



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DÉBORA LACHNER

**ENSAIOS IN VITRO COM A LINHAGEM CELULAR ZF-L
PARA ANÁLISE DOS EFEITOS DE GASOLINA E
EFLUENTES DE POSTOS DE COMBUSTÍVEL**

Londrina
2013

DÉBORA LACHNER

**ENSAIOS IN VITRO COM A LINHAGEM CELULAR ZF-L
PARA ANÁLISE DOS EFEITOS DE GASOLINA E
EFLUENTES DE POSTOS DE COMBUSTÍVEL**

Trabalho apresentado ao curso de Pós- Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L138e Lachner, Débora.

Ensaio in vitro com a linhagem celular ZF-L para análise dos efeitos de gasolina e efluentes de postos de combustível/ Débora Lachner. – Londrina, 2013.
61 f.: il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia

1. Células – Peixe – Modelos biológicos – Teses. 2. Organismos aquáticos – Teses. 3. Hidrocarbonetos – Teses. 4. Água – Poluição – Teses. 5. Citotoxicidade – Teses. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 597

DÉBORA LACHNER

**ENSAIOS IN VITRO COM A LINHAGEM CELULAR ZF-L PARA
ANÁLISE DOS EFEITOS DE GASOLINA E EFLUENTES DE POSTOS
DE COMBUSTÍVEL**

Trabalho apresentado ao curso de Pós- Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis
Martinez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra.. Silvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Marta Marques de Souza
Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Londrina, 9 de abril de 2013.

Este trabalho é dedicado aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é um sentimento nobre, que nos permite voltar àqueles que, de alguma forma, estiveram presentes em momentos de necessidade. Compartilhamos os dias ruins e agora o sucesso é de vocês também. Assim gostaria de deixar aqui registrado os meus sinceros agradecimentos:

- À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas;

- Ao CNPq, Capes e ao Instituto de Ciência e Tecnologia-Toxicologia Aquática/CNPq pelo apoio financeiro e ao último, pela concessão da bolsa de mestrado;

- À Prof. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez, por ter acolhido uma completa desconhecida no seu laboratório, obrigada pelo voto de confiança. Obrigada também por todas as oportunidades, pelos ensinamentos, pelo incentivo e investimento em mim. Por ser exemplo de competência e dedicação, muito obrigada!;

- À Prof. Dra. Marta Marques de Souza, pela incrível contribuição ao trabalho e participação nas bancas, tanto da qualificação quanto da dissertação;

- À Prof. Dra. Silvia Helena Sofia, tanto pela ótima contribuição ao trabalho e participação nas bancas de qualificação e dissertação, quanto por ter aberto oportunidades e me mostrado os caminhos no meu primeiro dia de UEL;

- À Prof. Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha, pelas conversas, conselhos e dicas e também por compartilhar as dores de cabeça causadas pela gasolina;

- A todo pessoal do LEFA: vocês são sensacionais! Muito obrigada por tudo que me ensinaram, de contas mirabolantes a aparelhos e toda a rotina laboratorial! Obrigada pelos desabafos, risadas, pelos happy hours, pelas aventuras e viagens. Muito obrigada Bru, Carlos, Déia, Claudinha, Lindalva, Angélica, Carol, Nadjha, Fran, Alexandre, Wagner. Mas algumas pessoas é preciso fazer um agradecimento especialíssimo: à Dalita, por ter me iniciado nos trabalhos com ZF-L e por tudo que me ensinou; à Luciana por todo apoio, ajuda e paciência com os experimentos e procedimentos e também por ter me dado calma e tranquilidade quando as coisas davam errado, muito, muito obrigada!; à Cássia (parenta), por me fazer rir, me deixar alegre sempre; às minhas parceiras de BAV, Fer e Kelly, pelo companheirismo, por compartilhar as experiências, por se preocuparem comigo e com as celulazinhas, por não me deixarem sentir sozinha na hora do estresse; à minha miiga Na, por chorar e sorrir comigo e com as benditas ZF-L, por todas as conversas, risadas, besteiras. Vocês todos foram e são muito importantes!

- Às minhas amigas Kátya R. Passos, Marina R. Antigo, Natália P. Gealh, Máira G. Arroyo, Maria Graziela P. de P. S. Danzmann, pela amizade sincera e verdadeira desde a graduação mas, principalmente, por continuarem assim desde então;

- Aos meus amores, Bárbara Lima e seu Samuca, por serem sempre presentes na minha vida;

- À minha família linda e complicada, que se fez presente em cada momento da minha vida, obrigada por tudo! Especialmente pelas orações e por torcerem tanto por mim;

- Aos meus anjinhos na terra: Paulo, Maria Cristina, Mariana e Daniela Lachner, Ute e Roberto Lachner e Maria Lonardoni. Vocês são os melhores pais, melhores irmãs e melhores avós que existem e eu sou a pessoa mais sortuda desse mundo por ter vocês na minha vida. Obrigada por todo carinho, toda conversa, choro e desabafo, por todo incentivo e paciência, pelas vezes que vocês perguntaram como iam as coisas no laboratório, mesmo sem entender o que eu fazia e por todas (e foram muitas!) as orações para que tudo desse certo;

- Ao meu lindo noivo, José dos Santos Neto, pois sem você não teria conseguido. Quero te agradecer, do fundo do coração por ser o melhor companheiro, o maior parceiro dessa vida. Muito obrigada por todas as manhãs, tardes, noites e madrugadas passadas na UEL, para que eu não ficasse sozinha, por todas as infinitas perguntas a respeito do meu trabalho, pelas ideias e sugestões que, muitas vezes, ajudavam a solucionar o problema da vez e por me ensinar e me ajudar com todas as análises estatísticas. Obrigada por aguentar, mais do que ninguém, meus lamentos, choros e reclamações quando as coisas não iam bem, mas também por vibrar e curtir quando as coisas davam certo. Por isso digo mais uma vez, não teria conseguido sem você! Muito obrigada!;

- Aos meus anjinhos do céu: Bruna Lawin e João Lonardoni, porque eu sei que vocês vêm comigo, aonde quer que eu vá;

- E finalmente a Deus, o responsável por tudo, que em Sua infinita bondade e sabedoria, nos dá o dom da vida e o poder da escolha.

MUITO OBRIGADA SEUS LINDOS!

“A maior sabedoria é ter o presente como objeto maior da vida, pois ele é a única realidade, tudo o mais é imaginação. Mas poderíamos considerar isso nossa maior maluquice, pois aquilo que existe só por um instante e some como sonho não merece um esforço sério”.

Arthur Schopenhauer

LACHNER, D. Ensaios *in vitro* com a linhagem celular ZF-L para análise dos efeitos de gasolina e efluentes de postos de combustível. 2013. 61 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Zoologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

O uso de linhagens celulares é bastante promissor como modelo biológico *in vitro*, tanto para a melhoria do rendimento dos testes de toxicidade quanto para redução dos seus custos. Destaca-se no presente trabalho a utilização da linhagem celular permanente de hepatócitos de *Danio rerio*, denominada ZF-L. Diversos trabalhos comprovam a sensibilidade de ZF-L quando expostas a diversos contaminantes, com a utilização satisfatória de diferentes biomarcadores. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade da fração solúvel em água da gasolina (FSG) e de um efluente de posto de combustível (EF) para ZF-L. Para isso, foi feita a exposição das células por 1, 3 e 6 h a diferentes diluições de FSG e EF. A FSG foi obtida simulando derrame de gasolina em ambiente tropical e o EF foi coletado do último tanque de decantação de um posto de combustível. Antes da exposição foram feitas diferentes diluições das soluções teste em água destilada, com adição dos sais da salina tamponada com fosfato (PBS). Para verificação da citotoxicidade, foram aplicados os testes de viabilidade celular por exclusão do azul de tripan (AT) e o de redução do brometo de dimetiltiazol difeniltetrazólio (MTT), testando as diluições de 5, 10, 25 e 50% dos contaminantes. O controle foi feito expondo as células apenas ao PBS. A partir dos resultados obtidos pelo AT, foram selecionadas as diluições com viabilidade celular maior que 80% para aplicação do ensaio do cometa, quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e capacidade antioxidante total (CAOT). Os resultados da viabilidade celular para ambos os poluentes, tanto para AT quanto para o MTT obedeceram a um padrão de resposta concentração-dependente. Demonstram também a maior citotoxicidade do EF em relação à FSG, provavelmente devido à visível presença de detergentes em sua composição. Para o ensaio do cometa, ERO e CAOT foram selecionadas as diluições de 5, 10 e 25% de FSG e 5 e 10% de EF. Com relação à quantificação de ERO e CAOT, foi verificada menor produção de ERO nas amostras expostas aos poluentes e CAOT aumentada em relação ao controle, demonstrando que nas concentrações e períodos de exposição avaliados as ZF-L aumentaram suas defesas antioxidantes, evitando o estresse oxidativo. O ensaio do cometa indicou a alta genotoxicidade de FSG, com escores de dano próximos ao valor máximo (300), que seguiram um padrão concentração-dependente. No caso das ZF-L expostas ao EF não houve uma relação concentração-dependente na ocorrência de danos no DNA e os escores após 1 h foram maiores que o controle, mas após 6 h foram significativamente menores nas amostras tratadas com EF que no controle, indicando uma possível atuação do sistema de reparo de DNA. Assim, é possível afirmar que o EF apresentou alto potencial citotóxico enquanto a FSG apresentou alto potencial genotóxico para as ZF-L, nas concentrações e nos tempos estudados, e que ZF-L apresenta-se como modelo biológico adequado para verificação da qualidade ambiental.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Estresse oxidativo. Genotoxicidade. Hepatócitos. Hidrocarbonetos.

LACHNER, D. *In vitro* assays using ZF-L cell line to analyze the effects of gasoline water soluble fraction and fuel stations wastewater. 2013. 61 p. Dissertation (Post-Graduation Program in Biological Sciences – Area: Zoology) – State University of Londrina.

ABSTRACT

The development of *in vitro* biological models using cell lines is promising, both for improving the performance of the toxicity test as to reduce its costs. Several studies have confirmed the sensitivity of ZF-L, a permanent hepatocyte cell line of *Danio rerio*, when exposed to various contaminants, with the satisfactory use of different biomarkers. The aim of this study was to evaluate the toxicity of the gasoline water soluble fraction (GSF) and an effluent from a gas station (EF) for ZF-L. For this, ZF-L was exposed for 1, 3 and 6 h to different dilutions of GSF and EF. In order to obtain GSF, a simulation of gasoline spill in a tropical environment was made, and the EF was collected from the last settling tank of a fuel station. These solutions were both diluted in distilled water previously to the exposure of the cells. To check the cytotoxicity, two methods were applied: cell viability (CV) by Trypan Blue exclusion (TA) and dimethylthiazol diphenyltetrazolium bromide reduction (MTT) testing the dilutions of 5, 10, 25 and 50% of contaminants. The control cells were exposed only to phosphate buffered saline (PBS). With the results from TA, the dilutions with more than 80% CV were selected to proceed with comet assay, quantification of reactive oxygen species (ROS) and total antioxidant capacity (TAC). The CV results for both pollutants evaluated with AT and MTT methods showed a concentration-dependent response. They also demonstrated greater cytotoxicity of EF compared to GSF, probably due to the visible presence of detergent in its composition. In order to run the comet assay, ROS and TAC the following dilutions were selected: 5, 10 and 25% of GSF and 5 and 10% EF. Regarding the quantification of ROS and TAC, the results showed lower production of ROS in samples exposed to pollutants together with an increase in TAC in comparison to control, suggesting that at the concentrations and exposure periods evaluated in this work, the ZF-L increased their antioxidant defenses, preventing oxidative stress. The comet assay results indicated the genotoxic potential of GSF, since the scores of DNA damage were close to the maximum value (300), and also followed a concentration-dependent standard. As for the ZF-L cells exposed to EF the results showed that after 1 h the scores were higher than in control cells, but after 6 h they were significantly lower in samples exposed to EF in comparison to respective control, indicating a possible role of DNA repair system. In conclusion, it was demonstrated that EF has a cytotoxic potential while FSG showed high genotoxic potential for ZF-L, at the concentrations and exposure times evaluated in this study, and ZF-L appears as a biological model suitable for the assessment of environmental quality.

Keywords: Cytotoxicity. Genotoxicity. Hepatocytes. Hydrocarbons. Oxidative stress.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	17
	2.1 Objetivos gerais	17
	2.2 Objetivos específicos.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
	3.1 Manutenção de ZF-L.....	18
	3.2 Padronização dos testes <i>in vitro</i>	18
	3.3 Substancias teste	19
	3.4 Preparo e exposição.....	20
	3.5 Testes de citotoxicidade.....	22
	3.6 Ensaio do cometa	23
	3.7 Quantificação de ERO e determinação da capacidade antioxidante total (CAOT).....	24
	3.8 Análise estatística	26
4	MANUSCRITO: Ensaio <i>in vitro</i> com a linhagem celular ZF-L para análise dos efeitos de gasolina e efluentes de postos de combustível	27
	4.1 Introdução.....	29
	4.2 Material e Métodos.....	30
	4.3 Resultados	35
	4.4 Discussão	46
	Agradecimentos	49
	Referencias	49
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Diversas portarias e normas brasileiras regulamentam a respeito da qualidade da água. Dentre elas, destaca-se a resolução n° 357 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) a qual estabelece diversos parâmetros para avaliação da qualidade da água. Dentre estes, ressalta-se a importância atribuída aos testes ecotoxicológicos, definidos, nesta resolução, como ensaios para detecção de efeitos deletérios de agentes físicos e químicos nos organismos aquáticos. Isso porque a simples presença de um determinado poluente no ambiente não é representativa do seu efeito nos organismos, visto a diversidade de interações que os compostos podem sofrer.

Então, para uma avaliação efetiva da água e possíveis efeitos prejudiciais aos seres que dela dependem, é necessário que seja feito o biomonitoramento. Define-se como biomonitoramento o uso de respostas de organismos vivos, as quais podem ser sistematicamente medidas, com intuito de avaliar as mudanças ocorridas no ambiente. Esta é uma ferramenta de avaliação da saúde ambiental, que fornece subsídios para a análise integrada da qualidade da água (Buss et al., 2003).

Para a realização do biomonitoramento faz-se necessário o uso de biomarcadores. Neste contexto, define-se como biomarcador qualquer alteração da resposta biológica induzida por xenobióticos em diferentes níveis de organização, desde molecular, histológicas e morfológicas, até comportamentais e no ciclo de vida dos organismos (Peakall, 1994). Os biomarcadores são ferramentas fundamentais para análise e monitoramento do equilíbrio de ecossistemas (Walker, 1996).

Dentre os biomarcadores, os moleculares e celulares apresentam como característica importante a capacidade de antecipar mudanças em níveis biológicos superiores, como populações e comunidades. Por essa razão, podem ser utilizados de forma preventiva, permitindo o desenvolvimento de estratégias de remediação antes da ocorrência de danos ambientais irreversíveis (Cajaraville et al., 2000).

As principais formas de eliminação de um composto tóxico pelo organismo são: excreção na sua forma original ou após biotransformação, a qual ocorre especialmente no fígado, em vertebrados. Este processo visa, através da ação de enzimas, transformar o poluente em um composto mais hidrofílico, facilitando a eliminação. No entanto o poluente pode ser convertido a outro ainda mais danoso às células (Van der Oost, 2003).

Na fase I da biotransformação, um grupo polar é adicionado à molécula do poluente, tornando-a mais solúvel em água, podendo ser eliminada ou utilizada como substrato para as reações da etapa seguinte. As principais enzimas de fase I são as do sistema de oxidases de função mista, como citocromo P450 (Di Giulio et al., 1995). Estas são encontradas principalmente no fígado (Martinez, 2006). A fase II envolve reações de conjugação do poluente a compostos endógenos das células, como o tripeptídeo glutathiona, buscando mais uma vez o aumento da solubilidade em água e eliminação. Dentre as enzimas envolvidas nesse processo, é possível citar a Glutathione S Transferase e UDP Glicuronil Transferases (Martinez, 2006).

Diversos poluentes ou seus metabólitos são capazes de exercer seu efeito tóxico através da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), instituindo, na célula, um desequilíbrio pró-oxidante, também chamado de estresse oxidativo (Monserrat et al., 2007). Este é capaz de causar danos teciduais e celulares, como a degradação de proteínas e danos ao genoma, podendo levar à morte celular (Winston e Di Giulio, 1991; Manduzio et al., 2005). As ERO são moléculas como o ânion radical superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio, eletricamente instáveis e potencialmente reativas (Manduzio et al., 2005).

Para prevenir e impedir prejuízos causados pelo estresse oxidativo, os organismos aeróbicos apresentam mecanismos de defesa antioxidante (Hermes-Lima, 2004; Lushchak, 2011). Alguns exemplos das defesas enzimáticas são: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Além desses, existem os antioxidantes não enzimáticos, como: glutathione reduzida, ácido ascórbico, ácido úrico e tocoferol (Martinez, 2006). As defesas não enzimáticas correspondem a cerca de 70% da capacidade antioxidante das células (Regoli, 2000). O sistema antioxidante trabalha de forma cooperativa e, portanto, determinar a capacidade antioxidante total de determinado tecido pode fornecer informações adequadas e o entendimento da toxicidade causada pelas ERO (Monserrat et al., 2007).

As lesões causadas no DNA da célula também podem ser utilizadas de forma eficiente como ferramentas no monitoramento de efeitos subletais de poluentes em organismos aquáticos (Monteiro et al., 2011), visto que a exposição a baixas concentrações de contaminantes pode ser detectada em uma grande variedade de espécies (Frenzilli et al., 2009). Para esse fim, um teste largamente utilizado é o ensaio do cometa, o qual apresenta capacidade de detectar quebras de fita simples no DNA, em condições alcalinas (Singh et al., 1988). Além de sensível, é um teste rápido que pode ser realizado com a maioria das células eucarióticas e exige relativamente pouca quantidade de células (Jha, 2008).

Devido às suas consequências nos organismos, a contaminação do ambiente aquático é

um fato de extrema importância e, dentre elas, a poluição causada por hidrocarbonetos merece destaque. De acordo com uma pesquisa realizada pela revista *Exame* (2010), em pouco mais de 70 anos foram verificados mais de 80 casos de média e alta gravidade de derramamentos e vazamento de petróleo, os quais lançaram ao ambiente marinho mais de 7 bilhões de litros de este composto. Esta deposição pode ocorrer acidentalmente, por falhas e problemas durante a extração ou transporte, ou deliberadamente, como foi o caso do derrame no Golfo Pérsico durante a Guerra do Golfo, em janeiro de 1991, o maior já relatado até hoje.

Em linhas gerais, o petróleo cru é composto por diversos tipos de hidrocarbonetos, como cadeias aromáticas e alifáticas, cadeias heterocíclicas de nitrogênio e enxofre além de baixas concentrações de alcanos e compostos oxigenados (Nicodem et al., 1997). A irradiação altera a toxicidade do petróleo, visto que os compostos que são transformados pela irradiação podem tornar-se ainda mais tóxicos e solúveis em água, afetando diretamente toda a biota (Nicodem et al., 1997). Outro fator que pode potencializar a contaminação de ambientes atingidos por derramamentos de petróleo é a utilização de dispersantes, os quais aumentam a disponibilidade do poluente no meio aquático (Ramachandran et al., 2004; Jung et al., 2009).

Diversos trabalhos apresentam como efeitos principais da exposição de organismos aquáticos ao petróleo o aumento na expressão e síntese do citocromo P450 e estresse oxidativo (Sturve et al., 2006; Bilbao et al., 2010; Trisciani et al., 2011). Outros efeitos também já foram descritos, como alterações no sistema imunológico (Reynaud e Deschaux, 2005; Bilbao et al., 2010) e na produção de hormônios sexuais (Arukwe et al., 2008), desestabilização da membrana plasmática e diminuição da viabilidade celular (Camus et al., 2003; Martins et al., 2005), acúmulo de metabólitos de hidrocarbonetos na bile e aumento na produção de glutathione S transferase hepática (Jung et al., 2009; Bilbao et al., 2010). Além desses, foram verificados também danos morfológicos em órgãos como rins, fígado e brânquias (Akaishi et al., 2004; Kodo-Filho, 2006), bem como deformidades severas em larvas de peixe (Debruyn et al., 2007). Ainda podem ser citados efeitos de lipoperoxidação de membranas e danos ao genoma de peixes (Frenzilli et al., 2004; Silva et al., 2009).

Tão problemáticas quanto à contaminação ambiental por petróleo são aquelas causadas por derivados desse composto, como gasolina e óleo diesel. Estes estão dentre os poluentes de maior impacto no meio aquático (Pacheco e Santos, 2001) e os mais comuns em regiões costeiras e estuarinas (Barbosa, 2005).

A gasolina é uma substância constituída, essencialmente, por hidrocarbonetos com, normalmente, de 4 a 12 átomos de carbono, produtos oxigenados, compostos de enxofre, nitrogênio e metais, estes últimos em menor concentração (Petrobras, 2011). No Brasil é feita

a adição de 22% de etanol à gasolina, o que a torna mais solúvel em água e pode dificultar a biodegradação natural, o que aumenta a sua persistência no ambiente e potencializa a contaminação ambiental (Corseuil e Marins, 1997; Tiburtius et al., 2005). Dentre os hidrocarbonetos que geralmente compõem a fração solúvel em água de gasolina, destacam-se as cadeias aromáticas monocíclicas, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) e as cadeias aromáticas policíclicas (HPA), como naftaleno, antraceno e fenantreno (Fedato et al., 2010; Simonato et al., 2011).

Diversos efeitos consequentes da exposição à gasolina e seus compostos já foram descritos em organismos aquáticos. Dentre eles, cita-se: aumento da atividade do citocromo P450 e de outras enzimas antioxidantes (Simonato et al., 2011), lipoperoxidação (Adeyemi et al., 2009), alterações imunológicas (Ahmad et al., 2003), efeitos genotóxicos e mutagênicos (Machaella et al., 2005; Calliani et al., 2009; Fedato et al., 2010), alterações do comportamento de forrageamento (Carvalho et al., 2008) e atraso na vitelogenia (Tintos et al., 2006).

Diversos eventos podem promover a contaminação e consequentes prejuízos ambientais causados por hidrocarbonetos: despejo irregular de refinarias de petróleo, acidentes ou deficiências no transporte e armazenamento desses compostos. Locais como postos de combustíveis, que armazenam estes líquidos, podem apresentar risco de contaminação constante, por exemplo, através de vazamentos dos tanques e efluentes despejados sem o devido tratamento.

De acordo com a resolução CONAMA nº 273 de 2000, para a instalação e controle de qualidade de postos de combustíveis, deve haver equipamentos e sistema de monitoramento, proteção e sistema de detecção de vazamento. Além desses é necessário detalhamento do tipo de tratamento e controle de efluentes provenientes dos tanques, áreas de bombas e áreas sujeitas a vazamento de derivados de petróleo ou de resíduos oleosos.

Complementarmente, a Resolução nº 038 de 2009 da Secretaria do Meio Ambiente do estado do Paraná resolve, dentre outros, que os estabelecimentos de comércio de combustíveis devem apresentar o Plano de Controle Ambiental. Este último deve apresentar o sistema de tratamento de efluentes líquidos, obrigatoriamente para as águas de lavagem de veículos e para as águas pluviais contaminadas incidentes sobre as áreas de serviço sujeitas a vazamentos acidentais de combustíveis ou óleos. Detalhando, os postos de combustíveis que possuem licenciamento ambiental apresentam tanques para os quais o efluente gerado é direcionado e deixado para que resíduos sólidos decantem. A água e compostos diluídos nela

são liberados diretamente no ambiente e o lodo formado pela decantação é recolhido por empresa de tratamento terceirizada conforme o influxo do efluente.

Estudos ecotoxicológicos, devem buscar cada vez mais o aprimoramento técnico sob a ótica dos 3 R's: *reduction, refinement, replacement* (redução, aperfeiçoamento e substituição). O desenvolvimento de modelos biológicos *in vitro* para testes de toxicidade é necessário por razões científicas, éticas e econômicas e o uso de linhagens celulares nestes testes é bastante promissor, tanto para a melhoria do rendimento dos testes quanto para redução dos seus custos (Teng et al., 2013). Outras vantagens no uso de linhagens em testes de toxicidade também podem ser pontuadas, tais como:

- Redução do uso de animais em testes toxicológicos (Bols et al., 2005);
- Estudo de um dado fenômeno em um ambiente bem definido (Bols et al., 2005);
- Medições mais rápidas, fáceis, reprodutíveis e que geram menos resíduos tóxicos (Bols et al., 2005).
- Interpretação dos resultados mais definitiva, visto que a cultura celular não apresenta as complexidades do organismo inteiro, como bioacumulação e depuração (Bols et al., 2005).
- Possibilidade de comparações entre diferentes espécies ao nível celular, sob condições equivalentes da exposição ao contaminante (Bols et al., 2005).
- O entendimento de mecanismos básicos de sensibilidade, aos níveis celulares e moleculares (Bols et al., 2005).
- Geração de informações básicas sobre a natureza dos agentes testados e da resposta celular (Binelli et al., 2009).

Além disso, as linhagens celulares representam um sistema padronizado, com relativamente baixa variabilidade. Também demonstram boas correlações com dados de citotoxicidade *in vitro/in vivo*, especialmente para avaliação de CE_{50} e CL_{50} em testes de amostras ambientais, efluentes e misturas complexas (Castaño et al., 2003).

O potencial do uso de linhagens celulares de vertebrados em pesquisas toxicológicas foi reconhecido por volta dos anos 1960, sendo utilizadas primeiramente, células de mamíferos para compreensão dos possíveis efeitos de compostos químicos em humanos. Somente em 1985 foi proposto o uso de culturas celulares de peixes como forma de substituição ao uso de peixes para monitoramento de efluentes industriais em testes de letalidade. Considerando-se que peixes são as espécies dominantes em avaliações ecotoxicológicas, deve-se atribuir a eles a mesma proteção legal atribuída aos mamíferos,

sendo assim, a validação de culturas celulares de peixes é meta social urgente (Schirmer, 2006).

Um exemplo de organismo aquático largamente utilizado em estudos ecotoxicológicos é o peixe-paulistinha ou “zebrafish” *Danio rerio* Hamilton, 1822, (Bopp et al., 2006; Sandrini et al., 2009). Esse peixe é utilizado tanto em experimentos *in vivo* quanto *in vitro*, com linhagens celulares comercialmente disponíveis como células de fígado (ZF-L), embrionárias (ZF4 e ZEM2S) e da nadadeira caudal (SJD.1 e AB.9) (Bopp et al., 2006; Bopp e Lettieri, 2007; Fent, 2007).

Destaca-se no presente trabalho a linhagem celular permanente de hepatócitos de *D. rerio*, denominada ZF-L. Essa foi primeiramente desenvolvida e caracterizada por Gosh e colaboradores, em meados de 1994 (Gosh et al., 1994), a partir de fígados normais de indivíduos adultos desta espécie. Nesta ocasião foi relatado o crescimento e propagação de ZF-L por mais de 100 gerações, mantendo sua morfologia epitelial e número modal de cromossomos de 46. Foi verificado também que a atividade das enzimas de ZF-L é semelhante às do fígado de *D. rerio*, apresentando alanina e aspartato aminotransferase e glicose-6-fosfatase (Gosh et al., 2004).

Diversos trabalhos comprovam a sensibilidade de ZF-L quando expostas a diferentes contaminantes, com a utilização satisfatória de diferentes biomarcadores:

- Metais: foram realizadas exposições de ZF-L a diversos metais, como arsênio, cobre, zinco e mercúrio, o que resultou em aumento da indução de mRNA de metalotioneínas (Chan et al., 2006; Cheuk et al., 2008), alterações na síntese de proteínas (Chen e Chan, 2011), redução da viabilidade celular e aumento da formação de ERO (Sandrini et al., 2009) e apoptose (Seok et al., 2007);
- Nanopartículas: verificou-se o aumento da síntese de mRNA de metalotioneínas após exposição de 96 h ao Cu_2O e CuCl_2 (Chen et al., 2011) e aumento na acumulação de arsênio após co-exposição com fulereno (C_{60}) (Costa et al., 2012);
- Defensivos agrícolas: detectou-se a expressão diferencial de proteínas envolvidas em processos metabólicos, bem como de chaperonas, receptores e transportadores de hormônios e proteínas de membrana, demonstrando a complexidade dos efeitos de metil paration em ZF-L (Huang e Huang, 2012);
- Produtos farmacêuticos: foi observada a redução na transcrição de proteínas do metabolismo e ciclo celular e aumento de proteínas quinases e outras envolvidas no reparo de DNA, após exposição de ZF-L a uma mistura de produtos farmacêuticos em concentrações ambientalmente relevantes (Pomati, et al., 2007). Bopp e Lettieri (2008)

também verificaram a redução da viabilidade celular após exposição ao tamoxifeno e fluzilazol;

- Efluentes: já foram relatadas alterações na indução de vitelogenina (Christianson-Heiska e Isomaa, 2008) decorrentes da exposição ao efluente de fábrica de papel, bem como a diminuição do reparo de DNA e aumento de citocromo P450 e vitelogenina-1 após exposição de ZF-L a diversos efluentes contaminados com compostos estrogênicos (Notch e Mayer, 2009);
- Retardantes de chamas: foram verificadas alterações na tradução de proteínas envolvidas na gliconeogênese e na regulação do ciclo celular após a exposição a hexabromociclododecano e ao tetrabromobifenol-A (Kling e Förlin, 2009).

Sendo assim, é possível afirmar que a linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* é capaz de demonstrar os possíveis efeitos tóxicos resultantes do contato com diferentes poluentes ambientais. Conseqüentemente, o uso dessas células em estudos ecotoxicológicos é adequado.

2 OBJETIVOS,

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos da fração solúvel em água de gasolina e de um efluente de posto de combustível na linhagem celular ZF-L.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade resultante da exposição à fração solúvel da gasolina e de um efluente de posto de combustível dos poluentes em células ZF-L por meio da verificação da integridade da membrana plasmática (teste de exclusão do azul de tripan) e o metabolismo celular (teste da redução do MTT);
- Verificar a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante total de células ZF-L expostas à fração solúvel da gasolina e ao efluente de posto de combustível;
- Analisar a genotoxicidade da fração solúvel da gasolina e de um efluente de posto de combustível para ZF-L utilizando o teste do cometa;
- Comparar a toxicidade e os efeitos fração solúvel da gasolina e de um efluente de posto de combustível para ZF-L.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção de ZF-L

A linhagem celular ZF-L foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ) e subcultivada em meio de cultura contendo 52,7% de meio Leibovitz L-15 (Gibco®), 42,1% de meio RPMI 1640 (Gibco®), 5,2% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco®), mantida em estufa seca a 28°C em frascos de 50 mL. Esses eram verificados diariamente, analisando-se morfologia celular, crescimento, possível sobreposição de células, presença ou ausência de contaminação e vacúolos celulares. As células eram repicadas semanalmente, ou seja, eram soltas dos frascos e a suspensão formada era dividida entre dois ou três frascos de cultura, para que continuassem a se proliferar. Cada vez que um frasco era repicado, considerava-se uma nova passagem ou geração, para assim fazer o controle interno do número de passagens das células utilizadas. Neste trabalho foram utilizadas células nas passagens de 14 a 21.

3.2 Padronização dos testes *in vitro*

Com o intuito de garantir que todas as células fossem expostas da mesma forma e os resultados fossem o mais verdadeiros quanto fosse possível, foi feita, previamente à realização dos testes ecotoxicológicos, a padronização dos ensaios, para que fossem definidos: quantidade de amostra necessária para cada metodologia, tipo de solução de exposição, quantidade de células necessárias para formação de monocamada.

Para as primeiras avaliações foram feitos testes de citotoxicidade com a solução teste diluída em meio de cultura. No entanto, verificou-se a redução da viabilidade celular apenas em altas concentrações (maiores que 50%), lançando a hipótese de interferência do meio de cultura (dados não mostrados). Para comprovação desta, foram realizados testes expondo ZF-L à solução teste diluída em salina tamponada com fosfato e livre de cálcio e magnésio (PBS: KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, NaCl 136,89 mM, Na₂HPO₃ anidro 8,10 mM), o que resultou no aumento da sensibilidade da resposta das células aos poluentes em estudo. Dessa forma, todas as exposições de todas as metodologias aplicadas neste trabalho foram feitas com PBS na solução teste.

Para os testes de citotoxicidade foram utilizadas placas de 24 poços (TPP®) que permitem análises com uma quantidade relativamente pequena de células. Bopp e Lettieri (2008) já demonstraram que em densidades celulares maiores que $1,25 \times 10^4$ células por poço

os resultados obedecem a uma relação linear entre quantidade de células e absorção. Sendo assim, foi padronizado para estes testes $8,5 \times 10^4$ células por poço, considerando a formação da monocamada.

Para a aplicação do ensaio do cometa, quantificação de ERO e avaliação da capacidade antioxidante total foi necessária uma maior quantidade de amostra, visto que os testes foram realizados simultaneamente. Assim, a exposição de ZF-L foi feita em frascos de cultura de 50 mL, adicionando a cada um deles $5,3 \times 10^6$ células, também considerando a formação da monocamada.

Tanto as placas de 24 poços quanto os frascos foram montados com cerca de 30 h de antecedência, tempo considerado suficiente para que ocorra aderência das células. Esse procedimento foi feito com meio de cultura adicionado de 5% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco®) (meio de cultura completo), este último para prevenir possíveis contaminações.

3.3 Substâncias teste

Amostras de gasolina comum e efluente do posto de combustível foram obtidas do mesmo estabelecimento para a realização de todas as etapas experimentais, com o objetivo de diminuir a possibilidade de variações na composição destas soluções.

Fração solúvel em água da gasolina (FSG): foi feita simulação de derrame em condições tropicais, como em Nicodem et al. (1998), com alterações. Em um béquer, foram adicionadas gasolina e água destilada na proporção de 1:4. Esta mistura foi exposta à radiação solar direta, por 6 h (das 9h às 15h) e em seguida e colocada em caixa escura por 16 h (das 15h às 9h do dia seguinte). Na primeira fase ocorre fotodegradação do combustível, os compostos resultantes são dissolvidos na água e na segunda fase os compostos hidrossolúveis passam para a água (Vanzella et al., 2007). De acordo com Simonato et al. (2011) a FSG obtida por simulação de derrame, utilizando o mesmo método deste trabalho, é composta principalmente por BTEX (etilbenzeno, xileno, benzeno, tolueno) e os principais HPA presentes são naftaleno, antraceno e fenantreno. A água gerada da exposição – FSG – foi separada e conservada em recipiente escuro a 4°C até o uso, não superando 5 dias de armazenamento (Vanzella et al., 2007). A FSG obtida nessa etapa foi considerada como concentração 100%.

Efluente (EF): resultante da canalização da água de lavagem dos veículos e águas pluviais incidentalmente contaminadas com combustíveis ou óleos. Essa mistura é

direcionada a tanques de decantação, seguindo a resolução nº038/09/SEMA. O lodo resultante é mensalmente recolhido para tratamento e a água é liberada continuamente no ambiente. De acordo com as análises feitas por Martins e Grisólia (2009) para efluentes de diferentes postos de combustível, é possível supor que dentre os compostos provavelmente presentes na amostra de efluente coletada neste trabalho estariam óleos e graxas, benzeno, tolueno, xileno, fenóis e metais como cobre e zinco, em concentrações diversas. Além desses, a presença de detergentes no efluente avaliado neste trabalho foi visivelmente detectável, visto a formação de espuma e considerando que a lavagem de veículos é uma atividade intensa no posto em que o EF foi coletado. Assim, o efluente final, resultante do tratamento foi coletado em frasco escuro e armazenado por no máximo 7 dias a 4°C, sendo considerado este 100% EF.

Para a exposição celular, as soluções iniciais dos poluentes (100%) foram diluídas em água destilada e foram acrescentados, de forma proporcional, os sais que compõem PBS e o pH de cada diluição foi corrigido para 7,4. Em seguida, as soluções foram filtradas em filtro de seringa de 0,22 µm, para esterilização, e conservadas em frasco escuro a 4°C até o uso, não superando 24 h. As células foram expostas às diluições arbitrárias de 50%, 25%, 10% e 5% de FSG e EF por 1, 3 e 6 h.

3.4 Preparo e exposição

Para os testes de citotoxicidade, tanto pela redução do brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5- difeniltetrazólio (MTT), quanto pelo azul de tripan (AT), as células foram expostas em placas de 24 poços. Para isso, as células foram soltas dos frascos de cultura com tripsina 0,125%, a qual foi inativada em seguida com meio de cultura 10% SBF. Essa suspensão celular foi transferida para um tubo de 50 mL, em seguida retirou-se uma amostra, corou-se com azul de tripan 0,4% e prosseguiu-se com a contagem de células em Câmara de Neubauer, contando as células viáveis nos quatro quadrantes mais externos e em seguida aplicando-se a fórmula seguinte:

$$Células/mL = \left(\frac{\text{número de células contadas}}{4} \right) \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Com a contagem realizada, foi calculado o volume de suspensão celular correspondente ao número total de células desejado, ou seja, $8,5 \times 10^4$ multiplicado pelo

número de poços a serem semeados. Feito isso, este volume transferido para outro tubo de 50 mL e adicionado a meio de cultura completo, para totalizar o volume necessário para semear quantos poços fossem necessários. Após a homogeneização desta mistura, montou-se a placa adicionando 600 μ L de suspensão celular. Em seguida, a placa incubada por aproximadamente 30 h na estufa, até a realização do experimento.

Após o período de incubação das placas, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se à placa PBS nos poços correspondentes ao branco e controle negativo, e as soluções teste, cada qual contendo a diluição de FSG ou EF (Fig. 3.1). Após a montagem, as placas foram deixadas por 1, 3 ou 6 h em estufa seca, a 28°C. Foram montadas duas placas para cada tempo experimental. Foram considerados como N amostral, para as análises estatísticas, cada um dos poços.

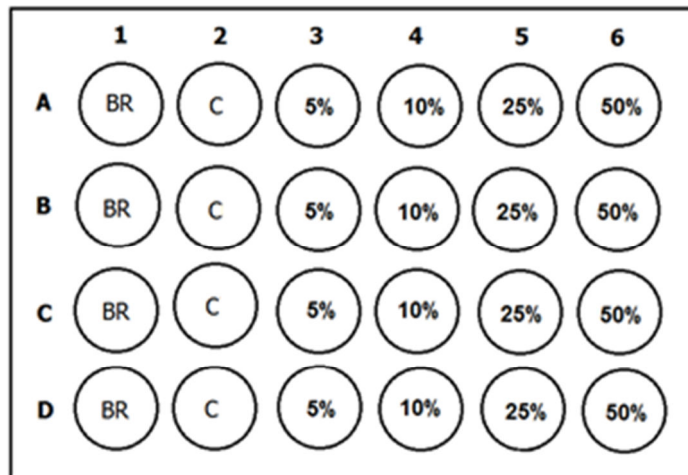


Figura 3.1: esquema da distribuição para os testes de viabilidade celular. BR: branco, C: controle, seguido pelo valor da diluição de cada substância teste.

Para o ensaio do cometa, bem como para a quantificação de ERO e determinação da capacidade antioxidante total, a exposição das células foi feita nos frascos de cultura celular. Para isso, cerca de 30 h antes dos experimentos, foram montados sete frascos para cada tratamento, adicionando-se a cada um deles $5,3 \times 10^6$ células, juntamente ao meio de cultura completo, os quais foram incubados em estufa até a realização do experimento. Dessa forma, foram obtidos frascos homogêneos, confluentes e com células em monocamada.

Após esse período, no dia do experimento, todos os frascos foram lavados com PBS e, em seguida, 5 mL da solução teste foi adicionada, sendo adicionado aos frascos controle apenas PBS. Feito isso, os frascos de cultura foram levados à estufa a 28°C e deixados por 1, 3 ou 6 h. Ao final da exposição, foi descartada a solução teste, adicionou-se tripsina 0,125%

nos frascos, por cerca de 1 minuto, a qual foi em seguida inativada com PBS com 10% SBF. Essa solução de células de cada frasco foi transferida para microtubos de 2 mL, centrifugada a 137 g e 4°C por 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 µL de PBS, eliminando possíveis interferências do SBF e tripsina.

3.5 Testes de citotoxicidade

Método de exclusão por azul de tripan: essa solução apresenta cromóforo de carga negativa, assim, só interage com a célula caso a membrana plasmática esteja danificada, deixando aquelas inviáveis, azuis (Freshney, 2010). Então, para esse ensaio, após a incubação e exposição aos contaminantes, as células foram soltas dos poços adicionando-se tripsina 0,125%, a qual foi inativada com solução de PBS e SBF 10%, em seguida adicionou-se azul de tripan 0,4%. Feito isso foram contadas, em Câmara de Neubauer, 100 células, numa ordem definida. Assim, a viabilidade celular foi dada em porcentagem de células viáveis. De acordo com os resultados obtidos neste teste, foram selecionados os tratamentos com viabilidade celular maior ou igual a 80% (Tice et al., 2000) para serem feitos o ensaio do cometa, quantificação de ERO e capacidade antioxidante total contra radicais peróxil.

Método de Redução do MTT (Mosmann, 1983): teste colorimétrico no qual o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) (MTT), solúvel em água e de coloração amarelada, é reduzido a formazan, cristal insolúvel em água e purpúreo. Essa conversão é feita pela succinato desidrogenase, presente na membrana interna das mitocôndrias (Bopp et al., 2006). Assim, quanto maior a quantidade de células viáveis, maior a formação de formazan nas amostras.

Após o tempo de exposição de 1, 3 e 6 h, foram retiradas as soluções de exposição e adicionou-se, a cada poço, MTT diluído em meio de cultura ($0,33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), deixando por 4 h em estufa seca, a 28°C. Terminada esta etapa, o meio de cultura foi retirado, acrescentou-se DMSO, para diluir o formazan, o volume dos poços foi homogeneizado e transferido para uma placa de 96 poços e prosseguiu-se com leitura em espectrofluorímetro (VICTOR 3, PerkinElmer), a 540 nm.

Para calcular a viabilidade celular de cada amostra, foi utilizada a fórmula seguinte, com as amostras de controle sendo consideradas como 100% de viabilidade celular (VC), determinando a VC das amostras expostas aos contaminantes de forma proporcional ao controle.

$$VC_A (\%) = \frac{Abs_A - Abs_{Br}}{Abs_C - Abs_{Br}} \times 100$$

Onde: VC_A = viabilidade celular da amostra

Abs_A = absorbância da amostra

Abs_{Br} = absorbância do branco

Abs_C = absorbância do controle

3.6 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi feito conforme Singh (1988), com alterações. Brevemente, foi adicionado a 20 μ L de amostra, 120 μ L de agarose baixo ponto de fusão a 37°C, essa solução foi homogeneizada e dividida entre duas lâminas com agarose, que em seguida foram encobertas com lamínulas e colocadas em refrigerador. Passados cerca de 30 minutos, as lamínulas foram retiradas e as lâminas mergulhadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH 10,0), por 1 h. Nesta etapa, as membranas celulares são degradadas, restando somente o DNA das células, formando um nucleóide. Após esta etapa, as lâminas foram colocadas em cubas de eletroforese, cobertas com solução de eletroforese (NaOH 10 M, EDTA 200 mM, pH > 13) e deixadas nela por 30 minutos, para que sejam degradadas as histonas e ocorra o relaxamento do DNA. Passado esse período, foi feita eletroforese por 20 minutos, a 25 V e 300 mA. Assim, os fragmentos de DNA menores avançaram mais que os fragmentos maiores, formando caudas mais curtas ou mais longas, dependendo da intensidade da fragmentação do DNA. Após esta etapa, foi feita a neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) das lâminas, lavando-as 3 vezes com solução de neutralização, com intervalos de 5 minutos. Para finalização, foi feita fixação das lâminas mergulhando-as em álcool etílico 100% por 10 minutos, deixando-as secar em temperatura ambiente e armazenando-as em caixas para lâminas histológicas a 4°C.

Para a análise, foi feita coloração com 50 μ L gel *red* (Biotium®), cobrindo a lâmina com lamínula e prosseguindo com leitura em microscópio óptico de fluorescência (Leica®, DM 2500) adaptada para fluorescência/epifluorescência, equipada com filtro azul de excitação (450-490 nm) e filtro de barreira de 515 nm, ao aumento de 400x. Para evitar interferência na leitura dos resultados, as lâminas foram codificadas independentemente, fazendo assim, uma leitura cega dos dados.

Foram analisados 100 nucleóides por amostra e os danos ao genoma foram classificados de acordo com Kobayashi et al. (1995), dividindo-os em 4 classes (Fig. 3.2), de acordo com o tamanho da cauda do nucleóide: classe 0 = sem dano aparente, classe 1 = cauda curta, menor que o diâmetro do nucleóide, classe 2 = comprimento da cauda correspondente a uma ou duas vezes o diâmetro do nucleóide e classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do nucleóide. Para o cálculo do escore do dano, o número de células em cada classe foi multiplicado pelo valor de cada classe e o escore dado pela seguinte fórmula, onde A, B, C e D corresponde ao número de células encontradas para cada categoria analisada. Também foi calculada, para cada amostra, a frequência de classes e total de nucleóides danificados.

$$\text{Escore} = (0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$$

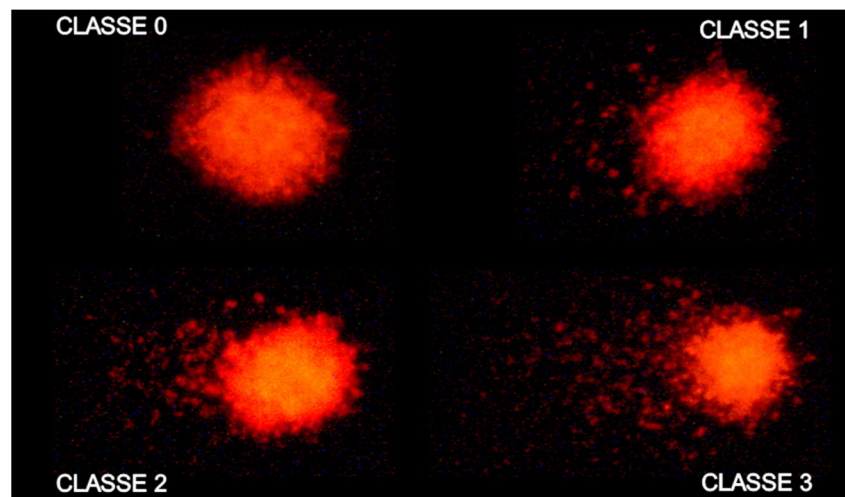


Figura 3.2: Classes de danos no DNA, divididas conforme o tamanho da cauda formada.

3.7 Quantificação de ERO e determinação da capacidade antioxidante total (CAOT)

Para a verificação destes biomarcadores, foi utilizado o protocolo de Amado et al. (2009) com algumas alterações. Primeiramente foi feita a determinação da quantidade total de proteínas, pelo método de Bradford (1976), com adaptações. Uma alíquota de cada amostra obtida foi diluída e pipetada em uma microplaca de 96 poços transparente, bem como foi feita uma curva padrão com diferentes concentrações de albumina de soro bovino. Em seguida foi adicionado reagente de Bradford, para que o Coomassie Brilliant Blue da solução ligue-se às

moléculas de proteínas da amostra, e, após 5 minutos foi feita a leitura a 595 nm em leitora de microplaca (Elx800 – Bio-tec Instruments). Feito isso, o valor da absorvância que foi obtido para as amostras foi comparada com o da curva padrão, indicando assim, a quantidade total de proteína em cada amostra.

Com os dados de proteína prontos, foi feita diluição das amostras com meio de reação (HEPES 30 mM, KCl 200 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,2) para concentrações de 60 µg.mL⁻¹ a 100 µg.mL⁻¹, em placa preta de 96 poços. Vale ressaltar que a diferença na concentração de proteínas utilizada não deve interferir na qualidade dos resultados (Amado et al., 2009). As amostras foram pipetadas em quadruplicata, e dois poços foram tratados com substância geradora de radicais peroxil, 2,2'- azobis (2 metilpropinamida) dihidroclorido (ABAP: 10 mM), e os outros dois receberam apenas tampão fosfato. Em seguida foi feita leitura da autofluorescência.

Feito isso, adicionou-se 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (1mM H₂DCF-DA) e foi feita leitura a 35°C, por 30 minutos, com intervalo de 5 minutos entre cada uma, excitação 485 nm e emissão 520 nm. A esta temperatura, o ABAP é degradado e libera nas células grande quantidade de radicais peroxil. Ocorre também a clivagem do H₂DCF-DA pelas esterases presentes nas amostras, liberando o H₂DCF. Este último reage com ERO, liberando diclorofluoresceína, composto que libera fluorescência. Sendo assim, quanto maior a quantidade de ERO, maior a fluorescência da amostra.

Para o cálculo da quantidade de ERO e da CAOT, foi feito ajuste dos dados de fluorescência para uma função polinomial de segunda ordem e calculado o valor da integral. Para a quantificação de ERO, foram analisados os valores das integrais das amostras tratadas apenas com tampão fosfato. Já para avaliação da CAOT, foi feita a diferença dos valores de área das amostras tratadas e não tratadas com ABAP, seguindo a fórmula:

$$\text{Área relativa} = \frac{(\text{Área}_{ABAP} - \text{Área}_{SEM\ ABAP})}{\text{Área}_{SEM\ ABAP}}$$

Assim, quanto maior a diferença entre as áreas, menor a CAOT, visto que altos valores de fluorescência indicam maior quantidade de ERO e menor capacidade de neutralização destes compostos. Para facilitar a visualização dos resultados, os dados de CAOT apresentados neste trabalho foram invertidos, ou seja, $\frac{1}{\text{Área relativa}}$.

3.8 Análise estatística

Para cada parâmetro analisado, os resultados obtidos para as diferentes diluições (CTR ou 0, 5, 10, 25 e 50%), nos diferentes tempos experimentais (1, 3 e 6 h), foram comparados entre si por meio de análise de variância de dois fatores (Fator 1: diluição e Fator 2: tempo) e no caso de indicação de diferença significativa, foi aplicado o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls (SNK). A variação dos resultados obtidos nas diferentes diluições (CTR ou 0, 5, 10, 25 e 50%), em um mesmo tempo experimental, foi analisada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

4 MANUSCRITO

Ensaio *in vitro* com a linhagem celular ZF-L para análise dos efeitos de gasolina e efluentes de postos de combustível

Débora Lachner e Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Manuscrito a ser enviado para Aquatic Toxicology

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade da fração solúvel em água da gasolina (FSG) e de um efluente de posto de combustível (EF) em ZF-L, uma linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio*. Para isso, foi feita a exposição das células por 1, 3 e 6 h a diferentes diluições de FSG e EF. A FSG foi obtida simulando derrame de gasolina em ambiente tropical e o EF foi coletado do tanque de decantação de um posto de combustível. Antes da exposição foram feitas diluições das soluções teste em água destilada, às quais foram acrescentados os sais de salina tamponada com fosfato (PBS). Para verificação da citotoxicidade, foram aplicados os testes de viabilidade celular por exclusão do azul de tripan (AT) e o de redução do brometo de dimetiltiazol difeniltetrazólio (MTT), testando as diluições de 5, 10, 25 e 50% dos contaminantes. O controle foi feito expondo as células apenas ao PBS. A partir dos resultados obtidos pelo AT, foram selecionadas as diluições com viabilidade celular maior que 80% para aplicação do ensaio do cometa, quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (CAOT). Os resultados da viabilidade celular para ambos os poluentes, tanto para o AT quanto para o MTT obedeceram a um padrão de resposta concentração-dependente. Demonstram também a maior citotoxicidade do EF em relação à FSG, provavelmente devido à visível presença de detergentes em sua composição. Para o ensaio do cometa, ERO e CAOT foram selecionadas as diluições de 5, 10 e 25% de FSG e 5 e 10% de EF. Com relação à quantificação de ERO e CAOT, foi verificada menor produção de ERO nas amostras expostas aos poluentes e CAOT aumentada em relação ao controle, demonstrando que nas concentrações e períodos de exposição avaliados as ZF-L aparentemente evitaram o estresse oxidativos. O ensaio do cometa indicou uma alta genotoxicidade de FSG, com escores de dano próximos ao valor máximo (300), que seguiram um padrão concentração-dependente. No caso das ZF-L expostas ao EF não houve uma relação concentração-dependente na ocorrência de danos no DNA, e os escores após 1 h foram maiores que o controle, mas após 6 h foram significativamente menores nas amostras expostas ao EF que no controle, indicando uma possível atuação do sistema de reparo de DNA. Também foi verificado que, em geral, os resultados apresentaram intensificação significativa do efeito avaliado no decorrer do tempo de exposição. Assim, é possível afirmar que o EF apresentou alto potencial citotóxico enquanto a FSG apresentou alto potencial genotóxico para as ZF-L, nas concentrações e nos tempos estudados, e que ZF-L apresenta-se como modelo biológico adequado para verificação da qualidade ambiental.

Palavras-chave: citotoxicidade; estresse oxidativo; genotoxicidade; hepatócitos; hidrocarbonetos.

4.1 Introdução

A poluição aquática causada por derivados de petróleo, como gasolina e óleo diesel, está dentre as de maior impacto (Pacheco e Santos, 2001) e em regiões costeiras e estuarinas. Alguns dos efeitos dessa contaminação nos organismos são alterações morfológicas nas brânquias e fígado, além de danos e mutações no DNA de peixes (Vanzella et al., 2007; Simonato et al., 2008).

A gasolina é uma substância constituída, essencialmente, por hidrocarbonetos com, normalmente, de 4 a 12 átomos de carbono, produtos oxigenados, compostos de enxofre, nitrogênio e metais (Petrobras, 2011). Dentre os hidrocarbonetos geralmente presentes na fração solúvel em água de gasolina, destacam-se as cadeias aromáticas monocíclicas (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno – BTEX) que estão entre as mais danosas ao ambiente, devido à sua solubilidade em água e toxicidade crônica, e as cadeias aromáticas policíclicas (HPA), com efeito mutagênico e carcinogênico na biota aquática (Fedato et al., 2010; Simonato et al., 2011).

Diversos eventos podem promover a contaminação e consequentes prejuízos ambientais causados hidrocarbonetos, como: despejo irregular de refinarias de petróleo, acidentes ou deficiências no transporte e armazenamento desses compostos. Locais como postos de combustíveis, que armazenam estes líquidos, podem apresentar risco de contaminação constante, por exemplo, através de vazamentos dos tanques e despejo de efluentes. Sobre o último, mesmo quando passam por tratamento, seus efeitos na biota ainda são desconhecidos.

Para a avaliação da qualidade de água, normalmente é feita a análise de parâmetros físicos e químicos, mas deve haver preocupação em avaliar os impactos sofridos pela biota em áreas contaminadas. No ambiente aquático, vários grupos de organismos interagem com as substâncias tóxicas, o que reduz a qualidade de vida dos mesmos (Arias et al., 2007).

Neste contexto, define-se biomonitoramento como uso sistemático das respostas de organismos vivos, com intuito de avaliar as mudanças ocorridas no ambiente, sendo este uma ferramenta de avaliação da saúde ambiental que fornece subsídios para uma análise integrada da qualidade da água (Buss et al., 2003). Para aplicação do biomonitoramento são utilizadas ferramentas como biomarcadores, os quais podem ser definidos como qualquer alteração da resposta biológica induzida por xenobióticos em diferentes níveis de organização, desde molecular, histológicas e morfológicas, até comportamentais e no ciclo de vida dos organismos (Peakall, 1994).

Dentre os biomarcadores, os moleculares e celulares apresentam como característica importante a capacidade de antecipar mudanças em níveis biológicos superiores, como populações e comunidades (Cajaraville et al., 2000). Por essa razão, podem ser utilizados de forma preventiva, permitindo o desenvolvimento de estratégias de remediação antes da ocorrência de irreversíveis danos ambientais (Cajaraville et al., 2000).

O desenvolvimento de modelos biológicos *in vitro* é necessário por razões científicas, éticas e econômicas. De acordo com Teng et al. (2013) o uso de linhagens celulares é um dos mais promissores, tanto para a melhoria do rendimento dos testes quanto para redução dos custos. Além disso, permitem que o fenômeno seja estudado em um ambiente bem definido (Bols et al., 2005), fornecem informações básicas sobre a natureza dos agentes testados e da resposta celular (Binelli et al., 2009). Adicionalmente, as linhagens celulares representam um sistema padronizado, com relativamente baixa variabilidade (Castaño et al., 2003) e demonstram boas correlações com dados de citotoxicidade *in vitro/in vivo*, especialmente para avaliação de CE_{50} e CL_{50} em testes de amostras ambientais, efluentes e misturas complexas (Castaño et al., 2003).

Dentre as linhagens empregadas em estudos ecotoxicológicos, destaca-se no presente trabalho a linhagem celular permanente de hepatócitos de *D. rerio*, denominada ZF-L. Diversos trabalhos comprovam a sensibilidade desta linhagem quando exposta a diversos contaminantes, como metais (Chan, et al., 2006; Seok et al., 2007; Sandrini et al., 2009; Costa et al., 2012), produtos farmacêuticos (Pomati, et al., 2007; Bopp e Lettieri, 2008), efluentes (Christianson-Heiska e Isomaa, 2008) e disruptores endócrinos (Teng et al., 2013). Para isso foram utilizados diversos biomarcadores, como metalotioneínas (Chan, et al., 2006; Seok et al., 2007; Costa et al., 2012), viabilidade celular e avaliação da capacidade antioxidante total (Bopp e Lettieri, 2008; Sandrini et al., 2009), apoptose (Seok et al., 2007), alterações na expressão de genes e tradução de proteínas (Chan, et al., 2006; Pomati, et al., 2007; Kling e Förlin, 2009).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos de diferentes diluições da fração solúvel da gasolina e do efluente de um posto de combustível *in vitro* utilizando para tanto a linhagem celular de fígado de *Danio rerio* – ZF-L.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Manutenção de ZF-L

A linhagem celular ZF-L foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ) e subcultivada em meio de cultura contendo 50% de meio Leibovitz L-15 (Gibco®), 40% de meio RPMI 1640 (Gibco®), 5% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco®), mantida em estufa seca a 28°C em frascos de 50 mL. Esses eram verificados diariamente e repicadas semanalmente. Neste trabalho foram utilizadas células nas passagens de 14 a 21.

4.2.2 Substâncias teste

Fração solúvel em água da gasolina (FSG): foi feita simulação de derrame em condições tropicais, como em Nicodem et al. (1998), com alterações. Em um béquer, foram adicionadas gasolina e água destilada na proporção de 1:4. Esta mistura foi exposta à radiação solar direta, por 6 h e em seguida e colocada em caixa escura por 16 h. Na primeira fase ocorre fotodegradação do combustível, os compostos resultantes são dissolvidos na água e na segunda fase os compostos hidrossolúveis passam para a água (Vanzella et al., 2007). De acordo com Simonato et al. (2011) a FSG obtida por simulação de derrame, utilizando o mesmo método deste trabalho, é composta principalmente por BTEX (etilbenzeno, xileno, benzeno, tolueno) e os principais HPA presentes são naftaleno, antraceno e fenantreno. A água gerada da exposição – FSG – foi separada e conservada em recipiente escuro a 4°C até o uso, não superando 5 dias de armazenamento. A FSG obtida nessa etapa foi considerada como concentração 100%.

Efluente (EF): resultante da canalização da água de lavagem dos veículos e águas pluviais incidentalmente contaminadas com combustíveis ou óleos. Essa mistura é direcionada a tanques de decantação, o lodo resultante é mensalmente recolhido para tratamento e a água é liberada continuamente no ambiente. Assim, o efluente resultante do tratamento foi coletado em frasco escuro e armazenado por no máximo 7 dias a 4°C, sendo considerado este 100% EF. De acordo com as análises feitas por Martins e Grisólia (2009), é possível supor que dentre os compostos provavelmente presentes na amostra de efluente coletada neste trabalho estariam óleos e graxas, benzeno, tolueno, xileno, fenóis e até mesmo alguns metais como cobre e zinco, em concentrações diversas. Além desses, a presença de detergentes no efluente avaliado neste trabalho foi visivelmente detectável, visto a formação de espuma e considerando que a lavagem de veículos é uma atividade intensa no posto em que o EF foi coletado.

Para a exposição celular, as soluções iniciais dos poluentes (100%) foram diluídas em água destilada e foram acrescentados, de forma proporcional, os sais que compõem PBS (KCl 2,68 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, NaCl 136,89 mM, Na_2HPO_3 anidro 8,10 mM) e o pH de cada diluição foi corrigido para 7,4. Em seguida, as soluções foram filtradas e conservadas em frasco escuro a 4°C até o uso, não superando 24 h. As células foram expostas às diluições arbitrárias de 50%, 25%, 10% e 5% de FSG e EF.

4.2.3 Preparo e exposição de ZF-L

Para os testes de viabilidade celular, tanto pela redução do brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5- difeniltetrazólio (MTT), quanto pelo azul de tripan (AT), placas de 24 poços foram semeadas com $8,5 \times 10^4$ células por poço dois dias antes da exposição. Após o período de incubação das placas, o meio de cultura foi retirado e as células foram expostas a somente PBS (controle) e às soluções teste, cada qual contendo a diluição de FSG ou EF. Feito isso, as placas foram deixadas por 1, 3 ou 6 h em estufa seca, a 28°C.

Para o ensaio do cometa, bem como para a quantificação de ERO e determinação da capacidade antioxidante total, a exposição das células foi feita nos frascos de cultura celular. Para isso, dois dias antes dos experimentos, os frascos foram semeados com $5,3 \times 10^6$ células cada um, os quais foram incubados em estufa até a realização do experimento. Dessa forma, foram obtidos frascos homogêneos, confluentes e com células em monocamada.

No dia do experimento, os frascos foram lavados com PBS e, em seguida, os frascos receberam 5 mL da solução teste (FSG ou EF) e os controles receberam apenas PBS. Feito isso, os frascos de cultura foram levados à estufa a 28°C e deixados por 1, 3 ou 6 h. Ao final da exposição, foi descartada a solução teste, adicionou-se tripsina 0,125% nos frascos, por cerca de 1 minuto, a qual foi em seguida inativada com PBS com 10% SBF. Essa solução de células de cada frasco foi transferida para microtubos de 2 mL, centrifugada a 137 g e 4°C por 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 μL de PBS, diminuindo possíveis interferências do SBF e tripsina.

4.2.4 Testes de citotoxicidade

Método de exclusão por azul de tripan (AT): o cromóforo apresenta de carga negativa e só interage com a célula caso a membrana plasmática esteja danificada, deixando aquelas inviáveis, azuis (Freshney, 2010). Então, para esse ensaio, após a incubação e exposição aos

contaminantes, as células foram soltas dos poços adicionando-se tripsina 0,125%, a qual foi inativada com solução de PBS e SBF 10% e em seguida adicionou-se azul de tripan 0,4%. Feito isso foram contadas, em Câmara de Neubauer, 100 células, numa ordem definida. Assim, a viabilidade celular foi dada em porcentagem de células viáveis. De acordo com os resultados obtidos neste teste, foram selecionados os tratamentos com viabilidade celular maior ou igual a 80% (Tice et al., 2000) para serem feitos o ensaio do cometa, quantificação de ERO e capacidade antioxidante total contra radicais peroxil.

Método de Redução do MTT (MTT): teste colorimétrico no qual o sal brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5- difeniltetrazólio (MTT) é reduzido a formazan, pela succinato desidrogenase, presente membrana interna das mitocôndrias (Bopp et al., 2006). Assim, quanto maior a quantidade de células viáveis, maior a formação de formazan nas amostras.

O teste foi aplicado como em Mosmann (1983) com modificações: após o tempo de exposição de 1, 3 e 6 h, foram retiradas as soluções de exposição e adicionou-se, a cada poço, MTT diluído em meio de cultura ($0,33 \text{ mg.mL}^{-1}$), deixando por 4 h em estufa seca, a 28°C . Terminada esta etapa, o meio de cultura foi retirado, acrescentou-se DMSO, para diluir o formazan, o volume dos poços foi homogeneizado e transferido para uma placa de 96 poços e prosseguiu-se com leitura em espectrofluorímetro (VICTOR 3, PerkinElmer), a 540 nm.

Para calcular a viabilidade celular, as amostras de controle foram consideradas como 100% de viabilidade celular (VC), determinando a VC das amostras expostas aos contaminantes de forma proporcional ao controle.

4.2.5 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi feito conforme Singh (1988), com alterações. Brevemente, foi adicionado a 20 μL de amostra a 120 μL de agarose baixo ponto de fusão, essa solução foi homogeneizada e dividida entre duas lâminas com agarose, que em seguida foram encobertas com lamínulas e colocadas em refrigerador. Passados cerca de 30 minutos, as lamínulas foram retiradas e as lâminas mergulhadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH 10,0), por 1 h. Após esta etapa, as lâminas foram colocadas em cubas de eletroforese, cobertas com solução de eletroforese (NaOH 10 M, EDTA 200 mM, pH > 13) e deixadas nela por 30 minutos. Passado esse período, foi feita eletroforese por 20 minutos, a 25 V e 300 mA. Assim, os fragmentos de DNA menores avançaram mais que os fragmentos maiores, formando caudas mais curtas ou mais longas, dependendo da intensidade da fragmentação do DNA. Após esta etapa, foi feita a

neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) das lâminas, lavando-as com solução de neutralização. Para finalização, foi feita fixação das lâminas em álcool etílico 100% por 10 minutos.

Para a análise, foi feita coloração da lâmina com 50 μL gel *red* (Biotium®), cobrindo-a com lamínula e prosseguindo com leitura em microscópio óptico de fluorescência (Leica®, DM 2500), ao aumento de 400x. Para evitar interferência na leitura dos resultados, as lâminas foram codificadas independentemente, fazendo assim, uma leitura cega dos dados.

Foram analisados 100 nucleóides por amostra e os danos ao genoma foram classificados de acordo com Kobayashi et al. (1995), dividindo-os em 4 classes, de acordo com o tamanho da cauda do nucleóide: classe 0 = sem dano aparente, classe 1 = cauda curta, menor que o diâmetro do nucleóide, classe 2 = comprimento da cauda correspondente a uma ou duas vezes o diâmetro do nucleóide e classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do nucleóide. Para o cálculo do escore do dano, o número de células em cada classe foi multiplicado pelo valor de cada classe e o escore dado pela seguinte fórmula, onde A, B, C e D corresponde ao número de células encontradas para cada categoria analisada. Também foi calculada, para cada amostra, a frequência de classes e total de nucleóides danificados.

$$\text{Escore} = (0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$$

4.2.6 *Quantificação de ERO e determinação da capacidade antioxidante total (CAOT)*

Para a verificação destes biomarcadores, foi utilizado o protocolo de Amado et al. (2009) com algumas alterações. Primeiramente foi feita a determinação da quantidade total de proteínas, conforme Bradford (1976). Com os dados de proteína prontos, foi feita diluição das amostras com meio de reação (HEPES 30 mM, KCl 200 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,2) para concentração de 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para os testes com FSG ou 60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para EF, em placa preta de 96 poços. Vale ressaltar que esta diferença na concentração de proteínas utilizada não deve interferir na qualidade dos resultados (Amado et al., 2009). As amostras foram pipetadas em quadruplicata, e dois poços foram tratados com substância geradora de radicais peroxil, 2,2'-azobis (2 metilpropinamida) dihidroclorido (ABAP: 10 mM, pH 7,2), e os outros dois receberam apenas tampão fosfato. Em seguida foi feita leitura da autofluorescência.

Feito isso, adicionou-se 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (1mM H₂DCF-DA) e, em seguida, foi feita leitura a 35°C, por 30 minutos, com intervalo de 5 minutos entre cada uma, excitação 485 nm e emissão 520 nm (Amado et al., 2009). A esta temperatura, o ABAP é

degradado e libera nas células grande quantidade de radicais peroxil (Amado et al., 2009). Ocorre também a clivagem do H₂DCF-DA pelas esterases presentes nas amostras, liberando o H₂DCF (Amado et al., 2009). Este último reage com ERO, liberando diclorofluoresceína, composto que libera fluorescência. Sendo assim, quanto maior a quantidade de ERO, maior a fluorescência da amostra (Amado et al., 2009).

Para o cálculo da quantidade de ERO e da CAOT, foi feito ajuste dos dados de fluorescência para uma função polinomial de segunda ordem e calculado o valor da integral (Amado et al., 2009). Para a quantificação de ERO, foram analisados os valores das integrais das amostras tratadas apenas com tampão fosfato. Já para avaliação da CAOT, foi feita a diferença dos valores de área das amostras tratadas e não tratadas com ABAP. Assim, quanto maior a diferença entre as áreas, menor a CAOT, visto que altos valores de fluorescência indicam maior quantidade de ERO e menor capacidade de neutralização destes compostos. Para facilitar a visualização dos resultados, os dados de CAOT apresentados neste trabalho foram invertidos, ou seja, $\frac{1}{\text{Área relativa}}$.

4.2.7 Análise estatística

Para cada parâmetro analisado, os resultados obtidos para as diferentes diluições (CTR ou 0, 5, 10, 25 e 50%), nos diferentes tempos experimentais (1, 3 e 6 h), foram comparados entre si por meio de análise de variância de dois fatores (Fator 1: diluição e Fator 2: tempo) e no caso de indicação de diferença significativa, foi aplicado o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls (SNK). A variação dos resultados obtidos nas diferentes diluições (CTR ou 0, 5, 10, 25 e 50%), em um mesmo tempo experimental, foi analisada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) e foram apresentados apenas os resultados com r significativo. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

4.3 Resultados

4.3.1 Viabilidade Celular (VC)

A Tabela 4.1 apresenta os resultados de VC após exposição à FSG e EF, obtidos pelo teste de exclusão do AT. Para FSG, em 1 h houve redução de VC apenas na maior concentração, em 3 h esse fato ocorreu para as duas maiores e em 6 h, para 10%, 25% e 50%.

Foi verificado também que tanto em 25% como em 50% de FSG, a VC reduziu significativamente conforme o aumento do período de exposição. Para a exposição ao EF, a VC das células expostas a 25% de EF por 3 e 6 h e a 50% de EF, em todos os tempos, foi zero, ou seja, todas as células estavam inviáveis após esses tratamentos. As ZF-L expostas por 1 h a 25% de EF apresentaram redução significativa da VC, em relação ao respectivo controle. Adicionalmente, notou-se que, em geral, após 6 h de exposição, a VC apresentou-se significativamente menor. Além disso, a diminuição da VC ocorreu de forma concentração-dependente, ou seja, conforme o aumento da concentração de FSG ou de EF, a redução da VC foi mais intensa, conforme demonstrado pelos valores de r .

Considerando-se os resultados obtidos com AT, foram selecionadas as diluições de 5%, 10%, e 25% de FSG e 5% e 10% do EF para realização do ensaio do cometa, quantificação de ERO e avaliação da capacidade antioxidante, por terem apresentado VC média maior que 80%.

Tabela 4.1: Viabilidade celular (média \pm DP, n=5) calculada pelo método de exclusão por azul de tripan das ZF-L expostas a diferentes diluições (5, 10, 25 e 50%) da fração solúvel da gasolina (FSG) e de um efluente de posto de combustível (EF), durante 1, 3 e 6 h. O valor de r indica o coeficiente de correlação de Pearson entre a viabilidade celular e as diferentes diluições (0, 5, 10, 25 e 50%) para cada tempo.

Viabilidade celular pelo azul de tripan (%)			
	FSG		
	1 h	3 h	6 h
CTR	94,2 \pm 1,7 aA	93,8 \pm 1,3 aA	97,6 \pm 1,6 aA
5%	93,8 \pm 1,3 aA	94 \pm 1,5 aA	96,2 \pm 0,8 aA
10%	92,2 \pm 1,9 aA	93,4 \pm 1,5 aA	92,2 \pm 1,9 bA
25%	90 \pm 2,2 aA	87,4 \pm 2,0 bB	82,4 \pm 2,7 cB
50%	77,8 \pm 3,9 bA	66,6 \pm 2,5 cB	59,6 \pm 6,4 dC
	r = -0,971	r = -0,964	r = -0,995
	EF		
	1 h	3 h	6 h
CTR	95 \pm 2,0 aA	96,2 \pm 1,9 aA	88 \pm 3,7 aB
5%	93,8 \pm 1,5 aAB	95,8 \pm 0,8 aA	92,2 \pm 3,0 aB
10%	94,8 \pm 2,7 aA	94,4 \pm 1,1 aA	90,4 \pm 3,2 aB
25%	70,2 \pm 4,4 bA	0 bB	0 bB
50%	0 cA	0 bA	0 bA
	r = -0,967	r = -0,884	r = -0,878

Letras minúsculas designam diferenças significativas entre os tratamentos, em um mesmo tempo; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos, em um mesmo tratamento (P < 0,05).

Os resultados referentes à VC após exposição das células a FSG e EF estão representados na Tabela 4.2. Para FSG foi verificado que, em todos os tempos e nas diluições de 10, 25 e 50%, os valores foram significativamente menores, chegando à zero a 50% em 6 h. Apenas as ZF-L expostas por 3 e 6 h a 5% de FSG apresentaram aumento significativo da VC. Já para EF, houve redução significativa da VC a partir de 10% em 3 e 6 h, e em 25% e 50% de EF a VC atingiu valores de 20% a 0% nos tempos avaliados, o que também foi observado no teste com azul de tripan. Além disso, os resultados demonstraram aumento significativo da VC em 5% de EF, independentemente do período de exposição.

Observou-se também, para ambos os poluentes, de forma geral, a redução significativa da VC nos maiores tempos de exposição. Adicionalmente foi verificada a diminuição da VC conforme o aumento da concentração do poluente de maneira concentração-dependente, demonstrado pelos valores significativos de r.

Tabela 4.2: Viabilidade celular (média \pm DP, n=6) calculada pelo método de redução do MTT das ZF-L expostas a diferentes diluições (5, 10, 25 e 50%) da fração solúvel da gasolina (FSG) e de um efluente de posto de combustível (EF), durante 1, 3 e 6 h. O valor de r indica o coeficiente de correlação de Pearson entre a viabilidade celular e as diferentes diluições (0, 5, 10, 25 e 50%) para cada tempo.

Viabilidade celular pelo MTT (%)			
	FSG		
	1 h	3 h	6 h
CTR	100,0 \pm 0,0 aA	100,0 \pm 0,0 aA	100,0 \pm 0,0 aA
5%	88,5 \pm 2,1 bA	111,6 \pm 4,2 bB	126,3 \pm 2,6 bC
10%	81,8 \pm 3,2 cA	80,9 \pm 4,0 cA	66,8 \pm 5,6 cB
25%	34,4 \pm 5,8 dA	18,2 \pm 2,6 dB	17,0 \pm 4,7 dB
50%	11,2 \pm 0,9 eA	3,2 \pm 0,8 eB	0,0 eC
	r = -0,971	r = -0,926	r = -0,892
	EF		
	1 h	3 h	6 h
CTR	100,0 \pm 0,0 aA	100,0 \pm 0,0 aA	100,0 \pm 0,0 aA
5%	133,4 \pm 7,6 bA	107,2 \pm 6,5 bB	110,5 \pm 6,6 bB
10%	104,5 \pm 9,1 aA	83,7 \pm 8,7 cB	74,0 \pm 10,6 cC
25%	18,1 \pm 6,0 cA	0,0 dB	0,0 dB
50%	0,0 dA	0,0 dA	0,0 dA
	r = -0,898	r = -0,889	r = -0,884

Letras minúsculas designam diferenças significativas entre os tratamentos, em um mesmo tempo; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos, em um mesmo tratamento ($P < 0,05$).

4.3.2 Quantificação de ERO e capacidade antioxidante total

Observou-se que em 1 h de exposição à FSG, houve maior formação de ERO no controle e essa quantidade reduziu significativamente com o aumento de FSG. Em 3 h, notou-se o aumento significativo de ERO nas amostras tratadas com FSG, com pico em 10%. Em 6 h o controle voltou a apresentar maior concentração de ERO no controle em relação aos demais tratamentos (Fig. 4.1). Para esse mesmo parâmetro, mas em relação às amostras expostas ao EF, nos três tempos experimentais foi possível observar uma redução significativa de ERO nas diferentes diluições de EF em comparação ao respectivo controle (Fig. 4.2). Além disso, foi verificado em relação ao tempo de exposição que, as expostas ao EF, independentemente da concentração, apresentaram maior quantidade de ERO em 3 e 6 h que em 1 h. O mesmo padrão não foi observado em FSG.

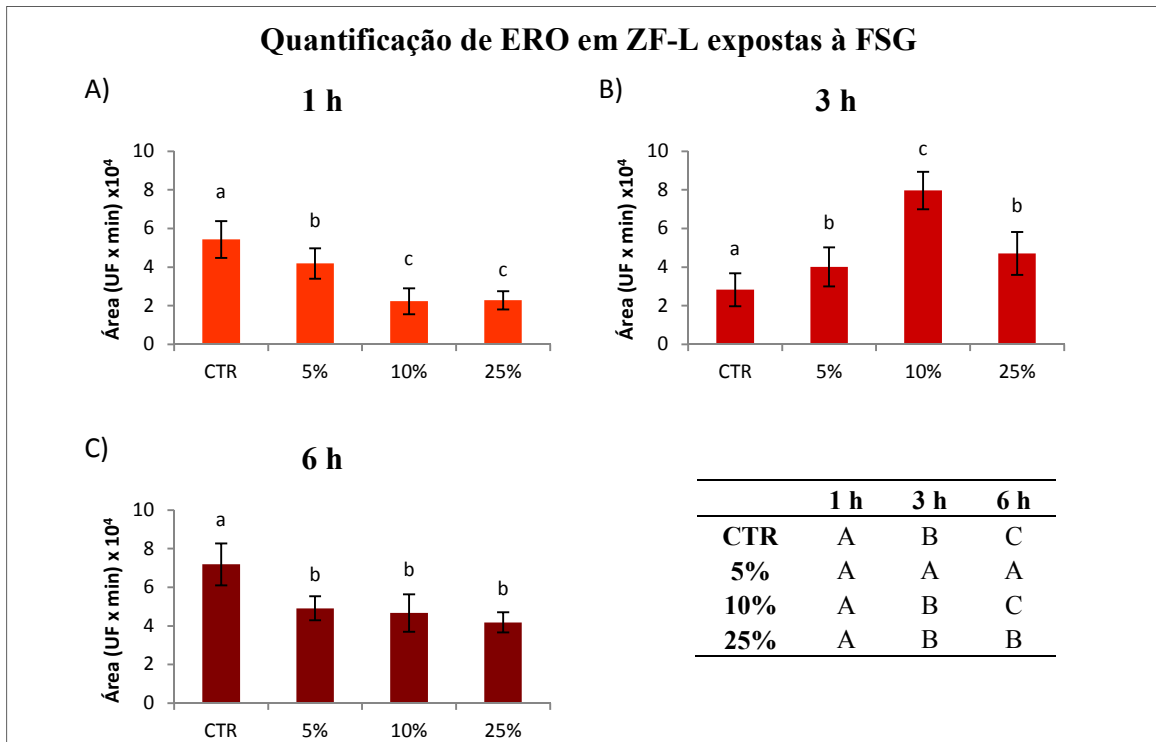


Figura 4.1: Valores (média \pm DP, n=5) referentes à quantificação de espécies reativas de oxigênio (área) por células ZF-L expostas apenas ao PBS (CTR) ou às diferentes diluições da FSG (5, 10 e 25%) durante 1 (A), 3 (B) e 6 h (C). Nos gráficos, as letras minúsculas desiguais indicam diferenças significativas entre os tratamentos em um mesmo tempo. Na Tabela, as letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos para um mesmo tratamento. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

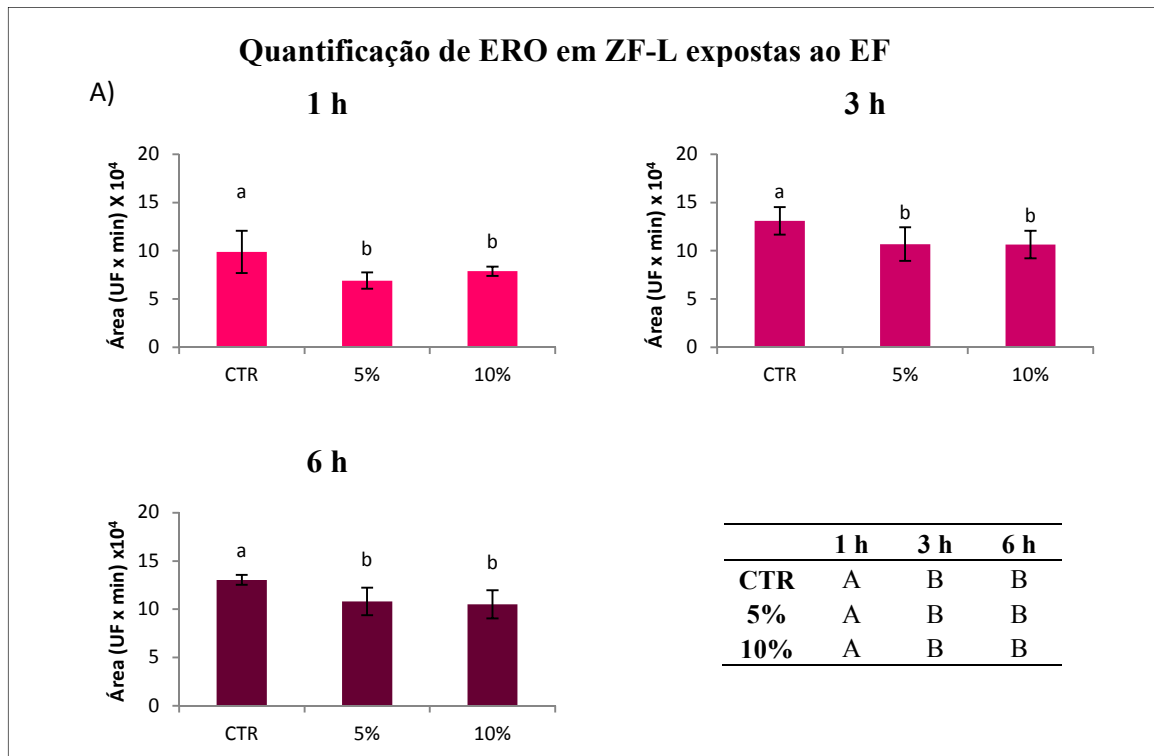


Figura 4.2: Valores (média \pm DP, n=5) referentes à quantificação de espécies reativas de oxigênio (área) por células ZF-L expostas apenas ao PBS (CTR) ou às diferentes diluições da EF (5, 10 e 25%) durante 1 (A), 3 (B) e 6 h (C). Nos gráficos, as letras minúsculas designam diferenças significativas entre os tratamentos em um mesmo tempo. Na Tabela, as letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos para um mesmo tratamento. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

Referente à CAOT foi possível verificar que em 1 h de exposição à FSG, as células do controle apresentaram maior CAOT, em 3 h as amostras tratadas com 10% e 25% de FSG tiveram maior CAOT e em 6 h, as células tratadas com FSG demonstraram valores significativamente maiores de CAOT que o controle (Fig. 4.3). Quanto à CAOT das células expostas ao EF, os resultados estão representados na Fig. 4.4, demonstrando padrão de resposta semelhante ao obtido para FSG. Em 1 h a CAOT do controle foi significativamente maior que dos tratamentos. Já em 3 h o controle e 5% de EF apresentaram CAOT significativamente menor que 10% de EF. Por fim, em 6 h, o resultado é o inverso de 1 h, ou seja, as amostras tratadas com EF possuem CAOT significativamente maior que o controle. Adicionalmente, ao comparar a CAOT nos diferentes tempos de exposição, foi possível observar tanto para FSG quanto para EF que em 6 h houve aumento significativo do parâmetro avaliado, com exceção do CTR.

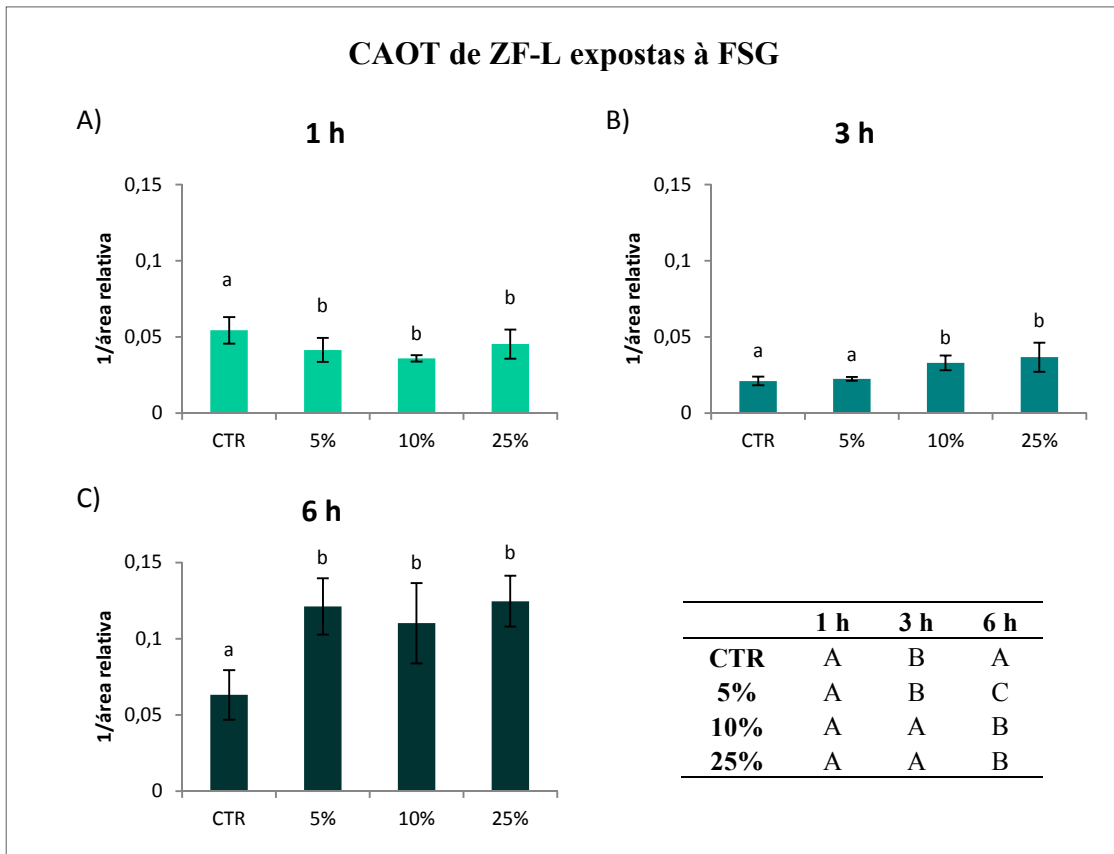


Figura 4.3: Valores (média \pm DP, n=5) referentes à capacidade antioxidante total (1/área relativa) de células ZF-L expostas apenas ao PBS (CTR) ou às diferentes diluições da FSG (5, 10 e 25%) durante 1 (A), 3 (B) e 6 h (C). Nos gráficos, as letras minúsculas desiguais indicam diferenças significativas entre os tratamentos em um mesmo tempo. Na Tabela, as letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos para um mesmo tratamento. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

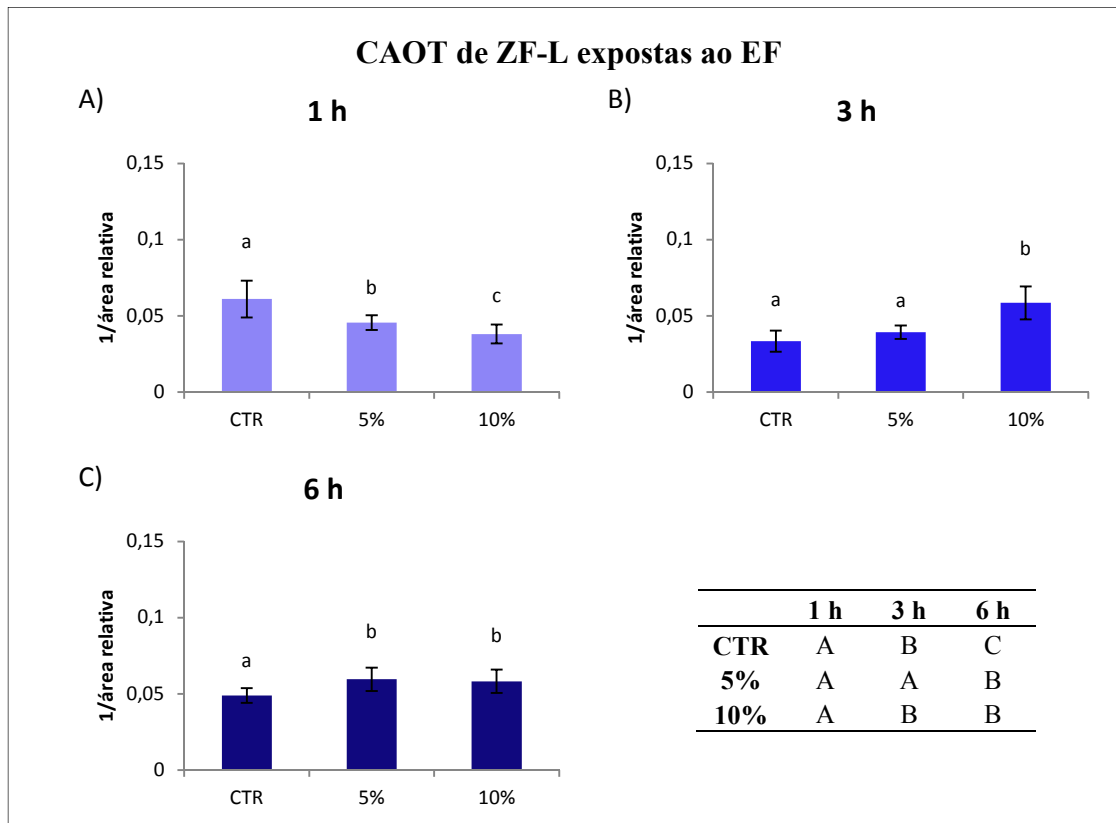


Figura 4.4: Valores (média \pm DP, n=5) referentes à capacidade antioxidante total (1/área relativa) de células ZF-L expostas apenas ao PBS (CTR) ou às diferentes diluições da EF (5, 10 e 25%) durante 1 (A), 3 (B) e 6 h (C). Nos gráficos, as letras minúsculas desiguais indicam diferenças significativas entre os tratamentos em um mesmo tempo. Na Tabela, as letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos para um mesmo tratamento. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

4.3.3 Ensaio do cometa

Os danos ao DNA de ZF-L, quando expostas à FSG, aumentaram significativamente em 5% e 10% de FSG em relação ao controle e entre si, nos três tempos experimentais (Fig. 4.5). Com relação à exposição a 25% de FSG, mesmo apresentando viabilidade celular maior que 80%, os danos ao DNA foram intensos, independentemente do tempo de exposição, com a maior parte dos nucleóides com DNA disperso em forma de nuvem, resultantes de células necróticas ou apoptóticas (Brendler-Schwaab et al., 2005). Estes nucleóides não foram contabilizados. Além disso, o coeficiente de correlação de Pearson (r) para esses tratamentos foi significativo, demonstrando a relação concentração-dependente entre os parâmetros, ou seja, conforme aumenta a concentração de FSG, ocorre também a intensificação dos danos no DNA das ZF-L. Complementarmente, foi verificado que, com o aumento do tempo de exposição ocorreu também o aumento significativo no escore de dano

Ainda com relação à exposição à FSG, a Tabela 4.3 apresenta o percentual de nucleóides observados em cada classe de cometa e o número total de nucleóides danificados. De forma geral, os dados evidenciam o aumento de ZF-L com nucleóides danificados em

FSG5% e FSG10%, e a maior ocorrência de danos de classe 2 e 3 nas células expostas à FSG, com aumento significativo da frequência de danos com o decorrer do tempo de exposição em todos os tratamentos.

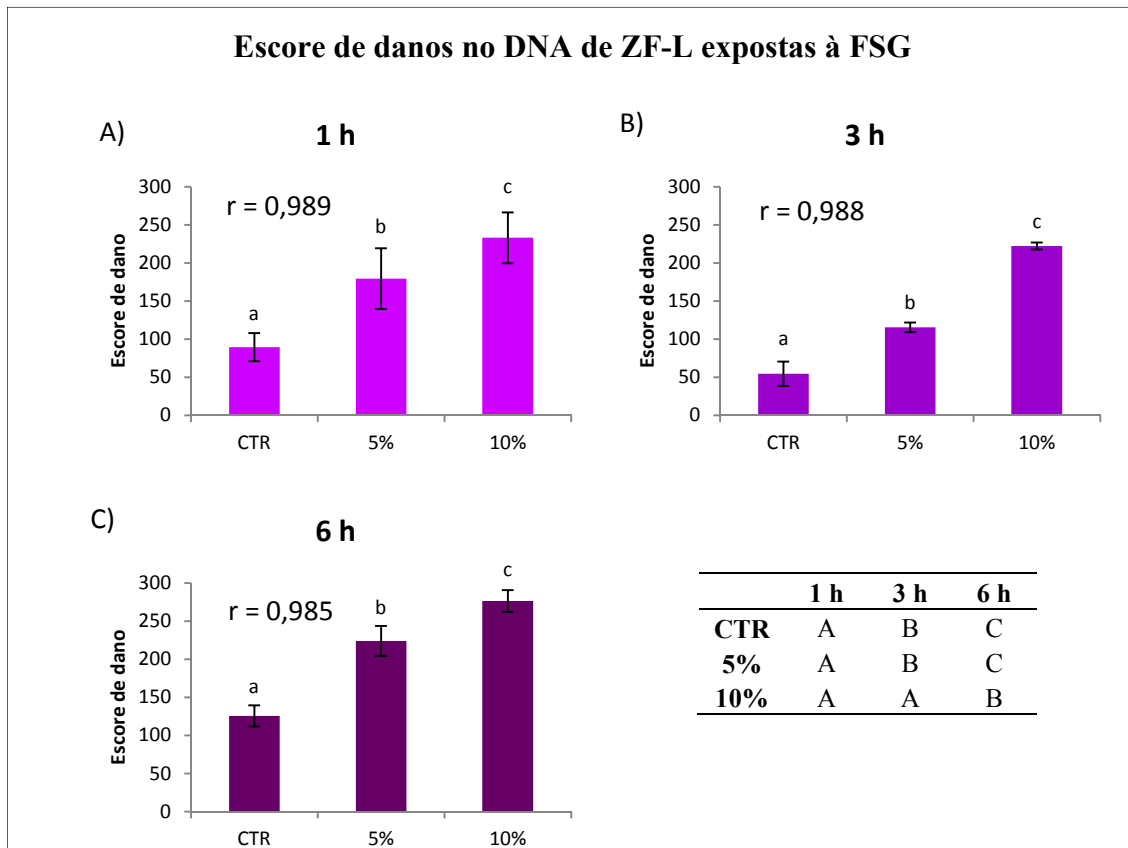


Figura 4.5: Escore de danos no DNA (média \pm DP, n=5) das células ZF-L expostas apenas ao PBS (CTR) ou às diferentes diluições da FSG (5, 10 e 25%) durante 1 (A), 3 (B) e 6 h (C). Nos gráficos, as letras minúsculas desiguais indicam diferenças significativas entre os tratamentos em um mesmo tempo. Na Tabela, as letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos para um mesmo tratamento. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

Tabela 4.3: Frequência (%) de nucleóides observados em cada classe do cometa (0, 1, 2, 3) e do total de nucleóides danificados observados (média \pm DP, n = 5) das células ZF-L expostas apenas ao PBS a diferentes diluições (5, 10, 25 e 50%) da fração solúvel da gasolina (FSG), durante 1 h, 3 h e 6 h.

Tempo	Grupo	Classe				Nucleóides Danificados
		0	1	2	3	
1 h	CTR	34,67	43,67	19,17	2,50	62,8 \pm 13,6 aA
	5%	6,00	32,83	36,83	24,33	95,6 \pm 4,1 bA
	10%	0,33	12,33	41,33	46,00	99,6 \pm 0,5 bA
3 h	CTR	64,00	21,00	11,40	3,60	36 \pm 10,3 aB
	5%	19,80	46,60	31,80	1,80	83,6 \pm 7,7 bB
	10%	0,00	11,00	56,00	33,00	100 \pm 0,0 cA
6 h	CTR	19,20	47,00	22,80	11,00	80,8 \pm 3,0 aC
	5%	3,80	18,20	28,20	49,80	96,2 \pm 5,2 bC
	10%	0,20	2,20	18,60	79,00	99,8 \pm 0,4 bB

Letras minúsculas desiguais indicam diferenças significativas entre os tratamentos, em um mesmo tempo; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos, em um mesmo tratamento ($P < 0,05$).

Com relação aos resultados de dano ao material genético pela exposição ao EF, diferentemente dos resultados obtidos com FSG, foi observado aumento dos danos em relação ao controle apenas em 1 h de exposição. Em 3 h, não há diferença significativa entre os tratamentos e em 6 h há significativamente mais dano nas células do controle (Fig. 4.6). Verificou-se também que, com o aumento do tempo de exposição houve redução significativa dos danos.

Referente ao total de nucleóides danificados (Tabela 4.4) foi observado aumento significativo apenas em 1 h. Em 3 e 6 h os resultados não diferiram significativamente dos respectivos controles. Ainda em relação à frequência de nucleóides danificados, notou-se também a redução significativa com o aumento do tempo de exposição.

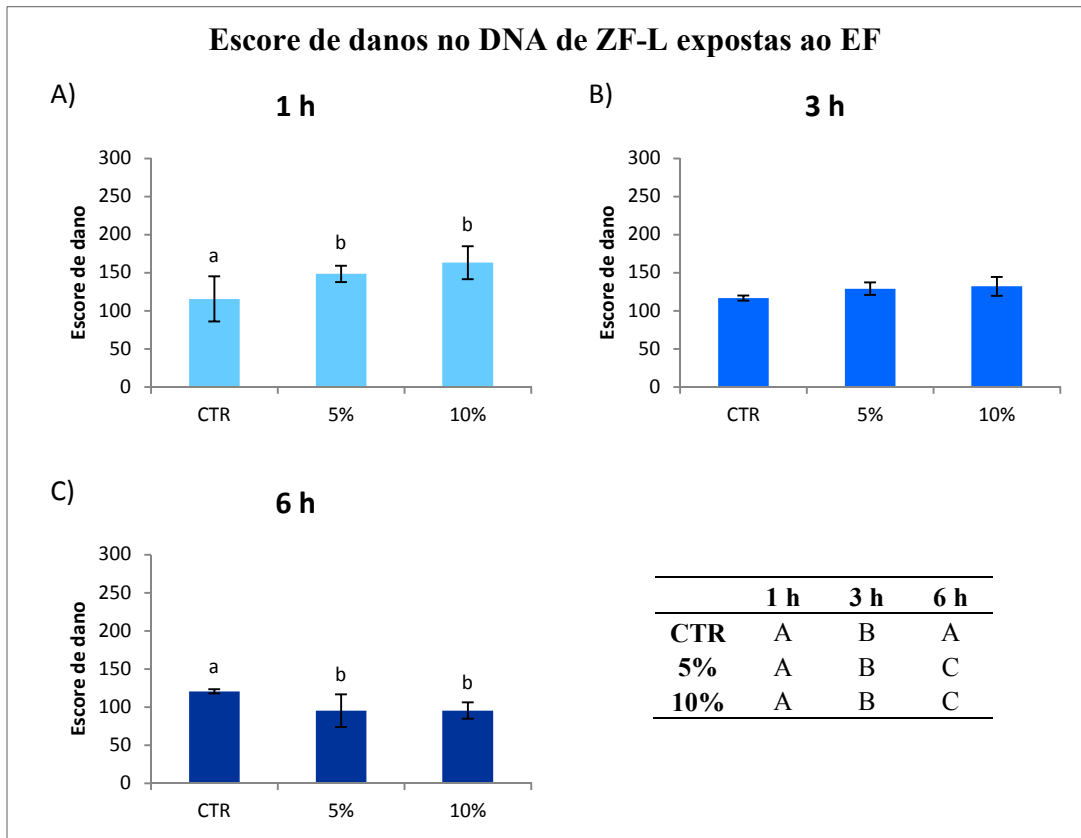


Figura 4.6: Escore de danos no DNA (média \pm DP, n=5) das células ZF-L expostas apenas ao PBS (CTR) ou às diferentes diluições da EF (5, 10 e 25%) durante 1 (A), 3 (B) e 6 h (C). Nos gráficos, as letras minúsculas desiguais indicam diferenças significativas entre os tratamentos em um mesmo tempo. Na Tabela, as letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos para um mesmo tratamento. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

Tabela 4.4: Frequência (%) de nucleóides observados em cada classe do cometa (0, 1, 2, 3) e do total de nucleóides danificados observados (média \pm DP, n = 5) das células ZF-L expostas apenas ao PBS a diferentes diluições (5, 10, 25 e 50%) de um efluente de posto de combustível (EF), durante 1 h, 3 h e 6 h.

Tempo	Grupo	Classe				Total de nucleóides danificados (%)
		0	1	2	3	
1 h	CTR	31,00	35,40	20,60	13,00	65,2 \pm 8,4 aA
	5%	14,80	41,60	23,80	19,80	85,2 \pm 7,3 bA
	10%	18,20	29,40	23,40	29,00	81,8 \pm 7,7 bA
3 h	CTR	33,00	35,40	21,20	10,40	67,0 \pm 9,2 aA
	5%	31,80	29,00	23,40	15,80	68,2 \pm 9,4 aA
	10%	23,40	42,40	15,80	16,80	75,0 \pm 8,2 aB
6 h	CTR	23,00	39,60	30,40	7,00	77,0 \pm 7,0 aA
	5%	36,20	32,40	25,00	6,40	63,8 \pm 6,0 aB
	10%	33,40	37,60	24,80	4,20	66,6 \pm 8,3 aC

Letras minúsculas desiguais indicam diferenças significativas entre os tratamentos, em um mesmo tempo; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos, em um mesmo tratamento ($P < 0,05$).

A análise da interação entre os dois fatores analisados, tempo e concentração, foi estatisticamente significativa para todos os tratamentos, independentemente do poluente avaliado, com exceção da interação da quantidade de ERO decorrente da exposição ao EF.

4.4 Discussão

Nas metodologias testadas, houve variação significativa dos parâmetros avaliados nos diferentes períodos de exposição para as células do controle. Estas diferenças provavelmente foram resultantes da exposição ao PBS, visto que esta solução não apresenta nutrientes necessários para as ZF-L e, portanto, pode apresentar-se como fonte de estresse às células, especialmente em tempos de exposição mais prolongados.

Observou-se de forma geral, tanto para FSG quanto para EF, que a citotoxicidade apresentou-se de forma concentração-dependente e que quanto maior o tempo de exposição, maior a mortalidade das células expostas a esses contaminantes, o que foi observado por ambos os testes utilizados neste trabalho. Assim, em concentrações baixas – 5% de EF e 5 e 10% de FSG – os dois poluentes não apresentaram efeito citotóxico, o que foi alterado conforme o aumento das concentrações. Resultados semelhantes foram encontrados por Fent

e Bättscher (2000), após exposição de linhagem de hepatoma de peixe PLHC-1 a diversos HPA. Este mesmo padrão foi obtido por Yang et al. (2010) e Kammann et al. (2001), ao expor diferentes linhagens de peixes – brânquias (FG) e pele (EPC), respectivamente – à extratos de sedimentos marinhos contaminados principalmente por HPA. A mortalidade das células em altas concentrações de hidrocarbonetos poderia estar relacionada com a indução de apoptose pela formação de adutos no DNA (Zhou et al., 2010).

Prosseguindo com a comparação das duas soluções teste utilizadas neste trabalho, foi evidenciada maior citotoxicidade de EF em relação à FSG, tanto pelo MTT quanto pelo AT. Tal fato provavelmente se deve à presença visivelmente detectável de detergentes na composição de EF. A citotoxicidade de detergentes foi observada também por Vinardell et al. (2008), em três linhagens celulares diferentes. Além disso, foi demonstrado também por Wei et al. (2006) que detergentes apresentam efeitos citotóxicos mesmo em concentrações relativamente baixas.

Especificamente em relação ao MTT, foi verificado que com diluições de 5%, tanto de EF quanto de FSG, houve aumento da taxa metabólica, o que pode indicar *hormesis*. Este fenômeno é caracterizado por estimulação do parâmetro avaliado em concentrações baixas do agente estressor e sua inibição em altas concentrações, resultando em curvas de resposta bifásicas, e tem sido frequentemente observado, independentemente do agente químico ou físico, modelo biológico e biomarcador avaliados (Calabrese e Baldwin, 2002). Este fenômeno pode estar relacionado à ativação da rota adaptativa para manutenção da homeostase celular e também com a proteção da célula, órgão ou sistema contra ambientes desfavoráveis, o que demanda desvio energético, levando a alterações de diversas funções basais (Zhang et al., 2008).

O estabelecimento do estresse oxidativo nas células expostas tanto à FSG quanto ao EF não foi observado, tanto em 3 h quanto em 6 h. Adicionalmente, foi possível relacionar a menor quantidade de ERO com a elevação da CAOT, a qual aumentou significativamente em 6 h. A ativação de mecanismos de defesa antioxidante também foi observada para ZF-L expostas a cobre por 96 h (Chen e Chan, 2010). Além disso, foi demonstrada a eficiência dos antioxidantes na prevenção de danos celulares, tanto em ZF-L (Seok et al., 2007) quanto em linhagem celular de hepatoma humano, HepG2 (Zhou et al., 2010). Em comparação com testes *in vivo*, foi verificada também a ativação da defesa antioxidante no fígado do peixe *Prochilodus lineatus* expostos a 5% de FSG (Simonato et al., 2011), com aumento de GSH em 24 e 96 h, dando indícios da ativação e capacidade de biotransformação de ZF-L.

Ainda referente à ERO, também foi possível verificar que os mecanismos antioxidantes das células foram nitidamente ativados em 6 h de exposição, independentemente da diluição, tanto de FSG quanto de EF. Tal fato indica que os mecanismos de CAOT de ZF-L demoram certo tempo até estarem plenamente ativados e responsivos.

Foi possível também verificar o alto potencial genotóxico de FSG, visto que os escores de dano dos tratamentos atingiram valores próximos do máximo (300). Observou-se também uma relação concentração-dependente entre dano e diluição. Os dados de frequência de nucleóides danificados corroboram esta hipótese, visto que as classes mais frequentes foram 2 e 3, consideradas de difícil reparo. O padrão de resposta concentração-dependente também foi obtido em trabalhos como os de Kammann et al. (2001) e Yang et al. (2010), ao avaliarem os efeitos tóxicos de sedimentos contaminados com HPA em diferentes linhagens celulares. Complementarmente, foi verificado em células de carcinoma pulmonar humano (A549) tanto o aumento de danos no DNA, quanto à formação de células micronucleadas após a exposição ao extrato de matéria particulada contaminado por gasolina (Zhang et al., 2008), indicando a dificuldade de reparo dos danos ao DNA causados por esse poluente. Ao comparar com experimentos *in vivo*, o mesmo fato foi observado em Caliani et al. (2009) ao expor o peixe *Gambusia affinis* à água de produção, contendo principalmente HPA, com aumento de células micronucleadas após 30 dias de exposição,

Considerando-se os dados relativos à quantidade de ERO e CAOT, é possível sugerir que os danos ao DNA causados pela exposição de ZF-L a FSG provavelmente não tenham origem oxidativa, mas sejam provenientes principalmente da formação de adutos. Corroborando este argumento, o trabalho de Pohjola et al. (2003) demonstrou que a formação de adutos no DNA de células bronquiais epiteliais humanas (BEAS-2B) expostas a extratos particulados de gasolina e benzo[a]pireno tem padrão de resposta concentração-dependente. A formação destes adutos também foi observada em experimentos *in vivo* por Jönsson et al. (2009), que também observaram o aumento da formação de ligações irreversíveis de HPA ao DNA de células de brânquia de *D. rerio*. Adicionalmente, o mesmo efeito foi observado em *Mytilus spp.*, após exposição *in situ* a locais com diversas fontes de contaminação por hidrocarbonetos, observando-se correlação positiva entre a quantidade de HPA no tecido e a quantidade de adutos no DNA (Skarphéðinsdóttir et al., 2007).

Referente às alterações no DNA resultante da exposição ao EF, notou-se que apenas em 1 h de exposição o escore de dano foi maior que o controle, e foi seguido por inversão desse padrão nos tempos experimentais seguintes. Tal resultado indica a ativação dos

mecanismos de reparo de ZF-L. A mesma indicação da capacidade de reparo de DNA pelas células ZF-L também foi descrita por Pomati et al. (2007), os quais verificaram o aumento da expressão de genes envolvidos neste mecanismo, após exposição da linhagem a uma mistura de diversos produtos farmacêuticos.

Com base nos resultados é possível afirmar que efluentes de postos de combustíveis são citotóxicos e necessitam estudos mais aprofundados para dimensionar seu real impacto no ambiente. Pode-se também comprovar o potencial genotóxico de compostos presentes na gasolina, solúveis em água. E finalmente, que a linhagem celular ZF-L é um bom modelo biológico para avaliação de impactos ambientais, apresentando resultados de forma rápida e adequada.

Agradecimentos

Ao INCT-TA/CNPq pela bolsa de mestrado concedida à D. Lachner e pelo apoio financeiro. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – UEL e a CAPES pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

Referências

- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2003. Naphthalene-induced differential tissue damage association with circulating fish phagocyte induction. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 7–15.
- Akaishi, F.M., Silva-De-Assis, H.C., Jakobi, S.C.G., Eiras-Stofella, D.R., St-Jean, S.D., Courtenay, S.C., 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.
- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407, 2115–2123.
- Arias, A.R.L., Buss, D.F., Alburquerque, C., Inácio, A.F., Freire, M.M., Egler, M., Mugnai, R., Baptista, D.F., 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Cien. Saude Colet.* 12, 61–72.
- Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C., Provini, A., 2009. Cytotoxic and genotoxic effects of in vitro exposures to triclosan and trimethoprimon on zebra mussel (*D. polymorpha*) hemocytes. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 150, 50–56.
- Bols, N.C., Dayeh, V.R., Lee, L.E.J., Schirmer, K., 2005. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology*. In: Mommsen, T.P., Moon, T.W. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Ed. Elsevier B.V., Amsterdam, Holanda.

- Bopp, S., Lettieri, T., 2008. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 8.
- Bopp, S.K., Lettieri, T., 2007. Gene expression profile assessment in zebrafish (*Danio rerio*), 1a ed. Joint Research Centre: Scientific and Technical Reports, Itália.
- Bopp, S.K., Minuzzo, M., Lettieri, T., 2006. The zebrafish (*Danio rerio*): an emerging model organism in the environmental field, 1a ed. Joint Research Centre: Scientific and Technical Reports, Itália.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248 – 254.
- Brasil, Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 273, 29 de novembro de 2000.
- Brasil, Paraná, Secretaria Estadual do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Resolução nº 038/09/SEMA, 19 de agosto de 2009.
- Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S., Speit, G., 2005. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20 (4): 245 – 254.
- Buss, D.F., Baptista, D.F., Nessimian, J.L., 2003. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Caderno da Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 19 (2): 465-473.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295-311.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2002. Hormesis: the dose-response revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 175 – 197.
- Caliani, I., Porcelloni, S., Mori, G., Frenzilli, G., Ferraro, M., Marsili, L., Casini, S., Fossi, M. C., 2009. Genotoxic effects of produced water in mosquito fish (*Gambusia affinis*). *Ecotoxicology* 18, 75 – 80.
- Castaño, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L.E.J., Mothersill, C., Pärt, P., Repetto, G., Sintes, J.R., Rufli, H., Smith, R., Wood, C., Segner, H., 2003. The use of fish cells in Ecotoxicology: the report and recommendations of ECVAM workshop. *ATLA* 31, 317 – 351.
- Chan, K.M., Ku, L.L., Chan, P.C.Y., Cheuk, W.K., 2006. Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. *Mar. Environ. Res.* 62 S83–S87.
- Chen, D.S., Chan, K.M., 2011. Differentially expressed proteins in zebrafish liver cells exposed to copper. *Aquat. Toxicol.* 104: 270-277.
- Christianson-Heiska, I., Isomaa, B. 2008. The use of primary hepatocytes from brown trout (*Salmo trutta lacustris*) and the fish cell lines RTH-149 and ZF-L for in vitro screening of (anti)estrogenic activity of wood extractives. *Toxicology in Vitro* 22: 589-597.
- Costa, C.L.A., Chaves, I.S., Ventura-Lima, J., Ferreira, J.L.R., Ferraz, L., Carvalho, L.M., Monserrat, J.M., 2012. *In vitro* evaluation of co-exposure of arsenium and an organic nanomaterial (fullerene, C₆₀) in zebrafish hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 155: 206-212.
- Debruyne, A.M.H., Wernick, B.G., Stefura, C., McDonald, B.G., Rudolph, B.L., Patterson, L., Chapman, P.M., 2007. *In situ* experimental assessment of lake whitefish development following a freshwater oil spill. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6983 – 6989.
- Fedato, R.P., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2010. Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. *Mutat. Res.* 700, 80 – 85.

- Fent, K., 2007. Permanent fish cell cultures as important tools in ecotoxicology. Completed Projects. ALTEX 24, Special Issue.
- Fent, K., Bätcher, R., 2000. Cytochrome P4501A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: demonstration of additive interactions. *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (8), 2047 – 2058.
- 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.
- Jönsson, M.E., Brunström, B., Brandt, I., 2009. The zebrafish gill model: induction of CYP1A, EROD and PAH adduct formation. *Aquat. Toxicol.* 91, 62 – 70.
- Kammann, U., Bunke, M., Steinhart, H., Theobald, N., 2001. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutat. Res.* 498, 67–77.
- Kling, P., Förlin, L., 2009. Proteomic studies in zebrafish liver cells exposed to the brominated flame retardants HBCD and TBBPA. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 1985–1993.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T., 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Communication* 3, 103 – 115.
- Martinez, C.B.R., 2006. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água, in: Silva-Souza, A.T. (Org.) *Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil*. Ed. ABRAPOA, Maringá, pp. 43-62.
- Monserrat, J.M., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 221–234.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55 – 63.
- Nicodem, D.E., Guedes, C.L.B., Correa, R.J., 1998. Photochemistry of petroleum I. Systematic study of a Brazilian intermediate crude oil. *Mar Chem* 63, 93 – 104.
- Oliveira-Martins, C.R.O., Grisolia, C.K. 2009. Toxicity and genotoxicity of wastewater from gasoline stations. *Genet. Molec Biol.* 32 (4): 853-856.
- 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. Saf.* 49, 64-75.
- Peakall, D.W., 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 1: 55-60.
- Petrobras. Disponível em: <http://www.br.com.br/wps/portal!/ut/p/c1/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hLf0N_P293QwP3YE9nAyNTD5egIEcnQ4tQA6B8JE55A1djFN3-ro5uBkZ-LgFO7n5-xgYWJgR0G5Gk29_f0xWo28DV1cPYHGiYMSUuNzDFp9vIHK9uC0cTAnb7eeTnpuoX5IYCQUQ5AAFxquc!/dl2/d1/L2dJQSEvUUt3QS9ZQnB3LzZfOU8xT05LRzEwR1NJQzAyNUhEUIJBQjEwUjE!/?WCM_GLOBAL_CONTEXT=>>. Acesso em 30 de abril de 2011.
- Pohjola, S.K., Lappi, M., Honkanen, M., Rantanen, L., Savela, K., 2003. DNA binding of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human bronchial epithelial cell line treated with diesel and gasoline particulate extracts and benzo[a]pyrene. *Mutagenesis* 18 (5), 429 – 438.
- Pomati, F., Cotsapas, C.J., Castiglioni, S., Zuccato, E., Calamari, D., 2007. Gene expression. Profiles in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells exposed to a mixture of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations. *Chemosphere* 70: 65–73.

- Sandrini, J.Z., Bianchini, A., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F.F., 2009. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquat. Toxicol.* 95, 285 – 291.
- Seok, S.H., Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Na, Y.R., Noh, K.J., Park, S.H., Lee, H.K., Lee, B.H., Ryu, D.Y., Park, J.H., 2007. Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. *Toxicol. in Vitro* 21: 870–877.
- 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. Saf.* 69, 112 – 120.
- Simonato, J.D., Martinez, C.B.R., Fernandes, M.N., 2011. Gasoline effects on biotransformations and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology* 20, 1400 – 1410.
- 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.
- Skarphéðinsdóttir, H., Ericson, G., Svavarsson, J., Næs, K., 2007. DNA adducts and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) tissue levels in blue mussels (*Mytilus spp.*) from Nordic coastal sites. *Mar. Environ. Res.* 64, 479 – 491.
- Teng, Q., Ekman, D.R., Huang, W., Collete, T.W. 2013. Impacts of 17 α -ethynylestradiol exposure on metabolite profiles of zebrafish (*Danio rerio*) liver cells. *Aquat. Toxicol.* 130: 184-191.
- Tiburtius, E.R.L., Peralta-Zamora, P., Emmel, A., Leal, E. S., 2005. Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. *Quim Nova* 28, 61 – 64.
- 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: 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.
- Vinardell, M.P., Benavides, T., Mitjans, M., Infante, M.R., Clapés, P., Clothier, R., 2008. Comparative evaluation of cytotoxicity and phototoxicity of mono and diacylglycerol amino acid-based surfactants. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3837 – 3841.
- Wei, T., Geijer, S., Lindberg, M., Berne, B., Törmä, H., 2006. Detergents with different chemical properties induce variable degree of cytotoxicity and mRNA expression of lipid-metabolizing enzymes and differentiation markers in cultured keratinocytes. *Toxicol. in Vitro* 1387 – 1394.
- Yang, F., Zhang, Q., Guo, H., Zhang, S., 2010. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and teratogenicity of marine sediments from Qingdao coastal areas using in vitro fish cell assay, comet assay and zebrafish embryo test. *Toxicol. in Vitro* 24, 2003 – 2011.
- Zhang, Q., Pi, J., Woods, C.G., Jarabek, A.M., Harvey, J.C., Andersen, M.E., 2008. Hormesis and adaptive cellular control systems. *Dose Response* 6, 196 – 208.
- Zhou, G.D., Richardson, M., Fazili, I.S., Wang, J., Donnelly, K.C., Wang, F., Amendt, B., Moorthy, B., 2010. Role of retinoic acid in the modulation of benzo(a)pyrene-DNA adducts in human hepatoma cells: implications for cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 249: 224-230.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando-se os resultados obtidos neste trabalho é possível afirmar que a FSG, nas menores concentrações avaliadas, apresenta potencial genotóxico e nas maiores concentrações, torna-se também citotóxica. Além disso, foi notável o potencial citotóxico de EF, mesmo em menores concentrações, indicando que o tratamento indicado pelos órgãos ambientais responsáveis não é suficiente para anular o efeito tóxico deste composto, ao liberá-lo no ambiente.

Algumas outras considerações também são válidas, como a afirmação de que o modelo de ensaio *in vitro* utilizado supre os requisitos para ser considerado um bom modelo biológico para estudos toxicológicos, como sensibilidade e rapidez de resposta, bem como redução dos custos e da geração de resíduos. Adicionalmente, comprova-se que os biomarcadores utilizados são ferramentas indispensáveis para o biomonitoramento e que eles fornecem respostas satisfatórias acerca da qualidade ambiental.

REFERÊNCIAS

- ADEYEMI, O., OGinni, O., OSUBOR, C.C., ADEYEMI, O., OLOYEDE, O.B., OLADIJI, A.T., ADEBAYO, E.A. *Effect of water contaminated with phthalate, benzene and cyclohexane on **Clarias gariepinus**' cellular system*. Food and Chemical Toxicology 47: 1941-1944. 2009.
- AHMAD, I., PACHECO, M., SANTOS, M.A. *Naphthalene-induced differential tissue damage association with circulating fish phagocyte induction*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 54: 7 – 15. 2003.
- AKAISHI, F.M., SILVA-DE-ASSIS, H.C., JAKOBI, S.C.G., EIRAS-STOFELLA, D.R., ST-JEAN, S.D., COURTENAY, S.C. *Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (Astyanax sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 46: 244 – 253. 2004.
- AMADO, L.L., GARCIA, M.L., RAMOS, P.B., FREITAS, R.F., ZAFALON, B., FERREIRA, J.L.R., YUNES, J.S., MONSSERAT, J.M. *A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity*. Science of the total environment 407: 2115 - 2123. 2009.
- ARIAS, A. R. L., BUSS, D. F., ALBURQUERQUE, C., INÁCIO, A. F., FREIRE, M. M., EGLER, M., MUGNAI, R., BAPTISTA, D. F. *Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos*. Ciência e Saúde Coletiva 12: 61–72. 2007.
- ARUKWE, A., NORDTUG, T., KORTNER, T.M., MORTENSEN, A.S., BRAKSTAD, O.G. *Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (**Danio rerio**) exposed to water-soluble fraction of crude oil*. Environmental Research 107 (3): 362-370. 2008.
- BARBOSA, L.H.C.B. *O uso da espécie Callinectes sapidus na avaliação da contaminação da fração biodisponível de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs)*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica. Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 2005.
- BILBAO, E., RAINGEARD, D., DIAZ DE CERIO, O., ORTIZ-ZARRAGOITIA, M., IZAGIRRE, U., ORBEA, A., MARIGÓMEZ, CAJARAVILLE, M.P., CANCIO, I. *Effects of exposure to Prestige-like heavy fuel oil and perfluorooctane sulfonate on conventional biomarkers and target gene transcription in the thicklip grey mullet **Chelon labrosus***. Aquatic Toxicology 98 (3): 282-296. 2010.
- BINELLI, A., COGNI, D., PAROLINI, M., RIVA, C., PROVINI, A. *Cytotoxic and genotoxic effects of in vitro exposures to triclosan and trimethoprimon on zebra mussel (**D. polymorpha**) hemocytes*. Comparative Biochemistry and Physiology, 150 C: 50–56. 2009.

- BOLS, N.C., DAYEH, V.R., LEE, L.E.J., SCHIRMER, K. *Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology*. In: MOMMSEN, T.P., MONN, T.W. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Ed. Elsevier B.V., Amsterdam, Holanda. 2005.
- BOPP, S., LETTIERI, T. *Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line*. BMC Pharmacology, v. 8. 2008
- BOPP, S.K., LETTIERI, T. *Gene expression profile assessment in zebrafish (Danio rerio)*. Joint Research Centre: Scientific and Technical Reports. Institute for Environment and Sustainability. Itália, 2007.
- BOPP, S.K., MINUZZO, M., LETTIERI, T. *The zebrafish (Danio rerio): an emerging model organism in the environmental field*. Joint Research Centre: Scientific and Technical Reports. Institute for Environment and Sustainability. Itália, 2006.
- BRADFORD, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry 72: 248 – 254. 1976.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº273, 29 de novembro de 2000.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, 17 de março de 2005.
- BRASIL, PARANÁ, Secretaria Estadual do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Resolução nº 038/09/SEMA, 19 de agosto de 2009.
- BRENDLER-SCHWAAB, S., HARTMANN, A., PFUHLER, S., SPEIT, G. *The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing*. Mutagenesis 20, v. 4: 245 – 254. 2005.
- BUSS, D. F., BAPTISTA, D. F., NESSIMIAN, J. L. *Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios*. Caderno da Saúde Pública, Rio de Janeiro, 19: 465-473. 2003.
- CAJARAVILLE, M.P., BEBIANNO, M.J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C., VIARENGO, A. *The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach*. The Science of the Total Environment 247: 295-311. 2000.
- CALABRESE, E. J., BALDWIN, L. A. *Hormesis: the dose-response revolution*. Annual Review on Pharmacology and Toxicology 43: 175 – 197. 2002.
- CALIANI, I., PORCELLONI, S., MORI, G., FRENZILLI, G., FERRARO, M., MARSILI, L., CASINI, S., FOSSI, M. C. *Genotoxic effects of produced water in mosquito fish (Gambusia affinis)*. Ecotoxicology 18: 75 – 80. 2009.

CAMUS, L., BIRKELY, S.R., JONES, M.B., BØRSETH, J.F., GRØSVIK, B.E., GULLIKSEN, B., LØNNE, O.J., REGOLI, F., DEPLEDGE, M.H. *Biomarker responses and PAH uptake in *Mya truncata* following exposure to oil-contaminated sediment in an Arctic fjord (Svalbard)*. *Te Science of the Total Environment* 308: 221-234. 2003.

CARVALHO, P.S.M., KALIL, D.C.B., NOVELLI, G.A.A., BAINY, A.C.D., FRAGA, A.P.M. *Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus brasiliensis**. *Marine Environmental Research* 66: 205-207. 2008.

CASTAÑO, A., BOLS, N., BRAUNBECK, T., DIERICKX, P., HALDER, M., ISOMAA, B., KAWAHARA, K., LEE, L. E. J., MOTHERSILL, C., PÄRT, P., REPETTO, G., SINTES, J. R., RUFLI, H., SMITH, R., WOOD, C., SEGNER, H. *The use of fish cells in Ecotoxicology: the report and recommendations of ECVAM workshop*. *ATLA* 31: 317 – 351. 2003.

CHAN, K.M., KU, L.L., CHAN, P.C.Y., CHEUK, W.K. *Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions*. *Marine Environmental Research* 62 S83–S87. 2006.

CHEN, D., ZHANG, D., YU, J.C., CHAN, K.M. *Effects of Cu₂O nanoparticle and CuCl₂ on zebrafish larvae and a liver cell-line*. *Aquatic Toxicology* 105: 344-354. 2011.

CHEN, D.S., CHAN, K.M. *Differentially expressed proteins in zebrafish liver cells exposed to copper*. *Aquatic Toxicology* 104: 270-277. 2011.

CHEUK, W.K., CHAN, P.C.Y., CHAN, K.M. *Cytotoxicities and induction of metallothionein (MT) and metal regulatory element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1) messenger RNA levels in the zebrafish (*Danio rerio*) ZFL and SJD cell lines after exposure to various metal ions*. *Aquatic Toxicology* 89: 103-112. 2008.

CHRISTIANSON-HEISKA, I., ISOMAA, B. *The use of primary hepatocytes from brown trout (*Salmo trutta lacustris*) and the fish cell lines RTH-149 and ZF-L for in vitro screening of (anti)estrogenic activity of wood extractives*. *Toxicology in Vitro* 22: 589-597. 2008.

CORSEUIL, H.X., MARINS, M.D.M. *Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave*. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental* 2 (2): 50-54. 1997.

COSTA, C.L.A., CHAVES, I.S., VENTURA-LIMA, J., FERREIRA, J.L.R., FERRAZ, L., CARVALHO, L.M., MONSERRAT, J.M. *In vitro evaluation of co-exposure of arsenium and an organic nanomaterial (fullerene, C₆₀) in zebrafish hepatocytes*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 155: 206-212. 2012.

CRISTIANSON-HEISKA, I., ISOMAA, B. *The use of primary hepatocytes from brown trout (*Salmo trutta lacustris*) and the fish cell lines RTH-149 and ZF-L for in vitro screening of (anti)estrogenic activity of wood extractives*. *Toxicology in Vitro* 22: 589-597. 2008.

DEBRUYN, A.M.H., WERNICK, B.G., STEFURA, C., MCDONALD, B.G., RUDOLPH, B.L., PATTERSON, L., CHAPMAN, P.M. *In situ experimental assessment of lake whitefish development following a freshwater oil spil.* Environmental Science & Technology 41: 6983 – 6989. 2007.

DI GIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A.. *Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity.* In: RAND, G.M., *Fundamentals of aquatic toxicology.* 2a ed. Washington, DC, Taylor & Francis. 1995

EXAME, disponível em: <<http://exame.abril.com.br/meio-ambiente-e-energia/noticias/10-maiores-acidentes-petroliferos-historia-556774?page=2>> de 06/05/2010. Acesso em 4 de março de 2013.

FEDATO, R.P., SIMONATO, J.D., MARTINEZ, C.B.R., SOFIA, S.H. *Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline.* Mutation Research 700: 80 – 85. 2010.

FENT, K. *Permanent fish cell cultures as important tools in ecotoxicology.* Completed Projects. ALTEX 24, Special Issue. 2007.

FENT, K., BÄTSCHER, R. *Cytochrome P4501A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: demonstration of additive interactions.* Environmental Toxicology and Chemistry 19, 8: 2047 – 2058. 2000.

FRENZILLI, G., NIGRO, M., LYONS, B.P. *The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments.* Mutation Research 681: 80 – 92. 2009.

FRENZILLI, G., SCARCELLI, V., BARGA, I.D., NIGRO, M., FÖRLIN, L., BOLOGNESI, C., STURVE, J. *DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbor.* Mutation Research 552: 187-195. 2004.

FRESHNEY, R. I., *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications.* Wiley-Blackwell, 6a ed. 2010. Nova Jérsei – EUA.

GOSH, C., ZHOU, Y.L., COLLODI, P. *Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line.* Cell Biology and Toxicology, 10: 167-176. 1994.

HERMES-LIMA, M., *Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals.* In: STOREY, K.B. *Functional metabolism: regulation and adaptation.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, Nova Jersey. 2004.

HUANG, Q., HUANG, H.Q. *Alterations of protein profile in zebrafish liver cells exposed to methyl parathion: a membrane proteomics approach.* Chemosphere 87: 68-76. 2012.

JHA, A.N. *Ecotoxicological applications and significance of the comet assay.* Mutagenesis 23: 207 – 221. 2008.

JÖNSSON, M. E., BRUNSTRÖM, B., BRANDT, I. *The zebrafish gill model: induction of CYP1A, EROD and PAH adduct formation.* Aquatic Toxicology 91: 62 – 70. 2009.

- JUNG, J.H., YIM, U.H., HAN, G.M., SHIM, W.J. *Biochemical changes in rockfish, **Sebastes schlegeli**, exposed to dispersed crude oil*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 150 (2): 218-223. 2009.
- KAMMANN, U., BUNKE, M., STEINHART, H., THEOBALD, N. *A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay*. Mutation Research 498: 67 – 77. 2001.
- KLING, P., FÖRLIN, L. *Proteomic studies in zebrafish liver cells exposed to the brominated flame retardants HBCD and TBBPA*. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 1985–1993. 2009.
- KOBAYASHI, H., SUGIYAMA, C., MORIKAWA, Y., HAYASHI, M., SOFUNI, T. *A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis*. MMS Communication 3: 103 – 115. 1995.
- KODO-FILHO, A.K. *Uso de biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do impacto do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná. 2006.
- LUSHCHAK, V.I., *Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals*. Aquatic Toxicology 101 (1): 13-30. 2011.
- MACHAELLA, N., REGOLI, F., SANTELLA, R.M. *Immunofluorescent detection of 8-oxo-dG and PAH bulky adducts in fish liver and mussel digestive gland*. Aquatic Toxicology 71: 335-343. 2005.
- MANDUZIO, H., ROCHER, B., DURAND, F., GALAP, C., LEBOULENGER, F. *The point about oxidative stress in molluscs*. ISJ 2: 91-104. 2005.
- MARTINEZ, C.B.R. *Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água*. In: SILVA-SOUZA, A.T. *Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil*. Ed. Maringá: ABRAPOA, 43-62, 2006.
- MARTINS, C.R.O., GRISOLIA, C.K. *Toxicity and genotoxicity of wastewater from gasoline stations*. Genetics and Molecular Biology 32 (4): 853-856. 2009.
- MARTINS, L.K.P., NASCIMENTO, I.A., FILLMANN, G., KING, R., EVANGELISTA, A.J.A., READMAN, J.W., DEPLEDGE, M.H. *Lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of chronic petroleum pollution at Todos os Santos Bay, Brazil*. Environmental Research 99: 387-396. 2005.
- MONSERRAT, J.M., MARTINEZ, P.E., GERACITANO, L.A., AMADO, L.L., MARTINS, C.M.G., PINHO, G.L.L., CHAVES, I.S., FERREIRA-CRAVO, M., VENTURA-LIMA, J., BIANCHINI, A. *Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives*. Comparative Biochemistry and Physiology 146 : 221–234. 2007.

MONTEIRO, V., CAVALCANTE, D.G.S.M., VILÉLA, M.B.F.A., SOFIA, S.H., MARTINEZ, C.B.R. *In vivo and in vitro exposures for the evaluation of genotoxic effects of lead on the neotropical freshwater fish Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology* 104: 291 – 298. 2011.

MOSMANN, T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *Journal of Immunological Methods* 65: 55 – 63. 1983.

NICODEM, D.E., FERNANDES, M.C.Z., GUEDES, C.L.B., CORREA, R.J. *Photochemical process and the environmental impact of petroleum spills*. *Biogeochemistry* 39: 121-138. 1997.
 NICODEM, D.E., GUEDES, C.L.B., CORREA, R.J. *Photochemistry of petroleum I. Systematic study of a Brazilian intermediate crude oil*. *Marine Chemistry* 63: 93 – 104. 1998.

NOTCH, E.G., MAYER, G.D. *17 α -Ethinylestradiol hinders nucleotide excision repair in zebrafish liver cells*. *Aquatic Toxicology* 95: 273-278. 2009.

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

PEAKALL, D.W., *Biomarkers: the way forward in environmental assessment*. *Toxicology and Ecotoxicology News* 1: 55-60. 1994.

PETROBRAS. Disponível em: <http://www.br.com.br/wps/portal!/ut/p/c1/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hLf0N_P293QwP3YE9nAyNTD5egIEcnQ4tQA6B8JE55A1djFN3-ro5uBkZ-LgFO7n5-xgYWJgR0G5Gk29_f0xWo28DV1cPYHGiYMSUuNzDFp9vIHK9uC0cTAnb7eeTnpuoX5IYCQUQ5AAFXquc!/dl2/d1/L2dJQSEvUUt3QS9ZQnB3LzZfOU8xT05LRzEwR1NJQzAyNUhEUIJBQjEwUjE!/?WCM_GLOBAL_CONTEXT=>>. Acesso em 30 de abril de 2011.

POHJOLA, S. K., LAPPI, M., HONKANEN, M., RANTANEN, L., SAVELA, K. *DNA binding of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human bronchial epithelial cell line treated with diesel and gasoline particulate extracts and benzo[a]pyrene*. *Mutagenesis* 18 (5): 429 – 438. 2003.

POMATI, F., COTSAPAS, C.J., CASTIGLIONI, S., ZUCCATO, E., CALAMARI, D. *Gene expression. Profiles in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells exposed to a mixture of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations*. *Chemosphere* 70: 65–73. 2007.

RAMACHANDRAN, S.D., HODSON, P.V. KHAN, C.W., LEE, K. *Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 300-308. 2004.

REGOLI, F., *Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress*. *Aquatic Toxicology* 50: 351-361. 2000.

REYNAUD, S., DESCHAUX, P. *The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review*. *Aquatic Toxicology* 77: 229-238. 2006.

SANDRINI, J.Z., BIANCHINI, A., TRINDADE, G.S., NERY, L.E.M., MARINS, L.F.F. *Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (Danio rerio) ZFL cells*. *Aquatic Toxicology* 95: 285 – 291. 2009.

SCHIRMER, K., *Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish*. *Toxicology* 224: 163-183. 2006.

SEOK, S.H., BAEK, M.W., LEE, H.Y., KIM, D.J., NA, Y.R., NOH, K.J., PARK, S.H., LEE, H.K., LEE, B.H., RYU, D.Y., PARK, J.H. *Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line*. *Toxicology in Vitro* 21: 870–877. 2007.

SILVA, C.A., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., KATSUMI, A., ARAÚJO, M.L.P., ZANDONÁ, E.M., COSTA SILVA, G.P., MASCHIO, J., ROCHE, H., SILVA DE ASSIS, H.C. *Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (2): 400-409. 2009.

SIMONATO, J. D., MARTINEZ, C. B. R., FERNANDES, M. N. *Gasoline effects on biotransformations and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus**. *Ecotoxicology* 20: 1400 – 1410. 2011

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

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L., *A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells*. *Experimental Cell Research* 175: 184-191. 1988.

SKARPHÉDINDSÓTTIR, H., ERICSON, G., SVAVARSSON, J., NÆS, K. *DNA adducts and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) tissue levels in blue mussels (*Mytilus spp.*) from Nordic coastal sites*. *Marine Environmental Research* 64: 479 – 491. 2007.

STURVE, J., HASSELBERG, L., FÄLTH, H., CELANDER, M., FÖRLIN, L. *Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*)*. *Aquatic Toxicology* 78, suplemento: 73-78. 2006.

TENG, Q., EKMAN, D.R., HUANG, W., COLLETE, T.W. *Impacts of 17 α -ethynylestradiol exposure on metabolite profiles of zebrafish (*Danio rerio*) liver cells*. *Aquatic Toxicology* 130: 184-191. 2013

TIBURTIUS, E.R.L., PERALTA-ZAMORA, P., EMMEL, A., LEAL, E.S. *Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados*. *Química Nova* 28, 61 – 64. 2005.

TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C., SASAKI, Y.F. *Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 206-221. 2000.

TINTOS, A., GESTO, M., ALVAREZ, R., MÍGUEZ, J.M., SOENGAS, J.L. *Interactive effects of naphthalene treatment and the onset of vitellogenesis on energy metabolism in liver and gonad, and plasma steroid hormones of rainbow trout **Oncorhynchus mykiss***. Comparative Biochemistry and Physiology C 144: 155-165. 2006.

TRISCIANI, A., CORSI, I., TORRE, C.D., PERRA, G., FOCARDI, S. *Hepatic biotransformation genes and enzymes and PAH metabolites in bile of common sole (**Solea solea**, Linnaeus, 1758) from an oil-contaminated site in the Mediterranean Sea: a field study*. Marine Pollution Bulletin 62: 806-814. 2011.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E., *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*. Environmental Toxicology and Pharmacology 13: 57-149. 2003.

VANZELLA, T.P., MARTINEZ, C.B.R., CÓLUS, I.M.S. *Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species*. Mutation Research 631: 36 – 43. 2007.

VINARDELL, M. P., BENAVIDES, T., MITJANS, M., INFANTE, M. R., CLAPÉS, P., CLOTHIER, R. *Comparative evaluation of cytotoxicity and phototoxicity of mono and diacylglycerol amino acid-based surfactants*. Food and Chemical Toxicology 46: 3837 – 3841. 2008.

WALKER, C.H. *Principles of ecotoxicology*. Taylor & Francis. Londres, Reino Unido. 1996.

WEI, T., GEIJER, S., LINDBERG, M., BERNE, B., TÖRMÄ, H. *Detergents with different chemical properties induce variable degree of cytotoxicity and mRNA expression of lipid-metabolizing enzymes and differentiation markers in cultured keratinocytes*. Toxicology in Vitro 1387 – 1394. 2006.

WINSTON, G.W., DI GIULIO, R.T., *Prooxidant and antioxidante mechanisms in aquatic organisms*. Aquatic Toxicology 19: 137-161. 1991.

YANG, F., ZHANG, Q., GUO, H., ZHANG, S. *Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and teratogenicity of marine sediments from Qingdao coastal areas using in vitro fish cell assay, comet assay and zebrafish embryo test*. Toxicology in Vitro 24: 2003 – 2011. 2010.

ZHANG, Q., PI, J., WOODS, C. G., JARABEK, A. M., HARVEY, J. C., ANDERSEN, M. E. *Hormesis and adaptative cellular controlle systems*. Dose-response 6: 196 – 208. 2008.

ZHOU, G.D., RICHARDSON, M., FAZILI, I.S., WANG, J., DONNELLY, K.C., WANG, F., AMENDT, B., MOORTHY, B. *Role of retinoic acid in the modulation of benzo(a)pyrene-DNA adducts in human hepatoma cells: implications for cancer prevention*. Toxicology and Applied Pharmacology 249: 224-230. 2010.