



CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA  
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM ECOLOGIA DE ECOSSISTEMAS

**EFEITOS TÓXICOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL EM  
CAVALO-MARINHO, *Hippocampus reidi*,  
E CURIMATÃ, *Prochilodus vimboides*,  
DURANTE EXPOSIÇÃO AGUDA**

CELINA ALCOFORADO DOS SANTOS

ORIENTADOR: PROF. DR. LEVY DE CARVALHO GOMES

VILA VELHA – ES

2010

CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA  
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM ECOLOGIA DE ECOSSISTEMAS

**EFEITOS TÓXICOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL EM  
CAVALO-MARINHO, *Hippocampus reidi*, E CURIMATÃ, *Prochilodus  
vimboides* DURANTE EXPOSIÇÃO AGUDA**

CELINA ALCOFORADO DOS SANTOS

ORIENTADOR: PROF. DR. LEVY DE CARVALHO GOMES

Dissertação apresentada ao Centro  
Universitário Vila Velha, como pré-  
requisito do Programa de Pós-  
Graduação em Ecologia de  
Ecosistemas, para obtenção do título  
de Mestre em Ecologia.

VILA VELHA – ES

2010

*Viver e não ter a vergonha de ser feliz. Cantar e cantar e cantar a beleza de ser um eterno aprendiz...*

*Eu sei que a vida devia ser bem melhor, e será. Mas isso não impede que eu repita: é bonita, é bonita e é bonita...*

*(Gonzaguinha)*

## AGRADECIMENTOS

A minha querida família. Pai, Mãe, Ericão, Line, Natan e cunhados... A vocês, principalmente, pelo amor incondicional demonstrado nos gestos, nas palavras e na torcida do dia-a-dia. Meus amores, minha vida! Não conseguiria cumprir mais esta etapa se não fossem vocês! Valeu.

Ao tio Jair a quem não pude dizer “tchau” por estar envolvida com o experimento no laboratório.

Ao professor Levy de Carvalho Gomes por me orientar com muita paciência, acreditar neste trabalho e me fazer enxergar o quanto é importante perseverar e romper certos paradigmas quando se quer obter algo. Abraço, Levy!

Aos membros da banca, Cláudia Bueno dos Reis Martinez e Dominik Lenz, que dispuseram de tempo e atenção ao meu trabalho e, sem dúvida, me acrescentaram muito conhecimento.

Ao Centro Universitário Vila Velha pela concessão da bolsa de estudos durante o Mestrado.

A todos os professores, em especial, Paulo Ferreira, pela idéia inicial de trabalhar com óleo diesel; Werter Kroling, por auxiliar no processo de concessão da bolsa de estudos, a Adriana Chippari, pelas muitas conversas sobre Ecotoxicologia, a Denise Endringer e Dominik Lenz pela parceria com o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e a Zilma Cruz pelo apoio.

A todos os amigos do Mestrado, em especial, a Adriana Canal, Larissa Simões, Bruno Silva, Frederico Delunardo, Frederico Eutrópio, Ederaldo Fleger, Bruno de Laquila e ao Amilton Hansen. Sem palavras...

A todos do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática que contribuíram se não com trabalho, com boas risadas na hora do aperto: às duplas Luciano e Michel, Juliana e Lorraine, Antônio e Edgar, à tríade Camilinha, Gigi e Alê e também a Renatinha.

Aos funcionários do Complexo Biopráticas que se mostraram muito disponíveis: Raissa (Química), Paulo Roberto (Microbiologia), Cláudia Macaúba (Coordenação de Apoio) e Dona Maria Oliveira (Limpeza).

À professora Geisamanda Pedrini do Laboratório da Petrobrás, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), pelas análises de metais.

A Vitório Correa da Escola Agrotécnica Federal de Colatina (EAFCOL), pela doação dos peixes.

## LISTA DE FIGURAS

### EFEITOS GENOTÓXICOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DE ÓLEO DIESEL EM CAVALO-MARINHO, *HIPPOCAMPUS REIDI*, DURANTE EXPOSIÇÃO AGUDA

Figura 1. Índice de danos no DNA (ID) de *Hippocampus reidi* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h..... 31

### BIOMARCADORES EM CURIMATÃ, *PROCHILODUS VIMBOIDES*, EXPOSTOS À FRAÇÃO SOLÚVEL DE ÓLEO DIESEL

Figura 1. Índice de danos no DNA (ID) de *Prochilodus vimboides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h..... 50

Figura 2. Área do nucleóide (Pixels) de *Prochilodus vimboides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) a fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h..... 51

Figura 3. Análise de regressão linear entre o índice de danos do DNA (ID) por microscópio óptico e área do nucleóide (Pixels) por citometria de imagens de *Prochilodus vimboides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h..... 52

Figura 4. Enzima Aspartato aminotransferase (U RF/mL) em plasma de *Prochilodus vimboides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h..... 54

Figura 5. Enzima Alanina aminotransferase(U RF/mL) em plasma de *Prochilodus vimboides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h..... 55

Figura 6. Concentração de cobre na brânquia (Sulfato de cobre,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) de *Prochilodus vimboides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h..... 56

## LISTA DE TABELAS

### EFEITOS GENOTÓXICOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DE ÓLEO DIESEL EM CAVALO-MARINHO, *HIPPOCAMPUS REIDI*, DURANTE EXPOSIÇÃO AGUDA

Tabela 1. Frequência de danos (%) nos eritrócitos de *Hippocampus reidi* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h..... 30

Tabela 2. Micronúcleos nos eritrócitos ( $^{0}/_{00}$ ) de *Hippocampus reidi* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h..... 32

### BIOMARCADORES EM CURIMATÃ, *PROCHILODUS VIMBOIDES*, EXPOSTOS À FRAÇÃO SOLÚVEL DE ÓLEO DIESEL

Tabela 1. Frequência de danos (%) nos eritrócitos de *Prochilodus vimboides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h..... 49

Tabela 2. Micronúcleos nos eritrócitos ( $^{0}/_{00}$ ) de *Prochilodus vimboides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h..... 53

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	9
I INTRODUÇÃO GERAL.....	10
1 POLUIÇÃO HÍDRICA.....	10
2 ACIDENTES EM AMBIENTES AQUÁTICOS.....	10
3 PETRÓLEO E DERIVADOS.....	11
3.1 ÓLEO DIESEL.....	12
4 ECOTOXICOLOGIA E TESTES DE TOXICIDADE.....	12
5 BIOINDICADORES E BIOMARCADORES.....	13
6 BIOMARCADORES ESTUDADOS.....	14
7 USO DE PEIXES NO MONITORAMENTO AMBIENTAL.....	16
8 ORGANISMOS-TESTE.....	16
Ia REFERÊNCIAS.....	18
Ib HIPÓTESE.....	22
II EFEITOS GENOTÓXICOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DE ÓLEO DIESEL EM CAVALO-MARINHO, <i>HIPPOCAMPUS REIDI</i> , DURANTE EXPOSIÇÃO AGUDA.....	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
1 INTRODUÇÃO.....	25
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1 ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO.....	26
2.2 PREPARO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL.....	27
2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	27
2.4 EFEITOS GENOTÓXICOS.....	28
2.4.1 ENSAIO COMETA.....	28
2.4.2 TESTE MICRONÚCLEO.....	29
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
3 RESULTADOS.....	30
3.1 EFEITOS GENOTÓXICOS.....	30
3.1.1 ENSAIO COMETA.....	30
3.1.2 TESTE MICRONÚCLEO.....	31
4 DISCUSSÃO.....	32
4.1 EFEITOS GENOTÓXICOS.....	32
4.1.1 ENSAIO COMETA.....	33
4.1.2 TESTE MICRONÚCLEO.....	34
5 CONCLUSÃO.....	34
6 REFERÊNCIAS.....	35
III BIOMARCADORES EM CURIMATÃ, <i>PROCHILODUS VIMBOIDES</i> , EXPOSTOS À FRAÇÃO SOLÚVEL DE ÓLEO DIESEL.....	39
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	40
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO.....	43
2.2 PREPARO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL.....	44

2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	44
2.4 EFEITOS GENOTÓXICOS.....	45
2.4.1 ENSAIO COMETA.....	45
2.4.2 CITOMETRIA DE IMAGEM.....	46
2.4.3 TESTE MICRONÚCLEO.....	47
2.5 EFEITOS BIOQUÍMICOS.....	47
2.5.1 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE E ALANINA AMINOTRANSFERASE (AST E ALT).....	47
2.6 FEITOS FISIOLÓGICOS.....	47
2.6.1 BIOACUMULAÇÃO DE COBRE.....	47
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
3 RESULTADOS.....	48
3.1 EFEITOS GENOTÓXICOS.....	48
3.1.1 ENSAIO COMETA.....	48
3.1.2 CITOMETRIA DE IMAGEM.....	50
3.1.3 TESTE MICRONÚCLEO.....	52
3.2 EFEITOS BIOQUÍMICOS.....	53
3.2.1 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE E ALANINA AMINOTRANSFERASE (AST E ALT).....	53
3.3 EFEITOS FISIOLÓGICOS.....	55
3.3.1 BIOACUMULAÇÃO DE COBRE.....	55
4 DISCUSSÃO.....	56
4.1 EFEITOS GENOTÓXICOS.....	56
4.1.1 ENSAIO COMETA.....	56
4.1.2 CITOMETRIA DE IMAGEM.....	58
4.1.2 TESTE MICRONÚCLEO.....	59
4.2 EFEITOS BIOQUÍMICOS.....	61
4.2.1 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE E ALANINA AMINOTRANSFERASE (AST E ALT).....	61
4.3 EFEITOS FISIOLÓGICOS.....	62
4.3.1 BIOACUMULAÇÃO DE COBRE.....	62
5 CONCLUSÃO.....	63
6 REFERENCIAS.....	64
 IV CONCLUSÃO GERAL.....	 71
 ANEXO 1: AQUISIÇÃO DO ÓLEO DIESEL E PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DE ÓLEO DIESEL (FSOD).....	 72
 ANEXO 2: APARELHOS, PROCEDIMENTOS E TESTES APLICADOS.....	 74
 ANEXO 3: ORGANISMOS-TESTE CAVALO-MARINHO, <i>HIPPOCAMPUS REIDI</i> E <i>CURIMATÃ</i> , <i>PROCHILODUS VIMBOIDES</i> .....	 77



## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é constituída pelos seguintes capítulos: (I) Introdução Geral; (II) Efeitos genotóxicos da fração solúvel de óleo diesel em cavalo-marinho, *Hippocampus reidi*, durante exposição aguda; (III) Biomarcadores em curimatã, *Prochilodus vimboides*, expostos à fração solúvel de óleo diesel e (IV) Conclusão Geral.

No primeiro capítulo foi realizada uma revisão de literatura abordando os principais assuntos discutidos nesta dissertação.

O segundo capítulo refere-se aos efeitos da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) em cavalo-marinho, *Hippocampus reidi*, em exposição aguda, justificando-se pela relevância biológica e ornamental de tal espécie. Neste trabalho foram avaliados os efeitos genotóxicos por meio do ensaio cometa e teste micronúcleo. Este capítulo foi submetido para publicação no periódico Neotropical Ichthyology (fator de impacto: 0,856).

O terceiro capítulo refere-se aos biomarcadores em curimatã, *Prochilodus vimboides*, expostos à fração solúvel de óleo diesel. Neste trabalho foram avaliadas: 1) alterações genotóxicas, pelo ensaio cometa e teste micronúcleo; 2) bioquímicas, pela análise de enzimas Aspartato amiotransferase e Alanina aminotransferase (AST e ALT, respectivamente); e 3) de bioacumulação, pela análise de cobre nas brânquias. Esta espécie foi escolhida por ser representativa de diversas bacias hidrográficas do Brasil, ser reconhecidamente um bom indicador de poluição (Gomes et al., 2009) e ser consumida pela população brasileira.

Na conclusão geral foi realizado o fechamento da dissertação, com as principais conclusões obtidas nos trabalhos experimentais.

---

Gomes, L. C., Chippari-Gomes, A. R., Oss, R. N., Fernandes, L. F. L., Magris, R. A., 2009. Acute toxicity of copper and cadmium for piaçu, *Leporinus macrocephalus*, and curimatã, *Prochilodus vimboides*. Acta Sci., Biol. Sci. (Online). 31, 313 - 315.

# I INTRODUÇÃO GERAL

## 1 POLUIÇÃO HÍDRICA

Uma vez que cursos hídricos constituem fontes para uso humano, eles também são o destinatário de grandes quantidades de resíduos (Glover e Smith, 2003). Desta forma, a biota aquática está sujeita e exposta a uma infinidade de substâncias tóxicas, lançadas no meio ambiente, vindas de diversas fontes de emissão, seja de efluentes industriais, processos de drenagem agrícola e esgotos domésticos (Van der Oost et al., 2003). A origem da poluição hídrica também pode estar associada ao derramamento de produtos químicos (Glover e Smith, 2003) e, nestes casos, são conhecidos prejuízos econômicos adicionais.

Ohe et al. (2004) revisaram a qualidade da água em uma série de bioensaios, e demonstraram que alguns rios no mundo, em especial na Europa, Ásia e América do Sul estão contaminados. Estas fontes de contaminação ou eram parcialmente tratadas ou não, devendo-se em especial às descargas de indústrias químicas e refinarias de petróleo. O estudo demonstrou que estas misturas ambientais continham substâncias tóxicas com potencial carcinogênico. Como a gestão dos recursos hídricos tem sido desorganizada em muitos países, tanto pela falta de consciência pública quanto pela baixa fiscalização para promover a proteção do ambiente hídrico (Ma et al., 2009), permanecem algumas questões como a vulnerabilidade da biota aos contaminantes e que classes de contaminantes são mais prováveis para causar impactos.

## 2 ACIDENTES EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Acidentes em ambientes aquáticos são comuns, por exemplo em 2000, de acordo com dados noticiados pela imprensa, um problema advindo das tubulações da Refinaria Duque de Caxias (Reduc), ocasionou o lançamento de aproximadamente 1,3 milhões de litros de óleo cru na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil. A mancha de óleo se estendeu por uma faixa superior a 50 quilômetros quadrados, atingindo o manguezal da área de proteção ambiental (APA) de Guapimirim, praias banhadas pela Baía de Guanabara, inúmeras espécies da fauna e flora, além de provocar graves prejuízos de ordem social e econômica à população.

Em 2001, constatou-se um importante derramamento de petróleo em ecossistema de água doce. Cerca de 50.000 L de petróleo bruto vazaram acidentalmente no Rio Barigui, sul do Paraná, Brasil (Akaishi et al., 2004). Em 2008, também de acordo com dados noticiados pela imprensa, cerca de 100 litros de óleo foram derramados no Rio Doce, Espírito Santo, Brasil. Embora estes tipos de derrames sejam divulgados nos meios de comunicação social, acredita-se que a principal fonte de petróleo e derivados que causam a contaminação das águas são pequenos e contínuos vazamentos de tanques, atingindo águas subterrâneas e, posteriormente, os rios (Vanzella et al., 2007).

### 3 PETRÓLEO E DERIVADOS

Produtos derivados do petróleo são compostos por hidrocarbonetos de cadeias químicas longas e curtas. As cadeias curtas são voláteis, mantendo-se menos tempo no ambiente aquático, entretanto, têm um alto potencial tóxico para a biota. A fração solúvel de petróleo bruto e de seus derivados contem uma mistura de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), fenóis e compostos heterocíclicos de nitrogênio e enxofre (Saeed e Mutairi, 1999).

A exposição aos HPAs pode causar inibição da atividade colinesterásica levando a alterações em respostas motoras, formação de aductos de DNA, pré-neoplasias e neoplasias hepáticas, alterações no epitélio branquial e lesões em outros tecidos como rins e baço. Entre os efeitos descritos no tecido hepático pode-se incluir fibrose, infiltração leucocitária, necrose, neoplasias e lipidoses (Akaishi et al., 2004).

Como os compostos mais tóxicos são também os mais voláteis, o peixe pode rapidamente absorvê-los com consequências adversas para organização biológica. Outro importante aspecto toxicológico da fração solúvel é seu potencial carcinogênico (Khan et al., 1995). A exposição ao petróleo bruto e aos derivados pode induzir uma variedade de sintomas tóxicos em animais experimentais, podendo agir como mediadores na geração de radicais livres em peixes (Achuba e Osakwe, 2003).

### 3.1 ÓLEO DIESEL

Define-se óleo diesel como sendo uma mistura de hidrocarbonetos constituída por frações com ponto de ebulição superior ao do querosene e inferior ao dos lubrificantes, que corresponde aos destilados intermediários do petróleo e cuja faixa de destilação se situa, aproximadamente, entre 190 e 380 °C (Vieira et al., 2007).

Do ponto de vista químico, o óleo diesel é constituído basicamente de hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos, naftênicos e aromáticos, em menores quantidades, moléculas de enxofre, nitrogênio, metais e oxigênio. A fração aromática contém hidrocarbonetos alquilados de um ou dois anéis conjugados até os policíclos aromáticos (HPAs). Estes são compostos por moléculas de oito a quarenta átomos de carbono, normalmente possuem maior peso molecular e são menos voláteis que a gasolina (Vieira et al., 2007).

Tanto o petróleo como seus derivados quando despejados na água espalham-se rapidamente, cobrindo grandes áreas com uma camada de óleo que pode variar em espessura. Tais poluentes submergem e se dissolvem facilmente na superfície e na coluna d'água e, pela ação das ondas e correntes, água e óleo se misturam produzindo uma emulsão. Os movimentos de óleo na superfície da água por dissolução e emulsão expõem moléculas e partículas do óleo aos organismos aquáticos (Albers, 2002). A toxicidade do petróleo é, portanto, em sua maioria, atribuída à parte solúvel. Esta fração solúvel possui os HPAs, compostos polares de baixo peso molecular e relevantes pelos danos que podem causar à biota (Pacheco e Santos, 2001).

## 4 ECOTOXICOLOGIA E TESTES DE TOXICIDADE

Ecotoxicologia é ciência que tem como princípio básico o estudo dos efeitos dos agentes físicos, químicos e biológicos sobre os organismos vivos no ecossistema, incluindo as formas de transporte, distribuição, transformação, interação e destino final desses agentes (Walker et al., 1996). Os testes de toxicidade desempenham um papel crucial no estudo do impacto causado por substâncias químicas no ambiente natural.

As agências de controle ambiental do mundo, *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) e a *Environment Canadá*, não só adotam os ensaios toxicológicos no monitoramento da qualidade ambiental, como utilizam os mesmos como ferramentas de

gestão do potencial impactante de atividades antrópicas. Tais agências criaram protocolos de realização dos principais testes de toxicidade, que são adotados pela maioria dos laboratórios que conduzem experimentos toxicológicos no mundo. Isso levou a uma padronização de metodologias. Normas para realização de testes de toxicidade com organismos de ambiente marinho e dulcícola têm sido implementadas internacionalmente.

No Brasil, a aplicação desses testes já é uma realidade e a normatização vem sendo realizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Alguns testes já foram padronizados pela ABNT, dos quais podem ser citados: ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea) pela norma brasileira (NBR) 12713/93; ensaio de toxicidade aguda com peixes em sistema estático e semi-estático pela NBR 12714/93 e NBR 12715/93, respectivamente; e avaliação de toxicidade crônica, utilizando *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 (Cladocera, Crustacea) pela NBR 13373/95. Além disso, a resolução CONAMA nº 357 (Brasil, 2005) preconiza testes de toxicidade para monitoramento dos corpos d'água.

## 5 BIOINDICADORES E BIOMARCADORES

Segundo Van Gestel e Van Brummelen (1996), bioindicador é o organismo que fornece informações sobre as condições de seu hábitat por sua presença ou ausência e, ainda pelo seu comportamento. Adams (2002) define bioindicadores como uma espécie capaz de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em diferentes níveis de organização biológica.

Pode-se atribuir o nome de biomarcadores aos parâmetros que expressam qualquer alteração biológica relacionada à presença de um composto químico no ambiente medida dentro do organismo ou em seus produtos (DNA, enzimas), que indica uma mudança comparada ao estado normal e que não pode ser detectada no organismo intacto (Van Gestel e Van Brummelen, 1996). Adams (2002) define ainda biomarcadores como alterações biológicas que expressam a exposição e/ou efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente.

Biomarcadores representam qualquer alteração bioquímica, fisiológica e comportamental que podem modificar o bem-estar de um organismo. Dessa forma, vários componentes moleculares e celulares em diferentes espécies de peixes têm sido utilizados como

biomarcadores de exposição e efeito, incluindo os bioquímicos, parâmetros imunológicos e genéticos (Van der Oost et al., 2003).

A este respeito, a caracterização das respostas biológicas aos poluentes em bioindicadores se tornou uma questão importante no monitoramento da qualidade ambiental e na avaliação de riscos. Entre as numerosas respostas biológicas, aquelas baseadas em variações no nível celular e molecular representam os primeiros sinais de perturbação ambiental e têm sido aplicadas em estudos ecotoxicológicos (Bombail et al., 2001). Ainda que biomarcadores individuais possam não refletir de forma abrangente o comprometimento das condições de saúde do organismo, o uso de uma série de biomarcadores é recomendado para se avaliar o impacto dos poluentes químicos. Portanto, a utilização simultânea de vários biomarcadores é importante para minimizar a má interpretação em casos de situações complexas de poluição (Flammarion et al., 2002).

## 6 BIOMARCADORES ESTUDADOS

O ensaio cometa mensura quebras primárias na fita de DNA em células individuais, não dependendo de características cromossômicas e de divisão celular (Singh et al., 1988). Neste ensaio, células são suspensas em agarose de baixo ponto de fusão sobre uma lâmina de vidro para microscopia. As lâminas são colocadas em eletroforese. Durante este procedimento, os fragmentos de DNA migram para além do corpo nuclear e formam um cometa com cauda (Pandurangi et al., 1995). Esta cauda, dependendo do tamanho, representa diferentes classes de danos. Vários autores utilizam o teste cometa objetivando monitorar a genotoxicidade associada à poluição dos rios e mares (Lee e Steinert, 2003; Jha, 2008), principalmente por ser considerado um método sensível, rápido e econômico (Lemos et al., 2005; Moller, 2006).

O teste micronúcleo serve como o primeiro passo no estudo de qualquer substância mutagênica. É um teste rápido e de sensível indicação, tanto para detectar alterações cromossômicas estruturais como numéricas (Heddle et al., 1983). Os micronúcleos são massas de cromatina citoplasmática com a aparência de pequenos núcleos que surgem da condensação de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos acêntricos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal, perdidos na anáfase. Os micronúcleos têm origem espontânea, mas sua indução é normalmente usada na detecção de danos

resultantes da ação de agentes mutagênicos. Assim, a visualização de um micronúcleo se dá após um ciclo de divisão celular e a frequência de micronúcleo dentro de uma população celular é dependente da cinética da divisão celular (Heddle et al., 1983).

Um dos métodos utilizados para detectar os efeitos de contaminantes em um sistema vivo é através do monitoramento das atividades enzimáticas. Dentre as enzimas, avaliou-se a Aspartato aminotransferase e a alanina aminotransferase (AST e ALT). A ASP é encontrada em concentração muito alta no músculo cardíaco, no fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas. A ALT é encontrada predominantemente no fígado, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e nos músculos esqueléticos. Qualquer lesão (injúria) tissular ou hepatocelular de qualquer etiologia ou doença afetando o parênquima hepático (ou uma lesão tecidual nos rins, coração e nos músculos esqueléticos) liberará uma maior quantidade destas enzimas para a corrente sangüínea, elevando os níveis séricos das AST e ALT. Assim, do ponto de vista ecotoxicológico, estas enzimas podem ser usadas como biomarcadores de exposição (Sparling et al., 1998).

Metais como cobre, vanádio e níquel podem ser encontrados em petróleo e seus derivados como elementos que ocorrem associados aos processos de formação (Reynolds, 2001). Embora presente somente em pequenas quantidades (mg/g ou ng/g níveis), esses metais são muito importantes, pois podem acumular nos tecidos e contaminar os animais. No ponto de vista ecológico, os traços metálicos no petróleo e derivados são de interesse devido ao seu potencial de contaminar o ambiente (Bettinelli e Tittarelli, 1994).

Cobre, metal essencial para os organismos vivos, está presente em águas naturais e sedimentos. Este metal desempenha um papel crucial em muitos sistemas biológicos de enzimas que catalisam a reações de redução /oxidação e tem oxigênio molecular como um co-substrato (USEPA, 2003). Além disso, participa na defesa contra radicais livres, na neurotransmissão, no metabolismo celular e compõe enzimas envolvidas na respiração celular (Matsuo, 2004). No entanto, se cobre está presente em concentrações relativamente altas no ambiente, a toxicidade aos organismos aquáticos pode ocorrer (USEPA, 2003).

## 7 USO DE PEIXES NO MONITORAMENTO AMBIENTAL

Ambientes aquáticos são importantes sumidouros de poluentes derivados de atividades antropogênicas. Peixes habitantes destas áreas têm sido propostos para monitoramento da poluição através da avaliação de biomarcadores. O uso de espécies-sentinelas aparece como uma escolha válida, especialmente, quando as análises químicas são integradas aos biomarcadores subcelulares, a fim de avaliar o impacto biológico da poluição e os mecanismos responsáveis pelas alterações biológicas (Nigro et al., 2002). Inventários, baseados no monitoramento químico de ambientes aquáticos, são com frequência restritos à identificação de certo número de poluentes, e podem não fornecer informações sobre os efeitos adversos para a biota (Livingstone, 1993).

Organismos aquáticos, como teleósteos apresentam respostas biológicas rápidas frente a contaminação das águas por produtos químicos (Ohe et al., 2004). Alguns trabalhos observaram a ocorrência de danos citogenéticos, genotóxicos, além da incidência de neoplasias, em peixes de água doce ou salgada coletados em ambientes contaminados (Pacheco e Santos, 2001; Lemos et al., 2005).

## 8 ORGANISMOS-TESTE

*Hippocampus reidi* são peixes com raios nas nadadeiras e, por tal característica pertencem à classe Actinopterygii (Nelson, 2006). Incluídos também na ordem Syngnathiformes e família Syngnathidae (Nelson, 2006), apresentam como nome popular cavalo-marinho. Esses organismos possuem altura máxima de 17,5cm; chegam a uma profundidade de 55m; desenvolvem-se entre algas, macroalgas, corais e esponjas; em relação ao peso e ao comprimento não apresentam dimorfismo sexual, e conforme estudo *in situ*, distribuem-se aos pares (Foster e Vicent, 2004).

Em sua maioria, os cavalos-marinhos investem no desenvolvimento de cada um de seus jovens. Durante o acasalamento, a fêmea deposita seus ovos na bolsa do macho, onde são fertilizados (garantindo a paternidade). Estes peixes detêm excelente capacidade de camuflagem, provavelmente, para facilitar a captura de presa e evitar o predador. Eles permanecem imóveis a maior parte do tempo e podem mudar de cor ao longo de alguns dias ou semanas. Possuem a mesma morfologia corpórea básica: cabeça posicionada em um ângulo direito ao corpo ereto; olhos que se movem de forma independente; um longo



tubo nasal (ausência de dentes) que suga o alimento; um trato digestivo sem estômago diferenciado; pele esticada sobre uma série de placas ósseas visíveis como anéis em torno do tronco e da cauda (Foster e Vicent, 2004).

Como são nadadores fracos, ancoram-se à vegetação ou o substrato com a cauda preênsil. Caracterizam-se por uma distribuição esparsa e baixa fecundidade (Rosa et al., 2007). Devido às populações em declínio, os cavalos-marinhos encontram-se ameaçados. Eles estão entre os muitos gêneros vulneráveis à exploração ou a outras situações como os danos do habitat. Possuem uma importante função como espécie-bandeira para promover a conservação de ecossistemas (Rosa et al., 2007). Assim como outros singnatídeos, fornecem um foco para os esforços voltados ao uso sustentável dos recursos marinhos (Martin-Smith e Vincent, 2006). Entendendo que as populações de cavalo-marinho estejam ameaçadas por uma série de fatores antropogênicos, é necessário um esforço contínuo que, promova melhores condições a estes organismos e a seus habitats.

*Prochilodus vimboides* pertencentes à classe Actinopterygii, ordem Characiformes e família Prochilodontidae (Nelson, 2006), apresentam como nomes populares curimatã ou curimbatá. Em geral, membros da família Prochilodontidae podem ser distinguidos de outros peixes, exceto como larvas, pelos lábios proeminentes constituídos por duas séries de numerosos e pequenos dentes, falciformes ou espatulados (Castro e Vari, 2003). As duas fileiras de dentes são variavelmente separadas, mas convergem para as margens laterais de cada maxilar. Peixes pertencentes a tal família possuem tamanhos de moderados a grandes; alguns considerados robustos, atingindo até 74cm.

Alimentam-se detritos e perifítons em superfícies aquáticas. Como consequência de seus hábitos alimentares, desempenham um papel significativo no fluxo de energia, sendo dominantes em alguns ecossistemas. Realizam migrações em massa, associadas com a alimentação e reprodução. Alguns indivíduos percorrem quase 1500km entre sua marca e recaptura, com movimentos diários de até 43km. São famosos por sua habilidade de transposição aos obstáculos durante as migrações. Sob a ótica da Ecologia Humana, possuem relevância na piscicultura comercial e de subsistência (Castro e Vari, 2003).

A espécie *P. vimboides* destaca-se em ambientes bentopelágicos, água doce. Distribuem-se na América do Sul e, no Brasil, do rio Jequitinhonha ao rio Paraíba e, na porção leste,

do Rio Paraná à Bacia do rio São Francisco, incluindo o Rio Doce. Estes organismos podem chegar a 33cm, possuem moderada vulnerabilidade (Casal e Torres, 2009) e atuam como potenciais bioindicadores.

## 1ª REFERÊNCIAS

Achuba, F. I., Osakwe, S. A., 2003. Petroleum-induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). Fish. Physiol. Biochem. 29, 97 - 103.

Adams, M., 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, USA: 644p.

Akaishi, F. M., Silva de Assis, H. C., Jakobi, S. C. G., Eiras-Stofella, D. R., St-Jean, S. D., Courtenay, S. C., Lima, E. F., Wagener, A. L. R., Scofield, A. L., Oliveira Ribeiro, C. A., 2004. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46, 244 - 253.

Albers, P. H., 2002. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Jr-Burton, G. A., Jr-Cairns, J. (Eds). Handbook of ecotoxicology. 2. ed. Boca Raton, Florida: cap. 14, 341 - 371.

Bettinelli, M., Tittarelli, P., 1994. Evaluation and validation of instrumental procedures for the determination of nickel and vanadium in fuel oils. J. Anal. At. Spectrom. 9, 805 - 812.

Bombail, V., Aw, D., Gordon, E., Batty, J., 2001. Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnelus*) erythrocytes from the firth of forth, Scotland. Chemosphere. 44, 383 - 392.

Brasil. Resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 357, de 18 de março de 2005. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

Casal, C. M. V., Torres, A. G. (Edts)., 2009. *Prochilodus vimboides*. FishBase. Downloaded: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).

Castro, R. M. C., Vari, R. P. Family Prochilodontidae (Flannel mouth characiforms). In: Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris Jr, C. A. (Eds). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EdiPCURS, Porto Alegre: 65 - 70.

Flammarion, P., Devaux, A. B., Noury, P., Garric, J., 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle river (France). *Ecotox. Environ. Safe.* 51, 145 - 153.

Foster, S. J., Vicent, C. J., 2004. Live history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *J. Fish. Biol.* 65, 1 - 61.

Glover, A. G., Smith, C. R., 2003. The deep-sea floor ecosystem: current status and prospects of anthropogenic change by the year 2025. *Environ. Conserv.* 30, 219 - 241.

Heddle, J. A., Hite, M., Jrhart, B., Macgregor, J. T., Salamone, M. F., 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutat. Res.* 123, 61 - 118.

Jha, A. N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis.* 23, 207 - 221.

Khan, M. A. Q., Alghais, S. M., Almarri, S., 1995. Petroleum hydrocarbons in fish from the Arabian Gulf. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 517-522.

Lee, R. F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mut. Res.* 544, 43 - 64.

Lemos, N. G., Dias, A. L., Silva-Souza, A. T., Mantovani, M. S., 2005. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. *Environ. Toxicol. Phar.* 19(2), 197 - 201.

Livingstone, D. R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biot.* 57, 195 - 211.

Ma, J., Ding, Z., Wei, G., Zhao, H., Huang, T., 2009. Sources of water pollution and evolution of water quality in the Wuwei basin of Shiyang river, Northwest China. *J. Environ. Manage.* 90, 1168 - 1177.

Martin-Smith, K. M., Vincent, A. C. J., 2006. Exploitation and trade in Australian seahorses, pipehorses, sea dragons and pipefishes (Family Syngnathidae). *Oryx.* 40,141 - 151.

Matsuo, A. Y. O., 2004. Aspectos ecofisiológicos e ecotoxicológicos em espécies da ictiofauna do Rio Negro, Amazônia, com ênfase em regulação iônica. Tese de Doutorado, INPA/UFAM, Manaus, 204p.

Moller, P., 2006. The Alkaline Comet Assay: Towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98, 336 - 345.

Nelson, J. S., 2006. *Fishes of the World.* 4 ed. John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ: 601p.

Nigro, M., Frenzilli, G., Scarcelli, V., Gorbi, S., Regoli, F., 2002. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Mar. Environ. Res.* 54, 517 - 520.

Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mut. Res.* 567,109 - 49.

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

Pandrangi, R., Petras, M., Ralph, S., Vrzoc, M., 1995. Alkaline Single Cell Gell (comet) assay and genotoxicity monitoring using bulheads and carp. *Environ. Mol. Mutagen.* 26, 345 - 356.

Reynolds, J. G., 2001. Ni in Petroleum Refining. *Pet. Sci. Technol.* 19, 979 - 1007.

Rosa, I. L., Oliveira, T. P. R., Castro, A. L. C., Moraes, L. E. S., Xavier, J. H. A., Nottingham, M. C., Dias, T. L. P., Bruto-Costa, L. V., Araújo, M. E., Birolo, A. B., Mai, A. C. G., Monteiro-Neto, C., 2007. Population characteristics, space use and habitat associations of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae). *Neotrop. Ichthyol.* 3 (5), 405 - 414.

Saeed, T., Mutairi, M. A., 1999. Chemical composition of the water soluble fraction of leaded gasolines in seawater. *Environ. Int.* 25, 117 - 129.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175, 184 - 191.

Sparling, D. W., Vann, S., Groves, R. A., 1998. Blood changes in mallards exposed to white phosphorus. *Env. Toxic. Chem.* 17(12), 2521 - 2539.

USEPA, 2003. Draft update of ambient water quality criteria for copper. US Environmental Protection Agency. November 2003. EPA 822-R-03-026. DPR (2004). Pesticide use information. California Department of Pesticide Regulation.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Phar.* 13, 57 - 149.

Van Gestel, C. A. M., Van Brummelen, T. C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology.* 5, 217 - 225.

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. *Mut. Res.* 63, 36 - 43.

Vieira, P. A., Vieira, R. B., França, F. P. E., Cardoso, V. L., 2007. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *J. Hazard. Mater.* 140, 52 - 59.

Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M., Peakall, D. B., 1996. Principles of ecotoxicology. 2 ed, London: Taylor & Francis, 309p.

## Ib HIPÓTESE

Hidrocarbonetos derivados de petróleo são comuns causadores de grandes focos de contaminação em ambientes aquáticos por serem provenientes de várias atividades antrópicas, mas principalmente em consequência de derrames. A toxicidade aguda destes compostos pode causar danos genéticos e morfológicos em diversos organismos (Kennedy e Farrell, 2005). Células e tecidos das espécies de peixes têm sido utilizados para investigar a toxicidade de tais compostos (Jha, 2008). Neste estudo, é sugerida a seguinte hipótese:

- ( $H_0$ ) Cavalo-marinho, *Hippocampus reidi*, e curimatã, *Prochilodus vimboides*, quando expostos à fração solúvel do óleo diesel, apresentam alterações que predizem os efeitos negativos desse composto químico.
  
- ( $H_1$ ) Cavalo-marinho, *Hippocampus reidi*, e curimatã, *Prochilodus vimboides*, quando expostos à fração solúvel do óleo diesel, não apresentam alterações que predizem os efeitos negativos desse composto químico.

## II- Efeitos genotóxicos da fração solúvel de óleo diesel em cavalo-marinho, *Hippocampus reidi*, durante exposição aguda

### RESUMO

O derramamento de óleo diesel é um problema em ambientes marinhos costeiros em função da alta toxicidade de seus componentes para a biota. Neste trabalho, avaliou-se o efeito genotóxico da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) em *Hippocampus reidi*. Os peixes foram expostos por dois tempos: 24h e 96h a três diferentes diluições da FSOD (1:1000, 1:500, 1:100) mais um grupo controle. A análise genotóxica foi realizada por meio do ensaio cometa e do teste micronúcleo. Para o ensaio cometa, após 24h e 96h de exposição, os eritrócitos dos peixes expostos a todas as diluições apresentaram maior quantidade de células com danos no DNA para as classes 2 e 3, danos moderados e pouco severos. Peixes expostos à diluição 1:100 da FSOD por 96h apresentaram maior quantidade de células na classe 4. Peixes expostos as três diluições apresentaram maior índice de danos no DNA (ID) quando comparados ao controle, em 24h e 96h. Para o teste micronúcleo, em 24h não houve diferença significativa entre o controle e as diluições. Após 96h, os peixes expostos às diluições 1:500 e 1:100 da FSOD apresentaram um aumento no número de micronúcleos. Houve um aumento no número de micronúcleos de 24h para 96h nos peixes expostos as três diluições da FSOD. Tanto o ensaio cometa quanto o teste micronúcleo foram eficazes para avaliar a ação genotóxica da FSOD em *H. reidi*. A FSOD provoca um efeito genotóxico em *H. reidi*, sendo este efeito crescente com o aumento da concentração e do tempo de exposição.

*Palavras-chave:* cavalo-marinho, diesel, ensaio cometa, micronúcleo e toxicidade.

## ABSTRACT

The high toxicity of diesel components make oil spills a problem to the biota in coastal marine environments. The genotoxic effect of the diesel water-soluble fraction (WSF) on *Hippocampus reidi* was assessed. Fish were exposed to three different WSF concentrations for up to 96h. Control groups were included. Genotoxicity was analyzed using the comet assay and the micronucleus test. All dilutions increased cells classes 2 and 3 frequencies in the comet assay after 24h and 96h. Fish exposed to WSF 1:100 exhibited a higher class 4 cells frequency in the 96h period. All dilutions increased DNA damage index as compared to the control in 24h and 96h. No significant difference between all WSF dilutions and control in the 24h period was observed in the Micronucleus Test. Micronuclei increased in fish exposed to 1:500 and 1:100 WSF dilutions for 96h. For all dilutions tested, the same was observed in fish after 96h as compared to those exposed for 24h. The Comet Assay and Micronucleus Test were efficient to detect WSF genotoxic action in *H. reidi*. Diesel WSF exerts genotoxic effect on *H. reidi*, which increases with WSF concentration and exposure time.

*Keywords:* seahorse; diesel; comet assay; micronuclei; toxicity



## 1 INTRODUÇÃO

Poluentes, compostos por agentes genotóxicos, resultantes das descargas industriais, agrícolas e de resíduos domésticos na superfície da águas tem aumentado a preocupação quanto aos efeitos adversos sobre ecossistemas aquáticos (Ohe et al., 2004). Os derramamentos de petróleo e seus derivados, como o óleo diesel combustível (Zhang et al., 2004; Simonato et al., 2008) são importantes fontes de poluição marinha e costeira (King et al., 2005; Albaigés et al., 2006). Estes derramamentos são causados principalmente por embarcações durante a navegação nas rotas marítimas, ou quando atracados em portos ou atracadouros (González et al., 2006; Silva et al., 2009).

Óleo diesel, como outros produtos destilados do petróleo, mostra uma baixa solubilidade em água, e por isso, investigações laboratoriais destes efeitos envolvem a preparação da fração solúvel. Análises químicas mostram que esta fração solúvel de óleo diesel contem compostos polares e hidrocarbonetos de dois grupos relevantes toxicologicamente: hidrocarbonetos monoaromáticos (benzeno, tolueno e xileno) e hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) de baixo peso molecular como naftaleno, fluoreno e fenantreno (Simonato et al., 2008). Entre os componentes do óleo diesel os que causam maior preocupação quanto ao risco ambiental são os HPAs, uma vez que estes compostos apresentam elevada toxicidade (Lee e Anderson, 2005; Ferreira et al., 2006).

Para avaliar a toxicidade de uma substância como o óleo diesel, são realizados testes genotóxicos (Martínez-Gomez et al., 2006; Vanzella et al., 2007). Ao nível celular, um indicador sensível de dano genético é a quebra de DNA, que pode ser detectada pelo ensaio cometa (Buschini et al., 2004). Este teste é vantajoso pela sua simplicidade, rápido desempenho e alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA sendo aplicado no biomonitoramento de populações (Hartmann et al., 2003). Efeitos genotóxicos em peixe também podem ser avaliados pela análise de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico (MNE). Micronúcleos podem ter origem na perda cromossômica quando um cromossomo inteiro não consegue migrar com um dos núcleos formados durante a mitose (efeito aneugênico) ou pela quebra de um cromossomo (efeito clastogênico) (Fenech, 2000).

Cavalo-marinho, ordem Gasterosteiformes (Nelson, 2006), são peixes de pouca movimentação e que ocorrem principalmente entre algas de clima temperado e em corais tropicais (Foster e Vicent, 2004). A espécie *Hippocampus reidi* apresenta distribuição em todo o mundo (Foster e Vicent, 2004). No Brasil, *H. reidi* é catalogada como superexplorada ou ameaçada de superexploração, categorias que resultam em medidas de proteção da pesca e de restrição do comércio (Rosa et al., 2006). A depleção do estoque, que coloca a existência da espécie em perigo aliada a sua baixa capacidade de movimentação, que impossibilita fugas rápidas em ambiente recentemente contaminado, além da sua ampla distribuição geográfica, qualifica esta espécie como potencial bioindicador de perturbação ambiental causada por compostos tóxicos em ambientes costeiros (Rosa et al., 2007). Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram: 1) avaliar o efeito genotóxico da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) em *Hippocampus reidi*, cavalo-marinho e 2) analisar a eficácia do ensaio cometa e do teste micronúcleo em detectar os efeitos genotóxicos do contaminante nesta espécie.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO

Os exemplares juvenis de *Hippocampus reidi*, foram obtidos de um criador particular, no município de Serra, ES. Os peixes ( $1,94 \pm 0,47\text{g}$  e  $8,47 \pm 0,68\text{cm}$ ; média  $\pm$  desvio padrão) foram transportados para o laboratório de Ecotoxicologia Aquática, localizado ao Complexo Biopráticas do Centro Universitário Vila Velha. Durante a aclimatação, assim como, durante os experimentos, foi utilizada água marinha coletada em um trecho da Praia de Itapuã, Vila Velha, Espírito Santo. O local foi escolhido por apresentar elevado nível de balneabilidade de acordo com os padrões estabelecidos pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente, o que assegurou boas condições de água aos peixes.

No laboratório, os peixes ( $n=56$ ) foram transferidos para dois aquários, cada um com capacidade para 30L contendo 25L de água filtrada. Nos aquários, a salinidade da água foi ajustada com substância salina para 30ppt. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com *Artemia* sp. viva. Durante a aclimatação, os parâmetros físico-químicos da água foram medidos a cada três dias com um multiparâmetro YSI 85 e com um pHmetro digital, e apresentaram o seguinte resultado (média $\pm$ desvio padrão): temperatura

22,1±0,4°C; condutividade 39,9±0,9µS/cm ; oxigênio dissolvido 6,6±0,7 mg/L e pH 7,5±0,2.

## 2.2 PREPARO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL

O óleo diesel comercial (B2) foi comprado em posto de gasolina comercial e apresentava uma densidade de 0,849g/cm<sup>3</sup>. O recipiente contendo óleo foi revestido por um saco preto a fim de evitar qualquer alteração nas propriedades físico-químicas da substância.

A preparação da fração solúvel do óleo diesel seguiu rigorosamente a metodologia descrita por Singer et al. (2000). Foram pesados 5g de óleo diesel. Em seguida, o óleo foi transferido para um balão volumétrico de 1L. Completou-se o volume do balão com a água marinha. A solução (óleo e água) foi colocada em um recipiente âmbar, e agitada por 24h em 9,1G, de maneira a não formar um vortex. Pelo sistema, obteve-se a fração solúvel do óleo diesel (FSOD) que, foi separada com auxílio de pipeta. A composição da FSOD foi analisada por cromatografia gasosa (Permin-Elkan, Clarus 500). Os parâmetros seguintes foram avaliados: HPA total (4,8%v/v); Benzeno (0,11%v/v); Tolueno (0,59%v/v); Xileno (2,1%v/v), Naftaleno (4,8mg/L); Fenantreno (0,47mg/L) e Fluoreno (0,36mg/L).

## 2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Após o período de aclimação, os peixes foram transferidos para 56 aquários de 1L, contendo água salgada e aeração constante. Em cada aquário foi colocado um animal. Foram estabelecidos quatro tratamentos, sendo um controle (sem FSOD) e três diferentes diluições de FSOD: 1:1000, 1:500 e 1:100, estas diluições foram definidas com base em trabalho anterior que expôs peixe marinho a FSOD (Solé et al., 2008). O experimento teve duração total de 96h. Foram amostrados 7 peixes por tratamento após 24h de exposição e outros 7 peixes por tratamento após 96h de exposição. Os aquários com peixes expostos por 96h tiveram 50% da água trocada após 24h de exposição. A água adicionada durante a troca apresentava a mesma diluição de FSOD da água que estava no aquário.

Após a exposição, os peixes foram colocados em uma solução contendo uma concentração letal de benzocaína (300 mg/L); e o sangue coletado por punção da veia caudal com seringas heparinizadas. Esta metodologia encontra-se em acordo com os

procedimentos descritos no guia para uso de peixes em pesquisa da American Fisheries Society (Nickum et al., 2004).

No início e no final do experimento, os parâmetros físico-químicos da água foram medidos com um multiparâmetro YSI 85, e apresentaram o seguinte resultado (média  $\pm$  desvio padrão): temperatura de  $23,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ; condutividade de  $41,3 \pm 0,5\mu\text{S/cm}$ , oxigênio dissolvido de  $6,9 \pm 0,5 \text{ mg/L}$  e salinidade de  $30 \pm 0,01$ .

## 2.4 EFEITOS GENOTÓXICOS

### 2.4.1 ENSAIO COMETA

As amostras sanguíneas foram diluídas a 1:120 (v/v) com RPMI 1640 médio e usadas imediatamente. O ensaio cometa alcalino foi realizado conforme descrito por Tice et al. (2000). Resumidamente,  $5\mu\text{L}$  de cada amostra de sangue diluído foram adicionados a 95L de 0,75%(w/v) agarose derretida de baixo ponto de fusão, e uma porção da mistura foi colocada sobre uma lâmina de microscópio pré-revestida com 1,5% (w/v), ponto de fusão agarose normal e com uma lamínula. Depois da agarose solidificada, lamínulas foram retiradas e as lâminas foram imersas em uma solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10.0 -10.5) contendo 1% Triton X-100 e 20% de DMSO. As lâminas foram mantidas congeladas em solução de lise ( $4^\circ\text{C}$ ) e protegidas da luz por pelo menos 2h e no máximo 3h. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em tampão recém-preparado alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH  $\geq 13$ , o que foi determinado experimentalmente) por 20min para o desenrolamento do DNA. Eletroforese (15min a 270mA e 20V [ $0,8 \text{ V / cm}$ ]) foi realizada no mesmo tampão. Cada etapa foi realizada sob luz amarela indireta. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas, Tris 400mM (pH 7,5), lavadas três vezes em água destilada, e deixadas para secar durante a noite em temperatura ambiente. As lâminas foram fixadas por 10 minutos em ácido tricloroacético 15% w/v, sulfato de zinco 5% w/v, 5% glicerol v/v, lavadas três vezes em água destilada, e secas durante 2h a  $37^\circ\text{C}$ . As lâminas secas foram re-hidratadas por 5min em água deionizada e, em seguida coradas (carbonato de sódio 5% w/v, de nitrato de amônio 0,1% w/v, nitrato de prata 0,1% w/v, ácido tungstosilícico 0,25%, 0,15% de formaldeído w/v, preparados na hora no escuro), e constantemente agitadas por 35 min. As lâminas coradas foram lavadas duas vezes com água deionizada e, em seguida, submersas na solução tampão (ácido acético 1%), lavadas novamente e, reservadas para posterior

análise. A análise das lâminas envolveu 200 células por animal, utilizando a classificação visual baseado na migração de fragmentos de DNA do núcleo da classe 0 (ausência de danos), classe 1 (danos leves - inferior ou igual ao diâmetro de um núcleo), classe 2 (danos moderados - de um núcleo e inferior ou igual ao diâmetro maior que o diâmetro de dois núcleos), classe 3 (danos pouco severos - superior a duas vezes o diâmetro de um núcleo) e classe 4 (danos severos, apoptose) (Kobayashi et al., 1995; Collins et al., 1995). Os dados foram apresentados como a frequência de células com e sem danos, contagem e distribuição de classes. O índice de danos (ID) foi calculado multiplicando o número de núcleos encontrados em uma classe vezes o número da classe.

#### 2.4.2 TESTE MICRONÚCLEO

Amostras de sangue periférico foram obtidas a partir da veia caudal dos espécimes e expandidas em lâminas limpas. As lâminas foram deixadas para secar no ambiente do laboratório durante a noite e, em seguida, os esfregaços foram fixados em metanol P. A. durante 15min e filtrados por 20min, com 5% (w/v), Giemsa, lavados com água deionizada e deixados para secagem no ambiente do laboratório. Após a secagem, 2.000 eritrócitos por peixe (duas lâminas) foram analisados quanto à presença de micronúcleos em lentes de 100 vezes sob microscópio óptico (Al-Sabati e Metcalfe, 1995).

#### 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat 3.0. Tanto para o ensaio cometa como para o teste micronúcleo, a diferença entre cada diluição (1:1000, 1:500 e 1:100) em relação ao seu respectivo controle em certo tempo (24h ou 96h) foi determinada pelo teste Kruskal-Wallis Anova e de Dunnet's ( $p < 0,05$ ). A diferença entre as mesmas diluições nos dois tempos de amostragem foi determinada pelo teste-T ( $p < 0,05$ ). Para a avaliação do Índice de Danos, foi comparada a diferença entre as diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) em relação ao seu respectivo controle em certo tempo (24h ou 96h) por uma Anova e teste de Dunnet's ( $p < 0,05$ ). A diferença entre uma mesma diluição nos dois tempos de amostragem foi determinada pelo teste-T ( $p < 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 EFEITOS GENOTÓXICOS

##### 3.1.1 ENSAIO COMETA

Em 24h não houve diferença significativa de cada diluição da FSOD em relação ao controle, para a classe 1 que determina danos leves no DNA das células. Para as classes 0, 2 e 3 que determinam, respectivamente, sem danos, danos moderados e danos poucos severos; *H. reidi* expostos a todas as diluições da FSOD apresentaram quantidade de células danificadas significativamente maior que os seus controles. Na classe 4, danos severos, a mediana foi de 0 para todas as diluições, não havendo diferença significativa (Tabela 1). Em 96h, os peixes expostos a todas as diluições da FSOD apresentaram menor quantidade de células pertencentes à classe 0, quando comparado ao controle. Por outro lado, os peixes expostos às diferentes diluições da FSOD apresentaram maior quantidade de células pertencentes à classe 2 e 3 quando comparado ao respectivo controle. Os peixes expostos à diluição 1:100 da FSOD apresentaram maior quantidade de células pertencentes à classe 4 em relação ao controle.

Tabela 1. Frequência de danos (%) nos eritrócitos de *Hippocampus reidi* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h. Os resultados estão apresentados como mediana. \* Indica diferença significativa do controle por uma Kruskal-Wallis ANOVA e teste de Dunnet's ( $p < 0,05$ ).

Diluição	Classe de cometa				
	0	1	2	3	4
24h de exposição					
Controle	60,5	37,5	1,5	0,5	0,0
1:1000	19,5*	48,5	30,5*	1,5*	0,0
1:500	7,0*	46,0	39,0*	8,5*	0,0
1:100	4,5*	25,0	49,5*	25,0*	0,0
96h de exposição					
Controle	66,5	31,00	3,50	0,00	0,00
1:1000	21,00*	45,50	32,50*	1,50*	0,00
1:500	7,50*	38,50	42,00*	10,00*	0,00
1:100	2,50*	13,50	47,50*	36,00*	2,50*

Os peixes expostos às diluições 1:1000, 1:500 e 1:100 da FSOD apresentaram maior índice de danos (ID) no DNA quando comparados ao grupo controle, em 24h e 96h (Figura 1). Não há diferença significativa no índice de danos nos dois tempos de amostragem de uma mesma diluição (controle  $p = 0,368$  e  $T = 0,934$ ; 1:1000  $p = 0,659$  e  $T = 0,452$ ; 1:500  $p = 0,722$  e  $T = 0,364$ ; 1:100  $p = 0,161$  e  $T = -1,994$ ).

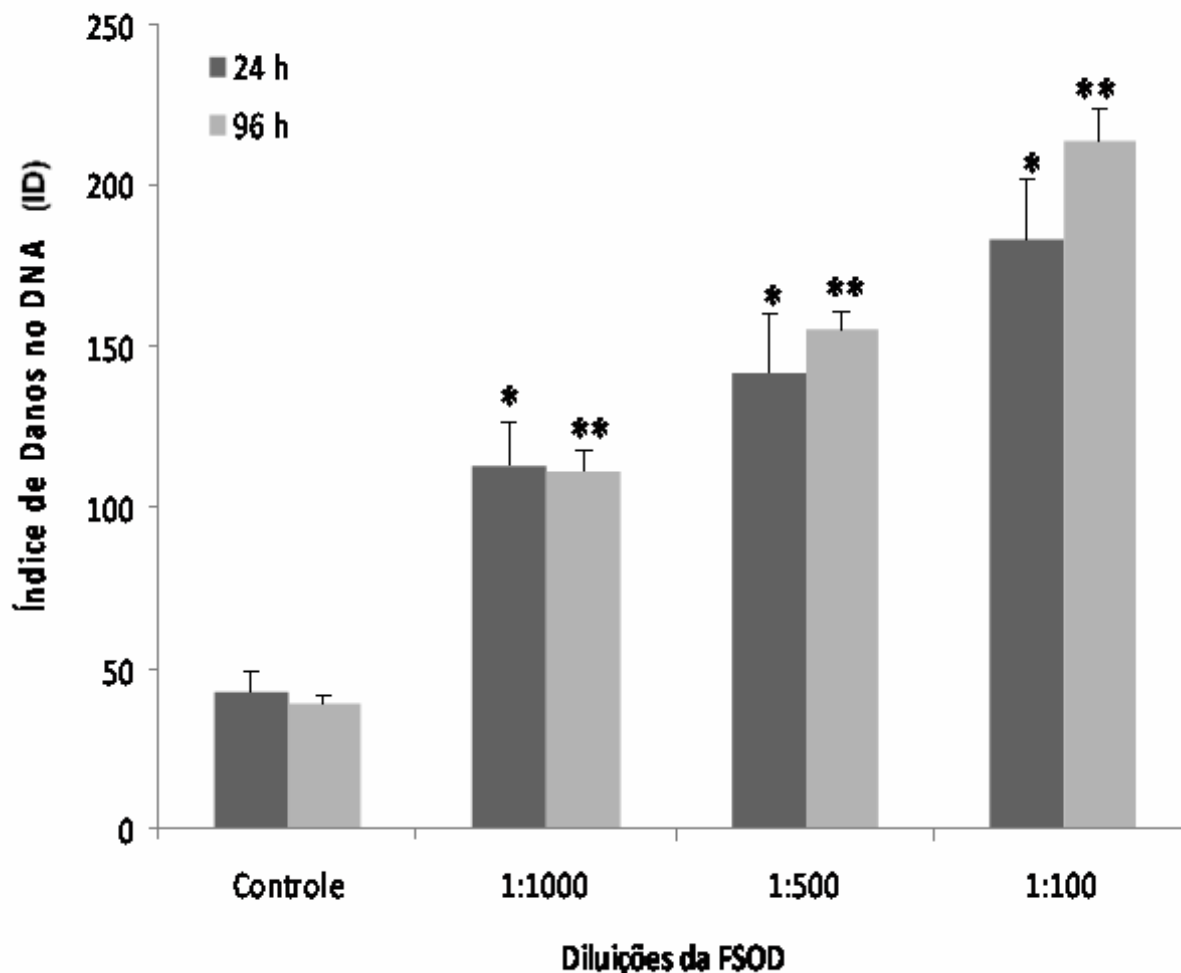


Figura 1. Índice de danos no DNA (ID) de *Hippocampus reidi* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão. \* Indica diferença significativa do tratamento controle em 24h de exposição por uma ANOVA e teste de Dunnet's ( $p < 0,05$ ). \*\* Indica diferença significativa do tratamento controle em 96h de exposição por uma ANOVA e teste de Dunnet's ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2 TESTE MICRONÚCLEO

Em 24h de exposição não houve diferença significativa entre o controle e as diferentes diluições testadas. Após 96h de exposição, os peixes expostos às diluições 1:500 e 1:100 da FSOD apresentaram um aumento significativo no número de micronúcleo em relação

ao controle (Tabela 2). Houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no número de micronúcleos do tempo 24h para o tempo 96h de exposição nos peixes expostos às diluições 1:1000, 1:500 e 1:100 de FSOD. Não houve diferença significativa ( $p = 0,825$ ) entre os peixes controles dos dois tempos analisados.

Tabela 2. Micronúcleos nos eritrócitos ( $\%_{100}$ ) de *Hippocampus reidi* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h. \* Indica diferença significativa entre as diluições de um determinado tempo em relação ao seu respectivo controle pelo teste Kruskal-Wallis e teste de Dunnet's ( $p < 0,05$ ). † Indica diferença significativa de uma determinada diluição nos dois tempos de amostragem (24h e 96h) pelo teste-T ( $p < 0,05$ ).

Diluição	Tempo de exposição (h)					
	24			96		
	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max
Controle	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	1,0
1:1000	0,5	0,0	1,5	2,0*†	1,0	2,5
1:500	1,0	0,0	2,5	3,5*†	0,5	5,5
1:100	1,5	0,0	2,5	6,0*†	2,0	8,5

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITOS GENOTÓXICOS

Os resultados obtidos com *H. reidi* mostram que a FSOD foi o fator determinante na indução dos micronúcleos e de danos no DNA (revelados pelo ensaio cometa). Vanzella et al. (2007) propõem que HPAs presentes na fração solúvel de óleo diesel geram compostos eletrofílicos. Estes, associados à molécula de DNA levam a inúmeros danos celulares. Iarmacovai et al. (2008) relatam ainda que as imperfeições nos sistemas de defesa responsáveis pela proteção contra a fixação de danos no DNA e a diminuição da eficácia no reparo do DNA podem levar a um acúmulo de mutações que, sozinhas ou em combinação com outras alterações, contribuem para o desenvolvimento de patologias.

Vanzella et al. (2007) avaliaram efeitos da FSOD sobre o peixe *Prochilodus lineatus*, em exposição aguda e as freqüências relativas dos eritrócitos foram maiores para peixes expostos ao xenobionte a partir de 96h. O dano nos eritrócitos de *H. reidi* também foi mais evidente em 96h de exposição. Uma hipótese para esse resultado é que o tempo de 24h não é suficiente para promover danos severos nas células eritrocíticas, as quais teriam apenas iniciado o processo de divisão. Já em 96h, o aumento da freqüência de



micronúcleos após a exposição à FSOD está relacionado às lesões celulares que não foram reparadas.

Neste trabalho, foi observado um efeito genotóxico crescente com o aumento da concentração da FSOD. Resultado semelhante foi obtido por Ergene et al. (2007) estudando três espécies de peixe do delta do Goksu, na Turquia, onde os autores evidenciaram uma correlação positiva entre frequência de anormalidade em eritrócitos dos peixes, com o teor de xenobiontes presentes na água.

#### 4.1.1 ENSAIO COMETA

De acordo com Maria et al. (2003) o processo de biotransformação de HPAs em peixes, freqüentemente converte esses xenobiontes em substâncias reativas intermediárias altamente tóxicas e que causam um dano oxidativo no DNA. O resultado do teste cometa evidenciou danos na fita de DNA nos *H. reidi* expostos as diferentes diluições da FSOD, induzidas pelos compostos genotóxicos presentes. Existe um aumento no índice de dano (ID) no DNA com o aumento da concentração da FSOD (figura 1), mas este dano não está relacionado com o tempo de exposição, uma vez que não houve diferença significativa no ID entre os tempos de exposição para nenhuma diluição testada.

No ensaio cometa é possível distinguir e quantificar células com diferentes taxas de dano no DNA, desta forma, a análise do valor médio para cada grupo é importante para entender a magnitude do dano causado pelo xenobionte (Vanzella et al., 2007). Houve uma predominância de classe 0 e 1 nos peixes do grupo controle. Os danos das classes 2 e 3 foram mais freqüentes em todas as diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) e nos dois tempos de exposição (24h e 96h) quando comparado ao controle. Danos severos que correspondem a classe de dano 4 só foram observados na diluição 1:100 em 96h de exposição, assim mesmo, em uma freqüência bastante baixa (2,5%). Os resultados obtidos com o ensaio cometa em *H. reidi* exposto a FSOD mostram ser suficientes para detecção de genotoxicidade ambiental. Este resultado é semelhante ao observado por Akcha et al. (2003) em relação aos efeitos dos HPAs em *Limanda limanda*, onde os resultados do ensaio cometa foram sensíveis ao xenobionte. Por outro lado, a classificação visual de cometas usada em *Tilapia rendalli* mostrou que, danos no DNA de células eritrocíticas não foram suficientes para a detecção de genotoxicidade em ambiental natural (Lemos et al., 2005).

#### 4.1.2 TESTE MICRONÚCLEO

Sob a ótica celular, os micronúcleos são constituídos por fragmentos cromossômicos ou por cromossomos que se atrasam durante a anáfase (Fenech, 2000). A formação de micronúcleos na divisão da célula resulta da quebra de cromossomo, por má reparação de lesões; e da falha na segregação de cromossomos, por mau funcionamento mitótico (Iarmacovai et al., 2008). Esses erros podem ser induzidos por defeitos genéticos no ciclo celular, estresse oxidativo e exposição a contaminantes (Iarmacovai et al., 2008), como neste trabalho.

Hoshina et al. (2008), indicaram a tilápia, *Oreochromis niloticus*, como organismo-teste adequado para avaliar a indução de danos genéticos causados por petróleo, pois a exposição ao petróleo provocou indução de micronúcleos e processo de morte celular. Para a tilápia a quantidade de micronúcleos variou de um a três, valor bem inferior ao constatado em 96h para *H. reidi*, que foi de três a seis. No presente estudo, a alta frequência de micronúcleos pode estar relacionada com a maior sensibilidade da espécie de peixe estudada ao xenobionte. O teste micronúcleo demonstrou ser eficaz para detectar a magnitude dos efeitos genotóxicos da FSOD em *H. reidi*, uma vez que, foi observado um aumento do número de micronúcleos com o aumento da concentração e do tempo de exposição.

#### 5 CONCLUSÃO

A frequência de células danificadas, tanto para o micronúcleo quanto para o ensaio cometa, foi inversamente proporcional às diluições (1:1000; 1:500 e 1:100) e diretamente proporcional ao tempo de exposição (24h e 96h a FSOD. Assim, *H. reidi* expostos a maiores diluições da FSOD e por pouco tempo, apresentaram menos danos celulares. Com base nos métodos utilizados (ensaio cometa e teste micronúcleo) pode-se afirmar que a espécie *Hippocampus reidi* é sensível aos efeitos tóxicos da FSOD, sendo então, esta espécie sugerida como bioindicador dos efeitos tóxicos deste tipo de xenobionte em ambientes costeiros.

## 6 REFERÊNCIAS

- Akcha, F., Vincent Hubert, F., Pfohl-Leszkowicz, A., 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutat. Res.* 534, 21 - 32.
- Albaigés, J., Morales-Nin, B., Vilas, F., 2006. The *Prestige* oil spill: a scientific response. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 205 - 207.
- Al-Sabati, K., Metcalfe, C. D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121 - 135.
- Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, 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. *Mutat. Res.* 557, 119 - 129.
- Collins, R. A., Ai-Guo, M., Duthie, S. J., 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in Human Cells. *Mutat. Res.* 336, 69 - 77.
- Ergene, S., Çavas, T., Çelik, A., Köleli, N., Kaya, F., Karahan, A., 2007. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology.* 16, 385 - 391.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mut. Res.* 455, 81 - 95.
- Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., Reis-Henriques, M. A., 2006. The effect of longterm depuration on phase I and phase II biotransformation in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to pollutants in River Douro Estuary, Portugal. *Mar. Environ. Res.* 61, 326 - 338.
- Foster, S. J., Vicent, C. J., 2004. Live history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *J. Fish. Biol.* 65, 1 - 61.

González, J. J., Vinas, L., Franco, M. A., Fumega, J., Soriano, J. A., Grueiro, G., Muniategui, S., Lopez-Mahia, P., Prada, D., Bayona, J. M., Alzaga, R., Albaigés, J., 2006. Spatial and temporal distribution of dissolved/dispersed aromatic hydrocarbons in seawater in the area affected by the *Prestige* oil spill. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 250 - 259.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R., 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis.* 18 (1), 45 - 51.

Hoshina, M. M., Angelis, D. F., Marin-Morales, M. A., 2008. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. *Mutat. Res.* 656, 44 - 48.

Iarmacovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R. A. Orsière, T., 2008. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mutat. Res.* 658, 215 - 233.

King, S. C., Johnson, J. E., Haasch, M. L., Ryan, D. A. J., Ahokas, J. T., Burns, K. A., 2005. Summary results from a pilot study conducted around an oil production platform on the Northwest Shelf of Australia. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1163 - 1172.

Kobayashi, H., Suguyama, Y., Morikawa, M., Hayashi, T., Sofuni, A., 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis, *MMS Commun.* 3, 103 - 115.

Lee, R.F., Anderson, J.W., 2005. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 705 - 723.

Lemos, N. G., Dias, A. L., Silva-Souza, A. T., Mantovani, M. S., 2005. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. *Environ. Toxicol. Phar.* 19, 197 - 201.

Maria, V. L., Correia, A. C., Santos, M. A., 2003. Genotoxic and biochemical responses in caged eel (*Anguilla anguilla* L.) after short-term exposure to harbour waters. *Environ. Int.* 29, 923 - 929.

Martínez-Gomez, C., Campillo, J. A., Benedicto, J., Fernandez, B., Valdes, J., Garcia, I., Sanchez, F., 2006. Monitoring biomarkers in fish (*Lepidorhombus boscii* and *Callionymus lyra*) from the northern Iberian shelf after the Prestige oil spill. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 305 - 314.

Nelson, J. S., 2006. *Fishes of the World*. 4 ed. John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ: 601p.

Nickum, J. G., Bart, H. L., Bowser, P. R., Greer, I. E., Hubbs, C., Jenkins, J. A., MacMillan, J. R., Rachlin, J. W., Rose J. D., Sorensen, P. W., Tomasso, J. R., 2004. *Guidelines for the use of fishes in research*. American Fisheries Society, Bethesda, MD.

Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mut. Res.* 567,109 - 49.

Rosa, I. L., Sampaio, C. L. S., Barros, A. T., 2006. Collaborative monitoring of the ornamental trade of seahorses and pipefishes (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil: Bahia State as a case study. *Neotrop. Ichthyol.* 4(2), 247 - 252.

Rosa, I. L., Oliveira, T. P. R, Castro, A. L. C, Moraes, L. E. S, Nottingham, M. C, Dias, T. L. P., 2007. Population characteristics, space use and habitat associations of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae). *Neotrop. Ichthyol.* 5(3), 405 - 474.

Silva, C. A., Ribeiro, C. A. O., Katsumiti, A., Araujo, M. L. P., Zandoná, E. M., Costa Silva, G. P., Maschio, J., Roche, H., Silva de Assis, H.C., 2009. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 400 - 409.

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. *Ecotox. Environ. Safe.* 69, 112 - 120.

Singer, M. M., Aurand, D., Bragin, G. E., Clarks, J. R., Coelho, G. M., Sowby, M., Tjeerdema, L., 2000. Standardization of the Preparation and Quantitation of Water accommodated Fractions of Petroleum for Toxicity Testing. *Mar. Pollut. Bull.* 40(11),1007 - 1016.

Solé, M., Lima, D., Reis-Henriques, M. A., Santos, M. M., 2008. Stress biomarkers in Juvenile Senegal Sole, *Solea senegalensis*, exposed to the Water-Accommodated Fraction of the "Prestige" Fuel Oil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 19 - 23.

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. *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (3), 206 - 221.

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. *Mutat. Res.* 631, 36 - 43.

Zhang, J. F., Wang, X. R., Guo, H. Y., Wu, J. C., Xue, Y.Q., 2004. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 58, 110 - 116.

### III- Biomarcadores em curimatã, *Prochilodus vimboides*, expostos

à fração solúvel de óleo diesel

#### RESUMO

Derivados de petróleo podem ser focos de contaminação em ambientes aquáticos, principalmente, em consequência de derrames. Neste trabalho, avaliou-se o efeito da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) em eritrócitos e em brânquias de *Prochilodus vimboides*. Os peixes foram expostos por 96h a três diferentes diluições da FSOD mais um grupo controle. As análises genotóxicas foram realizadas pelo ensaio cometa, micronúcleo e citometria de imagem; as bioquímicas pela atividade de enzima Aspartato aminotransferase e a alanina aminotransferase (AST e ALT) e as fisiológicas pelo acúmulo de metal cobre nas brânquias. Peixes expostos por 96h apresentaram maior índice de danos que aqueles expostos por 24h. Pela citometria, a área dos nucleóides aumentou conforme as diluições e os tempos de exposição. Danos no DNA foram diretamente proporcionais à área dos nucleóides. Não houve diferença significativa quanto à presença de micronúcleos entre peixes expostos e o controle e também entre 24h e 96h. Para AST, não houve diferença significativa para os dois tempos de amostragem e uma mesma diluição. Peixes expostos à diluição 1:100 apresentaram maior atividade da enzima ALT em relação ao controle, durante 24h de exposição. Não houve bioacumulação de metal cobre nas brânquias. Os efeitos genotóxicos da FSOD foram mais evidentes que os efeitos bioquímicos e fisiológicos em *P. vimboides* durante exposição aguda.

*Palavras-chave:* curimba; diesel; biomarcadores; toxicidade; ecotoxicologia.

## ABSTRACT

Petroleum products can be sources of contamination in aquatic environments, mainly as a result of spills. The effects of diesel water-soluble fraction (WSF) on *Prochilodus vimboides* were assessed. Fish were exposed to three different WSF concentrations for up to 96h. Control groups were included. Genotoxicity was analyzed using the comet assay, the micronucleus test and the image cytometry. Biochemical activity was analyzed using enzyme (AST and ALT). Physiological effects was analyzed using accumulation of metal in the gills. Fish exposed for 96h had higher rates of damage than those exposed for 24h. For cytometry, the cell area increased with the dilutions and exposure times. DNA damage was directly proportional to the cell area. There was no significant difference regarding the presence of micronuclei between exposed and control fish and between 24h and 96h. For AST, no significant difference for the two sampling times and the same dilution. Fish exposed to 1:100 dilution showed higher activity of the enzyme ALT in the control during 24h of exposure. There was no bioaccumulation of copper in the gills. The genotoxic effects of WSF were more evident than the biochemical and physiological effects on *P. vimboides* during acute exposure.

*Keywords:* curimba; diesel; biomarkers; toxicity; ecotoxicology



## 1 INTRODUÇÃO

Certos poluentes, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) têm sido produzidos e, em parte, liberados no meio ambiente. O destino final de muitos destes compostos é o meio aquático, quer devido a descargas diretas ou a processos hidrológicos e atmosféricos (Van der Oost et al., 2003).

Hidrocarbonetos derivados de petróleo são agentes causadores comuns de grandes focos de contaminação em ambientes aquáticos por serem provenientes de várias atividades antrópicas, mas principalmente em consequência de derrames. A toxicidade aguda destes compostos pode causar danos genéticos e morfológicos em diversos organismos (Kennedy e Farrell, 2005). Células e tecidos das espécies de peixes têm sido utilizados para investigar a toxicidade de tais compostos (Jha, 2008).

Infelizmente, pouca atenção tem sido reportada aos efeitos de derivados de petróleo, óleo diesel, no ambiente aquático. Ainda assim, alguns trabalhos avaliaram efeitos genotóxicos (Vanzella et al., 2007), bioquímicos e fisiológicos (Simonato et al., 2008) no peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Outros estudos também com peixes, *Carassius auratus*, direcionaram os efeitos do óleo diesel à defesa antioxidante (Zhang et al., 2004) do organismo-teste. Estes estudos confirmam a ação de poluentes que podem, inicialmente, causar alteração estrutural nas biomoléculas dos organismos aquáticos, e, posteriormente, levar à alteração das propriedades funcionais dessas moléculas envolvidas nos processos biológicos (Amado et al., 2006).

Os peixes têm um papel importante para o fluxo de energia nos ecossistemas aquáticos, estão expostos continuamente a poluentes no hábitat natural e constituem uma parte importante da dieta humana (Jha, 2008). Uma vez que peixes respondem com frequência a substâncias tóxicas de maneira semelhante aos vertebrados superiores, eles podem ser usados para estudos de produtos químicos que têm o potencial de causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em seres humanos. No entanto, a principal aplicação para o modelo de sistemas com peixe é determinar a distribuição e os efeitos tóxicos de contaminantes químicos no ambiente aquático (Al-Sabati e Metcalfe, 1995).

Mudanças biológicas em peixes que podem estar relacionadas à exposição ou aos efeitos de químicos e são denominadas biomarcadores (Van der Oost et al., 2003). O ensaio

cometa foi aplicado com sucesso em eritrócitos de muitas espécies de peixes expostos a diferentes agentes genotóxicos, permitindo a avaliação das alterações do DNA induzido por xenobióticos (Frenzilli et al., 2009). Entre as vantagens desta técnica, também pode ser mencionado que o tamanho e o número de cromossomos não são importantes e que a atividade mitótica não é necessária (Frenzilli et al., 2009).

O DNA nuclear tem sido estudado por meio da citometria de imagem. Este método é empregado com o objetivo de fornecer informações mais precisas sobre o comportamento biológico em adição ao método citológico tradicional (Kimball, 1996). A análise por citometria de imagem é uma das novas tecnologias que vem sendo utilizada com sucesso em países desenvolvidos, como complemento para análises laboratoriais de rotina (Bocking e Nguyen, 2004). Pode ser aplicada a pequeno número de células e permite medidas seletivas de células classificadas morfológicamente (Bocking, 1995). A imagem capturada é convertida em Pixels, que estão relacionados a uma cor e uma intensidade específicas, e processada automaticamente pelo *software*, gerando valores de absorvância relacionados com a área, denominados valores de densidade óptica integrada (DOI) (Hardie et al., 2002).

Um outro teste genotóxico consiste no teste micronúcleo cuja aplicação é ampla e busca investigar danos no DNA causados por propriedades de vários produtos químicos. O teste micronúcleo é muito utilizado para detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). Quando isso acontece, o material genético fragmentado ou perdido não se incorpora corretamente ao núcleo da célula-filha, originando um novo núcleo de tamanho menor que o principal, o micronúcleo (Fenech et al., 1999).

Para alterações ao nível tecidual, análises fisiológicas de peixes podem ser realizadas pelo processo de bioacumulação. No processo de absorção dos metais pesados estão envolvidas quatro possíveis rotas de absorção: 1) pele; 2) brânquias e 3) alimentação. Ao entrar no organismo os metais são transportados no sangue ligados a proteínas e acabam por acumular nas brânquias, na gordura, nos rins, no músculo e no fígado (Heath, 1995).

Suscetíveis aos xenobiontes, espécies de peixes do gênero *Prochilodus* têm sido usadas na Ecotoxicologia (Vanzella et al., 2007). Estas espécies são abundantes e distribuídas nos rios da América do Sul, que fluem para o Oceano Atlântico. Alimentam-se tanto de

partículas suspensas na coluna d'água como daquelas que se acumulam no sedimento. São peixes de extensos hábitos migratórios, de grande valor comercial e consumo humano (Ortí et al., 2001).

*Prochilodus vimboides* pertencentes à classe Actinopterygii, ordem Characiformes e família Prochilodontidae (Nelson, 2006) apresentam como nomes populares curimatã ou curimbatá. Destacam-se em ambientes bentopelágicos, água doce. Distribuem-se na América do Sul e, no Brasil, do rio Jequitinhonha ao rio Paraíba e, na porção leste, do Rio Paraná à Bacia do rio São Francisco. Estes organismos podem chegar a 33cm (Casal e Torres, 2009).

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos da fração solúvel do óleo diesel (FSOD) em curimatã, *Prochilodus vimboides*, durante exposição aguda.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO

Os exemplares juvenis de *Prochilodus vimboides* foram obtidos na Escola Agrotécnica Federal de Colatina, Espírito Santo. Os peixes ( $9,83 \pm 5,84\text{g}$  e  $9,48 \pm 1,60\text{cm}$ ; média  $\pm$  desvio padrão) foram transportados para o laboratório de Ecotoxicologia Aquática, localizado ao Complexo Biopráticas do Centro Universitário Vila Velha. Durante a aclimatação, os peixes foram mantidos por 15 dias em um de tanque de 500L com aeração constante.

No tanque, os peixes (n=72) foram alimentados duas vezes ao dia com ração extrusada 40% proteína (Nutriave). Durante a aclimatação, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados a cada três dias com um multiparâmetro YSI 85 e com um pHmetro digital, e apresentaram o seguinte resultado (média $\pm$ desvio padrão): temperatura  $25,6 \pm 0,4^\circ\text{C}$ ; condutividade  $148,6 \pm 33,3\mu\text{S/cm}$ ; oxigênio dissolvido  $6,2 \pm 0,4\text{mg/L}$ , pH  $7,3 \pm 0,2$  e dureza total  $27,75 \pm 0,01 \text{ mg/L CaCO}_3$ .

## 2.2 PREPARO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL

O óleo diesel comercial (B2) foi comprado em posto de gasolina comercial e apresentava uma densidade de  $0,832\text{g/cm}^3$ . O recipiente contendo óleo foi revestido por um saco preto a fim de evitar qualquer alteração nas propriedades físico-químicas da substância.

A preparação da fração solúvel do óleo diesel seguiu rigorosamente a metodologia descrita por Singer et al. (2000). Foram pesados 5g de óleo diesel. Em seguida, o óleo foi transferido para um balão volumétrico de 1L. Completou-se o volume do balão com a água do tanque. A solução (óleo e água) foi colocada em um recipiente âmbar, e agitada por 24h em 9,1G, de maneira a não formar um vortex. Pelo sistema, obteve-se a fração solúvel do óleo diesel (FSOD) que, foi separada com auxílio de pipeta. A composição da FSOD foi analisada por cromatografia gasosa (Perkin-Elmer, Clarus 500) e apresentou as seguintes características: HPA total (4,3mg/L); Benzeno (0,10%v/v); Tolueno (0,56%v/v); Xileno (2,0%v/v); Naftaleno (4,6 mg/L); Fenantreno (0,31mg/L) e Fluoreno (0,24mg/L). Uma amostra da FSOD foi devidamente digerida e submetida ao aparelho de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (EAA-FG; GBC Avanta 932, IL, USA) para análise da concentração de vanádio, cobre e níquel. As concentrações desses metais na FSOD foram 1,922ng/mL, 3,904ng/mL e 4,00ng/mL, respectivamente.

## 2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Após o período de aclimação, os peixes foram transferidos para 72 aquários de 2L, sob aeração constante. Em cada aquário foi colocado um animal. Foram estabelecidos quatro tratamentos, sendo um controle (sem FSOD) e três tratamentos com diferentes diluições de FSOD: 1:1000, 1:500, 1:100. Estas diluições foram definidas com base em trabalhos anteriores que expuseram peixes a FSOD (Solé et al., 2008). O experimento teve duração total de 96h. Foram amostrados 9 peixes por tratamento após 24h e outros 9 peixes por tratamento após 96h de exposição. Os aquários com peixes expostos por 96h tiveram 50% da água trocada a cada intervalo de 24h de exposição. A água adicionada durante a troca apresentava a mesma diluição da FSOD que a água que estava no aquário.

Após a exposição, os peixes foram colocados em uma solução contendo uma concentração letal de benzocaína (300 mg/L); e o sangue coletado por punção da veia caudal com seringas heparinizadas. Esta metodologia encontra-se em acordo com os

procedimentos descritos no guia para uso de peixes em pesquisa da American Fisheries Society (Nickum et al., 2004). As brânquias dos animais foram retiradas e condicionadas em refrigerador à -20°C para análise de bioacumulação de cobre.

Durante o experimento, os parâmetros físico-químicos da água foram medidos com um multiparâmetro YSI 85, e apresentaram o seguinte resultado (média±desvio padrão): temperatura 25,5±0,3°C; oxigênio dissolvido 6,9±0,5 mg/L; condutividade 87,5±2,9µS/cm; pH 7,05±0,3 e dureza total 28±0,3mg/L CaCO<sub>3</sub>.

## 2.4 EFEITOS GENOTÓXICOS

### 2.4.1 ENSAIO COMETA

As amostras sanguíneas foram diluídas a 1:120 (v/v) com RPMI 1640 médio e usadas imediatamente. O ensaio cometa alcalino foi realizado conforme descrito por Tice et al. (2000). Resumidamente, 5µL de cada amostra de sangue diluído foram adicionados a 95L de 0,75%(w/v) agarose derretida de baixo ponto de fusão, e uma porção da mistura foi colocada sobre uma lâmina de microscópio pré-revestida com 1,5% (w/v), ponto de fusão agarose normal e com uma lamínula. Depois da agarose solidificada, lamínulas foram retiradas e as lâminas foram imersas em uma solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10.0 -10.5) contendo 1% Triton X-100 e 20% de DMSO. As lâminas foram mantidas congeladas em solução de lise (4°C) e protegidas da luz por pelo menos 2h e no máximo 3h. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em tampão recém-preparado alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH ≥ 13, o que foi determinado experimentalmente) por 20min para o desenrolamento do DNA. Eletroforese (15min a 270mA e 20V [0,8 V / cm]) foi realizada no mesmo tampão. Cada etapa foi realizada sob luz amarela indireta. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas, Tris 400mM (pH 7,5), lavadas três vezes em água destilada, e deixadas para secar durante a noite em temperatura ambiente. As lâminas foram fixadas por 10 minutos em ácido tricloroacético 15% w/v, sulfato de zinco 5% w/v, 5% glicerol v/v, lavadas três vezes em água destilada, e secas durante 2h a 37°C. As lâminas secas foram re-hidratadas por 5min em água deionizada e, em seguida coradas (carbonato de sódio 5% w/v, de nitrato de amônio 0,1% w/v, nitrato de prata 0,1% w/v, ácido tungstosilícico 0,25%, 0,15% de formaldeído w/v, preparados na hora no escuro), e constantemente agitadas por 35 min. As lâminas coradas foram lavadas duas vezes com água deionizada e, em seguida, submersas na

solução tampão (ácido acético 1%), lavadas novamente e, reservadas para posterior análise. A análise das lâminas envolveu 200 células por animal, utilizando a classificação visual baseado na migração de fragmentos de DNA do núcleo da classe 0 (ausência de danos), classe 1 (danos leves - inferior ou igual ao diâmetro de um núcleo), classe 2 (danos moderados - de um núcleo inferior ou igual ao diâmetro maior que o diâmetro de dois núcleos), classe 3 (danos pouco severos - superior a duas vezes o diâmetro de um núcleo) e classe 4 (danos severos, apoptose) (Kobayashi et al., 1995, Collins et al., 1995). Os dados foram apresentados como a frequência de células com e sem danos, contagem e distribuição de classes. O índice de danos (ID) foi calculado multiplicando o número de núcleos encontrados em uma classe vezes o número de classes.

#### 2.4.2 CITOMETRIA DE IMAGEM

Após serem analisadas em microscópio óptico, as lâminas referentes ao ensaio cometa foram levadas ao Laboratório de Investigação Cardiovascular do Complexo Biopráticas do Centro Universitário Vila Velha. Neste caso, aplicou-se a técnica da citometria de imagem cuja função foi complementar a análise visual realizada anteriormente. Com um software gratuito disponível da Internet (CellProfiler®, [www.cellprofiler.com](http://www.cellprofiler.com)), as imagens foram analisadas para identificar área do nucleóide de *P. vimboides*. Utilizaram-se várias categorias "módulo". Dentro de cada módulo, várias tarefas foram resolvidas. O primeiro módulo foi usado para "carregar as imagens" do arquivo, onde as imagens foram carregadas a partir do disco rígido. Como as imagens eram coloridas, a cor do "módulo de gray", foi aplicada a partir da categoria de processamento de imagem. A intensidade invertida "módulo" foi utilizada a fim de ter objetos brilhantes com um fundo escuro. O módulo de "identificação primária automática" foi escolhido. Um algoritmo para identificação automática (segmentação) Ridler Calvard adaptativa foi aplicado. Foram definidas as áreas mínimas (15,50Pixels) e máximas (30,10Pixels) a fim de excluir duplicados e restos. Com os objetos identificados, o módulo de "medida de forma de área objeto" a partir da medição da categoria foi aplicado para quantificar o arredondamento (ou seja, fator forma) dos objetos identificados inicialmente. O filtro "módulo de medição objeto" foi aplicado para excluir objetos em desacordo com o padrão estabelecido. Como última etapa, a área de "forma do objeto da medida" foi realizada para quantificar o tamanho dos objetos remanescentes.

### 2.4.3 TESTE MICRONÚCLEO

Amostras de sangue periférico foram obtidas a partir da veia caudal dos espécimes e expandidas em lâminas limpas. As lâminas foram deixadas para secar no ambiente do laboratório durante a noite e, em seguida, os esfregaços foram fixados em metanol P. A. durante 15min e filtrados por 20min, com 5% (w/v), Giemsa, lavados com água deionizada e deixados para secagem no ambiente do laboratório. Após a secagem, 2.000 eritrócitos por peixe (duas lâminas) foram analisados quanto à presença de micronúcleos em lentes de 100 vezes sob microscópio óptico (Al-Sabati e Metcalfe, 1995).

## 2.5 EFEITOS BIOQUÍMICOS

### 2.5.1 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE E ALANINA AMINOTRANSFRASE (AST E ALT)

As amostras de sangue foram mantidas em microtubos de plástico (ependorfs). Estes foram centrifugados a 151,2G, por 10 minutos. O plasma foi separado dos outros componentes sanguíneos com auxílio de pipeta automática. Por tal componente sanguíneo foi possível analisar as atividades das enzimas Aspartato aminotransferase e Alanina aminotransfrase (AST E ALT), com kit enzimático Bioclin (k034 e k035).

## 2.6 FEITOS FISIOLÓGICOS

### 2.6.1 BIOACUMULAÇÃO DE COBRE

Amostras de brânquias foram enxaguadas com EDTA durante 30s para retirar qualquer resquício de contaminante (vindo da água ou do material da dissecação) e o excesso da água foi retirado com papel filtro. As amostras foram pesadas e digeridas em ácido nítrico 10% durante 24h em estufa à 80°C. As amostras digeridas foram submetidas ao aparelho de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (EAA-FG; GBC Avanta 932, IL, USA). Os resultados são expressos em mg de cobre/g de peso fresco (Menezes, 2005). O cobre foi escolhido para o estudo de bioacumulação por sua toxicidade, além de ser um dos mais abundantes durante a análise da FSOD.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat 3.0. A frequência de danos nos eritrócitos dos peixes expostos às diluições para seus respectivos controles foi comparada por Kruskal-Wallis ANOVA e teste de Dunn's ( $p < 0,05$ ). O índice de danos no DNA e o micronúcleo nos eritrócitos dos peixes expostos às diluições foram comparados com os seus respectivos controles, por uma ANOVA e teste de Dunnet's ( $p < 0,05$ ). A área da célula dos peixes expostos às diluições foi comparada com os seus respectivos controles, por uma Kruskal-wallis ANOVA e teste de Dunn's ( $p < 0,05$ ). A mesma diluição nos dois tempos de amostragem foi comparada pelo teste Man-Whitney ( $p < 0,05$ ). As atividades das enzimas AST e ALT e a concentração de cobre na brânquia, dos peixes expostos às diluições foram comparadas com seus respectivos controles, por uma ANOVA e teste de Dunn's ( $p < 0,05$ ). A mesma diluição nos dois tempos de amostragem foi comprada pelo teste T ( $p < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 EFEITOS GENOTÓXICOS

#### 3.1.1 ENSAIO COMETA

Exceto para *P. vimboides* expostos à diluição 1:1000 da FSOD, durante 24h, não houve diferença significativa das diluições 1:500 e 1:100 da FSOD em relação aos respectivos controles, para a classe 1 que determina danos leves no DNA dos eritrócitos. Para as classes 0 e 2 que determinam, respectivamente, sem danos e danos moderados; *P. vimboides* expostos às diluições 1:500 e 1:100 da FSOD apresentaram maior quantidade de células danificadas em relação aos seus respectivos controles, sendo estas diferenças significativas. Na classe 3, que determina danos pouco severos, apenas peixes expostos à diluição 1:100 da FSOD apresentaram maior quantidade de células danificadas em relação ao seu controle, sendo esta diferença significativa. Na classe 4, que determina danos severos, a mediana foi 0 para todas as diluições, não havendo diferença significativa em relação aos respectivos controles (Tabela 1).



Em 96h, *P. vimboides* expostos às diluições 1:1000, 1:500 e 1:100 da FSOD apresentaram menor quantidade de células pertencentes à classe 0, quando comparados aos respectivos controles. Para tal classe, esta diferença em relação ao controle foi significativa para as diluições 1:500 e 1:100 da FSOD. Peixes expostos à diluição 1:100 da FSOD também apresentaram menor quantidade de células pertencentes à classe 1, quando comparados ao controle, sendo essa diferença significativa. Por outro lado, os peixes expostos às diferentes diluições da FSOD apresentaram maior quantidade de células pertencentes à classe 2 e 3 quando comparado ao respectivos controles. Para tais classes, esta diferença em relação ao respectivo controle foi significativa para peixes expostos às diluições 1:500 e 1:100 da FSOD. Os peixes expostos à diluição 1:500 e 1:100 da FSOD apresentaram ainda maior quantidade de células pertencentes à classe 4 em relação aos respectivos controles, sendo esta diferença significativa (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de danos (%) nos eritrócitos de *Prochilodus vimboides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h. Os resultados estão apresentados como mediana. \* Indica diferença significativa do controle por uma Kruskal-Wallis ANOVA e teste de Dunn's ( $p < 0,05$ ).

Diluição	Classe de cometa				
	0	1	2	3	4
24h de exposição					
Controle	69,50	30,00	0,00	0,00	0,00
1:1000	30,00	43,00*	24,00	0,00	0,00
1:500	26,00*	32,00	41,00*	0,50	0,00
1:100	21,50*	31,50	44,00*	2,50*	0,00
96h de exposição					
Controle	67,00	32,50	0,50	0,00	0,00
1:1000	14,50	57,50	26,50	0,50	0,00
1:500	10,50*	25,00	48,00*	15,50*	0,50*
1:100	6,50*	15,50*	49,00*	45,25*	0,50

Os peixes expostos às diluições 1:1000, 1:500 e 1:100 da FSOD apresentaram maior índice de danos no DNA quando comparados ao grupo controle, tanto para 24h quanto para 96h (Figura 1). Considerando os dois tempos de amostragem (24h e 96h) e uma mesma diluição, peixes expostos por 96h apresentaram maior índice de danos que aqueles expostos por 24h, sendo essa diferença significativa de um tempo para o outro, inclusive, entre os controles.

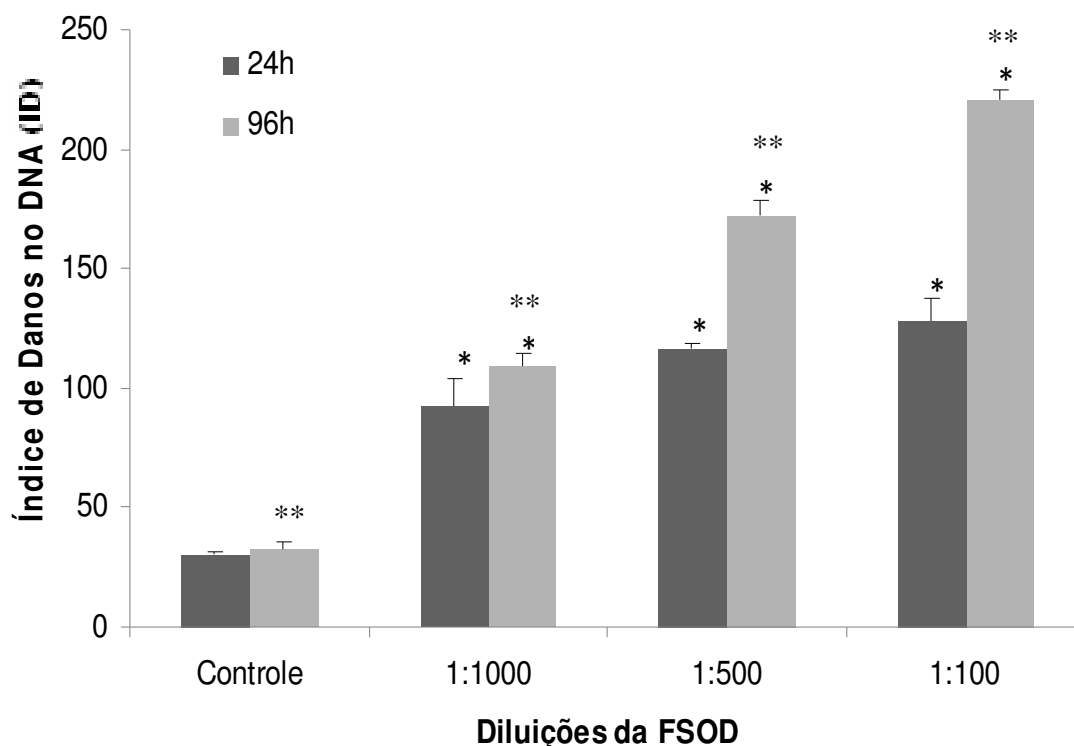


Figura 1. Índice de danos no DNA (ID) de *Prochilodus vimbooides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão. \* Indica diferença significativa de cada diluição em 24h ou 96h em relação ao controle pelo teste de Dunnet's ( $p < 0,05$ ). \*\* Indica diferença significativa entre a mesma diluição nos dois tempos de amostragem (24h e 96h) pelo teste T ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2 CITOMETRIA DE IMAGEM

*Prochilodus vimbooides* expostos às diluições 1:1000, 1:500 e 1:100 da FSOD apresentaram maior área de nucleóide quando comparados ao grupo controle, tanto para 24h quanto para 96h. Considerando os dois tempos de amostragem (24h e 96h) e uma mesma diluição, peixes expostos às diluições 1:500 e 1:100 por 96h apresentaram maior área de danos que aqueles expostos por 24h, sendo essa diferença significativa de um tempo para o outro, inclusive, entre os controles (Figura 2).

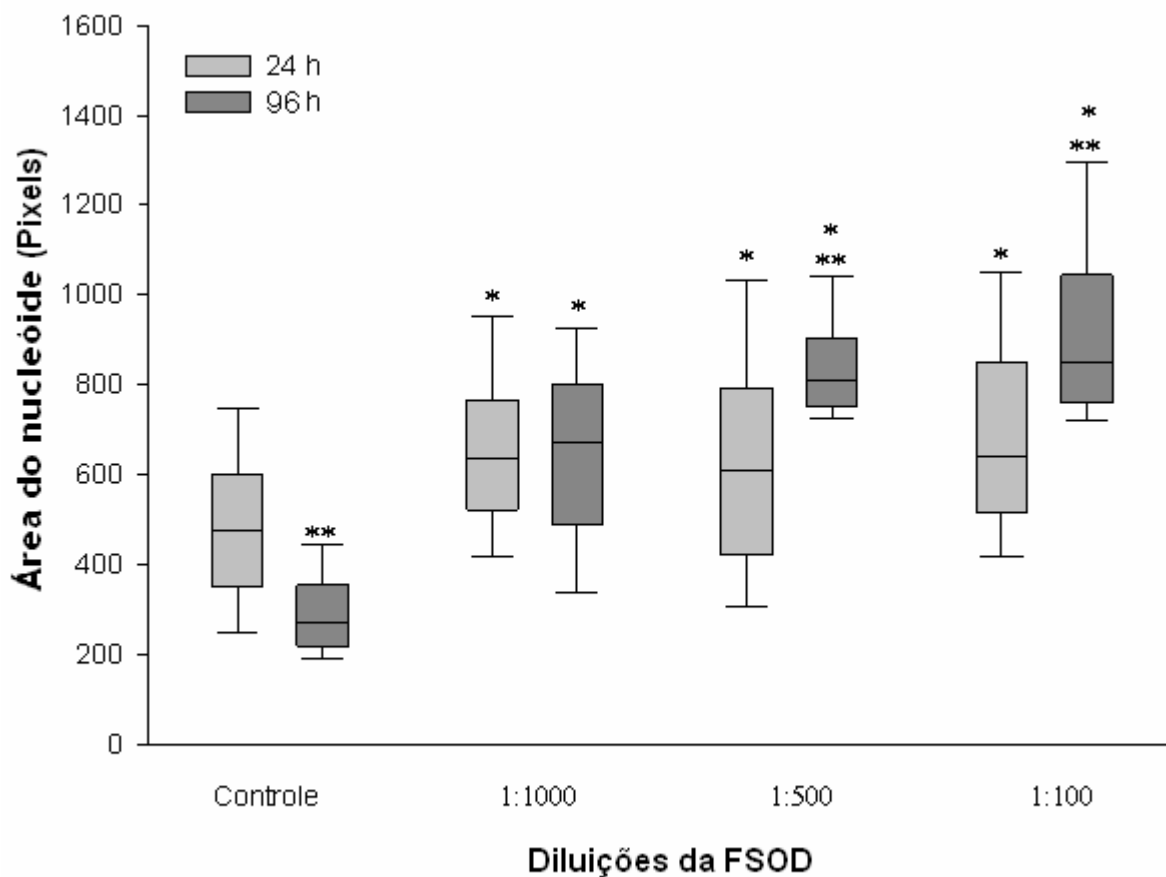


Figura 2. Área do nucleóide (Pixels) de *Prochilodus vimbooides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h. A caixa representa a amplitude interquartil que contém 50% dos valores. Linhas externas (na vertical) correspondem aos maiores e menores valores encontrados e linhas internas (horizontal) à mediana. \* Indica diferença significativa de cada diluição em 24h ou 96h em relação ao controle por uma Kruskal-Wallis ANOVA e teste de Dunn's ( $p < 0,05$ ). \*\* Indica diferença significativa entre a mesma diluição nos dois tempos de amostragem (24h e 96h) pelo teste de Man-Whitney ( $p < 0,05$ ).

Eritrócitos danificados (nucleóides) analisados pelo método convencional, de leitura com auxílio do microscópio óptico, apresentaram maior índice de danos à medida que os peixes foram expostos à FSOD e no transcorrer do tempo, de 24h para 96h (Figura 1). Pelo método da citometria, a área do nucleóide também aumentou de acordo com as diluições e com os tempos de exposição (Figura 2). Considerando as variáveis x (área da célula) e y (índice de danos), a regressão linear evidenciou uma relação positiva entre as mesmas. Constatou-se que danos nos eritrócitos foram diretamente proporcionais à área do nucleóide (Figura 3).

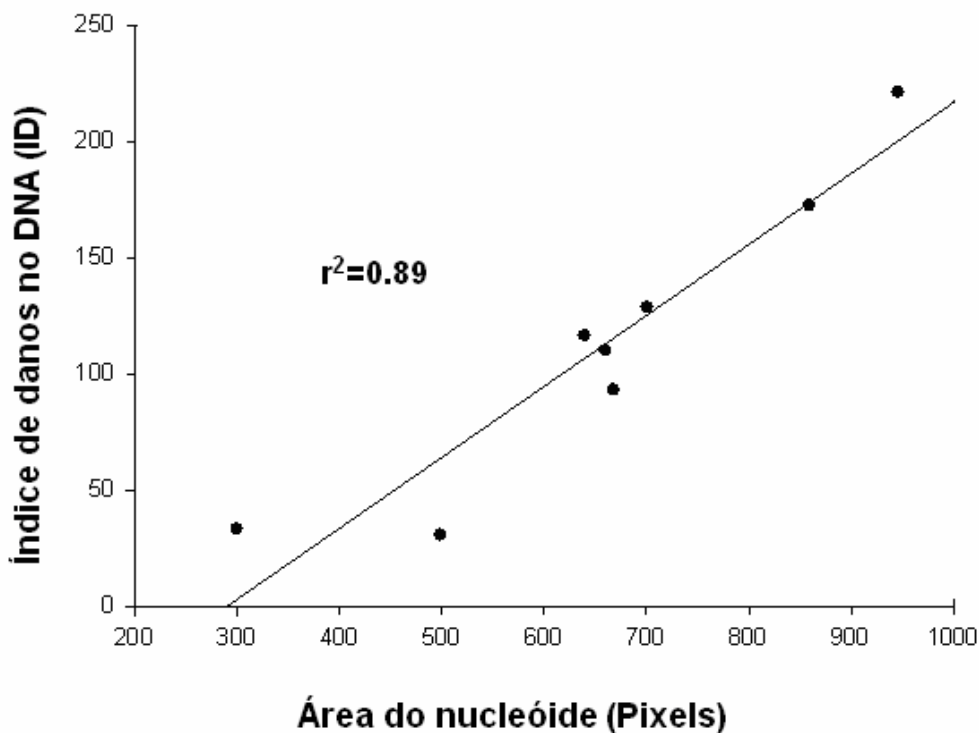


Figura 3. Análise de regressão linear entre o índice de danos do DNA (ID) por microscópio óptico e área do nucleóide (Pixels) por citometria de imagem de *Prochilodus vimbooides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h.

### 3.1.3 TESTE MICRONÚCLEO

Na comparação entre *P. vimbooides* expostos às diluições 1:1000, 1:500 e 1:100 com os respectivos organismos do controle, durante 24h ( $p=0,413$ ) e 96h ( $p=0,268$ ) não foi constatada diferença significativa quanto à presença de micronúcleos nos eritrócitos (Tabela 2). Para os dois tempos de amostragem e uma mesma diluição também não foi constatada diferença significativa quanto à presença de micronúcleos (controle  $p=1,00$  e  $F=1,00$ ; 1:1000  $p=0,641$  e  $F=0,221$ ; 1:500  $p=0,777$  e  $F=0,813$ ; 1:100  $p=0,595$  e  $F=0,288$ ).

Tabela 2. Micronúcleos nos eritrócitos ( $^0/_{00}$ ) de *Prochilodus vimboides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h. Valores apresentados em mediana, mínimo e máximo.

Diluição	Tempo de exposição (h)					
	24			96		
	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max
Controle	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1:1000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1:500	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1:100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

### 3.2 EFEITOS BIOQUÍMICOS

#### 3.2.1 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE E ALANINA AMINOTRANSFERASE (AST E ALT)

Em relação à AST (Figura 4), ao comparar *P. vimboides* expostos às diluições 1:1000, 1:500 e 1:100 com os respectivos organismos do controle, durante 24h ( $p=0,121$ ) e 96h ( $p=0,572$ ) não foram constatadas diferenças significativas quanto à atividade dessa enzima. Para os dois tempos de amostragem e uma mesma diluição também não foi constatada diferença significativa (controle  $p=0,428$  e  $F=0,622$ ; 1:1000  $p=0,312$  e  $F=1,088$ ; 1:500  $p=0,789$  e  $F=0,740$ ; 1:100  $p=0,365$  e  $F=0,870$ ).

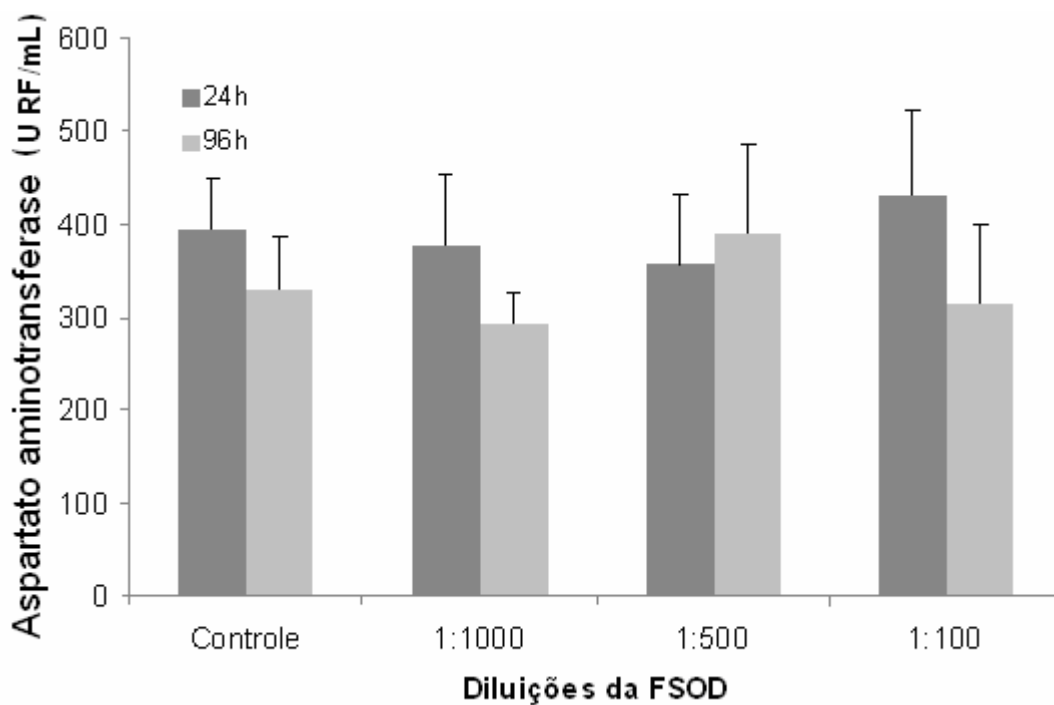


Figura 4. Enzima Aspartato aminotransferase (U RF/mL) em plasma de *Prochilodus vimbooides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h. Valores apresentados em média e erro padrão.

Quanto à ALT (Figura 5), ao comparar *P. vimbooides* expostos às diluições 1:1000, 1:500 e 1:100 com os respectivos organismos do controle, durante 24h, apenas os peixes expostos à diluição 1:100 apresentaram maior atividade enzimática, sendo essa diferença significativa. Em 96h, não foi constatada diferença significativa entre as diluições e o controle ( $p=0,946$ ). Para os dois tempos de amostragem e uma mesma diluição também não foi constatada diferença significativa (controle  $p=0,442$  e  $T=-0,790$ ; 1:1000  $p=0,361$  e  $T=-0,941$ ; 1:500  $p=0,302$  e  $T=-1,071$ ; 1:100  $p=0,204$  e  $T=1,329$ ).

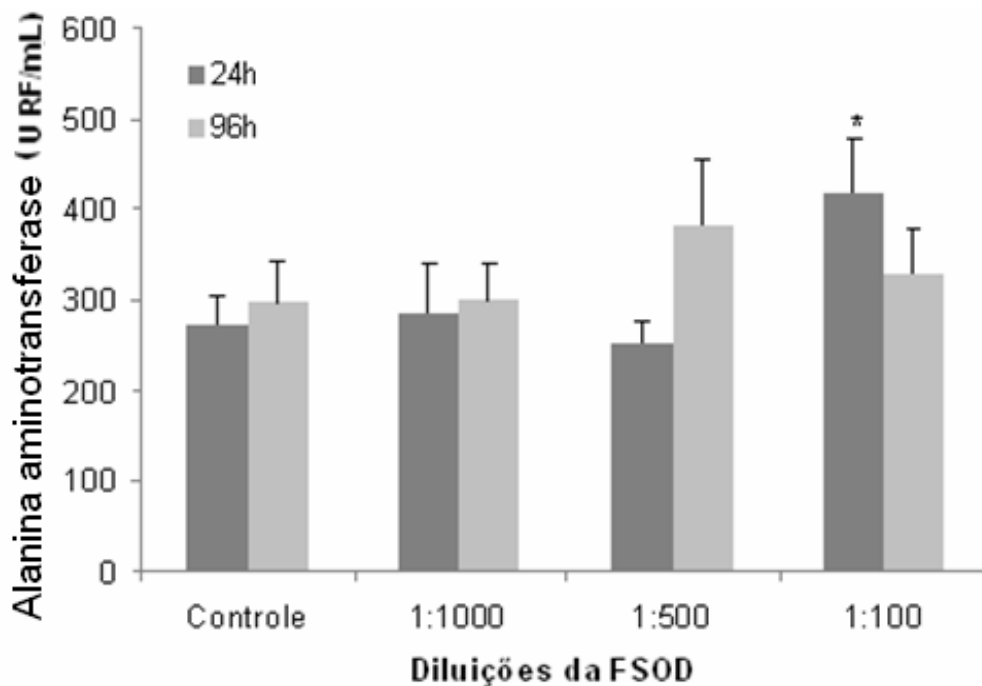


Figura 5. Enzima alanina aminotransferase (U RF/mL) em plasma de *Prochilodus vimboides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h. Os resultados estão apresentados em média e em erro padrão. \* Indica diferença significativa do controle por uma ANOVA e teste de Dunn's ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 EFEITOS FISIOLÓGICOS

#### 3.3.1 BIOACUMULAÇÃO DE COBRE

Na comparação entre *P. vimboides* expostos às diluições 1:1000, 1:500 e 1:100 com os respectivos organismos do controle, durante 24h ( $p=0,160$ ) e 96h ( $p=0,356$ ) não foi constatada diferença significativa quanto à bioacumulação de metal cobre nas brânquias (Figura 6). Para os dois tempos de amostragem e uma mesma diluição também não foi constatada diferença significativa quanto à presença de cobre neste tecido (controle  $p=0,603$  e  $F=0,286$ ; 1:1000  $p=0,881$  e  $F=0,234$ ; 1:500  $p=0,248$  e  $F=1,472$ ; 1:100  $p=0,125$  e  $F=2,668$ ).

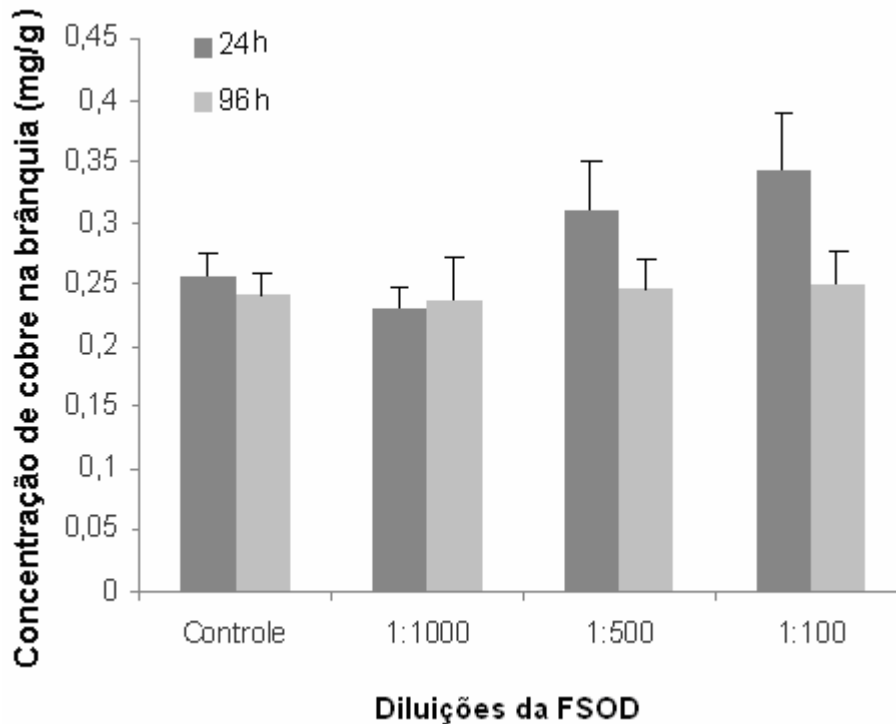


Figura 6. Concentração de cobre na brânquia (Sulfato de cobre,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) de *Prochilodus vimbooides* expostos a diferentes diluições (1:1000, 1:500 e 1:100) da fração solúvel de óleo diesel (FSOD) por 24h e 96h. Valores apresentados em média e erro padrão.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITOS GENOTÓXICOS

#### 4.1.1 ENSAIO COMETA

As alterações na estrutura do DNA, incluindo rupturas e modificações na sequência de bases nitrogenadas, tem sido associadas com a exposição a um grande número de contaminantes, em especial os HPAs (Pandurangi et al., 1995). Conforme Speit e Hartmann (1995), vários mecanismos de formação das quebras na cadeia de DNA têm sido propostos para vertebrados, particularmente, para exposição aos HPAs. Assim, o reparo incompleto do DNA e falhas no sistema de reparo parecem induzir essas quebras. Como o presente estudo utilizou FSOD constituída em sua maioria por HPAs, é possível que tais compostos tenham contribuído para uma ação genotóxica em *P. vimbooides*.

Vanzella et al. (2007) também evidenciaram danos genotóxicos em *P. lineatus* expostos à FSOD. No ensaio cometa, foram constatadas elevadas frequências médias de células



danificadas obtidas nos grupos expostos, frente aos valores obtidos com os peixes controles. Comparando *P. vimboides* expostos à FSOD e seus respectivos controles, durante 24h, constatou-se que quanto menor a diluição da FSOD (1:100), maior a quantidade de células pertencentes à classe 3 (danos pouco severos). Para 96h, as diluições 1:500 e 1:100 evidenciaram células com danos severos, pertencentes à classe 4. Estes dados mostram células danificadas e indicam uma alta genotoxicidade da FSOD, corroborando com os resultados obtidos por Vanzella et al. (2007).

Santos et al. (dados não publicados) constataram que o índice de danos no DNA (ID) de *Hippocampus reidi* expostos à FSOD foi maior quando comparado ao controle, em 24h e 96h. *Prochilodus vimboides* expostos à FSOD durante 96h apresentaram maior índice de danos que aqueles expostos por 24h. Como os autores estudaram outra espécie de peixe, é sugerido que o efeito genotóxico da FSOD seja observado tanto em organismos marinhos quanto dulcícolas.

Lemos et al. (2005) mostraram a eficácia do ensaio do cometa, quando este foi utilizado em *Tilapia rendalli*. Os organismos do ambiente contaminado apresentaram o dobro de dano de DNA em relação ao grupo controle. Altos índices de danos também foram relatados no DNA em eritrócitos de *Zoarcetes viviparus* coletados em um estuário cujo sedimento era contaminado por inúmeros compostos, incluindo HPAs (Frenzilli et al., 2004). Pandrangi et al. (1995) evidenciaram um aumento dos danos no DNA em eritrócitos dos peixes *Ameiurus nebulosus* e *Cyprinus carpio* após a captura em regiões contaminadas por HPAs. Embora tenha sido realizado sob condições laboratoriais, o presente estudo está em consonância aos trabalhos *in situ*. *Prochilodus vimboides* expostos à FSOD apresentaram danos no DNA, para os dois tempos de amostragem (24h e 96h).

Um trabalho sobre os efeitos genotóxicos dos HPAs foi conduzido por Akcha et al. (2003) em *Limanda limanda* coletados de diferentes pontos no Canal Inglês (França). Dois grupos de locais que pareciam em acordo com o nível de poluição puderam ser distinguidos pelo ensaio cometa. Este ensaio mostrou-se sensível à ação genotóxica da FSOD em *P. vimboides*. Os dados obtidos podem ir além da relação entre FSOD e danos genéticos. Pensando em diversos ecossistemas, principalmente, ambientes dulcícolas; a atenção volta-se para um possível vazamento de derivados do petróleo com efeitos negativos à biota.

#### 4.1.2 CITOMETRIA DE IMAGEM

Quando as células são coradas de forma adequada, a análise visual pode revelar mecanismos biológicos. Neste caso, os observadores pontuam uma ou, no máximo, algumas características celulares. De forma complementar, a citometria de imagem detecta simultaneamente muitas medidas inerentes às células. A análise baseada na imagem é versátil e pode resultar em elevado teor de informação, com amostras distintas (Carpenter et al., 2006). Eritrócitos de *P. vimboides* foram analisados por método convencional e por citometria. Embora danos no DNA tenham sido constatados visualmente, foram necessárias semanas para a realização completa da leitura de lâminas. Os resultados obtidos pelo método da citometria requereram menos tempo frente à inspeção visual.

Comparando os dois métodos de leitura de lâmina (convencional e por imagem), observa-se uma semelhança muito grande nos resultados obtidos, indicando que a citometria de imagem pode ser utilizada com eficácia para avaliação do dano no DNA. Para suportar esta afirmação, a regressão linear, constatou uma forte relação entre o índice de danos no DNA (ID) e a área do nucleóide (Pixels) ( $r^2 = 0,89$ ) para os peixes expostos às três diluições (1:1000, 1:500, 1:100) da FSOD. O maior problema desta análise é que existe uma baixa relação entre os métodos analíticos para o grupo controle.

A análise por citometria de imagem, em especial, o uso do programa CellProfiler pode tratar uma variedade de questões biológicas de forma quantitativa, incluindo ensaios normalizados como contagem e o tamanho de células, níveis de proteína celular e complexas análises morfológicas, como por exemplo, formas de organelas subcelulares, padrões de DNA ou proteína de coloração (Carpenter et al., 2006). Evidenciando a importância da citometria no estudo de aspectos biológicos, o presente estudo avaliou as áreas das células. Estas foram diretamente proporcionais aos índices de danos no DNA dos eritrócitos.

*Ameiurus nebulosus* sob ação de um HPA cancerígeno (benzopireno) foram avaliados por 18 meses. Análises de citometria do conteúdo de DNA de hepatócitos indicaram um aumento na síntese de DNA para os peixes expostos. Após 14 dias de exposição, as

variáveis de citometria retornaram aos níveis iniciais. Neste caso, o método não produziu evidências de alterações de DNA a longo prazo, considerando uma única exposição ao HPA. No entanto, as diferenças detectadas pela análise do DNA logo após o evento tóxico sugeriram que a citometria, usada na análise do ciclo celular, foi útil para documentar uma exposição contínua (Grady et al., 2006). Os dados obtidos em *A. nebulosus* corroboram com os obtidos em *P. vimboides*. Ainda que os últimos tenham sido expostos à FSOD, houve um aumento na área da célula para a maioria das diluições, de 24h para 96h, logo após o evento tóxico.

Os resultados obtidos em *Scophthalmus maximus* expostos a combustível sugerem que danos cromossômicos, analisados por citometria, também podem ser usados como uma resposta a agentes genotóxicos (Goanvec et al., 2004). Pela análise de citometria em *P. vimboides* e pela relação estabelecida entre o índice de danos no DNA e a área da célula, infere-se que a FSOD tenha efeitos genotóxicos para a espécie estudada.

#### 4.1.3 TESTE MICRONÚCLEO

Alterações nucleares têm sido estudadas em peixes como biomarcadores de danos genotóxicos, tanto em condições de laboratório quanto em campo (Al-Sabati e Metcalfe, 1995; Çavas e Ergene, 2003). Assim, o teste micronúcleo torna-se uma importante ferramenta para avaliar a poluição ambiental e os efeitos de diferentes compostos químicos nos organismos (Ergene et al., 2007). Os dados obtidos pelo teste de micronúcleo písceo e o registro de alterações morfológicas nucleares em avaliações genotóxicas confirmam sua utilidade e eficiência em estudos de biomonitoramento (Rao et al., 1997).

Embora alguns mecanismos relacionados aos micronúcleos não estejam inteiramente explicados, a literatura sugere que essas alterações morfológicas nucleares possam ser induzidas em resposta à exposição aos agentes genotóxicos (Serrano-Garcia e Montero-Montoya, 2001; Ferraro et al., 2004). É possível que a formação de alterações nucleares seja decorrente de problemas durante a segregação das cromátides no processo de divisão celular, ou mesmo durante a amplificação gênica (Ferraro et al., 2004).

Segundo Buschini et al. (2004), micronúcleos são considerados o ponto final (*edpoint*) da genotoxicidade, uma vez que, podem surgir após divisão celular. Como esta divisão é menor em indivíduos maduros, os mesmos tendem a responder pouco ao referido teste.

Após exposição a HPAs e ao naftaleno, as espécies *Dicentrarchus labrax* (Gravato e Santos, 2002) e *Anguilla anguilla* (Teles et al., 2003) apresentaram baixa quantidade de micronúcleo. Esses resultados estão em concordância com o presente estudo no qual foram constatados muitos eritrócitos sem micronúcleos, principalmente, para *P. vimboides* expostos à diluição 1:1000 da FSOD em 24h e 96h.

Çavas e Ergene (2003) demonstraram a indução de alterações em eritrócitos de *O. niloticus* expostos a resíduos de refinaria do petróleo. *Prochilodus lineatus* expostos à FSOD de forma aguda (6h, 24h, 96h) e sub-crônica (15 dias) obtiveram um aumento considerável na frequência de micronúcleos em todas as exposições, quando estes foram comparados aos respectivos controles-negativos. Este fato foi atribuído aos possíveis compostos com potencial clastogênico e/ou aneugênico presentes na FSOD testada (Vanzella et al., 2007). Para *P. vimboides* expostos à diluição 1:100 no tempo 96h, é sugerido, por meio da mediana, um aumento de micronúcleos em relação ao controle e às demais diluições da FSOD.

Barsiene et al. (2004) constataram em eritrócitos de peixes, *Scophthalmus maximus*, expostos a 0,5ppm de óleo cru, um aumento de micronúcleo em relação ao controle. Quando HPAs foram adicionados ao óleo cru, a indução de micronúcleos foi ainda maior. Neste caso, foi remetida a idéia de HPAs como potenciais compostos genotóxicos. A quantidade de micronúcleos em *S. maximus* variou de 0 a 1,6 para contagem de 1000 células por lâmina. Tais valores corroboram com os obtidos em *P. vimboides* que apresentaram poucos micronúcleos, de 0 a 2, em contagem similar.

Uma análise do teste micronúcleo foi realizada em eritrócitos de *Cyprinus carpio* e *Oncorhynchus mykiss*. Foram utilizados dois agentes mutagênicos, um de ação direta e o outro, indireta. A presença de micronúcleos foi maior entre os animais expostos às maiores concentrações dos agentes (Kim e Hyun, 2006). Santos et al. (dados não publicados) constataram em peixe marinho, *Hippocampus reidi*, expostos às diluições 1:500 e 1:100 da FSOD durante 96h, um aumento no número de micronúcleos em relação aos peixes de 24h. Em comparação aos outros trabalhos, é provável que o teste

micronúcleo em *P. vimbooides* expostos à FSOD não tenha sido suficiente para detectar alterações celulares, fato que pode estar relacionado ao reparo de danos durante o processo de divisão celular.

## 4.2 EFEITOS BIOQUÍMICOS

### 4.2.1 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE E ALANINA AMINOTRANSFERASE (AST E ALT)

Biomarcadores bioquímicos e fisiológicos têm sido aplicados para detectar danos em organismos, comunidades e ecossistemas (López-Barea e Pueyo, 1998). Enzimas hepáticas (por exemplo, AST e ALT) têm sido usadas como uma indicação de danos nos tecidos ou alterações metabólicas induzidas por contaminantes (Teles et al., 2003).

Sob a visão biológica, AST e ALT são enzimas que catalisam a remoção do grupo amino ( $\text{NH}_3$ ) de um composto carbonado para outro, funcionando tanto na degradação quanto na biossíntese de aminoácidos (Fivelstad et al., 1995). Assim, tais enzimas tornam-se ferramentas úteis no acompanhamento do impacto de estressores antrópicos sobre os peixes (Teles et al., 2003).

Para tilápia, *Oreochromis mossambicus*, durante exposição aguda (96h-CL50) a hidrocarbonetos (naftaleno, tolueno) não foi observada qualquer alteração nas atividades da AST e ALT no fígado ou no músculo. No entanto, considerando 10 semanas de exposição crônica subletais (50% 24h-CL50), houve um aumento na atividade enzimática em ambos os tecidos. Esta mudança foi acompanhada de alguns grupos por níveis reduzidos de tecido de proteínas solúveis e aminoácidos livres, o que sugere maior proteólise tecidual nesta tilápia sob estresse subletal (Dangé, 1986).

Trabalhos *in situ* também utilizam biomarcadores enzimáticos. A fim de analisar os efeitos induzidos por contaminantes presentes na água de Pateira de Fermentelos (Portugal), Teles et al. (2007) utilizaram exemplares de *Anguilla anguilla* L. (enguia europeia) como bioindicadores. As enguias foram confinadas por 48h em quatro locais, diferindo em suas distâncias da principal fonte de poluição conhecida. Em termos de respostas hepáticas, não foram observadas alterações significativas para a atividade transaminase, em especial, AST.

Em estudo sobre o efeito da água contaminada (em especial, com ciclohexano) no sistema celular de *Clarias gariepinus*, ensaios enzimáticos padrões foram conduzidos por AST e ALT. Os peixes permaneceram em água contaminada durante um período de 56 dias. Foi observado um aumento significativo na atividade de enzimas plasmáticas dos organismos mantidos em água contaminada, quando estes foram comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Considerando que tenha havido uma transposição de enzimas para o fluido extracelular, a elevada atividade de enzimas plasmáticas remete à idéia de que água contaminada tenha causado danos aos *C. gariepinus* (Adeyemi, 2009).

Uma vez que, em sua maioria, *P. vimboides* não apresentaram diferença significativa em relação ao controle e entre os tempos de exposição, os resultados obtidos por Dangé (1986), Teles et al. (2007) e Adeyemi (2009) corroboram com o presente estudo. Diante do exposto anteriormente para outros peixes, existe a possibilidade para *P. vimboides* de que enzimas, em especial AST e ALT, tenham maior significância em relação à sua atividade a partir de uma exposição que, considere os efeitos do contaminante por períodos maiores (dias ou semanas). A completar esta idéia, segundo Fivelstad et al. (1995), um pequeno aumento nos valores de AST e ALT em relação ao controle e a não diferença entre os tempos, sugere um estado de baixo nível de estresse, ou ainda, uma adaptação do organismo ao contaminante, neste caso, à FSOD.

#### 4.3 EFEITOS FISIOLÓGICOS

##### 4.3.1 BIOACUMULAÇÃO DE COBRE

A toxicidade aguda do cobre tem sido avaliada em diversas espécies tropicais como *P. scrofa* (Mazon e Fernandes, 1999) e *P. vimboides* (Gomes et al., 2009). A respeito do último trabalho, a concentração letal de cobre para *P. vimboides* foi cerca da metade do que para *Leporinus macrocephalus*, evidenciando a sensibilidade daquela espécie aos efeitos do cobre (Gomes et al., 2009).

Peixes do gênero *Prochilodus* podem apresentar respostas similares quanto à toxicidade do cobre, o que os torna potenciais bioindicadores (Gomes et al., 2009). No presente estudo, dentre os metais da FSOD, o cobre foi o mais abundante; sugerindo uma interação desse metal com as brânquias dos organismos analisados.

Um dos primeiros órgãos relacionados aos poluentes aquáticos são as brânquias, devido ao contato direto com o ambiente. O contato com os metais ativa a hipersecreção de muco nas brânquias que serve como mecanismo de proteção contra a absorção dos metais por meio de quelatação (formação de complexo com o cobre de forma a reduzir sua toxicidade) (Heath, 1995). Porém, esse mesmo mecanismo benéfico para reduzir o efeito tóxico do contaminante, acaba sendo prejudicial para o peixe, pois pode impedir as trocas gasosas e causar desordem na osmorregulação (Heath, 1995).

Martins e Bianchini (2008) constataram para *Trachinotus marginatus* expostos a uma concentração letal de cobre, que após 6h de exposição houve saturação do metal, indicando que os sítios de ligação do cobre nas brânquias pudessem ter sido completamente ocupados nas primeiras horas de exposição. Mazon (1997) observou o acúmulo de cobre em *P. scrofa* expostos à baixas concentrações do metal. Para tais trabalhos, infere-se que o cobre em pouco tempo e em baixas concentrações pode acumular no organismo.

Os resultados obtidos por Martins e Bianchini (2008) e Mazon (1997) diferem dos obtidos para *P. vimboides* expostos às diluições 1:1000, 1:500 e 1:100 da FSOD, durante 24h e 96h. No presente estudo, apesar da concentração de cobre nas brânquias ter variado de 0 a 0,45mg/uL, não houve bioacumulação do metal. Esta constatação pode ser explicada pela análise estatística. Peixes expostos às diluições da FSOD não apresentaram diferença significativa em relação ao controle e nem em relação aos tempos de amostragem. Assim, não é possível afirmar, pela análise do cobre nas condições testadas, que a FSOD tenha causado efeitos negativos na fisiologia de *P. vimboides*.

## 5 CONCLUSÃO

A frequência de células danificadas e o índice de danos para o ensaio cometa, foram inversamente proporcionais às diluições (1:1000; 1:500 e 1:100) e diretamente proporcionais ao tempo de exposição (24h e 96h) a FSOD. *P. vimboides* expostos a maiores diluições da FSOD e por pouco tempo, apresentaram menos danos no DNA dos eritrócitos. A relação entre a área do nucleóide e o índice de danos reforçou a idéia do ensaio cometa como biomarcador para *P. vimboides* expostos à FSOD. Simultaneamente, foi apresentado um método complementar ao ensaio cometa: a citometria. O teste do

micronúcleo mostrou-se pouco eficiente para os estudos de contaminação por FSOD utilizando a espécie *P. vimboides* como bioindicadora. As atividades das enzimas AST e ALT não diferiram para os tempos de amostragem, 24h e 96h. Não houve bioacumulação de cobre para *P. vimboides* expostos às diluições 1:1000, 1:500 e 1:100 da FSOD. Os efeitos genotóxicos da fração solúvel do óleo diesel (FSOD) foram mais evidentes que os efeitos bioquímicos e fisiológicos em *P. vimboides* durante exposição aguda.

## 6 REFERENCIAS

Adeyemi, O., Oloyede, O. B., Oladiji, A. T., Adebayo, E. A., 2009. Effect of water contaminated with phthalate, benzene and cyclohexane on *Clarias gariepinus* cellular system. Food. Chem. Toxicol. 47, 194 - 944.

Akcha, F., Vincent Hubert, F., Pfohl-Leszkowicz, A., 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. Mutat. Res. 534, 21 - 32.

Al-Sabati, K., Metcalfe, C. D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutat. Res. 343, 121 - 135.

Amado, L. L., Robaldo, R. B., Geracitano, L., Monserrat, J. M., Bianchini, A., 2006. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). Mar. Poll. Bull. 52, 207 - 213.

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. Aquat. Toxicol. 78, 99 - 104.

Bocking, A., 1995. DNA measurement: When and why? In.: Compendium on Quality Assurance, Proficiency Testing and Workload Limitations in Clinical Cytology. Chicago, USA, 170 - 88.



Bocking, A., Nguyen, V. Q. H., 2004. Diagnostic and prognostic use of DNA image cytometry in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma. *Cancer. Cytopathol.*102 (1), 41 - 54.

Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, 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. *Mutat. Res.* 557, 119 - 129.

Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Guertin, D. A., Chang, J. H., Lindquist, R. A., Moffat, J., Golland, P., Sabatini, D. M., 2006. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome. Biol.* 7(10), 100 - 110.

Casal, C. M. V., Torres, A. G. (Edts)., 2009. *Prochilodus vimboides*. FishBase. Downloaded: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).

Collins, R. A., Ai-Guo, M., Duthie, S. J., 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in Human Cells. *Mutat. Res.* 336, 69 - 77.

Çavas, T., Ergene, S. G., 2003. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutat. Res.* 534 (1-2), 93 - 99.

Dangé, A. D., 1986. Metabolic effects of naphthalene, toluene or phenol intoxication in the cichlid fish tilapia, *Oreochromis mossambicus*: changes in aminotransferase activities. *Environ. Pollut. A.* 42(4), 311 - 323.

Ergene, S., Çavaş, T., Çelik, A., Köleli, N., Kaya, F., Karahan, A., 2007. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology.* 16, 385 - 391.

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. *Mutat. Res.* 428, 271 - 283.

Ferraro, M. V. M., Fenocchio, A. S., Mantovani, M. S., Ribeiro, C. O., 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. *Genet. Mol. Biol.* 27(1), 103 - 107.

Fivelstad, S., Schwartz, J., Stromsnes, H., 1995. Sublethal effects and safe levels of ammonia seawater for Atlantic salmon postemolts (*Salmo salar* L.). *Aquacult. Eng.* 14(3), 271-280.

Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B. P., 2009. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat. Res.* 681, 80 - 92.

Frenzilli, G., Scarelli, V., Del Barga, I., Nigro, M., Förling, L., Bolognesi, C., Sturve, J., 2004. DNA in eelpout (*Zoarces viviparous*) from Göteborg harbour. *Mutat. Res.* 552, 187 - 195.

Goanvec, C., Theron, M., Poirier, E., Le Floch, S., Laroche, J., Nonnotte, I., 2004. Evaluation of chromosomal damage by flow cytometry in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) exposed to fuel oil. *Biomarkers.* 9(6), 435 - 446.

Gomes, L. C., Chippari-Gomes, A. R., Oss, R. N., Fernandes, L. F. L., Magris, R. A., 2009. Acute toxicity of copper and cadmium for piauçu, *Leporinus macrocephalus*, and curimatã, *Prochilodus vimboides*. *Acta Sci., Biol. Sci. (Online).* 31, 313 - 315.

Grady, A. W., McLaughlin, R. M., Caldwell, C. W., Schmitt, C. J., Stalling, D. L., 2006. Flow cytometry, morphometry and histopathology as biomarkers of benzo[a]pyrene exposure in brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*). *J. Appl. Toxicol.* 12(3), 165 - 177.

Gravato, C., Santos, M. A., 2002. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. *Ecotox. Environ. Safe.* 51, 115 - 127.

Lemos, N. G., Dias, A. L., Silva-Souza, A. T., Mantovani, M. S., 2005. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. Environ. Toxicol. Phar. 19(2), 197 - 201.

Hardie, D. C., Gregory, T. R., Hebert, P. D. N., 2002. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. J. Histochem. Cytochem. 50 (6), 735 - 749.

Heath, A. G., 1995. Water pollution and fish physiology. 2.ed. CRC Press, Lewis publishers. 342p.

Jha, A. N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. Mutagenesis. 23, 207 - 221.

Kennedy, C. J., Farrell, A. P., 2005. Ion homeostasis and interregional stress responses in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasii*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 323, 43 - 56.

Kim, I., Hyun, C. K., 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. Ecotox. Environ. Safe. 64, 288 - 297.

Kimball, R. E., 1996. Flow cytometric analysis of lymph node metastases in advanced ovarian cancer: clinical and biologic significance. Am. J. Obstet. Gynecol. 176, 1319 - 1327.

Kobayashi, H., Suguyama, Y., Morikawa, M., Hayashi, T., Sofuni, A., 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis, MMS Commun. 3, 103 - 115.

López-Barea, J., Pueyo, C., 1998. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. Mutat. Res. 399, 3 - 15.

Martins, S. E., Bianchini, A., 2008. Cooper accumulation and toxicity in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832 (Teleostei, Carangidae). Pan. Am. J. Aquati. Sci. 3(33), 384 - 390.

Mazon, A. F., 1997. Efeitos do íon cobre sobre o curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). Dissertação de Mestrado, UFSCAR, São Carlos, 160p.

Mazon, A. F., Fernandes, M. N., 1999. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). Environ. Contam. Toxicol., 63, 797 - 804.

Menezes, A. C. L., 2005. Toxicidade do cobre sobre tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH8. Dissertação de Mestrado, INPA/UFAM, Manaus, 68p.

Nelson, J. S., 2006. Fishes of the World. 4 ed. John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ: 601p.

Nickum, J. G., Bart, H. L., Bowser, P. R., Greer, I. E., Hubbs, C., Jenkins, J. A., MacMillan, J. R., Rachlin, J. W., Rose J. D., Sorensen, P. W., Tomasso, J. R., 2004. Guidelines for the use of fishes in research. American Fisheries Society, Bethesda, MD.

Ortí, G., Arjun, A., Bermingham, E., 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. Molecular Ecology. 10, 407 - 417.

Pandrangi, R., Petras, M., Ralph, S., Vrzoc, M., 1995. Alkaline Single Cell Gell (comet) assay ang genotoxicity monitoring using bulheads and carp. Environ. Mol. Mutagen. 26, 345 - 356.

Rao, S. S., Neheli, T., Carey, J. H., Cairns, V. W., 1997. Fish hepatic micronuclei as an indication of exposure to genotoxic environmental contaminants. Environ. Toxicol. Water Qual. 12, 217 - 222.

Santos, C. A., Simões, L., Gomes, L. C., 2010 (dados não publicados). Genotoxic effects of diesel water-soluble fraction on the seahorse, *Hippocampus reidi* (Gisnburg, 1933) during acute exposure. Neotrop. Ichthyol.

Serrano-Garcia, L., Montero-Montoya, R., 2001. Micronuclei and chromatine buds are related genotoxic events. Environ. Mol. Mutagen. 38, 38 - 45.

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. Ecotoxicol. Environ. Safe. 69 (1), 112 - 120.

Singer, M. M., Aurand, D., Bragin, G. E., Clarks, J. R., Coelho, G. M., Sowby, M., Tjeerdema, L., 2000. Standardization of the Preparation and Quantitation of Water accommodated Fractions of Petroleum for Toxicity Testing. Mar. Pollut. Bull. 40(11),1007 - 1016.

Solé, M., Lima, D., Reis-Henriques, M. A., Santos, M. M., 2008. Stress biomarkers in Juvenile Senegal Sole, *Solea senegalensis*, exposed to the Water-Accommodated Fraction of the "Prestige" Fuel Oil. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 80, 19 - 23.

Speit, G., Hartmann, A., 1995. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). Mutagenesis. 10, 555 - 559.

Teles, M., Pacheco, M., Santos, M. A., 2003. *Anguilla anguilla* L. liver EROD, GST, erythrocytic nuclear abnormalities and endocrine responses to naphthalene and  $\beta$ -naphthoflavone. Ecotoxicol. Environ. Safe. 55, 98 - 107.

Teles, M., Pacheco, M., Santos, M. A., 2007. Endocrine and metabolic responses of *Anguilla anguilla* L. caged in a freshwater-wetland (Pateira de Fermentelos-Portugal). Sci. Total. Environ. 372, 562 - 570.

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. Environ. Mol. Mutagen. 35 (3), 206 - 221.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 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. *Mut. Res.* 63, 36 - 43.

Zhang, J. F., Wang, X. R., Guo, H. Y., Wu, J. C., Xue, Y. Q., 2004. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 58 (1), 110 - 116.

#### IV-CONCLUSÃO GERAL

Cavalo-marinho, *H. reidi*, e curimatã, *P. vimboides* apresentaram alterações no DNA dos eritrócitos, evidenciando alguns efeitos genotóxicos da FSOD para as duas espécies durante exposição aguda. Nos tempos de amostragem (24h e 96h), sob uma ótica bioquímica e fisiológica, não foi possível prever os efeitos negativos da FSOD para *P. vimboides* ainda que tenham sido utilizados potenciais biomarcadores, como enzimas (AST e ALT) e órgãos (brânquias).

## ANEXO 1

Aquisição do óleo diesel e  
preparação da fração solúvel de óleo diesel (FSOD)





Figura 1. Aquisição do óleo diesel comercial. (A) Posto de combustível, bandeira-branca, do qual o óleo diesel foi adquirido. (B) Material usado no teste de densidade do óleo diesel a fim de certificar a qualidade da substância. (C) Armazenamento do óleo diesel em recipiente coberto por saco plástico preto a fim de manter estáveis propriedades físico-químicas do óleo. Observação: novo óleo diesel a cada experimento, tanto para cavalo-marinho, *Hippocampus reidi*, quanto para curimatã *Prochilodus vimboides*.



Figura 2. Preparação da fração solúvel do óleo diesel (FSOD). (A) Adição de água em balão volumétrico contendo 5g de óleo diesel até completar o volume de 1L. (B) Homogeneização da mistura (água + óleo diesel) em agitador magnético, por 24h. (C) Descarte do óleo diesel com auxílio de pipeta. (D) Separação da FSOD para uso imediato. Observação: nova fração solúvel de óleo diesel (FSOD) a cada experimento, tanto para cavalo-marinho, *Hippocampus reidi*, quanto para curimatã, *Prochilodus vimboides*.

## ANEXO 2

Aparelhos, procedimentos e testes aplicados

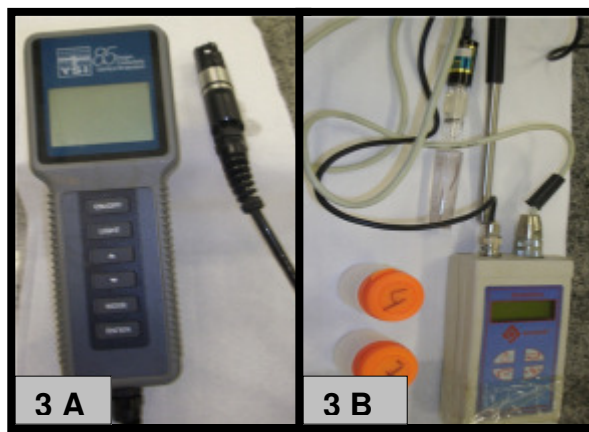


Figura 3. Aparelhos usados na análise de parâmetros físico-químicos da água. (A) Multiparâmetro YSO 085 que analisa condutividade, oxigênio dissolvido e salinidade. (B) pHmetro digital. Observação: usado na água dos bioensaios e da aclimatação, tanto para cavalo-marinho, *Hippocampus reidi*, quanto para curimatã, *Prochilodus vimboides*, expostos ou não à fração solúvel do óleo diesel (FSOD).

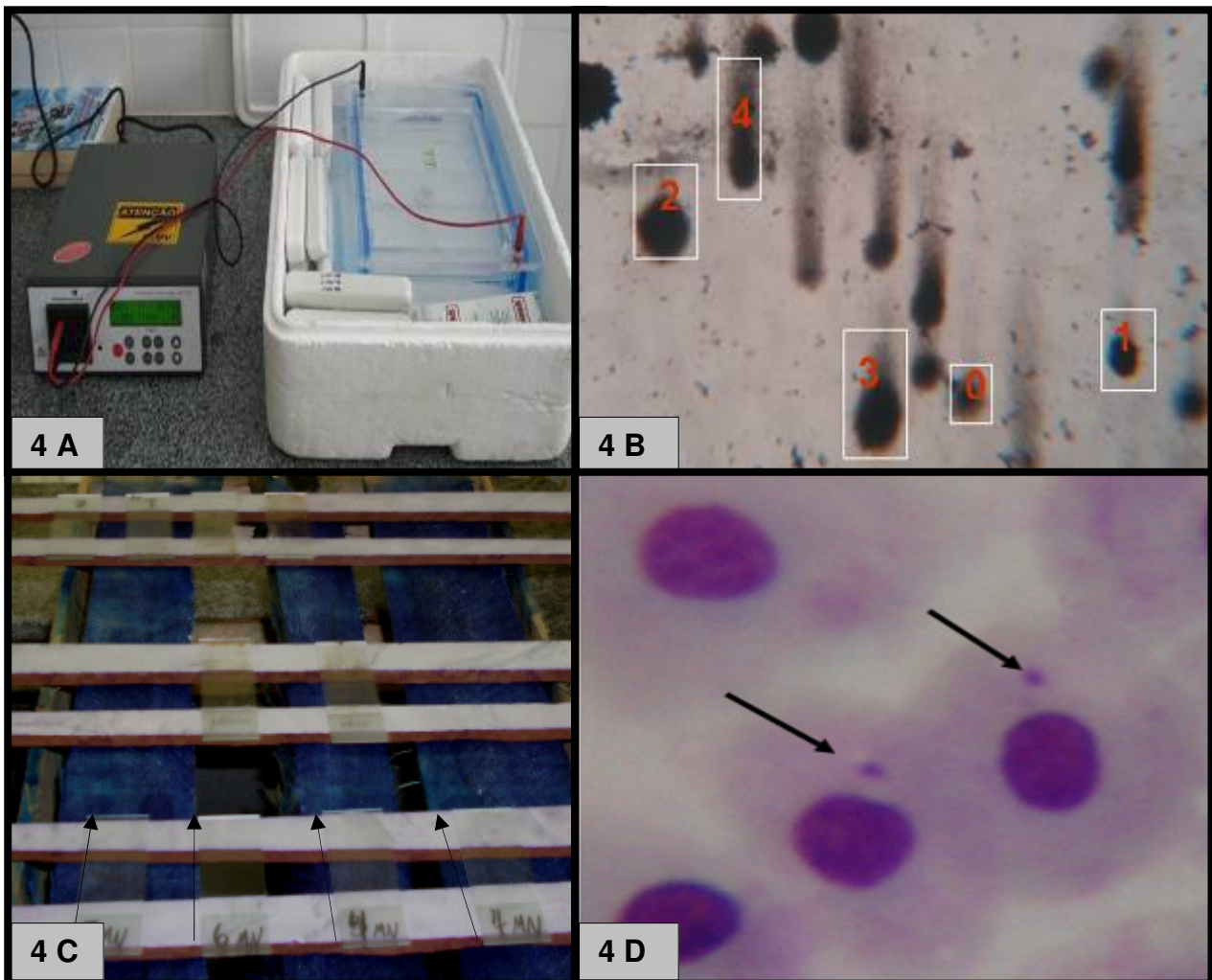


Figura 4. Algumas etapas dos testes genotóxicos e visualização de danos em microscópio óptico. (A) Procedimento de eletroforese do ensaio cometa (foto: Larissa Novaes). (B) Visualização de danos no DNA; números 0, 1, 2, 3 e 4 indicam, respectivamente, ausência de danos, danos leves, danos moderados, danos pouco severos e severos. Quanto maior o dano, maior a cauda (foto: Michel Galão). (C) Procedimento de fixação e coloração do teste micronúcleo, lâminas contendo extensões sanguíneas foram dispostas perpendicularmente ao estrado branco como mostram as setas. (D) Visualização de micronúcleos apontados pelas setas (foto: Bruno Ferreira). Observação: Etapas realizadas tanto para eritrócitos de cavalo-marinho, *Hippocampus reidi*, quanto para os eritrócitos de curimatã, *Prochilodus vimboides*, expostos à fração solúvel do óleo diesel (FSOD), durante exposição aguda.

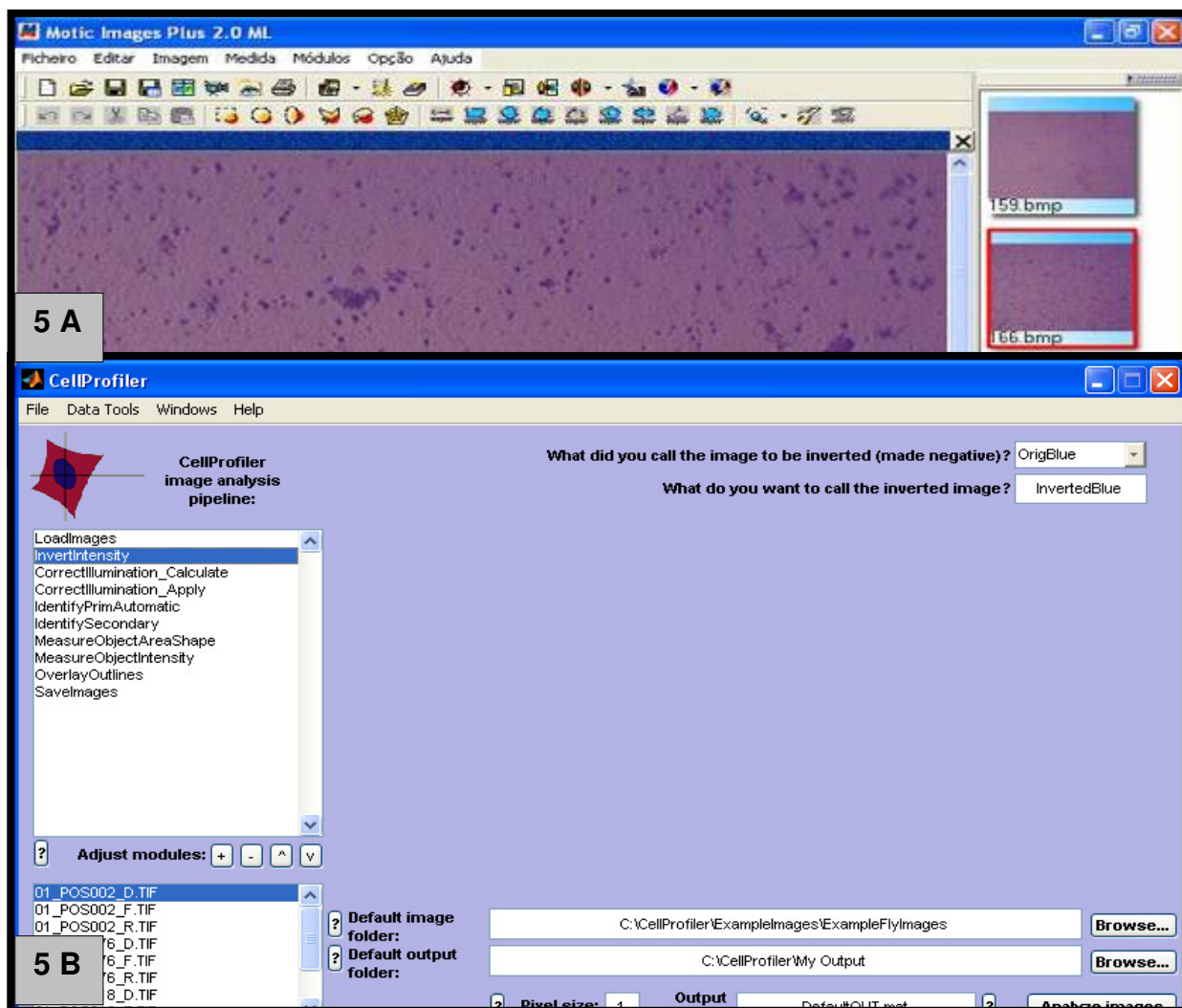


Figura 5. Algumas etapas do método citometria de imagem. (A) Captura de imagens por software, lâminas com os eritrócitos. (B) Programa Cell Profiler, com função de determinar a área das células. Observação: usado para curimatã, *Prochilodus vimboides*, expostos à fração solúvel do óleo diesel (FSOD), durante exposição aguda.

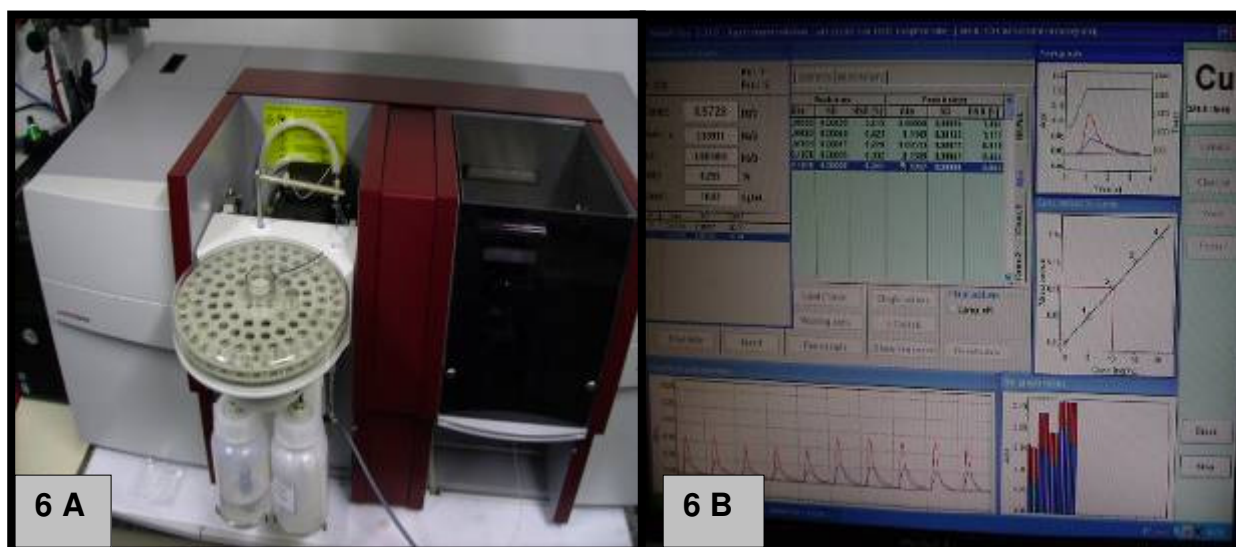


Figura 6. Aparelhos usados no teste de bioacumulação de cobre em brânquias (A) Espectrofotômetro de absorção atômica (EAA) (B) Software acoplado ao EAA que realiza leitura de cobre. Observação: usado para curimatã, *Prochilodus vimboides*, expostos à fração solúvel do óleo diesel (FSOD), durante exposição aguda.

## ANEXO 3

Organismos-teste: cavalo-marinho, *Hippocampus reidi* e curimatã, *Prochilodus vimboides*



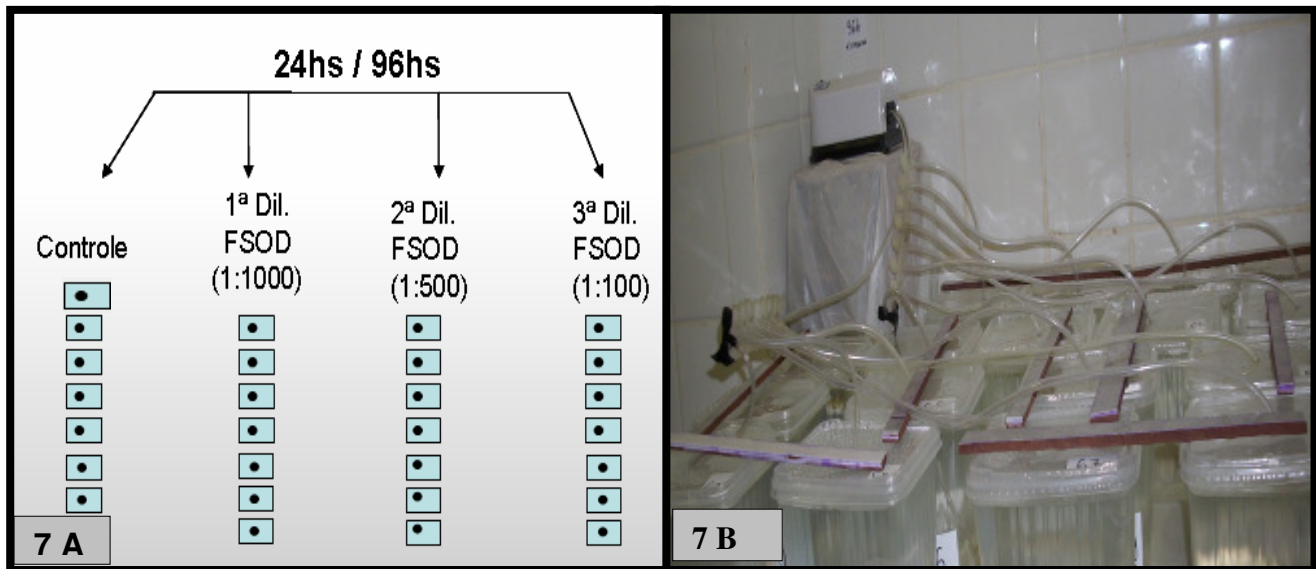


Figura 7. Delineamento experimental. (A) Desenho esquemático para 24h e 96h, considerando quatro tratamentos (controle, 1:1000, 1:500, 1:100) tanto para cavalo-marinho, *Hippocampus reidi*, quanto para curimatã, *Prochilodus vimboides*. Um peixe por aquário é representado por cada ponto no retângulo verde. Número amostral de cavalo-marinho e curimatã diferentes, sendo 7 e 9, respectivamente. (B) Disposição assimétrica dos bioensaios, modelo válido para as duas espécies estudadas (Foto: Frederico Delunardo).

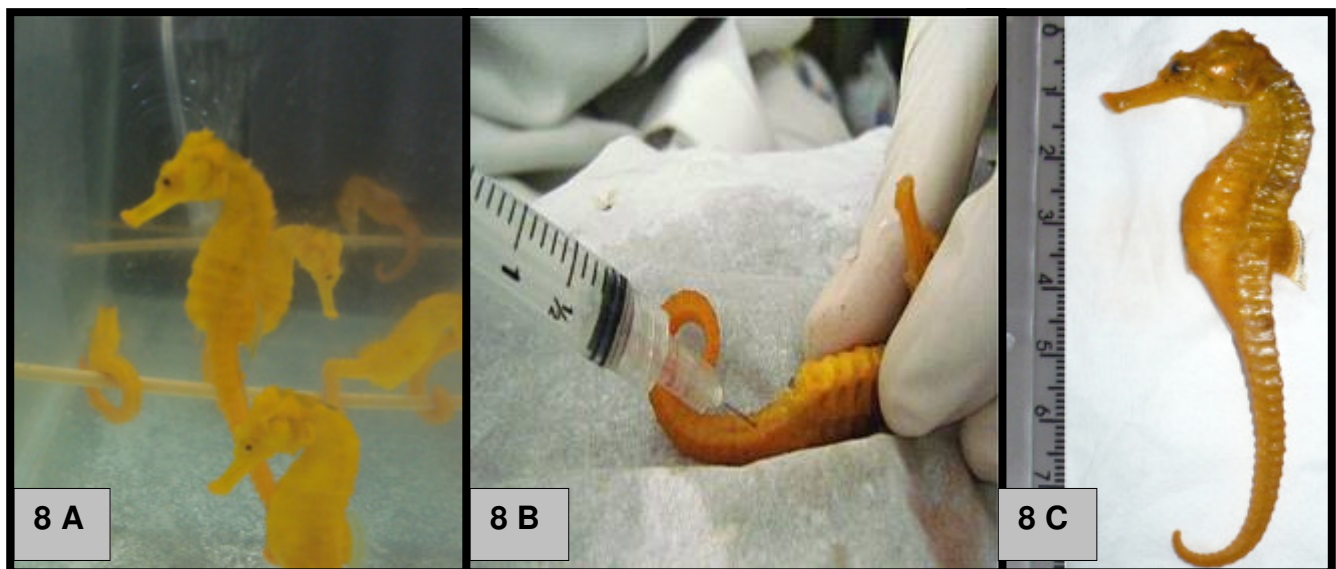


Figura 8. Organismo-teste cavalo-marinho, *Hippocampus reidi*. (A) Aclimação em aquários de 30L contendo 25L de água marinha ajustada para salinidade 30. (B) Coleta de sangue por punção da veia caudal usando seringa com agulha heparinizada. (C) Biometria de *H. reidi* (Fotos A, B, C: Bruno Ferreira).

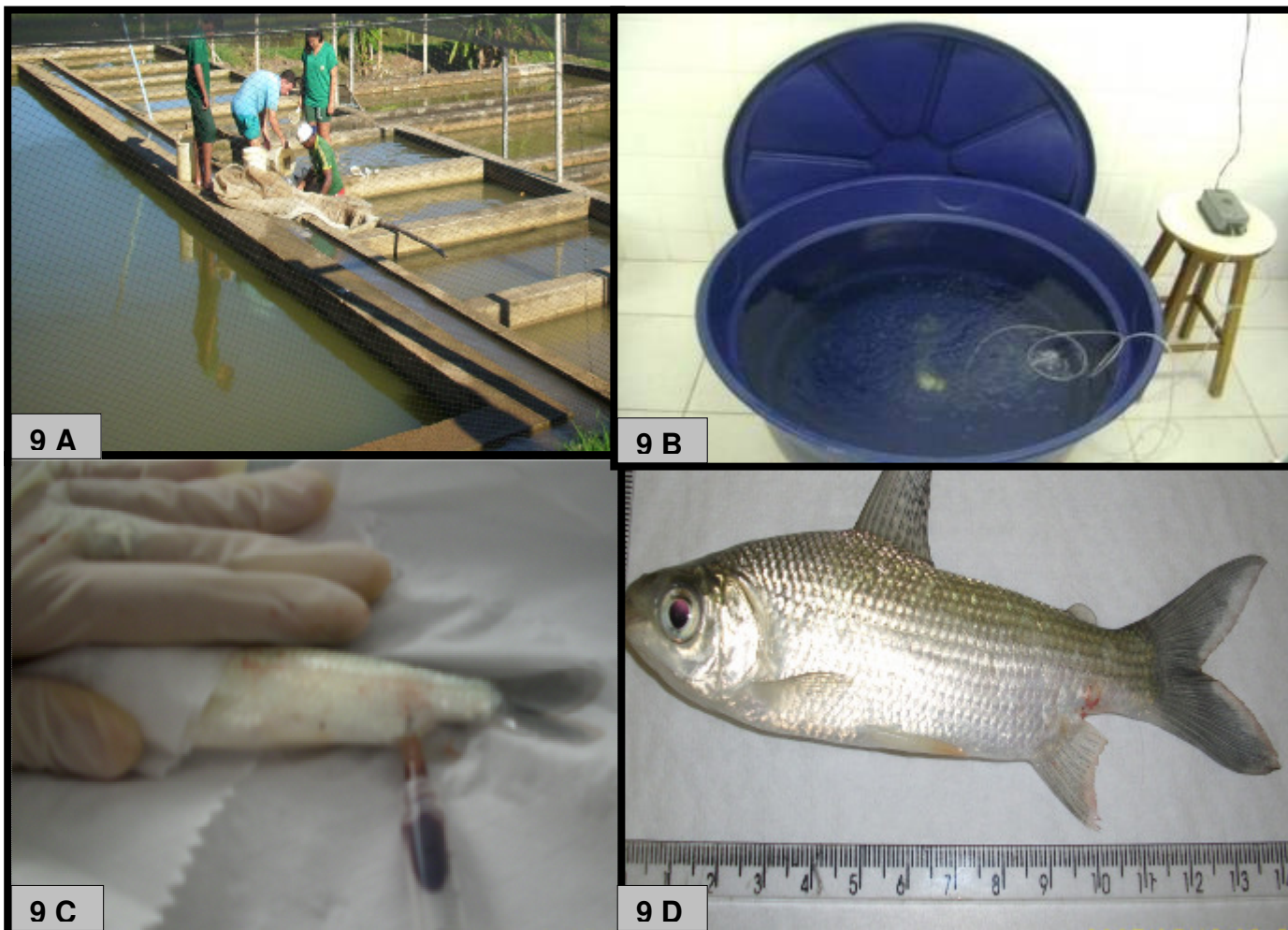


Figura 9. Organismo-teste curimatã, *Prochilodus vimboides*. (A) Peixes provenientes de tanques-rede da Escola Agrotécnica Federal de Colatina (EAFCOL), Espírito Santo, Brasil. (B) Aclimação em tanque de 500L contendo igual volume de água dechlorada (C) Coleta de sangue por punção da veia caudal usando seringa com agulha heparinizada. (D) Biometria de *P. vimboides*. (Fotos C e D: Frederico Delunardo).