um desses grupos foi submetido a uma recuperação por 168 h. As respostas genotóxicas foram avaliadas por meio do Teste do Micronúcleo e do Ensaio Cometa, com eritrócitos sanguíneos, e as respostas histopatológicas foram avaliadas semi quantitativamente nas brânquias dos animais (Valor Médio de Alteração - VMA e Índice de Alterações Histopatológicas - IAH). Os resultados obtidos mostram aumento na Frequência de Micronúcleos Eritrocitários apenas na exposição por 168h, assim como a incidência significativa de alterações histopatológicas, as quais ocorreram também após uma exposição mais prolongada, havendo uma recuperação destas após 7 dias. Já o Ensaio Cometa se mostrou mais sensível neste tipo de contaminação, visto que apresentou uma incidência significativa de danos no DNA dos peixes expostos por 96 e 168 h, porém não houve reparação desses danos no DNA após período de recuperação. Esses resultados mostram que os juvenis da espécie *Centropomus parallelus* podem ser considerados como moderadamente tolerantes à fração solúvel do petróleo. O segundo objetivo envolveu a exposição de exemplares de robalo ($15,5 \pm 3,90$ g e $11,85 \pm 1,06$ cm) a duas concentrações de petróleo bruto por 96 h. Os resultados encontrados na avaliação das alterações genotóxicas não foram significativos comparados ao grupo controle. E dentre as avaliações histopatológicas apenas a análise de imunohistoquímica apresentou diferença significativa na proliferação de células de cloreto no epitélio da lamela dos animais expostos. Em virtude desses resultados, sugere-se que a dose e o tempo testados foram insuficientes para causarem danos significativos em exemplares maiores de *Centropomus parallelus*.

Palavras chave: Poluição, Biomarcadores, Bioacumulação, Biomonitoramento, Testes ecotoxicológicos, *Centropomus parallelus*.

ABSTRAT

The ecological structure and functioning of natural ecosystems are disturbed frequently by discharges of compounds anthropogenic that endanger the lives of many organisms. The freshwater environment is an example of aquatic ecosystem that is impacted by a significant amount of pollutants. Discharges of petroleum hydrocarbons coming from diverse sources such as tanker accidents and toxic spills from industries are a major source of environmental pollution. Given that the main objectives of this dissertation were: 1) to evaluate the genotoxic and histopathological responses caused by exposure to three concentrations of water-soluble fraction of petroleum (WSF) in marine fish species *Centropomus parallelus* and its possible recovery; 2) evaluate through genotoxic histopathological responses of *Centropomus parallelus* after exposure to two concentrations of crude oil, for 96 h. The first objective was achieved with two experiments in which the first was the exposure of juvenile robalo (3.0 ± 0.58 g and 7.2 ± 0.46 cm) to four WSF concentrations (0, 25, 50 and 75%) for 96 h, and the second experiment, consisted the exposure of both groups of animals to a concentration of 50% WSF for 168 h. After, these groups were further subjected to a recovery for 168 h. Genotoxic responses were evaluated using the micronucleus test and the Comet assay, with blood erythrocytes, and histopathological responses were evaluated semi quantitatively using the gills of animals (Mean Value Change – MVC, Index and histopathological changes - IHC). The results show an increase in the frequency of Micronuclei in erythrocytes only at the 168h exposure, as well as the significant incidence of histopathological changes, which also occurred after a longer exposure, with recovery after 7 days. The Comet assay was more sensitive in this kind of contamination, since presented a significant incidence of DNA damage in fish exposed for 96 and 168 h, but there was no repair of DNA damage after the recovery period. These results show that juvenile *Centropomus parallelus* can be considered moderately tolerant to soluble fraction of oil. The second objective involved the exposure of robalo (15.5 ± 3.90 and 11.85 ± 1.06 g cm) at two concentrations of crude oil for 96 h. The findings in this assessment of genotoxic changes were not significant compared to the control group. Among histopathological evaluations only the immunohistochemical analysis showed significant difference in proliferation of mitochondria rich cells in the epithelia of the lamella treated animals. Given these results, it is suggested that the dose and time tested were insufficient to cause significant damage in larger specimens of *Centropomus parallelus*.

Keywords: Pollution, Biomarkers, Bioaccumulation, Biomonitoring, ecotoxicological tests, *Centropomus parallelus*.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Contaminação do ambiente marinho

A acumulação e a persistência de poluentes no ambiente aquático, proveniente da descarga de compostos antropogênicos, perturbam a estrutura ecológica e o funcionamento dos ecossistemas naturais, tornando-se uma ameaça para a vida (Fleeger et al., 2003; Çavas e Ergene-Gözükara, 2005).

Somente na década de 70, os cientistas começaram a perceber que o ambiente marinho do mundo todo estava impactado por uma quantidade significativa de poluentes, principalmente descargas de hidrocarbonetos de petróleo. Porém poucos dados quantitativos sobre o volume das descargas destes poluentes estava disponível. Mas esta década representou um marco, pois a partir de então descargas que eram liberadas diretamente em ambientes ecologicamente sensíveis, estuarinos e costeiros, passaram a ser uma grande preocupação (National Research Council, 2003) e persistem até os dias de hoje, visto que, os oceanos e mares continuam sendo afetados por diversas descargas de hidrocarbonetos vindas de acidentes com petroleiros, da queima de resíduos no alto mar, da lavagem de porões dos cargueiros e petroleiros, dos derramamentos tóxicos das indústrias feitos diretamente para as praias ou costas, do funcionamento dos barcos a motor, dentre outros.

O histórico de acidentes recentes nos mostra que a segurança das operações de exploração em camadas profundas do oceano ainda é frágil oferecendo graves riscos ambientais. A necessidade de adotar medidas socioambientais de prevenção e de segurança mais rígidas é inegável e urgente, pois os derramamentos de petróleo podem trazer consequências graves para o equilíbrio ecológico dos ecossistemas aquáticos principalmente o marinho como já pode ser observado há anos com os acidentes do Exxon Valdez, Amoco Cadiz e Prestige (dos Anjos et al., 2011).

Sendo assim, acidentes de todas as magnitudes podem ser nocivos ao meio ambiente, até aqueles que ocorrem diariamente como resultado de descargas de resíduos municipais e industriais, assim como pequenos vazamentos diários provenientes de atividades rotineiras de navegação e pesca e em tanques de postos de combustível. A entrada de petróleo e seus derivados no ambiente marinho pode acontecer de diversas formas, mas

podem ser categorizadas em quatro grupos principais: a escoa natural, a extração de petróleo, o transporte e o consumo (Rodrigues et al., 2010). Além disso, é importante lembrar que ambientes aquáticos têm sido usados por décadas como um depósito importante de resíduos antropogênicos (Pacheco e Santos 2001).

1.2 Efeitos tóxicos do petróleo

A fração solúvel do petróleo (FSP) e conseqüentemente o óleo bruto contém uma mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), fenóis, compostos heterocíclicos (contendo azoto e enxofre) e também metais pesados (Saeed e Al-Mutairi, 1999). Comparações sobre os efeitos tóxicos da FSP e do petróleo bruto são difíceis uma vez que as concentrações de hidrocarbonetos presentes no petróleo são extremamente variáveis de acordo com sua origem (Neff et al., 2000). Além da enorme variação na metodologia utilizada na preparação da FSP (Saeed e Al-Mutairi, 1999; Singer et al, 2000) e a distinta tolerância de diversas espécies a estes compostos (Ramachandran et al, 2006). Lembrando também que uma vez derramado, o óleo é rapidamente alterado por inúmeros processos naturais que ocorrem no ambiente, incluindo a evaporação, a dissolução, a biodegradação, e a fotodegradação (National Research Council, 2003). Portanto, a maioria dos resultados dos estudos *in vivo* não pode ser facilmente extrapolado para situações reais de contaminação, devido à complexidade da composição do óleo e dos processos naturais de intemperismo que afetam o comportamento do óleo após um derrame (Della Torre et al., 2012). Pois a dimensão do impacto gerado e a velocidade de cada um desses processos variam de acordo com as condições intrínsecas de cada ambiente (Pedrozo et al., 2002).

Rodrigues et al. (2010) dizem que a toxicidade aguda da fração solúvel do diesel e da gasolina pode ser cinco vezes maior do que a toxicidade do petróleo, mesmo com todas as substâncias podendo induzir alterações histopatológicas. Eles também alertam que muita atenção tem sido dada apenas às grandes superfícies visíveis de petróleo derramado enquanto que

o potencial efeito tóxico dos hidrocarbonetos aromáticos dissolvidos, que ficam mais disponíveis para a biota marinha, passa despercebido.

Diante dessa problemática, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de monitorar o ambiente, principalmente o ambiente marinho, uma vez que esta área é a mais freqüentemente afetada pela contaminação de petróleo. O conhecimento atual dos impactos da poluição de petróleo em organismos marinhos e estuarinos origina-se principalmente de duas fontes: estudos de campo após grandes derramamentos de petróleo e investigações laboratoriais dos efeitos tóxicos ou sub-letais do petróleo e petro-químicos específicos utilizando-se plantas e animais que fornecem informações valiosas sobre a poluição crônica ou aguda por hidrocarbonetos (Anderson et al., 1974).

1.3 *Biomonitoramento do ambiente aquático*

Uma das formas de monitorar a contaminação do ambiente aquático e tentar minimizar o efeito da atividade petroleira é através do uso de biomarcadores, que são testes que monitoram as respostas dos organismos, nos diversos níveis da organização biológica, desde o nível molecular e celular até os níveis morfológicos. Os biomarcadores podem ser sensíveis a mínimas concentrações dos compostos tóxicos presentes no petróleo e, diagnosticando o status “de saúde” dos organismos, se pode obter respostas iniciais de advertência a riscos ambientais (Payne et al., 1987). Dessa forma, podem ser utilizados de forma preventiva, permitindo que sejam tomadas ações de biorremediação antes que ocorram danos ambientais irreversíveis com conseqüências ecológicas severas (Cajaraville et al., 2000).

Ainda hoje há pouco conhecimento sobre as respostas dos organismos marinhos à contaminação de petróleo. Pouco se sabe sobre os processos celulares e moleculares que estão associados aos efeitos adversos relacionados às exposições agudas ou crônicas. Portanto a aquisição de conhecimento utilizando modernos métodos moleculares que proporcionam a oportunidade de identificação de biomoléculas importantes que podem ser usadas como biomarcadores são necessariamente urgentes (Arukwe et al., 2008)

Dentre os organismos empregados como sentinelas, os peixes são excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, pois alertam sobre o perigo potencial da poluição ambiental e podem indicar o potencial de exposição das populações humanas a substâncias genotóxicas presentes na água (Vanzella et al., 2007), uma vez que os poluentes tendem a acumular-se mais em organismos do que no meio ambiente (Anyakora et al., 2005). A acumulação de hidrocarbonetos de petróleo é extremamente rápida em peixes (Gravato e Santos, 2002), o que facilita e muito a utilização destes organismos em experimentos curtos de laboratório. Esta bioacumulação de hidrocarbonetos em tecidos de organismos pode ser de 10 a 1000 vezes maior do que em água (Ramachandran et al., 2006).

A exposição dos animais aquáticos, neste caso os peixes, aos derivados do petróleo causa inúmeras alterações bioquímicas, fisiológicas, histológicas, dentre outras. Alterações estas que podem ser utilizadas como biomarcadores na análise e monitoramento da qualidade da água de locais impactados por estes contaminantes. Os biomarcadores baseados na resposta ao nível molecular e celular trazem respostas sobre os primeiros sinais de perturbação ambiental e vêm sendo comumente usados em programas de biomonitoramento (Nigro et al., 2006).

Uma vez então que os produtos contaminantes, derivados do petróleo: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), hidrocarbonetos halogenados aromáticos (HAHs), metais pesados, dentre outros, já são conhecidos por causar a indução de respostas genotóxicas (Huang et al., 1995; Pickering, 1999), a sua presença pode ser avaliada ao se monitorar as respostas dos organismos vivos presentes no ambiente.

A presença de micronúcleos (MN) e outras anormalidades nucleares (ANs) nas células têm sido largamente utilizadas em peixes como indicadores de danos genotóxicos causados por águas poluídas, tanto no meio ambiente quanto em condições de laboratório (Al-Sabit e Metcalfe, 1995; Barsienè et al, 2006; Bolognesi et al, 2006; Çavas e Ergene-Gözükara, 2003; da Silva Souza e Fontanetti , 2006; Gravato e Santos, 2003), uma vez que estas alterações indicam aberrações cromossômicas estruturais e/ou numéricas surgidas durante aberrações mitóticas (Fenech et al., 1999). Portanto micronúcleos (MN) são pequenos fragmentos de cromatina resultantes da

fragmentação cromossômica ou perda de cromossomos durante a mitose (Heddle et al., 1991).

Outro indicador sensível de genotoxicidade é o dano no DNA medido pela quebra nas fitas de DNA (Gustavino et al., 2005). O Teste do Cometa é um teste de genotoxicidade capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Este pode ser realizado tanto em animais como em plantas, demonstrando grande sensibilidade e rapidez de resultados em estudos de genotoxicidade.

Outra forma de identificar contaminação por constituintes do petróleo nos organismos aquáticos tem sido pela identificação de metabólitos de HPAs na bile de peixes pois na maioria dos peixes os metabólitos são excretados através do sistema hepatobiliar (Jewett et al., 2002; Krahn et al., 1992), podendo ser usados como indicadores de exposição de curto prazo (Krahn et al., 1992; Van Der Oost et al., 2003). Este tipo de estudo tem sido aplicado tanto em pesquisas de laboratório quanto em estudos de campo (Aas et al., 2000; Klumpp et al., 2002; Oliveira Ribeiro et al., 2000; Yang e Bauman, 2005; Silva et al., 2006).

A avaliação de órgãos que desempenham funções essenciais para o funcionamento do organismos também oferecem muitas respostas sobre a contaminação. Com isso as brânquias por serem estruturas vitais para a saúde dos peixes, sendo o principal local de trocas gasosas, estando envolvidas nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido básico e excreção de compostos nitrogenados, apresentam ótimas pistas sobre a qualidade do ambiente, uma vez que qualquer alteração em sua estrutura certamente comprometerá a sobrevivência dos peixes (Morgan e Tovell, 1973).

As brânquias dos teleósteos, por ser um importante órgão responsável pela osmorregulação, sofrerão alterações com qualquer mudança de fluxo iônico do meio ambiente. Peixes de água doce, são relativamente hiperosmóticos em relação ao ambiente, por isso promovem a entrada de água no organismo, aumentando assim a absorção de compostos solúveis (Willmer et al, 2000). Assim, a absorção da HPAs solúveis pode ser influenciada por alterações na osmorregulação realizada nas brânquias (Ramachandran et al., 2006). Desta forma a avaliação estrutural e

histopatológica deste órgão se torna uma importante ferramenta na avaliação da qualidade ambiental.

1.4. Espécie estudada

O *Centropomus parallelus* é considerado um bom bioindicador, por se tratar de um predador de cadeia, que se alimenta de pequenos peixes até organismos bentônicos, e assim pode biomagnificar e bioacumular tóxicos presentes na água a partir do alimento (Kirschbaum et al., 2009). Ele pertencente à família Centropomidae. Os juvenis são encontrados próximos a estuários e em águas marinhas, já os adultos também são localizados a dezenas de quilômetros rio acima (Cerqueira e Tsuzuki, 2009). Portanto os peixes do gênero *Centropomus* são diádromos e eurihalinos, ou seja, apresentam migrações entre os habitats marinhos e dulcícolas, com o propósito de alimentação e procriação, e podem tolerar uma grande variação de salinidade (Rivas, 1986; Cerqueira, 2002; Chaves e Bouchereau, 2006). Com isso tem ampla distribuição geográfica, sendo encontrados no Oceano Atlântico desde os Estados Unidos (Flórida) até o sul do Brasil (Froese e Pauly, 2012). No litoral brasileiro são encontradas quatro espécies de robalo: *Centropomus undecimalis*, *Centropomus ensiferus*, *Centropomus pectinatus* e *Centropomus parallelus*, sendo este, robalo-peva, predominante na região sudeste (Borges et al., 2010; Tsuzuki et al., 2007).

São animais resistentes ao manejo e variações dos parâmetros físico-químicos da água, por isso possuem potencial para o cultivo, adaptando-se bem às condições de cativeiro e às dietas artificiais (Lemos et al., 2006; Tsuzuki et al., 2007). Estas características o torna um excelente para realização de trabalhos de avaliação ambiental (Kirschbaum et al., 2009).

REFERÊNCIAS

- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., Andersen, O.K., 2000. HPA metabolites in bile, cytochrome P450 1A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic Cod. *Aquatic Toxicology*. 51, 241-258.
- Al-Sabit, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*. 343, 121–135.
- Anderson, J.W., Neff, J.M., Cox, B.A., Tatem, H.E., Hightower, G.M., 1974. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Marine Biology*. 27, 75-88.
- Anyakora, C., Ogbeche, A., Palmer, P., Coker, H., 2005. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. *Journal of Chromatography A*. 1073, 323–30.
- Arukwe, A., Nordtug, T., Kortner, T. M., Mortensen, A.S., Brakstad, O.G., 2008. Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil. *Environmental research*. 107, 362-70.
- Barsienè, J., Dedonytè, V., Rybakovas, A., Andreikènitè, L., Andersen, O.K., 2006. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquatic Toxicology*. 78, 99-104.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M., Sciutto, A., 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*. 78, 93-98.
- Borges, J.C.S., Pressinotti, L.N.P., Gomes, V., Cunha Da Silva, J.R.M., 2010. Lipidic and proteic absorption in digestive tract of tropical fat snook (*Centropomus parallelus*, POEY 1860). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 386, 39–44.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula. *Science of The Total Environment*. 247, 295–311.
- Çavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2003. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutation Research*. 534, 93–99.
- Çavas, T., Ergene-Gözükara, S. 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum

refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*. 74, 264–71.

Cerqueira, V.R., 2002. Cultivo do Robalo: aspectos da reprodução, larvicultura e engorda. Do autor. UFSC-Ed, Florianópolis, SC. 94.

Cerqueira, V.R., Tsuzuki, M.Y., 2009. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 35, 17-28.

Chaves, P.T., Bouchereau, J.L., 2006. Síntese de estudos sobre a pesca artesanal no litoral sul do Paraná e norte de Santa Catarina. Curitiba: Eletrônica e Impressão.

da Silva Souza, T., Fontanetti, C.S., 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research*. 605, 87-93.

Della Torre, C., Tornambè, A., Cappello, S., Mariottini, M., Perra, G., Giuliani, S., Amato, E., Falugid, C., Crisarie, A., Yakimovc, M.M., Magaletti, E., 2012. Modulation of CYP1A and genotoxic effects in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to weathered oil: A mesocosm study. *Marine Environmental Research*. 76, 48–55.

dos Anjos, N.A., Schulze, T., Brack, W., Val, A.L., Schirmer, K., Scholz, S., 2011. Identification and evaluation of cyp1a transcript expression in fish as molecular biomarker for petroleum contamination in tropical fresh water ecosystems. *Aquatic Toxicology*. 103, 46-52.

Fenech, M.; Holland, N.; Chang, W. P.; Zeiger, E., Bonassi, S., 1999. The human micronucleus project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, v. 428, 271-283.

Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment*. 317, 207–233.

Froese, R., Pauly, D., 2012. FishBase. Disponível em: <www.fishbase.com> Acesso em: 23 mar. 2012.

Gravato, C., Santos, M.A., 2002. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 51, 115–27.

Gravato, C., Santos, M.A., 2003. *Dicentrarchus labrax* biotransformation and genotoxicity responses after exposure to a secondary treated industrial/urban effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55, 300-306.

- Gustavino, B., Buschini, A., Monfrinotti, M., Rizzoni, M., Tancioni, L., Poli, P., Rossi, C., 2005. Modulating effects of humic acids on genotoxicity induced by water disinfectants in *Cyprinus carpio*. *Mutation Research*. 587, 103–113.
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, Ph., Macgregor, J.T., 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 18, 277-291.
- Huang, Q., Wang, X., Liao, Y., Kong, L., Han, S., Wang, L., 1995. Discriminant analysis of the relationship between genotoxicity and molecular structure of organochloride compounds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 55, 796-801.
- Jewett, S.C., Dean, T.A., Woodin, B.R., Hoberg, M.K., Stegeman, J.J., 2002. Exposure to hydrocarbons ten years after the Exxon Valdez: evidence from cytochrome P4501A expression and biliary FACs in nearshore demersal fishes. *Marine Environmental Research*. 54, 21–48.
- Kirschbaum, A.A., Seriani, R., Pereira, C.D.S., Assunção, A., Abessa, S.D.M., Rotundo, M.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2009. Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 32, 151-154.
- Klumpp, D.W., Huasheng, H., Humphrey, C., Xinhong, W., Cordi, S., 2002. Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. I. Organic pollutants in mussel and fish tissues. *Marine Pollution Bulletin*. 44, 752-760.
- Krahn, M.M., Burrows, D.G., Ylitalo, G.M., Brown, D.W., Wigren, C.A., Collier, T.K., Chan, S.L., Varanasi, U. 1992. Mass spectrometric analysis for aromatic compounds in bile of fish sampled after the Exxon Valdez oil spill. *Environmental Science & Technology*. 26, 116–126.
- Lemos, D., Netto, B., Germano, A., 2006. Energy budget of juvenile fat snook *Centropomus parallelus* fed live food. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 144, 33–40.
- Morgan, M., Towell, P.W.A., 1973. The structure of the gill of the *Salmo Gairdneri* (Richardson). *Zoology Zellforsch.* 142, 147-162.
- National Research Council., 2003. *Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects*. The National Academies Press. Washington, DC.
- Neff, J.M., Ostazeski, S., Gardiner, W., Stejskal, I., 2000. Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19, 1809–21.

Nigro, M.; Falleni, A.; Barga, I. D.; Scarcelli, V.; Lucchesi, P.; Regoli, F.; Frenzilli, G. 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology*. 77, 339-347.

Oliveira Ribeiro, C.A., Pelletier, É., Pfeiffer, W.C., Rouleau, C., 2000. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. *Environmental Research*. 83, 286-292.

Pacheco, M., Santos, M. A., 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 49, 64-75.

Payne, J.F., Fancey, L.L., Rahimtula, A.D., Porter, E.L., 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comparative Physiology and Biochemistry*. 86, 233–245.

Pedrozo, M. F. M.; Barbosa, E. M.; Corseuil, H. X.; Sheneider, M. R.; Linhares, M. M. 2002. Ecotoxicologia e avaliação de risco do Petróleo. Série Cadernos de Referência Ambiental, Salvador-BA.12, p 229.

Pickering, R.W., 1999. A toxicological review of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Toxicology - Cutaneous and Ocular Toxicology*. 18, 101-135.

Ramachandran, S.D., Swezey, M.J., Hodson, P.V., Boudreau, M., Courtenay, S.C., Lee, K., King, T., Dixon, J.A., 2006. Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil. *Marine Pollution Bulletin*. 52, 1182–1189.

Rivas, L.R., 1986. Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia*. 3, 579-611.

Rodrigues, R. V., Miranda-Filho, K. C., Gusmão, E. P., Moreira, C. B., Romano, L. A., Sampaio, L. A., 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *The Science of the total environment*. 408, 2054-2063.

Saeed, T, Al-Mutairi, M., 1999. Chemical composition of the water-soluble fraction of leaded gasolines in sea water. *Environment International*. 25, 117–206.

Silva, C.A.R., Smith, B.D., Rainbow, P.S., 2006. Comparative biomonitors of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). *Marine Environmental Research*. 61, 439-455.

Singer, M.M., Aurand, D., Bragin, G.E., Clark, J.R., Coelho, G.M., Sowby, M.L., Tjeerdema, R.S., 2000. Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. *Marine Pollution Bulletin*. 40, 1007–1016

Tsuzuki, M.Y., Sugai, J.K., Maciel, J.C., Francisco, C.J., Cerqueira, V.R., 2007. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. *Aquaculture*. 271, 319–325.

Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environment risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13, 57-149.

Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research*. 631, 36-43.

Willmer, P., Stone, G., Johnston, I., 2000. *Environmental Physiology of Animals*. Blackwell Science Ltd. London.

Yang, X., Baumann, P. C., 2005. Biliary PAH metabolites and the hepatosomatic index of brown bullheads from lake Erie tributaries. *Ecological Indicators*. 6, 567-574.

CAPÍTULO 1
AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS GENOTÓXICAS E HISTOPATOLÓGICAS
DE *Centropomus parallelus* (ROBALO PEVA) EXPOSTO À FRAÇÃO
SOLÚVEL DE PETRÓLEO (FSP).

RESUMO

Avaliação das respostas genotóxicas e histopatológicas em *Centropomus parallelus* expostos à fração solúvel de petróleo (FSP)

O uso indiscriminado de combustíveis fósseis, geram inevitavelmente acidentes e emissões intencionais. Com isso testes de toxicidade voltados para a avaliação dos efeitos destes poluentes em espécies de peixes de ambientes neotropicais são necessários e urgentes. Em virtude disso, a proposta deste trabalho foi o de avaliar as respostas genotóxicas e histopatológicas provocadas pela exposição a três concentrações de fração solúvel de petróleo (FSP) na espécie de peixe marinha *Centropomus parallelus* e sua possível recuperação. Os juvenis foram expostos a quatro concentrações: 0% (controle), 25%, 50% e 75% da FSP em aquários individuais (n=8) por 96 h. Já em um segundo experimento, dois grupos de oito animais cada, foram expostos à concentração de 50% de FSP por 168 h. E posteriormente um dos grupos foi transferido para aquários individuais sem contaminante por mais 168 h para recuperação. As respostas genotóxicas foram avaliadas por meio do Teste do Micronúcleo e do Ensaio Cometa, com eritrócitos sanguíneos, e as respostas histopatológicas foram avaliadas semi quantitativamente nas brânquias dos animais (Valor Médio de Alteração - VMA e Índice de Alterações Histopatológicas - IAH). A frequência de Micronúcleos Eritrocitários não foi alterada nos exemplares de robalo expostos por 96 h, em 25, 50 e 75% da FSP. No entanto, houve um aumento dessa frequência nos animais expostos por 168 h, na concentração de 50%, assim como uma recuperação destes após 7 dias. Com relação ao Índice de Danos no DNA (ID), houve uma incidência significativa de danos nos peixes expostos por 96 h, nas concentrações de 25% e 50% de FSP quando comparados ao grupo controle. Aumento significativo também foi observado após exposição de 168 h, porém não houve reparação desses danos no DNA após período de recuperação. Assim como observado no teste do micronúcleo, a incidência significativa de alterações histopatológicas ocorreu apenas após uma exposição mais prolongada ao contaminante e por terem sido classificadas como danos leves a moderados foram passíveis de recuperação em 168 h. Em virtude dos resultados obtidos, pode-se considerar os juvenis da espécie *Centropomus parallelus* como moderadamente tolerantes à fração solúvel do petróleo.

Palavras-chave: Robalo peva, contaminantes, teste do micronúcleo, Danos no DNA, histopatologia de brânquias.

ABSTRAT

Evaluation of the genotoxic and histopathological responses in *Centropomus parallelus* exposed to water-soluble fraction of petroleum (WSF)

The indiscriminate use of fossil fuels inevitably generate accidental and intentional emissions. Toxicity tests aimed at assessing the effects of these pollutants on fish species from neotropical environments are necessary and urgent. Therefore the purpose of this study was to evaluate the genotoxic and histopathological responses caused by exposure to three concentrations of water-soluble fraction of petroleum (WSF) in the marine fish species *Centropomus parallelus* and its possible recovery. Juveniles were exposed to four concentrations, 0% (control), 25%, 50% and 75% of WSF in eight individual aquaria (3 L), for 96 h. In a second experiment, two groups of eight animals each were exposed to 50% concentration of WSF for 168 h. That group was transferred to individual tanks without contaminant for over 168 h for recovery. Genotoxic responses were evaluated using the micronucleus test and the Comet assay, with blood erythrocytes, and histopathological responses were evaluated semi quantitatively in the gills of animals (Mean Value Change - MVC Index and histopathological changes - IHC). The frequency of micronuclei in erythrocytes was not altered in specimens exposed for 96 h to 25, 50 and 75% of WSF. However, there was an increased frequency in animals exposed for 168 h at a concentration of 50% and a recovery after 7 days. Concerning Damage Index in DNA (DI), there was a significant incidence of damage in fish exposed for 96 h at concentrations of 25% and 50% of WSF compared to the control group. Significant increase was also observed after 168 h of exposure, but there was no DNA repair after the recovery period. As observed in the micronucleus test, the incidence of significant histopathological changes occurred only after longer exposure to the contaminant and was classified as mild to moderate damages and recoverable in 168 h. In view of the results obtained, we can consider the juvenile of *Centropomus parallelus* as moderately tolerant to water-soluble fraction of petroleum .

Keywords: Micronucleus Test, Comet assay, DNA damage, Histopathology of gills, Contaminant.

1. INTRODUÇÃO

O petróleo e seus derivados são um grupo complexo de misturas, e cada grupo pode conter variadas quantidades de compostos, sendo suas partes solúveis as mais tóxicas (Pedroti, 2007). Embora muitos dos compostos sejam aparentemente benignos, muitos outros, tais como alguns tipos de HPAs, são conhecidos por causar efeitos tóxicos em alguns organismos marinhos. Mesmo quando os níveis de exposição não são altos o suficiente para causar letalidade, os organismos podem ser afetados por hidrocarbonetos tóxicos dissolvidos (Rodrigues et al., 2010). Estes contaminantes podem provocar danos em diversos níveis: moleculares, bioquímicos, celulares e fisiológicos, levando à deficiência reprodutiva, desenvolvimento anormal, câncer, mutações letais, bem como a um aumento ou diminuição da variabilidade genética (Dickmann et al., 2004).

Considerando-se o elevado número de acidentes com petróleo e seus derivados que vem ocorrendo atualmente no Brasil e no mundo, testes de toxicidade voltados para a avaliação dos efeitos destes poluentes em organismos são necessários e urgentes. Os peixes vêm sendo frequentemente utilizados como organismos sentinelas, pois desempenham um grande papel na cadeia trófica ao acumularem substâncias tóxicas e, também, por serem considerados organismos sensíveis, visto que muitos deles respondem a baixas concentrações de agentes mutagênicos (Çavas e Ergene-Gozukara, 2005a).

Em geral, essas respostas que os organismos apresentam mediante a exposição a contaminantes podem ser utilizadas em testes ecotoxicológicos, sendo denominadas de biomarcadores. Estes são definidos como alterações biológicas que expressam a exposição e/ou o efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente (Walker et al., 1996). Este tipo de estudo vem sendo amplamente utilizado nas últimas décadas na avaliação da toxicidade de compostos químicos em áreas impactadas (Oliveira Ribeiro et al., 2005). Sendo assim, a utilização de biomarcadores em peixes como índices dos efeitos da poluição é de importância crescente e pode permitir a detecção precoce de problemas ambientais (Van Der Oost et al, 2003).

Técnicas de fácil avaliação e baixo custo são sempre as preferidas para trabalhos de biomonitoramento. Com isso em ambientes marinhos e de água doce, ensaios genotóxicos como o teste do micronúcleo e o ensaio cometa são largamente utilizados para estudar áreas com diferentes níveis de contaminação. Estes testes detectam quebras nas fitas de DNA, no caso do ensaio cometa, e fragmentação cromossômica ou perda de cromossomos durante a mitose, no caso do teste do micronúcleo (Heddle et al., 1991; Gustavino et al., 2005).

Outro biomarcador que pode ser usado como indicador da qualidade do ambiente é a análise de histopatologia de brânquias, visto que este órgão nos peixes são vias primárias de absorção e excreção, ricos em lipídios (Thomas e Rice, 1982) e estão diretamente em contato com as águas contaminadas, servindo como uma rota para a captação hidrofóbica direta de frações de petróleo. Bastante apenas que haja contato entre gotículas de óleo em suspensão e a superfície branquial (Ramachandran et al., 2006).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas genotóxicas e histopatológicas provocadas pela exposição a três concentrações de fração solúvel de petróleo (FSP) na espécie de peixe marinha *Centropomus parallelus* e sua possível recuperação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aquisição e aclimação dos peixes

Os exemplares de juvenis de *Centropomus parallelus* ($3,0 \pm 0,58$ g e $7,2 \pm 0,46$ cm) foram adquiridos em uma estação de criação particular localizada no município de São Mateus, ES. Os peixes foram mantidos em tanque de polietileno de 500 L, com aeração constante, no Laboratório de Ictiologia Aplicada (Lab Peixe, Biopráticas – UVV). A água salgada foi trocada uma vez por semana e foi oferecida ração comercial uma vez ao dia para os animais até a saciedade. Após 30 dias de aclimação, o lote de peixes saudáveis foi selecionado para o experimento.

A água salgada que abasteceu os aquários de manutenção, e os aquários-testes foi coletada na Praia da Costa -Vila Velha, ES ($20^{\circ}21'13''S$, $40^{\circ}17'02''O$), com índices de balneabilidade classificado como excelente pelo Instituto Estadual do Meio Ambiente do ES (IEMA), de acordo com a resolução CONAMA N° 274/00. Ao chegar ao Laboratório a água foi filtrada com filtros de papel. Ela manteve as características constante de: temperatura = $24,8 \pm 0,34^{\circ}C$, oxigênio = $7,09 \pm 0,18$ mgO₂ / L, pH = $8,04 \pm 0,34$, condutividade = $53,8 \pm 1,07$ ms/cm e de salinidade = 34 ± 1 .

2.2 Delineamento experimental

Primeiro experimento: exposição dos juvenis de *C. parallelus* a três concentrações (75%, 50% e 25%) da fração solúvel do petróleo por 96 h;

Para a realização do primeiro experimento, após as 24 h de aclimação dos animais, foi adicionada na água dos aquários-testes as diferentes concentrações da fração solúvel do petróleo (75%, 50% e 25%). Cada uma das concentrações de FSP foi adicionada em oito aquários. Os animais permaneceram nestas condições por 96 h. Uma troca de 50% da água total do aquário foi realizada após 48 h, fazendo a reposição do contaminante na mesma proporção. Outro grupo de oito exemplares de juvenis de robalo foi colocado individualmente em aquários-teste, no entanto não foi adicionado nenhum tipo de contaminante na água tornando este um grupo controle (0% de FSP) e recebeu os mesmos cuidados dos demais.

Segundo experimento: exposição dos juvenis de *C. parallelus* à concentração de 50% da fração solúvel do petróleo por 168 h (7 dias) e posterior recuperação de outras 168 h.

No segundo experimento, após as 24 h de aclimatação dos animais, foi adicionada na água a fração solúvel do petróleo na proporção de 50% em 16 aquários-testes. Os animais permaneceram nesta condição por sete dias. Uma troca de 50% da água total do aquário foi realizada após 96 h, fazendo a reposição do contaminante na mesma proporção. Outro grupo de 16 exemplares de juvenis de robalo também foi colocado em aquários-testes individuais, no entanto sem adição de contaminante na água (grupo controle – 0% de FSP) e também recebeu os mesmos cuidados dos demais. Após os sete dias de exposição a estes dois tratamentos, oito animais do grupo contaminado e 8 do grupo controle foram eutanasiados para coleta de material para análise. Enquanto isso os 8 animais restantes do grupo exposto e mais os 8 restantes do grupo controle foram transferidos para aquários-testes individuais, com nova água sem nenhum contaminante, onde permaneceram em recuperação por mais 7 dias.

Esses experimentos foram realizados colocando cada um dos exemplares em aquários-testes individuais de 4 L, tendo um número amostral de oito indivíduos para cada tratamento, com fotoperíodo controlado (14:10h). Os animais foram transferidos para estes aquários 24 h antes do início dos experimentos, para que houvesse aclimatação dos mesmos. A alimentação dos animais foi suspensa 24 h antes da transferência dos peixes, sendo oferecida novamente após 24 h, sendo realizada uma vez por dia.

2.3 Preparo da fração solúvel do petróleo

A fração solúvel do petróleo utilizada nos testes foi referente a uma amostra de petróleo doada pela Petrobras®, com características de leve a levíssimo, proveniente da Bacia do Espírito Santo. Foi utilizada uma razão de 1/10 para preparar a solução (óleo e água) que foi agitada a 250 rpm em um recipiente de vidro por 24 h, de maneira a formar um pequeno vortex. O frasco em agitação foi coberto com sacos plásticos pretos para evitar a alteração da composição da mistura por fotodegradação.. Com esse sistema, se obteve a fração solúvel do petróleo (FSP) que foi separada por sifonação.

2.4 Coleta de sangue e tecido

Ao término dos experimentos, os animais foram anestesiados com solução de Benzocaina 0,1 g/L e o sangue foi coletado por punção da veia caudal, com a utilização de seringas heparinizadas, e transferido para microtubos, mantendo-o sempre em gelo fundente, sendo usado nas análises genotóxicas (Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo). Imediatamente após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por meio de secção cervical de acordo com Winkaler et al. (2007) para retirada dos arcos brônquiais, que foram conservados em formol 4% para análises histopatológicas.

2.5 Teste do Micronúcleo

O sangue foi coletado e gotejado sobre uma lâmina para a realização de extensões sanguíneas. Após seca foi submetida a um banho de 30 minutos em Metanol P. A. (100%) para fixação. Sendo coradas em seguida com uma solução de Giemsa 5% por 40 minutos; lavada posteriormente com água destilada e seca em temperatura ambiente, como descrito por Grisolia et al. (2005). Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico, 1000 células sanguíneas (eritrócitos) por lâmina foram contadas para a quantificação dos micronúcleos presentes. Foram contadas duas lâminas para cada peixe.

2.6 Ensaio Cometa

A análise de fragmentos de DNA foi realizada utilizando ensaio cometa alcalino e coloração com nitrato de prata modificado de Tice et al. (2000) e Andrade et al. (2004). O método consiste na detecção de fragmentos de DNA em microgel de agarose. Para isso lâminas de microscopia, duas para cada exemplar, foram previamente cobertas com agarose 1,5% (1,80 g de agarose e 120 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4). As amostras de sangue foram diluídas 20 vezes em tampão fosfato e posteriormente, 10 µl do sangue diluído foi misturado com 100 µl de agarose low melting (0,15 g de agarose em 20 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4) a 40°C. Em seguida foram colocadas sobre as lâminas com pré-cobertura e recobertas com lamínulas para que o gel se espalhasse uniformemente até solidificar. Após a retirada

das lâminas, os slides foram colocados na solução de lise (146,1 g NaCl (2,5 M), 37,2 g EDTA (100 mM), 1,2 g de Tris (10 mM), 1 litro de água destilada e o pH da solução foi ajustado para 13 com NaOH e no momento do uso foram adicionados 1% de Triton X-100 e 10% DMSO) por no mínimo 2 h, em geladeira e protegidos da luz. Depois da lise as lâminas foram colocadas em cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético (300 mM NaOH e 1 mM EDTA em pH>13) por 20 min. Em seguida foi realizada a corrida eletroforética em 25 V e 300 mA por 15 min. Após esta etapa as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (48,5 g de Tris em 1 litro de água destilada) durante 5 minutos por três vezes e sendo lavadas com água destilada por duas vezes. As lâminas foram secas por 2 h a 37°C. Após esse período as lâminas foram fixadas em solução fixadora (15% de ácido tricloroacético, 5% de sulfato de zinco (heptahidratado), 5% de glicerol e 1 litro de água destilada) por 10 min. Após esta etapa as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e secas por 2 h a 37°C. Depois de secas as lâminas foram hidratadas por 5 minutos com água destilada e coradas com solução de coloração com prata (66 ml da solução de carbonato de cálcio (12,5 g de carbonato de cálcio para 250 ml de água) e 34 ml da solução de nitrato de prata (50 mg de nitrato de prata, 50mg de nitrato de amônio, 250mg de ácido tungstosalicílico e 125 µl de formaldeído) por 15 min. a 37°C. Depois de coradas as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e então submersas por 5 minutos em solução stop (ácido acético 1%). Passado os 5 minutos de reação foram novamente lavadas por três vezes e secas em temperatura ambiente.

Os danos no DNA foram medidos e classificados posteriormente de acordo com o tamanho da cauda em 4 classes: classe 0 – não apresenta cauda (classe sem danos); classe 1 – cauda é menor que o diâmetro do núcleo (poucos danos); classe 2 – cauda com variação de comprimento de 1x a 2x o diâmetro do núcleo (danos médios); classe 3 – cauda maior que 2x o diâmetro do núcleo (danos extensivos); classe 4 – ausência de um núcleo principal - presença apenas de fragmentos do DNA (apoptose da célula) (Grazeffe et al., 2008). Os resultados foram expressos em porcentagem para cada classe. O índice de danos (ID) analisado pelo teste cometa foi avaliado

utilizando a somatória do número de células danificadas multiplicado pelo valor da classe de dano (0 a 4). Esses valores demonstram os Danos apresentados nos tratamentos de acordo com Heuser et al. (2008).

2.7 Histologia Branquial

Para a observação de possíveis histopatologias branquiais as amostras das brânquias coletadas e fixadas em formol 4% foram desidratadas em bateria crescente de álcoois e incluídas em metacrilato (Historesina Leica). Cortes não seriados de 3,5 µm de espessura foram realizados para a confecção das lâminas, os quais foram corados com Azul de Toluidina e posteriormente analisados em microscópio de luz. A ocorrência de alterações histopatológicas nos órgãos foi avaliada semi-quantitativamente de duas formas: a) Cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA), com base na incidência de lesões, de acordo com Schwaiger et al. (1997). Para tanto, atribuiu-se um valor numérico para cada animal conforme a escala: grau 1 (ausência de alterações histopatológicas), grau 2 (ocorrência de lesões pontualmente localizadas) e grau 3 (lesões amplamente distribuídas pelo órgão); b) Cálculo do Índice de Alterações Histopatológicas (IAH), com base na severidade de cada lesão (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994). Para tanto, as alterações foram classificadas em estágios progressivos quanto ao comprometimento das funções teciduais (Tabela 1): alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do tecido; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis. Um valor de IAH foi calculado para cada animal através da fórmula: $IAH = 10^0 \Sigma I + 10^1 \Sigma II + 10^2 \Sigma III$, sendo I, II e III corresponde ao número de alterações de estágio I, II e III, respectivamente. Os valores de IAH entre 0 e 10 indicam um funcionamento normal do órgão; valores entre 11 e 20 indicam danos leves a moderados no órgão; valores entre 21 e 50 indicam danos moderados a severos e valores maiores que 100 indicam danos irreparáveis no tecido.

Tabela 1. Classificação das alterações histopatológicas quanto aos estágios de comprometimento da função branquial.

Estágios		
I	II	III
Hipertrofia do epitélio lamelar	Fusão total das lamelas	Necrose
Hiperplasia do epitélio lamelar	Aneurisma lamelar	
Congestão vascular	Ruptura epitelial	
Dilatação do canal marginal		
Descolamento epitelial		
Constricção do sistema de células pilares		
Proliferação de células-cloreto		
Proliferação de células mucosas		
Fusão parcial das lamelas		
Edema		

2.8 Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi testada através do teste estatístico Kolmogorov-Smirnov.

Para o primeiro experimento as diferenças encontradas entre as concentrações (25, 50 e 75% de FSP) em relação ao seu grupo controle foram determinadas por Kruskal-Wallis Anova e teste de Dunn ($p < 0,05$). Com exceção dos dados obtidos no ensaio cometa onde foi realizado uma Anova e um teste de Dunnett's ($p < 0,05$).

Para o segundo experimento as diferenças encontradas foram determinadas por uma Anova de dois fatores (grupo exposto à FSP e grupo recuperado), seguido de um teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na comparação dos dois experimentos (exposição a 50% FSP por 96 h com exposição a 50% FSP por 168 h) utilizou-se um teste Kruskal-Wallis Anova e teste de Dunn ($p < 0,05$).

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Teste do micronúcleo

O Teste do Micronúcleo já é bem conhecido e utilizado em ensaios de genotoxicidade para eucariotos. Esta avaliação detecta aberrações cromossômicas, estruturais e numéricas, as quais são induzidas por agentes clastogênicos e aneugênicos, através do surgimento de pequenos núcleos, que nada mais são do que cromossomos intactos ou fragmentados que ficaram para trás (fora do núcleo) na divisão celular (Fenech et al., 1999; Frieauff et al., 1998; Heddle et al., 1991).

No primeiro experimento (exposição por 96 h à FSP em três concentrações) não foi observado nos eritrócitos um aumento significativo da frequência de micronúcleos nos indivíduos expostos em relação ao grupo controle. Embora se observe um aumento de sua frequência em alguns dos animais com o aumento da concentração de FSP utilizada como demonstrado na Figura 1.

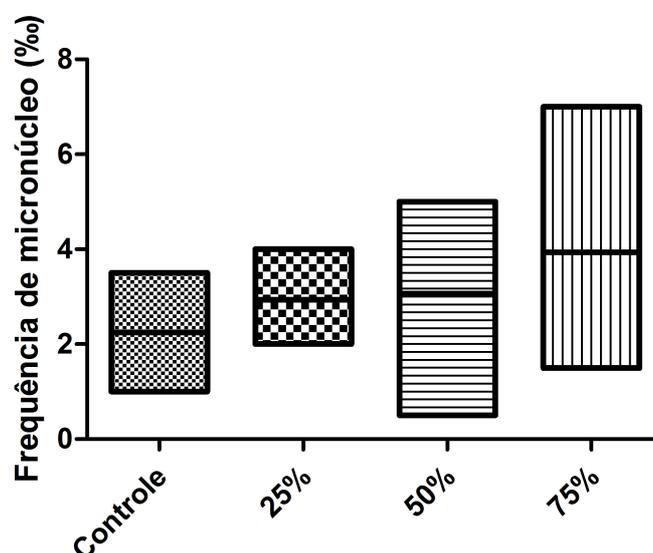


Figura 1. Frequência de Micronúcleos Eritrocitários de *Centropomus parallelus* expostos a três concentrações de fração solúvel de petróleo (FSP), por 96 h, acompanhados do grupo controle. Os dados estão expressos em mediana, com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%.

Este resultado sugere que a FSP nas concentrações de 25%, 50% e 75% não foi o fator determinante na indução dos micronúcleos, ou que o

tempo de 96 h de experimento não foi suficiente para detectar uma quantidade grande de células em processo de divisão uma vez que a formação de eritrócitos micronúcleados é decorrente de problemas durante a segregação das cromátides no processo de divisão celular, ou mesmo durante a amplificação gênica (Kodo Filho, 2006; Ferraro et al., 2004). Embora muitos estudos indiquem que o tempo de 96 h é suficiente para se detectar células eritrocitárias com micronúcleos, visto que neste período muitas células já passaram pelo processo de divisão celular (Simonato et al., 2006; Santos et al. 2010).

No trabalho de Santos et al. (2010), onde exemplares de *Hippocampus reidi* foram usados como modelo biológico, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de fração solúvel de óleo diesel (FSOD) testadas quando comparadas ao grupo controle no período de 24 horas, no entanto, foi observado um aumento de micronúcleos nos eritrócitos dos peixes expostos a 1:500 e 1:100 de FSOD durante 96 horas. Vanzella et al. (2007) também encontraram diferenças significativas nas frequências de micronúcleos ao expor *Prochilodus lineatus* a 50% de FSOD por 6, 24, 96 e 360 h. Com base nos resultados obtidos nesses dois trabalhos percebe-se que a toxicidade da fração solúvel do diesel é maior que a da FSP. Segundo Rodrigues et al. (2010), a toxicidade desses dois produtos derivados do petróleo podem ser cinco vezes maior do que a toxicidade do petróleo bruto.

Outra questão que também pode estar envolvida na baixa frequência de micronúcleos nos exemplares de *C. parallelus* é a baixa diluição dos compostos tóxicos presentes no petróleo utilizado, pois as concentrações de hidrocarbonetos presentes no petróleo são extremamente variáveis de acordo com sua origem (Neff et al., 2000). E também com a sensibilidade da espécie estudada, já que as tolerâncias a diferentes compostos tóxicos varia entre as espécies (Ramachandran et al, 2006).

No segundo experimento (exposição por 168 h à FSP na concentração de 50% e recuperação dos mesmos), foi observado aumento significativo de eritrócitos micronúcleados nos animais expostos à FSP (50%) por sete dias em comparação ao seu respectivo grupo controle (Figura 2). E esta diferença não foi observada no grupo submetido à recuperação, indicando que o período de 168 h de recuperação foi efetivo para que houvesse a ciclagem

dessas células afetadas pelo contaminante. E isto pode ser observado na redução significativa de células micronucleadas do grupo recuperado (rec-50%) em comparação ao grupo exposto (50%) (Figura 2).

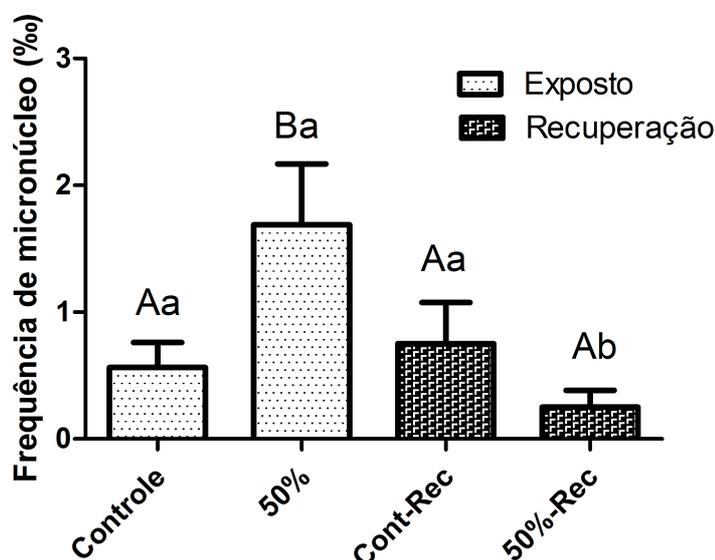


Figura 2. Frequência de Micronúcleos Eritrocitários de *Centropomus parallelus* expostos à concentração de 50% de fração solúvel de petróleo (FSP) acompanhado do seu grupo controle, por 168 h, e o grupo recuperação exposto também à 50% da FSP, por 168 h, e posteriormente submetidos a uma recuperação de igual período, acompanhado do seu respectivo grupo controle. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos (controle e 50%) de um determinado período (Exposição ou Recuperação). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os períodos (Exposição e Recuperação) para um mesmo tratamento (Controle ou 50%)

Delunardo (2010) observou aumento significativo de eritrócitos micronucleados em exemplares de *Hippocampus reidi*, expostos ao petróleo bruto (1%) no intervalo de 48 a 168 h, sendo a frequência maior em 96 h e em 336 h observou uma diminuição significativa desses valores. Segundo o autor, essa redução se deve à renovação dos eritrócitos, e ao fato de que os eritrócitos danificados tendem a ser eliminados do organismo mais rapidamente do que as células intactas, conforme sugerido por De Flora et al. (1993). No presente trabalho, observa-se também uma quantidade maior de eritrócitos micronucleados nos animais expostos por 96 h a 50% de FSP (figura 1) do que os animais expostos por 168 h nesta mesma concentração

(figura 2), o que também pode indicar que em 168 h já ocorre essa eliminação das células danificadas.

Poucos são os trabalhos que avaliam a recuperação dos animais após a exposição aos contaminantes. O que se observa no presente trabalho e que também foi observado por Delunardo (2010) é que o período de 168 h é suficiente para que haja recuperação deste tipo de danos em juvenis de *C. parallelus*, visto que a frequência de danos observada neste grupo é similar ao seu respectivo grupo controle.

No geral o *C. parallelus* é considerado um bom bioindicador, por se tratar de um predador de cadeia, que se alimenta de pequenos peixes até organismos bentônicos, e assim pode biomagnificar e bioacumular tóxicos presentes na água a partir do alimento (Kirschbaum et al., 2009). No entanto, o Teste do Micronúcleo usado como biomarcador nesta espécie exposta a estas concentrações de FSP e por tempos de exposição inferiores a 168 h não pode ser considerado como um bom biomarcador. Alguns trabalhos mostram que a utilização de células brânquiais na realização do teste do MN pode ser mais sensível (à indução de micronúcleo) do que a utilização de eritrócitos sanguíneos, pois as brânquias estão mais diretamente expostas (Çavas, 2008; Çavas e Ergene-Gözükara, 2003, 2005b; Hayashi et al, 1998).

3.2 Ensaio cometa

O Ensaio Cometa vem sendo proposto para estudos toxicogenéticos devido às vantagens apresentadas quando comparado a outros testes usados na detecção de substâncias genotóxicas. Ele consegue detectar quebras no DNA com a utilização de um número pequeno de células analisadas (Tice et al., 2001). Este ensaio não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. No entanto diferente das mutações, as lesões detectadas pelo Ensaio Cometa são passíveis de correção (Albertini et al., 2000).

Ao analisar os dados do teste pelo Índice de Danos (ID), no primeiro experimento, encontra-se uma incidência significativa de danos no DNA dos peixes expostos a FSP nas concentrações 25% e 50% quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$), conforme pode ser observado na figura 3. Já o

grupo exposto à FSP na concentração de 75% não apresentou uma incidência significativa de danos no DNA quando comparado ao grupo controle.

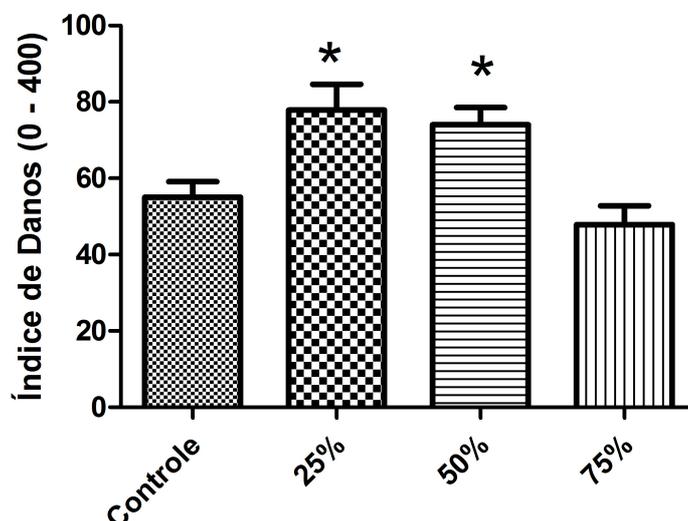


Figura 3. Índice de danos no DNA em *Centropomus parallelus* expostos a três concentrações de fração solúvel de petróleo (FSP), por 96 h, acompanhados do grupo controle. * Indica diferença significativa em relação ao grupo controle. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão médio.

Já em relação às análises feitas com os resultados de ID no segundo experimento foram observadas diferenças significativas entre o grupo exposto por sete dias (168 h) quando comparado com seu respectivo grupo controle, e entre o grupo submetido à recuperação em relação ao seu respectivo grupo controle (Figura 4). O trabalho mostra que uma contaminação de FSP na concentração de 50% provoca danos ao DNA e que não foi possível recuperação destes danos no tempo de sete dias, visto que o ID do grupo exposto não diferiu do grupo recuperado, corroborando com os dados observados na tabela 3, para as diferentes classes de danos.

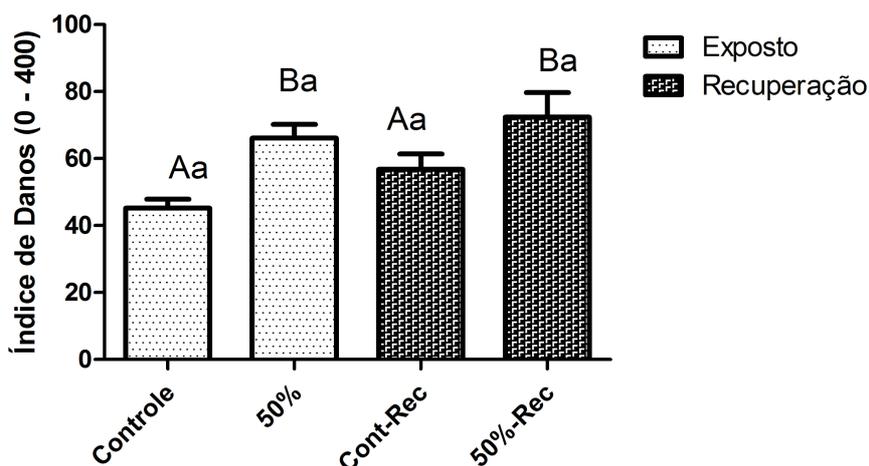


Figura 4. Índice de danos no DNA em *Centropomus parallelus* expostos à concentração de 50% de fração solúvel de petróleo (FSP), acompanhado do seu grupo controle, por 168 h, e o grupo recuperação exposto também a 50% da FSP por 168 h e, posteriormente, submetidos a uma recuperação de igual período, acompanhado do seu respectivo grupo controle. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão médio. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos (controle e 50%) de um determinado período (Exposição ou Recuperação). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os períodos (Exposição e Recuperação) para um mesmo tratamento (Controle ou 50%).

Uma observação interessante encontrada é que ao se comparar o ID dos peixes expostos à FSP na concentração de 50%, por 96 h (primeiro experimento – Figura 3), com o grupo exposto a mesma concentração por sete dias (segundo experimento – Figura 4), não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$). O que indica que o dano não se intensificou ao se prolongar o período de exposição (Figura 5).

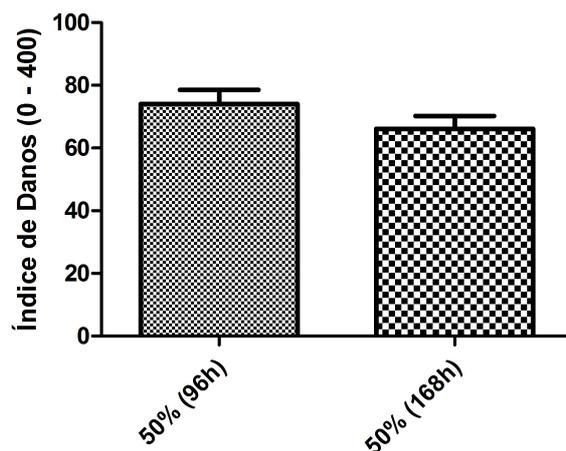


Figura 5. Índice de danos no DNA em *Centropomus parallelus* expostos à concentração de 50% de fração solúvel de petróleo (FSP), por 96 e 168 h. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão médio.

Ao contrário do que foi observado no presente estudo, Santos et al. (2010) observou em *Hippocampus reidi* diferença significativa em todas as concentrações de FSOD testadas quando comparadas ao controle, tanto em 96 como em 24 horas. E o trabalho de Vanzella et al. (2007) também encontrou diferenças significativas neste teste ao expor *Prochilodus lineatus* a 50% de FSOD por 6, 24, 96 e 360 h. Mostrando mais uma vez que o óleo diesel apresenta um maior potencial tóxico comparado à fração solúvel do petróleo. Pois o diesel é um combustível composto de frações residuais do petróleo obtido a partir de sua destilação. É volátil, tóxico e mais viscoso que a gasolina. Constituído basicamente por hidrocarbonetos de pesos moleculares elevados como o enxofre que pode ser extremamente tóxico em seus diversos compostos por ser muito reativo.

A camada insolúvel do petróleo em conjunto com a parte solúvel também pode causar mais danos do que somente a fração solúvel como demonstrado no trabalho de Delunardo (2010) onde o Ensaio Cometa conseguiu detectar danos com apenas 12 horas de exposição, bem como após 168 horas de exposição. O autor atribuem este aumento do dano do DNA em eritrócitos de *H. reidi*, em todos os períodos de exposição de petróleo bruto, com a metabolização do óleo, que pode gerar danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) que atuou sobre o DNA dos animais expostos e resultou nas lesões detectadas. Neste

mesmo estudo, o período de recuperação de 168 h também foi tempo suficiente para corrigir os danos genotóxico observados, o que não foi observado no presente trabalho. O autor relaciona esta rápida recuperação aos danos leves que possivelmente ocorreram ao DNA do organismo que ele próprio foi capaz de reparar neste curto tempo de recuperação, pois quando a recuperação é lenta, indica que o organismo foi gravemente afetado, podendo atingir não só os mais baixos níveis de organização biológica (molecular e bioquímica), mas também os níveis fisiológicos e morfológicos. No presente trabalho esta explicação não se aplica totalmente aos dados obtidos, visto que embora não tenha tido recuperação em sete dias, os danos severos que surgiram durante essa exposição ainda não são significativos em relação ao controle, como pode ser observado na tabela 2 (classe 3). Sendo assim, acredita-se que o que está ocorrendo nos exemplares de *C. parallelus* é uma lentidão no organismo para fazer este tipo de reparo celular, que pode ser devida a tolerância da espécie ao contaminante.

A classificação de Danos no DNA observada nos eritrócitos de *Centropomus parallelus* do primeiro experimento, expostos a três concentrações (25%,50% e 75%) de fração solúvel de petróleo (FSP), por 96 h, está demonstrada na Tabela 2. Nela observa-se exclusivamente uma diferença significativa na classe 0, onde o grupo 25% difere do grupo controle e do grupo 50%, neste caso há um predomínio de células com danos em classe 1 no grupo 25%, em contraposição aos demais tratamentos onde há um predomínio de classe 0. Observa-se ainda que a exposição à FSP nas concentrações de 25 e 50% causou danos graves no DNA (classe 3) nos exemplares de *C. parallelus*, embora em baixa quantidade.

Tabela 2. Distribuição das classes de danos encontrados nos eritrócitos de *Centropomus parallelus* expostos a três concentrações de fração solúvel de petróleo (FSP), por 96 h, acompanhado do grupo controle. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. * Indica diferença significativa dos tratamentos em relação ao grupo controle.

	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Controle	57,36 \pm 2,70	30,57 \pm 1,80	12,07 \pm 2,36	0	0
25%	38,50 \pm 4,11*	45,36 \pm 4,14	15,93 \pm 3,86	0,21 \pm 0,21	0
50%	47,50 \pm 4,54*	38,93 \pm 5,49	12,50 \pm 2,09	1,07 \pm 1,07	0
75%	57,64 \pm 2,81	33,54 \pm 2,81	8,82 \pm 2,24	0	0

Com relação ainda à Classificação de Danos no DNA observados nos eritrócitos de *C. parallelus* expostos à concentração de 50% de FSP, por 168 h, e posteriormente submetidos a uma recuperação de igual período (segundo experimento), foi observada diferença significativa apenas na classe 0, onde o grupo 50% difere de seu respectivo grupo controle (Tabela 3). Neste experimento, observa-se também um predomínio da classe 0 em todos os grupos, embora observa-se neste experimento um surgimento maior de células com danos na classe 3, maiores do que os observados no experimento 1 (Tabela 2), o que nos leva a supor que exposição por um tempo maior que 168 h começa a induzir danos graves no DNA, no entanto ainda não são significativos a ponto de refletir no valor final do Índice de Danos (Figura 4).

Tabela 3. Distribuição das classes de danos encontrados nos eritrócitos de *Centropomus parallelus* expostos à concentração de 50% de fração solúvel de petróleo (FSP), acompanhado do seu grupo controle, por 168 h, e o grupo recuperação exposto também à 50% da FSP por 168 h e posteriormente submetidos a uma recuperação de igual período, acompanhado do seu respectivo grupo controle. Média \pm erro padrão da média. * Indica diferença significativa dos tratamentos em relação aos seus respectivos grupos controles.

	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Controle	61,81 \pm 1,30	31,06 \pm 2,50	7,06 \pm 2,23	0	0
50%	48,19 \pm 4,29*	32,31 \pm 4,22	14,81 \pm 2,96	4,69 \pm 2,45	0
Cont – Rec	54,87 \pm 3,10	33,75 \pm 4,21	11,10 \pm 3,00	0,31 \pm 0,31	0
50% - Rec	49,25 \pm 3,01*	31,31 \pm 3,73	17,25 \pm 4,81	4,52 \pm 1,60	0

Os nossos dados de ensaio cometa corroboram com os encontrados por Deasi et al. (2010), onde se observou um aumento proporcional, embora lento, nas quebras das moléculas do DNA com o aumento do período de exposição. O que sugere que os efeitos nocivos do FSP foram progressivos, possivelmente devido aos seus compostos sofrerem fotoxidação e se tornarem mais tóxicos.

Os danos encontrados nos animais do grupo controle dos dois experimentos é perfeitamente normal pois podem indicar modificações estruturais normais que ocorrem na molécula de DNA durante a replicação e também durante colisões aleatórias que ocorrem nos diversos processos do metabolismo celular (Elliott e Elliott, 1997). Por isso não existem células sem dano no DNA, visto que o próprio metabolismo celular pode gerar em torno 1000 lesões diárias no DNA/célula (Gontijo e Tice, 2003).

Ao comparar os resultados do teste do micronúcleo com os encontrados no ensaio cometa verifica-se uma elevada concordância entre os ensaios, com maior sensibilidade do ensaio cometa ao já se mostrar sensível a exposição de 96 h, concordando assim com os resultados de diversos autores (Ramsdorf, 2007; Hartmann et al., 2001; Dixon et al., 2002; Klobucar et al., 2003). Pode-se deduzir que essa sensibilidade maior do ensaio cometa seja decorrente da natureza do dano que cada teste detecta uma vez que o teste do micronúcleo só detecta danos bruscos ao DNA (Mitchelmore e Chipman, 1998; Koppen et al., 1999) e também necessita que as células estejam em processo de proliferação para sua viabilidade (Pandurangi et al., 1995).

3.3 Histopatologia Brânquial

Os poluentes causam alterações bioquímicas e fisiológicas nas células e tecidos branquiais que podem levar a histopatologias brânquiais, pois modificam a função normal do órgão (Couch e Fournie, 1993). Esse tecido é metabolicamente muito ativo e dinâmico, o que o torna extremamente sensível (Hinton et al., 1992). E com isso a maioria das lesões aparece como resultado de mecanismos de defesa ou mecanismos compensatórios (Wendelaar Bonga, 1997).

A estrutura normal e as histopatologias das brânquias encontradas nas lâminas de *Centropomus parallelus* estão apresentadas na figura 6.

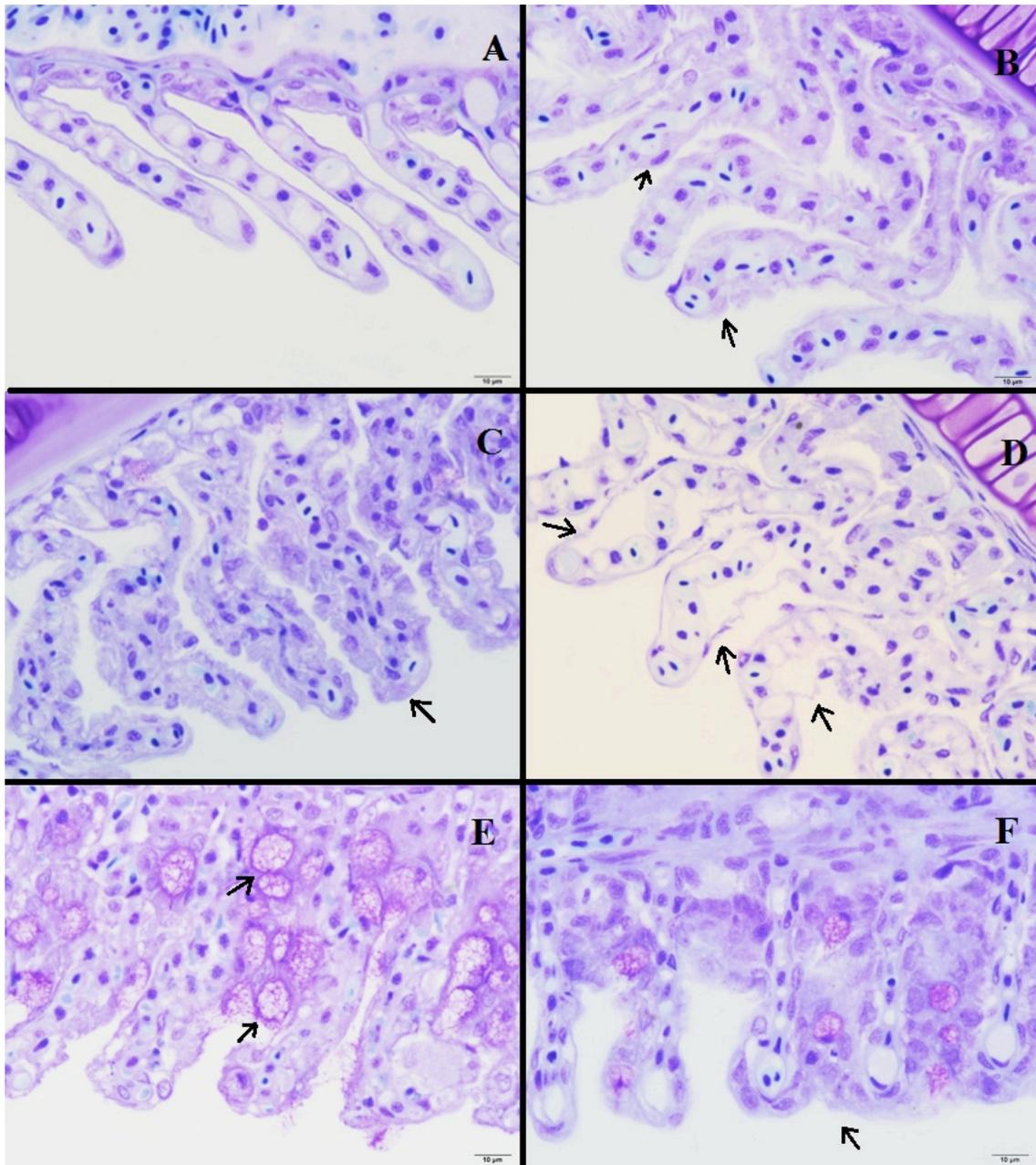


Figura 6. Histopatologia em brânquias encontradas em exemplares de *Centropomus parallelus* (A) Estrutura branquial normal; (B) hipertrofia do epitélio lamelar (C) Hiperplasia e fusão de várias lamelas; (D) Descolamento do epitélio (E) proliferação de células mucosas (F) Hiperplasia e fusão de várias. Barra de escala = 10 µm. Coloração = Azul de Toluidina.

As alterações mais frequentes encontradas no primeiro experimento, foram as de estágio de severidade I. Tais como hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, proliferação de células de cloreto e de células mucosas. Mas

também foi observada patologia de grau de severidade II, tal como fusão das lamelas (Tabela 4). As alterações mais frequentes encontradas no segundo experimento também foram as de estágio de severidade I, tais como hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar e proliferação de células de cloreto, porém também apresentou patologias de grau de severidade II, tais como fusão das lamelas e aneurisma lamelar (Tabela 5). Não foram encontradas alterações do estágio III nos animais em nenhum dos dois experimentos. A frequência e o tipo de alteração nas brânquias dos animais analisados estão representados pela Tabela 4 e 5.

Tabela 4. Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *Centropomus parallelus* expostos a diferentes concentrações da fração solúvel do petróleo, acompanhadas do grupo controle, por 96 h.

Alteração	Estágio	Controle	25%	50%	75%
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	++	++	++	++
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	+	++	+	+
Dilatação capilar	I	0+	0+	0+	+
Descolamento epitelial	I	0+	0+	0+	0+
Proliferação de células cloreto	I	+	+	+	+
Proliferação de células mucosas	I	0+	0+	0	0
Congestão	I	0	0+	0+	0
Edema	I	0	0	0	0+
Fusão das lamelas	II	0+	0+	0+	0+

0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco freqüente; ++ = freqüente; +++ = muito freqüente

Tabela 5. Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *Centropomus parallelus* expostos a 50% da fração solúvel do petróleo, acompanhado do seu grupo controle, por 168 h, e o grupo recuperação exposto também à 50% da FSP por 168 h e posteriormente submetidos a uma recuperação de igual período, acompanhado do seu respectivo grupo controle.

Alteração	Estágio	Controle	50%	Cont-Rec	50%-Rec
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	++	+	+	0+
Hiperplasia do epitélio lamellar	I	++	+++	+	+
Dilatação capilar	I	0	0+	0	0
Descolamento epithelial	I	0+	0+	0+	0+
Proliferação de células cloreto	I	++	+	0+	+
Proliferação de células mucosas	I	0+	0	+	0+
Fusão das lamelas	II	0+	+++	0+	0
Aneurisma lamellar	II	0	+	0	0

0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco freqüente; ++ = freqüente; +++ = muito freqüente

As análises histológicas das brânquias de *Centropomus parallelus* não apresentaram variações significativas do cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA) entre as concentrações testadas no primeiro experimento (Figura 7A), e nem após um aumento do tempo de exposição testado no segundo experimento (Figura 7B). A média dos valores de VMA foi próximo de 1, o que indica que as lesões estavam pontualmente localizadas e, dessa forma, o órgão teve funcionamento normal durante o experimento de 96hs.

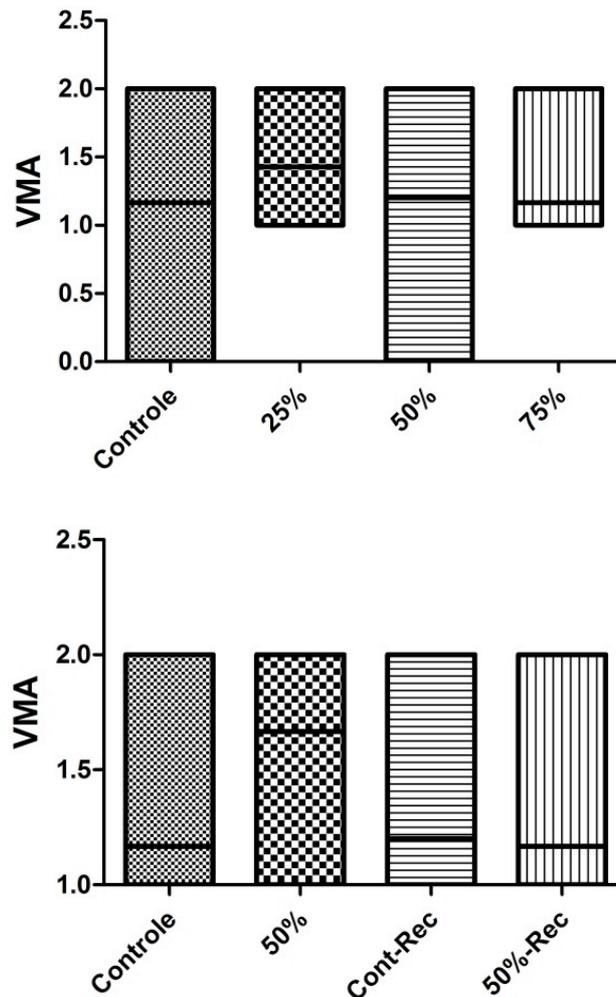


Figura 7. Mediana de alteração (VMA) em brânquias de *Centropomus parallelus* (A) expostos a diferentes concentrações de petróleo, por 96 horas, e (B) expostos a 50% da fração solúvel do petróleo, acompanhado do seu grupo controle, por 168 h, e o grupo recuperação exposto também à 50% da FSP, por 168 h, e posteriormente submetidos a uma recuperação de igual período, acompanhado do seu respectivo grupo controle. Os dados estão expressos em mediana, com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%.

O índice de alteração histopatológica (IAH) das brânquias também não apresentou variação significativa entre as concentrações testadas no primeiro experimento (Figura 8A). Mas já se mostrou mais sensível na avaliação das brânquias do segundo experimento, possivelmente devido ao aumento do tempo de exposição. Esta análise encontrou aumento significativo do IAH no grupo exposto por sete dias quando comparado com seu respectivo grupo controle, indicando danos leves a moderados no epitélio branquial desses animais, conforme pode ser observado na figura 8B. Com relação à recuperação destes animais, após a recuperação observa-se uma redução

significativa dos danos quando comparado com o grupo que foi exposto a 50% da FSP (Figura 8B). Estes dados são corroborados com o fato de que o grupo recuperado não difere significativamente de seu respectivo grupo controle.

Esta análise também evidenciou que as lesões causadas pela FSP nas brânquias dos animais expostos, aumentam com o tempo de exposição, visto que a média dos danos observados nos animais expostos a 50% de FSP por 168h (Figura 8B) é bem superior a média dos animais expostos na mesma concentração de FSP por apenas 96h (Figura 8A).

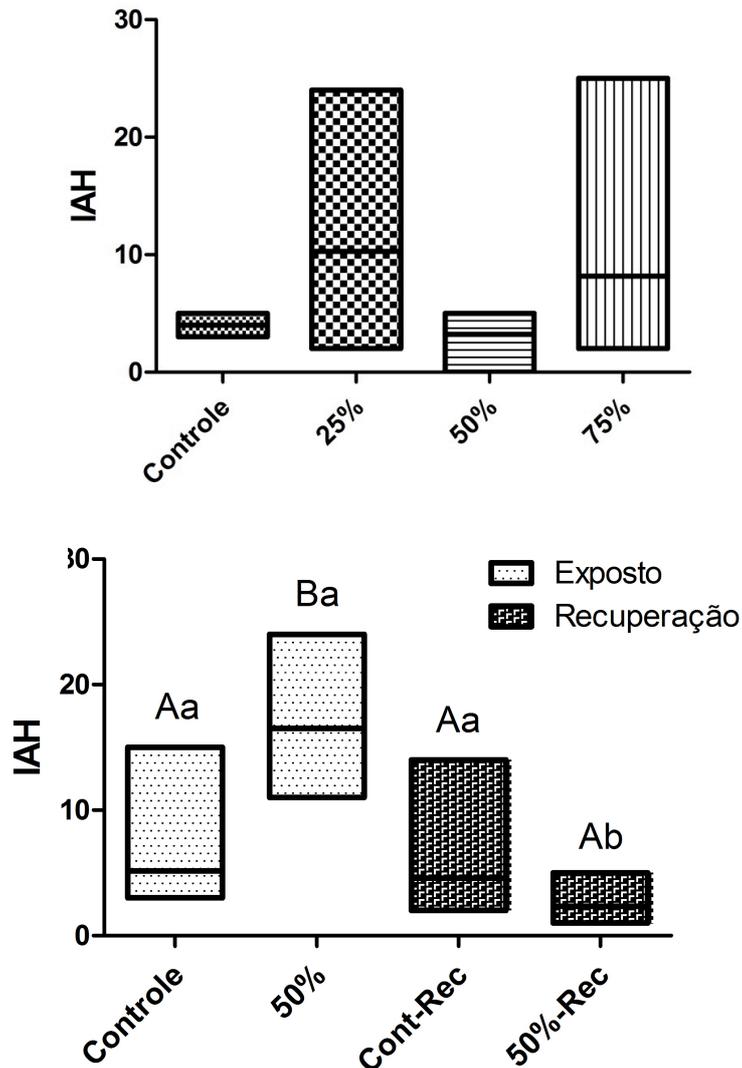


Figura 8. Índice de alteração histopatológica (IAH) em brânquias de *Centropomus parallelus* (A) expostos a diferentes concentrações de petróleo, acompanhado do grupo controle, por 96 h e (B) expostos a 50% da fração solúvel do petróleo, acompanhado do seu grupo controle, por 168 h, e o grupo recuperação exposto também à 50% da FSP por 168 h e posteriormente submetidos a uma recuperação de igual período, acompanhado do seu respectivo grupo controle. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos (controle e 50%) de um determinado período (Exposição ou Recuperação). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os períodos (Exposição e Recuperação) para um mesmo tratamento (Controle ou 50%). Os dados estão expressos em mediana, com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%.

De uma forma geral, as alterações encontradas no presente estudo das brânquias de *C. parallelus* nas concentrações testadas nos dois experimentos são classificadas como moderadas e podem não ter inferido nas funções essenciais desempenhadas por este órgão dependendo de seu

grau de frequência e de sua distribuição (Bernet et al., 1999). Estas alterações estruturais encontradas não são específicas para exposições ao petróleo, tais alterações podem também ser observadas em peixes expostos a diversos tipos de contaminantes (Fanta et al., 2003; Martinez et al., 2004; Figueiredo-Fernandes et al., 2007; Simonato et al., 2008; Camargo et al., 2009). Essas alterações tratam-se de um mecanismo protetor, que pode resultar em redução da superfície respiratória e em um aumento da distância de difusão poluente-sangue (Black e McCarthy, 1990), dificultando assim o funcionamento normal do órgão e, por isso, se tornam patologias.

Nossos dados corroboram também com os encontrados no trabalho de Shiogiri et al. (2012) onde as alterações encontradas evidenciam a presença de respostas de defesa do organismo em presença de contaminantes, tais como a hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, edema e proliferação das células mucosas (Cerqueira e Fernandes, 2002; Mallat, 1985) e indicam a toxicidade moderada do contaminante.

Delunardo (2010) também encontrou em seu trabalho com *Hippocampus reidi* exposto ao petróleo bruto, danos leves que não representam um risco a sobrevivência dos indivíduos porque os danos apresentados se mostraram esporádicos e reversíveis. No entanto, ele diz que os indivíduos que têm essas alterações se tornam mais vulneráveis uma vez que tem a capacidade de oxigenação do sangue reduzida. Neste mesmo trabalho, o grupo recuperação não exibiu uma redução significativa nas frequências de alterações histopatológicas em relação ao grupo exposto ao poluente durante 96 h, revelando que um período de sete dias livre do poluente não foi suficiente para inverter os danos, diferentemente de nossos resultados onde já se encontrou uma restauração do tecido da brânquia dos animais expostos no segundo experimento.

A histopatologia branquial então pode ser um biomarcador importante na avaliação de exposições mais prolongadas, superiores a 168 h, como demonstrado no trabalho de Spies et. al. (1996), medindo a exposição de hidrocarbonetos em *Hypsurus cary* e *Rachochilus toxodes* no Canal de Santa Barbara (um local de escoa superficial natural de petróleo), que encontrou lesões branquiais relativamente graves. Sendo duas vezes mais frequentes dos que em seus locais de referência. Mas não se mostrou eficiente na

avaliação com menores tempos de exposição como observado no primeiro experimento deste trabalho.

4. CONCLUSÕES

- A FSP causa danos genotóxicos nos exemplares de *C. parallelus* principalmente no nível de danos do DNA, visto que não foi identificada uma reparação destes danos após a exposição à FSP em 50% em sete dias.
- Os danos histopatológicos ocorrem após uma exposição mais prolongada ao contaminante e por serem danos leves a moderados foram passíveis de recuperação em sete dias nos exemplares de *C. parallelus*.
- Considerando os resultados obtidos com os encontrados na literatura o *C. parallelus* pode ser considerada uma espécie moderadamente tolerante à fração solúvel do petróleo.

REFERÊNCIAS

- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemmink K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norpa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*. 463, 111-172.
- Andrade, V., Freitas, T.R.O., Silva, J., 2004. Comet assay using mullet (*Mugil sp*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research*. 560, 57-67.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. 22, 25-34.
- Black, M.C., Mccarthy, J.F., 1990. Effects of sublethal exposure to chlorine on the uptake of polychlorinated biphenyl congeners by rainbow trout. *salmo gairdneri* (richardson). *Aquatic Toxicology*. 17, 275-290.
- Camargo, M.M.P., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquatic Toxicology*. 94, 40-46.
- Çavas, T., 2008. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 352-358.
- Çavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in exposed to textile mill effluent. *Mutation Research*. 538, 81-91.
- Çavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2005a. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 19, 107-111.
- Çavas, T., Ergene-Gözükara, S., 2005b. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic toxicology*. 74, 264-271.
- Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish, *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 52, 83-91.
- Couch, J.A. Fournie, J.W., 1993. *Advances in fisheries sciences. Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms*. CRC Press, Boca Raton.

De Flora, S., Vigano, L., Agostini, F.D., Camoirano, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C., Melodia, F., Arillo, A., 1993. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Research*. 319, 167-177.

Deasi, S.R., Verlecar, X.N., Ansari, Z.A., Jagtap, T.G., Sarkar, A., Deepti Vashistha, Dalal, S.G., 2010. Evaluation of genotoxic responses of *Chaetoceros tenuissimus* and *Skeletonema costatum* to water accommodated fraction of petroleum hydrocarbons as biomarker of exposure. *Water Research*. 44, 235-2244.

Delunardo, F.A.C., 2010. Danos genotóxicos, mutagênicos e morfológicos em *Hippocampus reidi* (Ginsburg, 1933) exposto ao petróleo. Dissertação de Mestrado. Centro Universitário Vila Velha. 78p.

Dickmann, M., Waldmann, P., Schnurstein, A., Grummt, T., Brun-Dbeck, T., Nagel, R., 2004. On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. *Aquatic Toxicology*. 68, 27-37.

Dixon, D.R., Pruski, A. M., Dixon, L. R., Jha, A.N., 2002. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis*. 17, 495-507.

Elliott, W.H., Elliott, D.C., 1997. *Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press, New York.

Fanta, E., Rios, F.S., Romão, S., Viana, A.C.C., Freiberger, S., 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54, 119-130.

Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S., 1999. The human micronucleus Project an international collaborative study on the use of micronucleus technique for measuring DNA damages in humans. *Mutation Research*. 428, 271-283.

Ferraro, M.V.M., Fenocchio, A.S., Mantovani, M.S., De Oliveira Ribeiro, C., Cestari, M.M., 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*. 27, 103-107.

Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A., 2007. Histopathological changes in liver and Gill epithelium of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 27, 103-109.

Frieauff, W., Potter-Locher, F., Cordier, A., Sutter, W., 1998. Automatic analysis of the in vitro micronucleus test on V79 cells. *Mutation Research*. 413, 57-68.

Gontijo, A.M.M.C., Tice, R., 2003. Teste do cometa para detecção de dano do DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F., Marques, E. K. (ed.) Mutagênese Ambiental. Canoas, Editora da ULBRA. pp. 247-279.

Grazeffe, V.S., Tallarico, L.F., Pinheiro, A.S., Kawano, T., Suzuki, M.F., Okazaki, K., Pereira, C.A., Nakano, E., 2008. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Mutation Research. 654, 58-63.

Grisolia, C.K., Oliveira, A.B.B.D., Bonfim, H., Klautau-Guimarães, M.D.N., 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. Genetics and Molecular Biology, 28, 334-338.

Gustavino, B., Buschini, A., Monfrinotti, M., Rizzoni, M., Tancioni, L., Poli, P., Rossi, C., 2005. Modulating effects of humic acids on genotoxicity induced by water disinfectants in *Cyprinus carpio*. Mutation Research. 587, 103-113.

Hartmann, A., Elhajouji, A., Kiskinis, E., Poetter, F., Martus, H.J., Fjallman, A., Fricauff, W., Suter, W., 2001. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. Food Chem. Toxicol. 39, 843-858.

Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, K., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofui, T., Ojima, Y., 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. Mutation Research. 399, 125-133.

Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P.H., Macgregor, J.T., 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. Environmental and Molecular Mutagenesis. 18, 277-291.

Heuser, V.D., De Andrade, V.M., Peres, A., Gomes de Macedo Braga, L.M., Bogo Chies, J.A., 2008. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. Cell Biology International. 32, 1223-1229.

Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.R., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okihiro, M.S., 1992. Histopathologic biomarkers. In: Hugget, R., R. Kimerle, P. Mehrle, H. Bergman (Eds.). Biomarkers – biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Lewis Publishers, pp.155-195.

Kirschbaum, A. A., Seriani, R., Pereira, C.D.S., Assunção, A., Abessa, S.D.M., Rotundo, M.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2009. Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. Genetics and Molecular Biology. 32, 151-154.

Klobucar, G.I.V., Pavlica, M., Erben, R., Papes, D., 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*. 64, 15- 23.

Kodo-Filho, A.K.K., 2006. Uso de Biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 86p.

Koppen, G., Toncelli, L. M., Triest, L., Verschaeve, L., 1999. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. *Mechanisms of Ageing and Development*. 110, 13-24.

Mallatt J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 42, 630-648.

Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B., Zaia, D.A.M., 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Brazilian Journal of Biology*. 64, 797-807.

Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*. 399, 135-147.

National Research Council., 2003. *Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects*. The National Academies Press. Washington, DC.

Neff, J.M., Ostazeski, S., Gardiner, W., Stejskal, I., 2000. Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19, 1809-1821.

Oliveira Ribeiro, C.A., Voltaire, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H., 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*. 74, 53-69.

Pandurangi, R., Petras, M., Ralph, S., Vrzoc, M., 1995. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 26, 345-356.

Pedroti, G.I., 2007. Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do Petróleo em solos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, 119p.

Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Muller, R., Lloyd, R. *Sublethal and Chronic Effects of pollutants on Freshwater fish*. Oxford: Fishing News Book. 30, 339-352.

Ramachandran, S.D., Swezey, M.J., Hodson, P.V., Boudreau, M., Courtenay, S.C., Lee, K., King, T., Dixon, J.A., 2006. Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil. *Marine Pollution Bulletin*. 52, 1182-1189.

Ramsdorf, W., 2007. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*astyanax sp B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 127p.

Rodrigues, R.V., Miranda-Filho, K. C., Gusmão, E.P., Moreira, C.B., Romano, L.A., Sampaio, L.A., 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *The Science of the total environment*. 408, 2054-2063.

Santos, C.A., Novaes, L.S., Gomes, L.C., 2010. Genotoxic effects of the diesel water-soluble fraction on the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae) during acute exposure. *Zoologia*. 27, 956-960.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Tribskorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6, 75-86.

Shiogiri, N.S., Paulino, M.G., Carraschi, S.P., Baraldi, F.G., Da Cruz, C., Fernandes, M.N., 2012. Acute exposure of a glyphosatebased herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental toxicology and pharmacology*. 34, 388–396.

Simonato, J.D., Albinati, A.C.L., Martinez, C.B.R., 2006. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Valenciennes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 76, 505-511.

Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 69, 112-120.

Spies, R.B., Stegeman, J.J., Hinton, D.E., Woodin, B., Smolowitz, R., Okihira, M., Shea, D., 1996. Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid fishes from a natural petroleum seep in the Santa Barbara channel. *Aquatic Toxicology*. 34, 195-219.

Thomas, R.E., Rice, S.D., 1982. Metabolism and clearance of phenolic and mono-, di-, and polynuclear aromatic hydrocarbons by Dolly Varden char. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38, 70-77.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single

cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35, 206-21.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Wells, P.G., Depledge, M.H., Butler, J.N., Manock, J.J., Knap, A.H., 2001. Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants - exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*. 42, 799-804.

Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environment risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13, 57-149.

Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species, *Mutation Research*. 631, 36-43.

Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 1996. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis. Londres, pp. 321.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*. 77, 591- 625.

Winkaler, E.U., Thiago, R.M., Santos, T.R.U., Joaquim, G., Machadoneto, J.G., Martinez, C.B.R., 2007. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 145, 236-244.

CAPÍTULO 2
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PETRÓLEO BRUTO EM
***Centropomus parallelus* (ROBALO PEVA)**

RESUMO

Avaliação dos efeitos do petróleo em *Centropomus parallelus* (robalo peva)

O petróleo e seus derivados possuem uma complexa mistura de várias substâncias que podem causar lesões no material genético e na estrutura celular. Devido ao histórico de acidentes pode-se perceber que a segurança das operações de exploração ainda é frágil oferecendo graves riscos ambientais. Com isso o objetivo deste trabalho foi o de avaliar através de respostas genotóxicas e histopatológicas os efeitos da exposição de exemplares de *Centropomus parallelus* a duas concentrações de petróleo bruto por 96 h. O experimento foi realizado utilizando duas concentrações de petróleo (10 and 20ml/L) e um controle (0 ml/L) com um número amostral de sete animais ($15,5 \pm 3,90g$ e $11,85 \pm 1,06$ cm) para cada tratamento. As respostas genotóxicas foram avaliadas por meio do Teste do Micronúcleo e do Ensaio Cometa, com eritrócitos sanguíneos, e as respostas histopatológicas foram avaliadas semi quantitativamente (Valor Médio de Alteração - VMA e Índice de Alterações Histopatológicas - IAH) e por meio de imunohistoquímica (quantificação de células cloreto) nas brânquias dos animais. Os resultados encontrados na avaliação das alterações genotóxicas (teste do micronúcleo e danos no DNA) não foram significativos nos exemplares expostos ao petróleo, por 96 h, comparados ao grupo controle. E dentre as avaliações histopatológicas as alterações mais frequentes foram as de estágio de severidade I, tais como hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, descolamento epitelial, proliferação de células de cloreto e de células mucosas e edema. Algumas patologias de grau de severidade II também foram observadas, como fusão das lamelas e ruptura epitelial. Já na análise de imunohistoquímica foi observada diferença significativa na proliferação de células de cloreto no epitélio da lamela (CCL) dos animais expostos a 10 m/L de petróleo bruto em relação ao controle. Em virtude desses resultados, sugere-se que os exemplares de *C. parallelus* com porte maior são mais tolerantes do que animais menores e em fases iniciais de vida, e também que a dose e o tempo testados foram insuficientes para causarem danos significativos em exemplares maiores de *Centropomus parallelus*.

Palavras-chave: Peixes, contaminante, genotoxicidade, histopatologia, teste do micronúcleo, danos no DNA, células cloreto.

ABSTRAT

Assessment of the effects of crude oil on *Centropomus parallelus*

The petroleum and its derivatives have a complex mixture of substances that can cause damage to the genetic material and cell structure. Due to historical accident can be seen that the safety of mining operations is still fragile offering serious environmental risks. Therefore, the objective of this study was to evaluate responses through genotoxic and histopathological effects of exposure to *Centropomus parallelus* in two concentrations of crude oil for 96 h. The experiment was performed using two concentrations of oil (10 and 20ml/L and a control (0 ml/L) with a sample size of seven animals (15.5 ± 3.90 and 11.85 ± 1.06 g cm) for each treatment. Genotoxic responses were evaluated using the micronucleus test and the Comet assay, with erythrocytes blood, and histopathological responses were evaluated semi quantitatively (Mean Value Change - MVC Index and histopathological changes - IHC) and by immunohistochemistry (quantification cells chloride) in the gills of the animals. The findings in the assessment of genotoxic changes (micronucleus test and DNA damage) were not significant in specimens exposed to crude oil, for 96 h, compared to the control group. And from the reviews histopathological changes were more frequent in stage I severity, such as hypertrophy and hyperplasia of the lamellar epithelium, epithelial detachment, chloride cells proliferation and mucous cells and edema. Some pathologies of severity II were also observed, as a fusion of lamellae and epithelial disruption. In the analysis of immunohistochemistry was no significant difference in cell proliferation in the epithelium of the lamella chloride (CCL) of animals exposed to 10 m/L of crude oil in relation to the control. In view of these results, it is suggested that *C. parallelus* with larger size are more tolerant than smaller ones and in early stages of life, and also that the dose and time tested were insufficient to cause significant damage in larger specimens of *Centropomus parallelus*.

Keywords: Micronucleus test, Comet assay, DNA damage, histopathological damage, cell chloride, contaminant.

1. INTRODUÇÃO

A expansão das economias globais, o aumento da população, e uma melhoria no padrão de vida em todo o mundo resultaram em uma busca crescente de combustíveis fósseis, principalmente com a crescente demanda de combustíveis para o transporte. Tal uso indiscriminado, no entanto, de qualquer substância poderá gerar, inevitavelmente, acidentes e emissões intencionais (National Research Council, 2003), que podem causar danos sérios e até mesmo irreversíveis ao meio ambiente. Além dos efeitos físicos dos derrames, a toxicidade de muitos de seus compostos individuais é significativa, mesmo em pequenas quantidades. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos conhecidos pelo seu potencial carcinogênico em humanos, sendo encontrados em proporções variáveis tanto no petróleo bruto como em seus derivados refinados e são considerados os componentes mais tóxicos do petróleo bruto (National Research Council, 2003; McAuliffe, 1987).

Formas de minimizar os riscos para o meio ambiente exigem uma rica compreensão de como os lançamentos de petróleo podem afetar o ambiente e principalmente os organismos ali presentes. Por isso órgãos ambientais federais e estaduais devem trabalhar junto às indústrias para aumentar os esforços em promover técnicas de extração que minimizem emissões acidentais ou intencionais de petróleo para o meio ambiente (National Research Council, 2003). Além desses esforços, o biomonitoramento dessas áreas pode ser uma ferramenta importante para evitar danos graves ao ambiente.

Dentre os organismos empregados como sentinelas, os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, pois alertam sobre o perigo potencial de novas substâncias químicas ou para a possibilidade de poluição ambiental e podem indicar o potencial de exposição das populações humanas a substâncias genotóxicas presentes na água (Vanzella et al., 2007). Além dos peixes serem indicadores do potencial de poluição do ambiente também são importantes veículos para a transferência de contaminantes para as populações humanas (Al-Sabti e Metcalfe, 1995).

Várias técnicas de citogenética como o Teste de Micronúcleo e o Ensaio Cometa são utilizadas rotineiramente para monitorar os efeitos dos poluentes nos ecossistemas aquáticos por meio dos bioindicadores (Kirschbaum et al., 2009; Vanzella et al., 2007). Estes testes genotóxicos e outros podem ser utilizados para avaliações tanto in vitro como in vivo (Çavas, 2008; Çavas e Ergene-Gözükara, 2003; 2005). O Teste do Micronúcleo e o Ensaio Cometa com eritrócitos sanguíneos ganharam popularidade em relação a outros ensaios genotóxicos básicos na investigação de toxicidade aquática, devido à sua sensibilidade, simplicidade e confiabilidade para a detecção de danos no DNA (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Anbumani e Mohankumar, 2012; Bopp et al, 2008).

As brânquias também podem servir de base para importantes mecanismos de avaliação uma vez que são a maior fração da superfície total do corpo, que está em contato direto com a água (Hughes, 1984). E é o primeiro alvo dos poluentes por ser a porta de entrada deles no organismo (Perry e Laurent, 1993; Playle et al., 1992). Estudos histopatológicos de brânquias, realizados em laboratório e em campo, provaram que esta é uma ferramenta sensível para detectar efeitos tóxicos diretos de compostos químicos (Schwaiger et al, 1997; Au, 2004; Ayas et al, 2007; Yasser e Naser, 2011).

Portanto o objetivo desta pesquisa foi avaliar as alterações causadas em exemplares da espécie de peixe *Centropomus parallelus* exposta a duas concentrações de petróleo bruto, pelo período de 96 h. Os efeitos desta exposição foi avaliada através de respostas genotóxicas (Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo) e histopatológicas (histopatologia e imunohistoquímica).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aquisição e aclimação dos peixes

Os exemplares de *Centropomus parallelus* ($15,5 \pm 3,90\text{g}$ e $11,85 \pm 1,06\text{ cm}$) foram adquiridos em uma estação de criação localizada no município de São Mateus, ES. Os peixes foram mantidos em tanques de polietileno de 320 L, com aeração constante, no Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES). A água doce de origem de poço foi trocada uma vez por semana e foi oferecida ração comercial uma vez ao dia para os animais. Após 30 dias de aclimação, o lote de peixes saudáveis foi selecionado para o experimento.

2.2 Delineamento experimental

O experimento foi realizado em uma casa de vegetação do CEUNES onde foram utilizados seis tanques de polietileno com capacidade para 310 L. Foram realizados 3 tratamentos: sem contaminante (controle); 10 e 20 ml/L de petróleo bruto, com duas repetições cada. Sete exemplares de *C. parallelus* foram transferidos para cada tanque experimental (120 L), dotados de aeração constante, 24 h antes do início dos experimentos, para que houvesse aclimação dos mesmos.

A água utilizada nos experimentos foi proveniente de poço do CEUNES e as características físico-químicas foram mantidas constantes durante todo o período experimental: temperatura= $22,7 \pm 0,12^\circ\text{C}$, oxigênio= $7,95 \pm 0,25\text{ mgO}_2/\text{L}$, pH= $6,45 \pm 0,14$, condutividade= $85,0 \pm 2,29\text{ }\mu\text{s}/\text{cm}$ e amônia= $0,39 \pm 0,32\text{ mg}/\text{L}$. E o petróleo utilizado foi doado pela empresa brasileira de petróleo - Petrobras®, com características de leve a levíssimo, proveniente da Bacia do Espírito Santo

2.3 Coleta de sangue e tecido

Ao término dos experimentos, os animais foram anestesiados com solução de Benzocaina 0,1 g/L e o sangue foi coletado por punção da veia caudal, com a utilização de seringas heparinizadas, e transferido para microtubos, mantendo-o sempre em gelo fundente. O sangue foi usado nas análises do Ensaio Cometa e do Teste do Micronúcleo. Imediatamente após

a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por meio de secção cervical, de acordo com Winkaler et al. (2007), para retirada dos arcos brânquiais, que foram conservados em formol 4% para análises histopatológicas e imunohistoquímicas.

2.4 Teste do micronúcleo

O sangue foi coletado e gotejado sobre uma lâmina para a realização de extensões sanguíneas. Após seca foi submetida a um banho de 30 minutos em Metanol P. A. (100%) para fixação. Sendo coradas em seguida com uma solução de Giemsa 5% por 40 minutos; lavada posteriormente com água destilada e seca em temperatura ambiente, como descrito por Grisolia et al. (2005). Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico, 1000 células sanguíneas (eritrócitos) por lâmina foram contadas para a quantificação dos micronúcleos presentes. Foram contadas 2 duas lâminas para cada peixe.

2.5 Ensaios Cometa

A análise de fragmentos de DNA foi realizada utilizando ensaio cometa alcalino e coloração com nitrato de prata modificado de Tice et al., (2000) e Andrade et al., (2004). O método consiste na detecção de fragmentos de DNA em microgel de agarose. Para isso lâminas de microscopia, duas para cada exemplar, foram previamente cobertas com agarose 1,5% (1,80 g de agarose e 120 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4). As amostras de sangue foram diluídas 20 vezes em tampão fosfato e posteriormente, 10 µl do sangue diluído foi misturado com 100 µl de agarose low melting (0,15 g de agarose em 20 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4) a 40°C. Em seguida foram colocadas sobre as lâminas com pré-cobertura e recobertas com lamínulas para que o gel se espalhasse uniformemente até solidificar. Após a retirada das lamínulas, os slides foram colocados na solução de lise (146,1 g NaCl (2,5 M), 37,2 g EDTA (100 mM), 1,2 g de Tris (10 mM), 1 litro de água destilada e o pH da solução foi ajustado para 13 com NaOH e no momento do uso foram adicionados 1% de Triton X-100 e 10% DMSO) por no mínimo 2 h, em geladeira e protegidos da luz. Depois da lise as lâminas foram

colocadas em cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético (300 mM NaOH e 1 mM EDTA em pH>13) por 20 min. Em seguida foi realizada a corrida eletroforética em 25 V e 300 mA por 15 min. Após esta etapa as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (48,5 g de Tris em 1 litro de água destilada) durante 5 minutos por três vezes e sendo lavadas com água destilada por duas vezes. As lâminas foram secas por 2 h a 37°C. Após esse período as lâminas foram fixadas em solução fixadora (15% de ácido tricloroacético, 5% de sulfato de zinco (heptahidratado), 5% de glicerol e 1 litro de água destilada) por 10 minutos. Após esta etapa as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e secas por 2 h a 37°C. Depois de secas as lâminas foram hidratadas por 5 minutos com água destilada e coradas com solução de coloração com prata (66 ml da solução de carbonato de cálcio (12,5 g de carbonato de cálcio para 250 ml de água) e 34 ml da solução de nitrato de prata (50 mg de nitrato de prata, 50 mg de nitrato de amônio, 250 mg de ácido tungstosalicílico e 125 µl de formaldeído) por 15 minutos a 37°C. Depois de coradas as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e então submersas por 5 min. em solução stop (ácido acético 1%). Passado os 5 minutos de reação foram novamente lavadas por três vezes e secas em temperatura ambiente.

Os danos no DNA foram medidos e classificados posteriormente de acordo com o tamanho da cauda em 4 classes: classe 0 – não apresenta cauda (classe sem danos); classe 1 – cauda é menor que o diâmetro do núcleo (poucos danos); classe 2 – cauda com variação de comprimento de 1x a 2x o diâmetro do núcleo (danos médios); classe 3 – cauda maior que 2x o diâmetro do núcleo (danos extensivos); classe 4 – ausência de um núcleo principal - presença apenas de fragmentos do DNA (apoptose da célula) (Grazeffe et al., 2008). Os resultados foram expressos em porcentagem para cada classe. O índice de danos (ID) analisado pelo teste cometa foi avaliado utilizando a somatória do número de células danificadas multiplicado pelo valor da classe de dano (0 a 4). Esses valores demonstram os Danos apresentados nos tratamentos de acordo com Heuser et al. (2008).

2.6 Histologia Branquial

Para a observação de possíveis histopatologias branquiais as amostras das brânquias foram coletadas e fixadas em formol 4% foram desidratadas em bateria crescente de alcoóis e incluídas em metacrilato (Historesina Leica). Cortes não seriados de 3,5 µm de espessura foram realizados para a confecção das lâminas, os quais foram corados com Azul de Toluidina e posteriormente analisados em microscópio de luz. A ocorrência de alterações histopatológicas nos órgãos foi avaliada semi-quantitativamente de duas formas: a) Cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA), com base na incidência de lesões, de acordo com Schwaiger et al. (1997). Para tanto, atribuiu-se um valor numérico para cada animal conforme a escala: grau 1 (ausência de alterações histopatológicas), grau 2 (ocorrência de lesões pontualmente localizadas) e grau 3 (lesões amplamente distribuídas pelo órgão); b) Cálculo do Índice de Alterações Histopatológicas (IAH), com base na severidade de cada lesão (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994). Para tanto, as alterações foram classificadas em estágios progressivos quanto ao comprometimento das funções teciduais (Tabela 1): alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do tecido; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis. Um valor de IAH foi calculado para cada animal através da fórmula: $IAH = 10^0 \Sigma I + 10^1 \Sigma II + 10^2 \Sigma III$, sendo I, II e III corresponde ao número de alterações de estágio I, II e III, respectivamente. Os valores de IAH entre 0 e 10 indicam um funcionamento normal do órgão; valores entre 11 e 20 indicam danos de leves a moderados no órgão; valores entre 21 e 50 indicam danos de moderados a severos e valores maiores que 100 indicam danos irreparáveis no tecido.

Tabela 1. Classificação das alterações histopatológicas quanto aos estágios de comprometimento da função branquial.

Estágios		
I	II	III
Hipertrofia do epitélio lamelar	Fusão total das lamelas	Necrose
Hiperplasia do epitélio lamelar	Aneurisma lamelar	
Congestão vascular	Ruptura epitelial	
Dilatação do canal marginal		
Descolamento epitelial		
Constricção do sistema de células pilares		
Proliferação de células-cloreto		
Proliferação de células mucosas		
Fusão parcial das lamelas		
Edema		

2.7 Células de cloreto (CC)

Para a determinação do número de CC nas brânquias foi utilizada a técnica de imunohistoquímica específica para a enzima Na^+/K^+ -ATPase. As amostras de brânquias que foram coletadas e fixadas em formol 4% foram desidratadas em séries graduais alcoólicas, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes histológicos longitudinais de 6 μm de espessura foram montados em lâminas e a parafina removida utilizando banhos consecutivos de xilol. Após hidratação com água, as lâminas foram lavadas duas vezes por 10 minutos em solução 0,1% TBS-T (TBS 0,1% e 1 ml de triton. $\text{pH}=7,3-7,4$). Para o bloqueio de ligações não-específicas, as lâminas foram incubadas durante 20 minutos em 20% de “normal goat serum” (NGS) diluído em TBS-T (200 μL NGS em 1000 μl de TBS-T) diluído (100 ml de TBS em 900 ml de água destilada). Em seguida, as lâminas foram incubadas com o primeiro anti-corpo (alfa 5) – Na-ATPase diluído em 0,1% TBS-T (1 parte de Na-ATPase: 300 partes de tampão) “overnight” em câmara de incubação úmida. Logo após, as lâminas foram lavadas duas vezes durante 10 minutos em TBS-T diluído e escurridas para a incubação do segundo anticorpo Goat Antimouse (GAM) - alíquotas de 1:150 diluídas com 1500 μl de tampão TBS-T - durante 1 hora em câmara úmida. O processo de lavagem das lâminas foi repetido para a incubação com Peroxidase Anti-peroxidase (PAP)/mouse (alíquotas de 2,5 μl diluídas em 2000 μl de tampão TBS-T), onde foram incubadas durante 1 hora em câmara úmida. As lâminas foram lavadas duas

vezes por 10 minutos em solução 0,1% de TB para a coloração com 3-3'-diaminobenzidina (DAB-Ni e H₂O₂). Foram pesados 0,050 g de DAB e diluído em TB (0,1%), onde foi adicionado 0,5 g de Sulfato níquel amoniacal e agitado até que o DAB e o Sulfato níquel amoniacal fossem dissolvidos, a solução foi filtrada e no momento as lâminas foram imersas na solução de DAB + Sulfato níquel amoniacal e adicionado 30 µl H₂O₂. As lâminas ficaram sob imersão durante 6 minutos para as duas espécies. Para interromper a reação, as lâminas foram lavadas em água destilada duas vezes por 10 minutos em cuba de vidro sobre agitador magnético. Logo após seguiu-se o processo de desidratação das lâminas até xilol e as mesmas foram montadas para observação em microscópio de luz. Após a montagem, as lâminas foram analisadas utilizando um microscópio de luz Olympus BX com uma câmara de vídeo acoplada a um computador que contém um software (Motic Images Plus 2.0 ML).

2.8 Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi testada através do teste estatístico Kolmogorov-Smirnov. Para as diferenças encontradas entre as concentrações (10 e 20 ml/L de petróleo bruto) em relação ao seu grupo controle foi determinada por Kruskal-Wallis, uma Anova e teste de Dunnet's ($p < 0,05$). Com exceção dos dados obtidos no ensaio cometa onde foi realizado uma Anova e um teste de Dunnet's ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste do Micronúcleo

Não foi observado nas células eritrocíticas um aumento significativo da frequência de micronúcleos nos indivíduos expostos ao petróleo em relação ao grupo controle (Figura 1).

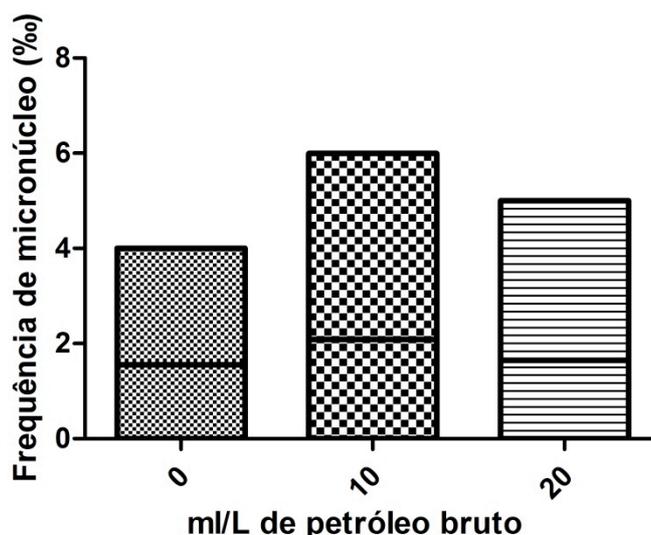


Figura 1. Frequência de Micronúcleos Eritrocitários de *Centropomus parallelus* expostos a duas concentrações (10 e 20 ml/L) de petróleo bruto, por 96 h, comparados ao grupo controle. Os dados estão expressos em mediana, com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%.

Possivelmente, esses resultados não significativos encontrados para esta análise em exemplares de *C. parallelus* se devam à baixa concentração do contaminante testado (10 e 20 ml/L) e também ao baixo tempo de exposição. Esta consideração é reforçada com os resultados obtidos por Çavas e Ergene-Gözükara (2005), ao avaliarem os efeitos de um efluente de uma refinaria de petróleo em exemplares de *Oreochromis niloticus*. Os autores observaram que este efluente provoca aumento significativo nas frequências MN em eritrócitos apenas em doses mais elevadas (10 e 20% v/v), sem haver alterações na dose mais baixa (5 % v/v) entre 3 e 6 dias, vindo a apresentar diferença significativa apenas no nono dia. De acordo com Manna et al. (1985) e Das e Nanda (1986) a indução de micronúcleos em eritrócitos de sangue de peixes depende do tempo de exposição dos mesmos

às substâncias testadas, uma vez que este tipo de teste se mostra mais expressivo após uma exposição aguda em altas concentrações ou com maior duração de tempo em doses mais baixas, levando até mesmo as células à apoptose (Anbumani e Mohankumar, 2012).

Outro motivo que deve ser levado em consideração para explicar os resultados obtidos é com relação à sensibilidade do *Centropomus parallelus*. O trabalho realizado por Rodriguez-Cea et al. (2003) com diferentes espécies de peixes, *Salmo trutta*, *Anguilla anguilla* e *Phoxinus phoxinus*, mostra que elas apresentam diferentes níveis de sensibilidade a este biomarcador, resultando em diferentes respostas. Com isso sua pesquisa em ecossistemas de água doce com diferentes níveis de poluição mostra que algumas espécies podem viver em locais poluídos e não apresentar maiores médias de micronúcleos do que aquelas que estão em sistemas limpos, assim como observado em nosso trabalho.

Barsiene et al. (2006) reforça esta idéia mostrando em seu trabalho diferenças inter-específicas e inter-tecidos nas respostas de peixes expostos ao petróleo bruto. Os eritrócitos maduros do sangue não são células em divisão e uma vez que o MN pode surgir após a divisão celular a realização deste teste no sague periférico, embora de baixo custo e de fácil análise, se apresenta desvantajosa ao apresentar uma baixa resposta à exposição de agentes genotóxicos (Barsiene, et al. 2006). Esta diferença inter-específica pode estar relacionada com a capacidade de cada espécie ciclar e eliminar suas células sanguíneas danificadas, não acumulando assim células micronúcleadas. E ainda não se sabe ao certo qual a proporção de eritroblastos danificados que poderão aparecer no sistema circulatório durante o tempo de exposição e nem qual o grau de reparo do DNA para cada espécie (Buschini et al., 2004). Alguns trabalhos mostram também que a utilização de células brânquiais na realização do teste do MN pode ser mais sensível (à indução de micronúcleo) do que a utilização de eritrócitos sanguíneos, pois as brânquias estão mais diretamente expostas ao contaminante (Çavas, 2008; Çavas e Ergene-Gözükara, 2003, 2005; Hayashi et al, 1998), ou até mesmo células renais, pois são responsáveis pela metabolização de xenobióticos (Al-Sabti e Metcalfe, 1995).

3.2 Ensaio Cometa

A análise do Índice de Danos no DNA (ID) não apresentou diferença significativa nos exemplares jovens de *C. parallelus* expostos a 10 e 20 ml/L de petróleo bruto, por 96 h, quando comparados ao grupo controle (Figura 2).

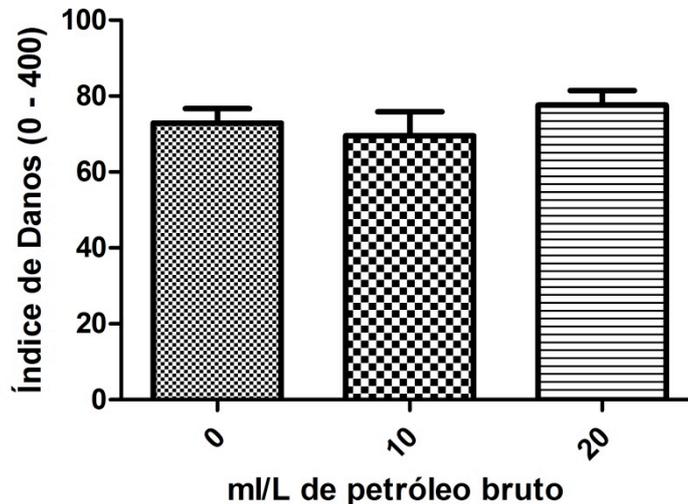


Figura 2. Índice de danos no DNA em *Centropomus parallelus* expostos a duas diferentes concentrações (10 e 20 ml/L) de petróleo bruto, por 96 h, acompanhado do grupo controle (sem contaminante). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média.

A análise de Índice de Danos no DNA em eritrócitos embora seja sensível para vários contaminantes e em diversas espécies (Aas et al., 2000; Negreiros et al., 2011; Taban et al., 2004) outros trabalhos, assim como o presente, não apresentaram alterações significativas. O trabalho realizado por Roy et al. (2003), não encontrou diferenças significativas com o teste cometa ao analisar eritrócitos sanguíneos de peixes expostos à frações de sedimento contaminado por hidrocarbonetos. Mas encontrou diferença significativa ao analisar o DNA de células hepáticas com o mesmo teste. Mostrando assim a maior sensibilidade do teste na utilização de células hepáticas, o que pode ser uma alternativa para avaliações como a deste trabalho (com baixas concentrações e com pouco tempo de exposição) uma vez que a análise dos eritrócitos sanguíneos não se mostrou sensível o suficiente, tornando-se assim inadequada.

A Distribuição de Danos no DNA em classes observados nos eritrócitos de *Centropomus parallelus* expostos às duas concentrações (10 e 20 ml/L) de petróleo bruto, por 96 h, não aumentou significativamente em nenhuma das classes de danos em relação ao grupo controle (Tabela 2). O que se observa na distribuição de danos por classes é um predomínio das classes 0 e 1 em todos os tratamentos, não havendo danos mais graves nos nucleóides dos exemplares jovens de *C. parallelus*, não modificando assim a porcentagem de células sem dano (classe 0) comparados ao controle.

Tabela 2. Distribuição das classes de danos no DNA encontrados nos eritrócitos de *Centropomus parallelus* expostos a duas concentrações (10 e 20 ml/L) de petróleo bruto, por 96 h, acompanhado do grupo controle (sem contaminante). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média.

	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Controle	39,36 \pm 2,68	49,50 \pm 3,05	10,05 \pm 2,03	1,09 \pm 0,58	0
10ml/L	41,86 \pm 3,72	48,71 \pm 3,50	7,50 \pm 2,24	1,93 \pm 1,49	0
20ml/L	37,04 \pm 3,70	50,59 \pm 5,17	10,09 \pm 1,59	2,27 \pm 1,23	0

Brown e Steinert (2003), também concluem que o sangue pode ter sido uma má escolha para avaliar os danos do DNA, uma vez que outros estudos encontraram uma boa resposta ao se avaliar os danos ao DNA nas células do fígado (Roy et al, 2003). Esta diferença pode estar relacionada com a maior facilidade que o sangue tem em ciclar suas células, diferentemente do fígado.

Além disso, possivelmente, a falta de diferença significativa no presente trabalho se deva à baixa concentração de contaminante utilizada ou ao curto período de exposição e, principalmente, à tolerância do organismo teste a este contaminante. Visto que ao se trabalhar com espécies mais sensíveis como é o caso do *Hippocampus reidi* observa-se resultados significativos mesmo durante exposições ao petróleo mais curtas (8h e 12h) (Negreiros et al., 2011; Delunardo, 2010) ou mesmo em baixa concentrações (10ml/L) como foi observado por Delunardo (2010).

3.3 Histopatologia Brânquial

As alterações mais freqüentes encontradas no experimento, foram as de estágio de severidade I, tais como hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, descolamento epitelial, proliferação de células de cloreto e de células mucosas e edema. Mas também se mostrou presente patologias de grau de severidade II, tal como fusão das lamelas e ruptura epitelial (hemorragia). Não foram encontradas alterações do estágio III nos animais testados. A freqüência e o tipo de alteração nas brânquias dos animais analisados estão representados pela Tabela 3.

Tabela 3. Freqüência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *Centropomus parallelus* expostos a duas diferentes concentrações (10 e 20 ml/L) de petróleo bruto por 96 h, acompanhado de grupo controle.

Alteração	Estágio	Controle	10	20
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	+	+	++
Hiperplasia do epitélio lamellar	I	0+	0+	++
Dilatação capilar	I	0	0	0+
Descolamento epitelial	I	+	0	0+
Proliferação de células cloreto	I	0+	+	++
Proliferação de células mucosas	I	0+	0	+
Edema	I	0+	0	+
Fusão das lamelas	II	0	0+	+
Aneurisma lamellar	II	0	+	0

0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente.

A análise histológica das brânquias de *C. parallelus* do experimento não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) no Cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA) dos grupos expostos em relação ao grupo controle (Figura 3A). Uma vez que a média dos valores de VMA ficou próxima de 1 e as lesões se mostraram pontualmente localizadas, com isso o órgão possivelmente apresentou funcionamento normal mesmo após a exposição ao contaminante testado.

Com relação ao índice de alteração histopatológica (IAH) das brânquias (Figura 3B) também não foi observada variação significativa entre as concentrações testadas no experimento. Mostrando que possivelmente o tempo de exposição se mostrou pequeno para provocar alterações histopatológicas nas brânquias dos animais avaliados.

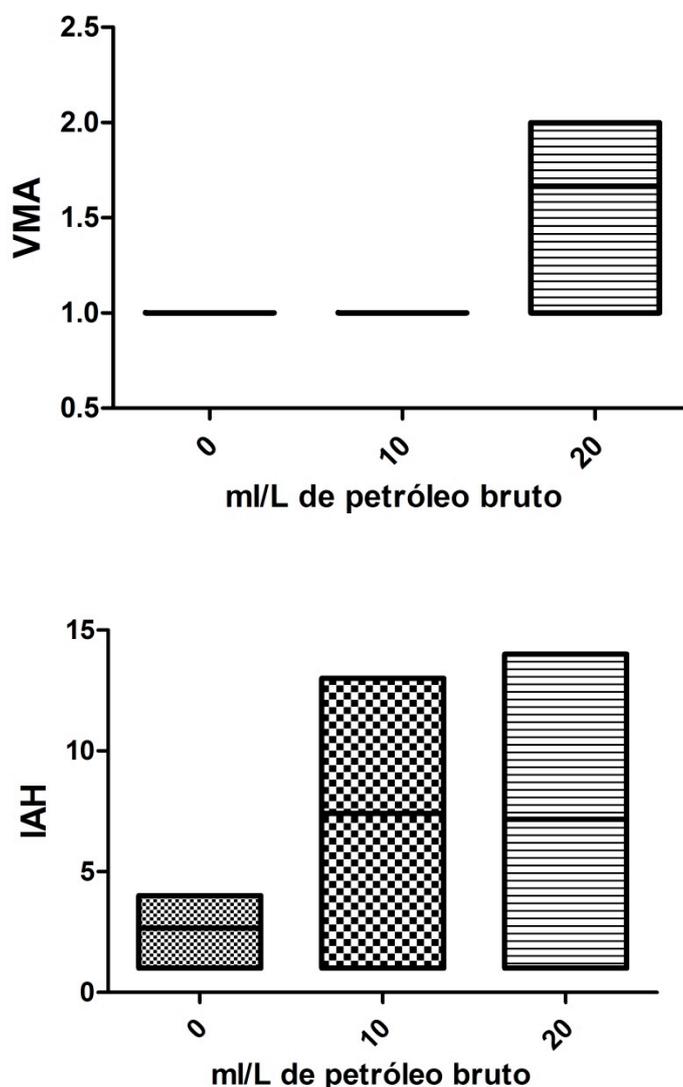


Figura 3. (A) Valor médio de alteração (VMA) e (B) Índice de alteração histopatológica (IAH) em brânquias de *Centropomus parallelus* expostos a duas diferentes concentrações (10 e 20 ml/L de petróleo bruto, por 96 h, acompanhado do grupo controle. Os dados estão expressos em mediana, com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%.

No presente estudo, os animais testados apresentaram hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar que são exemplos de mecanismos de defesas contra o agente tóxico, impedindo que o agente tóxico penetre no organismo (Paulino, 2011). Entretanto, esses mecanismos aumentam a distância água-

sangue e podem dificultar o funcionamento normal do órgão (Mallat, 1985; Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Fernandes e Mazon, 2003). A hiperplasia, em especial, tende a diminuir os espaços interlamelares, podendo levar à fusão parcial ou total das lamelas, na tentativa de reduzir o contato do epitélio branquial com o agente estressor (Paulino, 2011). Reduzindo assim a superfície respiratória, devido ao desaparecimento das lamelas (Rajbanshi e Gupta, 1988).

Este trabalho encontrou pouca fusão lamelar nas brânquias de *C. parallelus*, mas ela se mostrou frequentemente crescente de acordo com o aumento da concentração do contaminante utilizado (Tabela 3), assim como no trabalho de Abdel-Moneim et al. (2012), mostrando o trabalho de defesa do sistema circulatório em resposta à contaminação do poluente.

O trabalho de Onwumere e Oladimeji (1990), com efluente de uma refinaria de petróleo nas concentrações 20, 40, 60, 80, e 100%, por 96 h, mostra que a brânquia é o melhor órgão para avaliações histopatológicas quando comparada ao fígado e aos rins. Assim como os resultados do trabalho de Delunardo (2010) e Negreiros et al. (2011) também mostram que a exposição ao petróleo bruto, a uma concentração semelhante a testada no presente trabalho, não é suficiente para induzir modificações significativas no epitélio branquial. No entanto, estes resultados estão possivelmente relacionados com o período de exposição dos animais, que se revelou insuficiente para induzir a lesões mais graves, se tornando-se um fator limitante, o que indica que o desenvolvimento de tais lesões deve ocorrer em concentrações mais elevadas e após um período de exposição superior a 7 dias.

Camargo e Martinez (2007) mostram que a histopatologia pode ser um biomarcador muito apropriado quando se avalia conjuntamente diversos órgãos, confirmando que as alterações histopatológicas são bons biomarcadores para as avaliações em campo, em especial em áreas tropicais, que são naturalmente sujeitas a uma multiplicidade de variações ambientais. O trabalho enfatiza que a histopatologia é capaz de avaliar os efeitos precoces e as respostas à exposições crônicas a estressores químicos. Sendo assim, os resultados encontrados no presente trabalho

poderiam ser melhor avaliados conjuntamente com a histopatologia de outros órgãos e até mesmo com um maior tempo de exposição ao contaminante.

3.4 Células Cloreto (CC)

A densidade das células de cloreto (CC) no filamento e lamelas das brânquias de jovens de *C. parallelus* expostos ao petróleo bruto (10 e 20 ml/L) estão demonstradas na Tabela 4 e na Figura 4.

Tabela 4. Valores médios de Células de Cloreto (μm^2) no filamento (CCF) e nas lamelas (CCL) das brânquias de *Centropomus parallelus*, expostos a duas diferentes concentrações (10 e 20 ml/L) de petróleo bruto, por 96 h, acompanhado do grupo controle. *Indica diferença significativa em relação ao grupo controle (sem contaminante). Teste de Dunnet ($P < 0,05$). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média.

Tratamento	CCF	CCL
Controle	0,022 \pm 0,005	0,015 \pm 0,004
10ml/L	0,023 \pm 0,004	0,042 \pm 0,005*
20ml/L	0,024 \pm 0,002	0,029 \pm 0,006

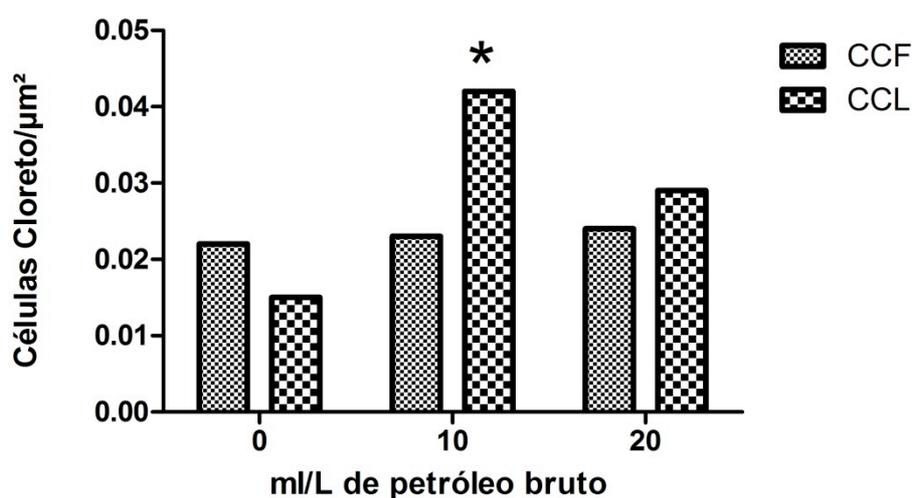


Figura 4. Densidade de Células de Cloreto no Filamento (CCF) e nas Lamelas (CCL) de *Centropomus parallelus* expostos a duas diferentes concentrações (10 e 20 ml/L) de petróleo bruto, por 96 h, acompanhado do grupo controle. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. *Indica diferença significativa em relação ao grupo controle (0%). Teste de Dunnet ($P < 0,05$).

O número de Células Cloreto na superfície do epitélio do filamento (CCF) não aumentou significativamente entre os grupos testados comparando-se com o grupo controle. Mas o número de Células Cloreto na superfície do epitélio da lamela (CCL) aumentou significativamente apenas no grupo exposto à concentração de 10ml/L em relação ao controle (sem contaminante) (Figura 5).

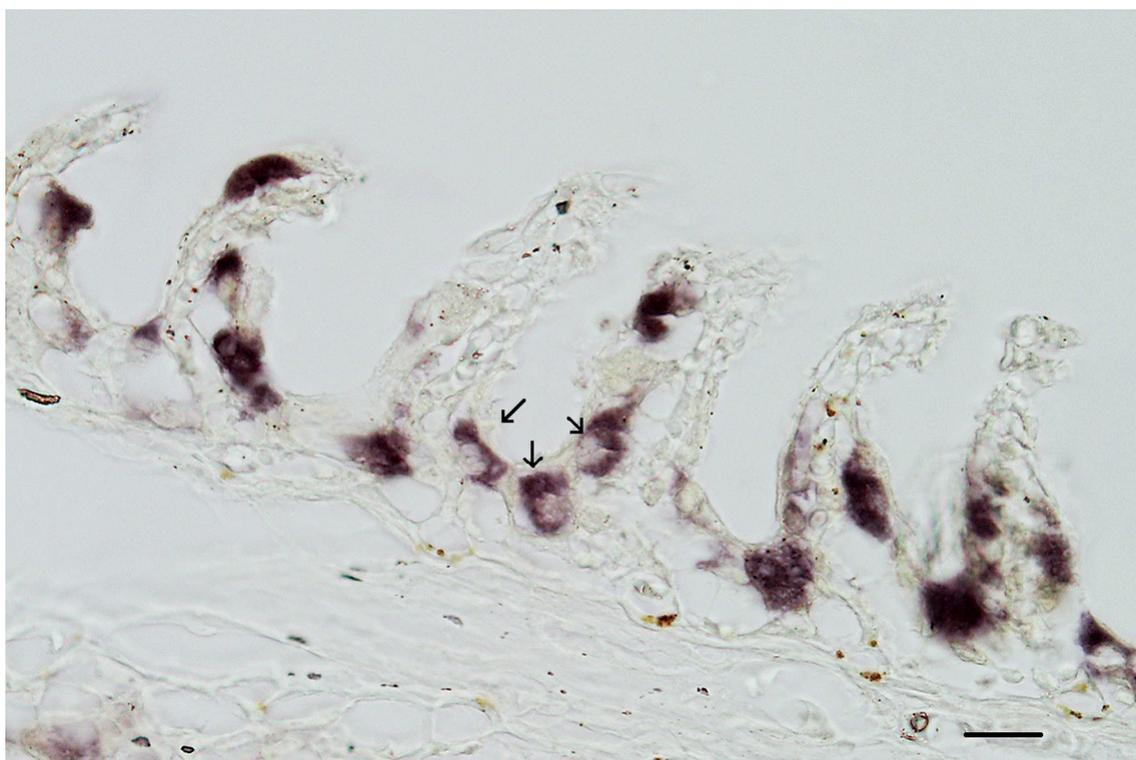


Figura 5. Células cloreto (↓) nos filamentos e lamelas de *Centropomus parallelus*. Barra de escala = 20 µm.

O número de CC está intimamente relacionado com a concentração dos íons na água, de forma a manter a homeostase iônica (Perry, 1997; Fernandes e Perna-Martins, 2002). Em águas duras e ricas em íons, as células-cloreto estão restritas à região interlamelar do epitélio do filamento e na borda do filamento próximo à região basal das lamelas (Perry, 1997). A presença de xenobióticos na água pode alterar a densidade das CCs e interferir na sua função. No presente estudo, o número de CC tendeu a aumentar nas lamelas branquiais em relação ao filamento dos peixes expostos ao petróleo bruto. Alteração desse tipo ocorre em respostas

compensatórias na troca iônica para manter ou restaurar o balanço hidroeletrólítico (Van Der Heuvel et al., 2000; Dang et al., 2000).

Visto que os agentes tóxicos são os principais intervenientes na manutenção do equilíbrio iônico nos peixes (Perry, 1997), eles podem então ser considerados responsáveis pela proliferação de células de cloreto, conseqüentemente esta resposta pode ser usada como uma resposta de stress em geral em peixes expostos a várias classes de agentes tóxicos (Oronsaye e Brafield, 1984; Van Den Heuvel et al., 2000)

No entanto, existe uma grande diversidade a respeito do número de CC branquiais em peixes teleósteos. Já foi mostrado por Mazon et al. (2002) e Camargo et al. (2009), que a presença de CC nas lamelas é característica de cada espécie. A quantidade de íons presentes na água e a eficiência iônica e osmoregulatória da espécie pode determinar a localização e densidade das CCs, na maioria dos teleósteos (Moron et al., 2003). Portanto o presente estudo precisa ser comparado com trabalhos realizados com esta espécie, que são bem raros até o presente momento, e também mais análises devem ser feitas para entender melhor o processo de exposição e efeito do contaminante.

4. CONCLUSÃO

- A concentração e o tempo testados foram insuficientes para causarem danos significativos nestes animais.
- Os exemplares de *Centropomus parallelus* são moderadamente tolerantes a este contaminante.

REFERÊNCIAS

- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., Andersen, O.K., 2000. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adduct as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology*. 51, 241-258.
- Abdel-Moneim, A.M., Al-Kahtani, M.A., Elmenshawy, O.M., 2012. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia *Chemosphere*. 88, 1028-1035.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*. 343, 121-135.
- Anbumani, S., Mohankumar, M.N., 2012. Gamma radiation induced micronuclei and erythrocyte cellular abnormalities in the fish *Catla catla*. *Aquatic Toxicology*. 122– 123, 125-132.
- Andrade, V., Freitas, T.R.O., Silva, J. 2004. Comet assay using mullet (*Mugil sp*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research*. 560, 57-67.
- Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*. 48, 817-834.
- Ayas, Z., Ekmekci, G., Ozmen, M., Yerli, S.V., 2007. Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir. Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 23, 242-249.
- Barsiene, J., Dedonyte, V., Rybakovas, A., Andreikenaite, L., Andersen, O.K., 2006. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquatic Toxicology*. 78, 99-104.
- Bopp, K.S., Abicht, H.K., Knauer, K., 2008. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquatic Toxicology*. 86, 197-204.
- Brown, J.S., Steinert, S.A., 2003. DNA damage and biliary PAH metabolites in flatfish from Southern California bays and harbors, and the Channel Islands. *Ecological Indicators*. 3, 263-274.
- Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dorr, A.J.M., Rizzoni, M., 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research*. 557, 119-129.
- Camargo, M.M.P., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquatic Toxicology*. 94, 40-46.

Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*. 5, 327-336.

Çavas, T., 2008. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 352-358.

Çavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in exposed to textile mill effluent. *Mutation Research*. 538, 81-91.

Çavas, T., Ergene-Gözükara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic toxicology*. 74, 264-271.

Dang, Z.R.A.C., Lock, G.F., Wendelaar Bonga, S. E., 2000. Na⁺/K⁺ - ATPase Immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *The Journal of Experimental Biology*. 203, 379-387.

Das, R. K., Nanda, N. K., 1986. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutation Research*. 175, 67-71.

Delunardo, F.A.C., 2010. Danos genotóxicos, mutagênicos e morfológicos em *Hippocampus reidi* (Ginsburg, 1933) exposto ao petróleo. Dissertação de Mestrado. Centro Universitário Vila Velha. 78p.

Fernandes, M.N., Mazon, A.F., 2003. Environmental Pollution and Fish Gill Morphology, In Val. A. L., Kapoor, B. G. (Eds.), *Fish Adaptations Science Publishers, Inc. Enfield, USA*, 203-231.

Fernandes, M.N., Perna-Martins, S.A., 2002. Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the Gill of the armored catfish, *Hypostomus tietensis* (Loricariidae). *Acta Zoologica*. 83, 321-328.

Grazeffe, V.S., Tallarico, L.F., Pinheiro, A.S., Kawano, T., Suzuki, M.F., Okazaki, K., Pereira, C.A., Nakano, E., 2008. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Research*. 654, 58-63.

Grisolia, C. K., Oliveira, A. B. B. D., Bonfim, H., Klautau-Guimarães, M. D. N., 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 334–338.

Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofuni, T., Ojima, Y., 1998.

Development of genotoxicity assays systems that use aquatic organisms. *Mutation Research*. 399, 125–133.

Heuser, V.D., De Andrade, V.M., Peres, A., Gomes de Macedo Braga, L.M., Bogo Chies, J.A., 2008. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biology International*. 32, 1223-1229.

Hughes, C.M., 1984. General anatomy of the gills. In: Hoar, R.D.J., Marshal, W.S. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, New York. pp. 1–72.

Kirschbaum, A. A., Seriani, R., Pereira, C.D.S., Assunção, A., Abessa, S.D.M., Rotundo, M.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2009. Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 32, 151-154.

Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 42, 630-648.

Manna, G. K., Banerjee, G., Gupta, S., 1985. Micronucleus test in the peripheral erythrocytes of the exotic fish, *Oreochromis mossambica*. *The Nucleus*. 28, 176-179.

Mazon, A.F., Monteiro, E.A.S., Pinheiro, G.H.D., Fernandes, M.N., 2002. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Biology*. 62, 621–631.

Mcauliffe, C.D., 1987. Organism exposure to volatile/soluble hydrocarbons from crude oil spills - a field and laboratory comparison. In: *Oil Spill Conference*. American Petroleum Industry, Washington, DC. pp. 357–363.

Moron, S.E., Oba, E.T., Andrade, C.A., Fernandes, M.N., 2003. Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the Erythrinids *Hoplias malabaricus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus*. *Journal of Experimental Zoology*. 298, 93-104.

National Research Council., 2003. *Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects*. The National Academies Press. Washington, DC.

Negreiros, L.A., Silva, B.F., Paulino, M.G. 2011. Effects of hypoxia and petroleum on the genotoxic and morphological parameters of *Hippocampus reidi*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 153, 408–414.

Onwumere, B.G., Oladimeji, A.A., 1990. Accumulation of Metals and Histopathology in *Oreochromis niloticus* Exposed to Treated NNPC Kaduna (Nigeria) Petroleum Refinery Effluent. *Ecotoxicology And Environmental Safety*. 19,123- 134.

Oronsaye, J.A.O., Brafield, A.E., 1984. The effect of dissolved cadmium on the chloride cells of the gills of the stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Fish Biology*. 25, 253–258.

Paulino, M.G., 2011. Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleosteo, *Prochilodontidae*). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. p118.

Perry, S.F., 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annual Review of Physiology*. 59, 325–47.

Perry, S.F., Laurent, P., 1993. Environmental effects on fish gill structure and function. In: Rankim, J.C., Jensen, F.B. (Eds.), *Fish Ecophysiology*. Chapman and Hall. pp. 231–264.

Playle, R.C., Gensemer, R.W., Dixon, D.G., 1992. Copper accumulation on gills of fathead minnows: influence of water hardness, complexation and pH of the gill micro-environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 11, 381–391.

Poleksic, V., V. Mitrovic-Tutundzic., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R., R. Lloyd (Eds.). *Sublethal and Chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Oxford, Fishing News Books. pp. 339-352.

Rajbanshi, V.K.; Gupta, A.K., 1988. Alterations in the architecture of gill surface produced by water-borne copper in *Hepteteroneusters fossilis* (Bloch). *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*. 16, 325-332.

Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56, 442-448.

Roy, L.A., Steinert, S., Bay, S. M., Greenstein, D., Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., Leifer, I., Schlenk, D., 2003. Biochemical effects of petroleum exposure in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediments collected from a natural petroleum seep in CA, USA. *Aquatic Toxicology*. 65, 159-169.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Tribskorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6, 75–86.

Taban, I.C., Bechmann, R.K., Torgrimsen, S., Baussant, T., Sanni, S., 2004. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Marine Environmental Research*. 58, 701–705.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single

cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35, 206-21.

Van Der Heuvel. M.R.; Power, M.; Richards, J.; Mackinnon, M., Dixon, D.G., 2000. Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining associated waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 46, 334 – 341.

Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species, *Mutation Research*. 631, 36-43.

Winkaler, E.U., Thiago, R.M., Santos, T.R.U., Joaquim, G., Machadoneto, J.G., Martinez, C.B.R., 2007. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 145, 236-244.

Yasser, A.Gh., Naser, M.D., 2011. Impact of pollutants on fish collected from different parts of Shatt Al-Arab River: a histopathological study. *Environmental Monitoring and Assessment*. 181, 175–182.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Exemplares juvenis de *Centropomus parallelus* apresentam respostas genotóxicas e histopatológicas em presença de FSP.
- O aumento no tempo de exposição a FSP agrava os danos genotóxicos e histopatológicos.
- A recuperação de 7 dias não é suficiente para restaurar todas as alterações observadas na exposição de 7 dias a 50% da FSP.
- Alterações genotóxicas e histopatológicas foram pouco observadas em exemplares de porte maior de *C. parallelus* expostos a concentração de 10 e 20 ml/L de petróleo bruto, por 96 h.
- Exemplares jovens de *C. parallelus* são menos sensíveis que os juvenis, visto que não foram observadas alterações significativas em níveis genotóxicos e histopatológicos.
- Exemplares juvenis de *C. parallelus* podem ser considerados bioindicadores de contaminação por FSP em virtude de suas respostas genotóxicas e histopatológicas e em virtude de sua ampla distribuição, podendo ocorrer em ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos.