



Universidade Estadual de Londrina

---

**TATIANA PERES VANZELLA**

**EFEITOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DA FRAÇÃO  
SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE  
NEOTROPICAL**

---

Londrina  
2006



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

**TATIANA PERES VANZELLA**

**EFEITOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DA FRAÇÃO  
SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE  
NEOTROPICAL**

---

Londrina  
2006

**TATIANA PERES VANZELLA**

**EFEITOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DA FRAÇÃO  
SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE  
NEOTROPICAL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**Orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus**

Londrina  
2006

**TATIANA PERES VANZELLA**

**EFEITOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL  
DO ÓLEO DIESEL EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa. Dra. **Ilce Mara de Syllos Cólus**

Departamento de Biologia Geral

CCB-UEL

Profa. Dra. **Maria Aparecida Marin - Morales**

Departamento de Biologia

UNESP/Rio Claro-SP

Profa. Dra. **Sílvia Helena Sofia**

Departamento de Biologia Geral

CCB-UEL

Londrina, 20 de fevereiro de 2006.

*Pelo amor, incentivo, suporte e confiança...*

*Com todo amor, aos meus pais, Valtuir e*

*Virgínia, dedico este trabalho.*

*À Thais, minha irmã querida,  
pelo amor e motivação.*

*Ao Sylvio, meu amor e amigo, pelo  
carinho e amparo em todos os  
momentos.*

## *AGRADECIMENTOS*

Ao **Departamento de Biologia Geral e a Coordenação do Mestrado em Genética e Biologia Molecular** por possibilitarem a realização deste trabalho.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilce Mara de Syllos Cólus** pela valiosa orientação, apoio, paciência e amizade e, sem dúvida, pelo incentivo em todas as etapas deste trabalho.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Bueno dos Reis Martinez** pelo auxílio e pelas importantes sugestões destinadas ao trabalho.

Às professoras convidadas para compor a banca examinadora, **Dr<sup>a</sup>. Silvia Helena Sofia** e **Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Marin-Morales**, pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Aos professores do Departamento de Biologia Geral, **Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovanni**, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Giuliano Caetano** e **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Dias** pela amizade e auxílio indispensável nestes dois anos de convivência.

Aos técnicos do interlaboratório, **Dário e Melyssa**, pela disponibilidade, ajuda e amizade.

À **Sueli**, secretária do Programa de Mestrado, por todos os “galhos quebrados”, pela amizade e disponibilidade.

Pela eterna amizade... a todos os meus amigos de graduação na UNESP de Assis, em especial, **Cláudia, Renata, Paloma, Christiane, Thais e Bruna**.

À **Renata**, amigona de república, pela amizade, pelas risadas, discussões e divagações, pela paciência nas horas mais estressantes, pela disponibilidade e incentivo nestes anos de convivência.

Aos amigos do laboratório de Citogenética de Peixes **Renata, Marce, Vivian, Fernando Treco, Sandra, Larissa, Andressa** pelo auxílio imprescindível, confiança e por todos os momentos de descontração.

A todo pessoal do laboratório de Mutagênese em especial à **Aline e a Fernanda** pelo apoio nas etapas deste trabalho.

Ao **Sylvio**, meu companheiro e amigo nesta fase importante da vida... obrigada pela presença e paciência, pelo suporte nos momentos difíceis, pelos tantos momentos felizes...

À **minha família**: mãe, pai e irmã, que são as pessoas mais importantes de minha vida... muito obrigada pelo incentivo, pela motivação, pelo amparo e amor, mas principalmente por vocês estarem presentes na minha vida.

Aos **peixes** que literalmente deram vida ao meu trabalho.

A todas as pessoas que de alguma colaboraram e fizeram desse trabalho possível.

Ao meu **Deus...** pilar da minha vida.

*“Se a motivação é pura e sincera,  
todo resto vem por si.”*

*Dalai Lama.*

VANZELLA, TATIANA PERES. Efeitos Genotóxicos e Mutagênicos da Fração Solúvel do Óleo Diesel em uma Espécie de Peixe Neotropical. 2006. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR.

## RESUMO

O presente trabalho apresenta os resultados da avaliação da mutagenicidade e genotoxicidade da fração solúvel do óleo diesel comercial em peixes dulcícolas da espécie *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), vulgarmente conhecidos como curimbas. A fração solúvel do óleo diesel (FSD) foi obtida via simulação de derrame em ambiente tropical. No derrame, o óleo foi misturado à água em aquários de vidro (50L), exposto a luz solar intensa e em seguida coletado a fração solúvel do diesel em galões opacos e armazenada até o momento dos experimentos. Os animais foram expostos à FSD, diluída em 50% com água de poço artesiano, de forma aguda (6, 24, 96 horas) e sub-crônica (15 dias) em aquários de 100L contendo oito peixes cada. Água de poço artesiano foi empregada como controle-negativo. O controle-positivo constou de animais que receberam injeção de ciclofosfamida. Após as exposições foi coletado o sangue da veia caudal dos animais e realizados os ensaios Cometa e do Micronúcleo. Na análise estatística dos resultados empregaram-se os testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Pelo ensaio Cometa, todos os animais expostos à fração solúvel do óleo diesel apresentaram um aumento na frequência de células danificadas quando comparado aos seus respectivos controles-negativos. O índice de dano celular (score) também foi estatisticamente diferente daqueles observados nos animais expostos somente à água de poço artesiano. As lesões causadas no material genético dos peixes expostos à FSD podem ser resultado de danos oxidativos causados por compostos eletrofílicos decorrentes da metabolização dos hidrocarbonetos do óleo diesel. Em todas as exposições à FSD realizadas observou-se um aumento considerável na frequência de micronúcleos nos eritrócitos dos peixes expostos, quando comparados aos seus respectivos controles-negativos, o que sugere a presença de compostos com potencial clastogênico e/ou aneugênico na FSD testada. Conseqüentemente, a combinação destas duas metodologias no presente estudo mostrou-se adequada e vantajosa para a avaliação da genotoxicidade da fração solúvel do óleo diesel devido às suas complementaridades. Dessa forma, o presente trabalho mostrou que um derrame de óleo diesel na natureza pode acarretar, a curto e médio prazo, danos no material genético dessa espécie brasileira de peixe neotropical.

**Palavras-chave:** óleo diesel, mutagenicidade, genotoxicidade, *Prochilodus lineatus*, ensaio cometa, micronúcleo.

VANZELLA, TATIANA PERES. Genotoxic and Mutagenic Effects of the Diesel Oil Water Soluble Fraction on a Neotropical Fish Specie. 2006. Dissertation (Mesters in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR.

### ABSTRACT

The present work shows results of the mutagenicity and genotoxicity evaluation of the comercial diesel oil fraction on freshwater fishes *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae), ordinarily known as curimba. The water containing the diesel oil soluble fraction was obtained through simulation of the spill in tropical environment. In the spill, the oil has been mixed with water in glasses aquariums (50L), exposed to intense sun light followed by collecting the diesel water soluble fraction on opaque gallons and kept until the moment of the experiences. The animals were exposed to the diesel water soluble fraction (DWSF) diluted on 50% with artesian well water, in acute way (6, 24 and 96 hours) and sub-chronic way (15 days) on 100L aquarium containing eight fishes each. Artesian well water has been employed as negative – control. The positive – control was performed with animals wich received ciclophosphamide injection. After exposurings, the blood from the caudal vein of the animals were collected to achieve the Comet and Micronuclei assays. In the statistics analyses Mann-Whitney and Kruskal-Wallis non-parametrics tests have been used. By the Comet assay all animals exposed to the diesel water soluble fraction presented an increase on damaged cells frequency in comparison to theirs respective negative – controls. As well as this the score of cell damage was statistical differently from those observed on the animals exposed only in water from artesian well. The lesions caused in the genetic material of fishes exposed to DWSF might be resulted from oxidative damages by eletrophilics compounds originated on metabolized diesel oil hydrocarbons. In every exposures to DWSF a remarkable increase on the frequency of micronucleus on erythrocytes of exposed fishes was observed, when compared to theirs respective negative controls, with suggests the presence of compounds with clastogenic and or aneugenic potentials on the water tested. Therefore, the combination of both methodologies at the present work has shown suitable and profitable in evaluating genotoxicity of the diesel oil water soluble fraction due to its complementarities. Consequently, the present work demonstrated that the diesel oil spill on tropical environment may carry, in short or medium term, damages on the genetic material of this Brazilian neotropical fish specie.

**Key-words:** diesel oil, mutagenicity, genotoxicity, *Prochilodus lineatus*, comet assay, micronuclei.

## LISTA DE FIGURAS

MATERIAL E MÉTODOS	Páginas
<b>Figura 1</b> – Exemplar jovem de <i>Prochilodus lineatus</i> .....	<b>34</b>
<b>Figura 2</b> – Simulação do derrame de óleo diesel .....	<b>37</b>
<b>Figura 3</b> – Classes de cometas em eritrócitos de <i>Prochilodus lineatus</i> após a exposição à fração solúvel do óleo diesel .....	<b>42</b>
<b>Figura 4</b> – Eritrócitos do sangue periférico de <i>Prochilodus lineatus</i> .....	<b>44</b>
 <b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Figura 1</b> – Escores Médios obtidos no ensaio do Cometa para curimbas expostos à Fração Solúvel do Óleo Diesel (FSD) sob tratamentos agudos e sub-crônico e seus respectivos controles-negativos e positivos .....	<b>61</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

### Páginas

**TABELA I** - Número de nucleóides observados em cada classe de cometa (0, 1, 2, 3) e média de nucleóides danificados por animal em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do óleo diesel (FSD), considerando-se o número total de animais analisados (N) para cada tratamento experimental (agudo ou sub-crônico) e seus controles negativos e positivos.....**60**

**TABELA II** - Frequência (média e %) de eritrócitos micronucleados obtidos em *Prochilodus lineatus* após exposições agudas (6, 24, 96 horas) e sub-crônica (15 dias) à fração solúvel do óleo diesel (FSD) e seus respectivos controles negativos e positivos.....**63**

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1. POLUIÇÃO AQUÁTICA POR PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS.....	13
1.2. GENÉTICA TOXICOLÓGICA .....	18
1.2.1 GENÉTICA TOXICOLÓGICA AQUÁTICA.....	21
1.3. ENSAIO COMETA.....	24
1.4. TESTE DO MICRONÚCLEO.....	28
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1. ESPÉCIE ESTUDADA.....	33
3.2. ÓLEO DIESEL.....	35
3.3. SIMULAÇÃO DE ACIDENTE AMBIENTAL COM DERRAME DE ÓLEO DIESEL.....	35
3.4. EXPOSIÇÃO DOS PEIXES AO ÓLEO DIESEL.....	38
3.5. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CELULARES.....	39
3.6. ENSAIO ALCALINO DO COMETA.....	39
3.7. TESTE DO MICRONÚCLEO.....	43
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45

## **CAPÍTULO 1**

<b>EFEITOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL.....</b>	<b>46</b>
RESUMO.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1. ESPÉCIE ESTUDADA.....	52
2.2. SIMULAÇÃO DE DERRAME COM ÓLEO DIESEL.....	52
2.3. EXPOSIÇÃO DOS PEIXES E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CELULARES.....	53
2.4. ENSAIO COMETA.....	54
2.5. TESTE DO MICRONÚCLEO.....	56
2.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	57
3. RESULTADOS.....	58
3.1. ANÁLISE DA ÁGUA.....	58
3.2. ENSAIO DO COMETA.....	58
3.3. TESTE DO MICRONÚCLEO.....	62
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	64
5. REFERÊNCIAS.....	72
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. POLUIÇÃO AQUÁTICA POR PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS

A Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) define poluição como a presença de uma substância no ambiente que, devido à sua composição química ou quantidade, prejudica o funcionamento dos processos naturais, produzindo efeitos indesejáveis sobre a saúde e ambientes. Qualquer material que cause poluição é chamado de poluente. A poluição é o resultado do grande descaso do homem com o meio ambiente e os problemas com poluição têm se tornado urgentes com o passar dos anos. O aumento da população, a expansão do consumo e a descarga de produtos no meio ambiente são as principais causas da poluição (WRIGHT & NOBEL, 2000).

O ambiente aquático é um habitat para grande número de plantas, animais e espécies microbianas e sua composição influencia diretamente estes organismos (ALLOWAY & AYRES, 1997). Entretanto, as águas de mares e rios sempre foram locais convenientes para a liberação de dejetos humanos (SCARPATO *et al.*, 1990) e por décadas estes ambientes têm sido usados como depósitos de resíduos antropogênicos e de efluentes industriais (PACHECO & SANTOS, 2001; FLEEGER *et al.*, 2003). Atualmente atividades tecnológicas também têm contribuído para a contaminação aquática (JOBBLING, 1996).

As fontes de poluição aquática mais freqüentes são os patógenos, os resíduos orgânicos, os sedimentos e, nutrientes e os poluentes químicos. Tais

poluentes podem se espalhar pela superfície e/ou pela coluna d'água formando "soluções", que podem resultar em efeitos indesejáveis sobre os corpos de água. Poluentes orgânicos como os pesticidas, compostos químicos industriais (como é o caso das bifenilas policloradas - BPCs), solventes, detergentes e os derivados de petróleo são prejudiciais para o ecossistema aquático (WRIGHT & NOBEL, 2000).

O petróleo, seus produtos refinados e seus hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs – do inglês: polycyclic aromatic hydrocarbons) individuais são encontrados por toda parte do mundo, com ocorrências detectadas nos componentes vivos e sem vida do ecossistema (ALBERS, 2002). Contaminações da água por hidrocarbonetos de petróleo podem ser resultado de acidentes com tanques de óleo, grandes derramamentos, descargas de resíduos municipais e industriais, além de pequenos vazamentos diários provenientes de atividades rotineiras de navegação e pesca (PACHECO & SANTOS, 2001) e em tanques de postos de combustível. Tanto o petróleo como seus derivados quando despejados na água espalham-se rapidamente, cobrindo grandes áreas com uma camada de óleo que pode variar em espessura. Tais poluentes submergem e se dissolvem facilmente na superfície e na coluna d'água e, pela ação das ondas e correntes, água e óleo se misturam produzindo uma emulsão. Os movimentos de óleo na superfície da água por dissolução e emulsão expõem moléculas e partículas do óleo aos organismos do ambiente (ALBERS, 2002).

Após um derrame de petróleo ou de seus derivados em águas naturais, ocorre uma variedade de efeitos físicos, químicos e biológicos. Processos de

intemperismo iniciam-se com a evaporação, seguida de fotodegradação, a qual favorece o processo de degradação biológica (NICODEM *et al.*, 1997).

O petróleo pode ser destilado em diversos produtos, como óleo diesel, gasolina, óleo cru, gás natural dentre outros. A toxicidade do petróleo é, em sua maioria, atribuída à sua parte solúvel (ALMEIDA-VAL *et al.*, 2002), que contém, segundo PACHECO & SANTOS (2001), compostos polares de baixo peso molecular, denominados hidrocarbonetos aromáticos (mono ou poliaromáticos), que podem ser classificados em dois grupos toxicológicos: compostos BTEX (tolueno, benzeno, etilbenzeno e xileno) e pequenos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), como o naftaleno. HAMOUTENE *et al.* (2002) afirmam que os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes em efluentes de refinarias de petróleo são descritos como os principais componentes capazes de causar danos no DNA.

De acordo com JHA (2004), a presença de PAHs no ambiente aquático é preocupante, pois eles induzem toxicidade aguda nos organismos e sua presença nos sedimentos está ligada a neoplasias de fígado em espécies bentônicas.

A fração solúvel do petróleo em água, mesmo em baixas concentrações, é considerada um poluente ambiental perigoso e pode causar distúrbios químicos nos organismos (ALMEIDA-VAL *et al.*, 2002).

A fração menos solúvel do óleo cru pode persistir por um longo tempo no ambiente aquático e se tornar uma barreira física na interface água-ar, impondo um desafio às espécies de peixes que dependem da superfície da água para respirar.

Além disso, o contato com a mancha de óleo pode resultar num decréscimo do oxigênio do sangue dentre outros tipos de distúrbios químicos em tais organismos (ALMEIDA - VAL & VAL, 1999). O óleo cru pode causar vários outros tipos de efeitos crônicos sobre as espécies de peixes da coluna d'água, como disruptura neurosensorial, anormalidades de desenvolvimento e comportamento, além da redução de fertilidade (BHATTACHARYYA *et al.*, 2003).

Segundo PACHECO & SANTOS (2001) o óleo diesel e a gasolina são misturas complexas de centenas de substâncias químicas, e seus principais componentes podem ser divididos em duas classes: hidrocarbonetos alifáticos (alcanos e alcenos) e hidrocarbonetos aromáticos (benzeno, tolueno, xileno). No óleo diesel, o naftaleno (PAH mais simples) e seus derivados são os mais freqüentemente encontrados (0,4%).

O óleo diesel possui baixa solubilidade na água. Assim, experimentos em laboratório geralmente utilizam a fração solúvel do óleo diesel, que permite reproduzir e estudar a mistura dos hidrocarbonetos aromáticos ali presente (PACHECO & SANTOS, 2001). Segundo NICODEM *et al.* (1997), nesse processo o filme de óleo na superfície da água torna-se menos tóxico devido à perda de PAHs, mas a fração solúvel torna-se mais tóxica devido à formação de componentes polares decorrentes de irradiação do óleo combustível.

Os poucos trabalhos existentes sobre a avaliação genotóxica de peixes expostos ao óleo diesel foram realizados após acidentes ambientais ou em testes de toxicidade em laboratórios utilizando peixes submetidos ao óleo diesel. Os

resultados destes trabalhos mostraram que o óleo diesel danifica o epitélio respiratório, produz alterações no hematócrito, aumenta o consumo de oxigênio e reduz as taxas de crescimento, sobrevivência e reprodução dos animais (PACHECO & SANTOS, 2001).

## 2.2. GENÉTICA TOXICOLÓGICA

A vulnerabilidade do material genético às agressões impostas pelo ambiente criou uma nova área de pesquisa, a Genética Toxicológica (RABELLO – GAY *et al.*, 1991), que busca avaliar o potencial de dano às células, o mecanismo de ação das substâncias, bem como fazer previsão de genotoxicidade e carcinogenicidade. A toxicidade genética não é uma medida de carcinogenicidade, mas, freqüentemente, é usada como um indicador desse fenômeno (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações denominadas mutações, que podem ser causadas por erros durante a sua duplicação ou durante a divisão celular (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

Um dano mutagênico pode ser manifestado como uma mudança resultante de mutações em células da linhagem germinativa e ou somática. Essas mutações podem ser expressas em genes individuais ou grupos de genes, bem como ao nível cromossômico (DEARFIELD *et al*, 2002).

HOUK (1992) descreveu três classes de mutações:

1. Mutação G nica: referente a mutações de ponto, que causam alterações na seq ncia de DNA dentro do gene;
2. Mutação Cromoss mica Estrutural: referente a alterações na estrutura cromoss mica, resultando em ganho ou perda, ou rearranjo de pedaços dos cromossomos, como deleções e translocações;
3. Mutação Cromoss mica Numérica: referente a ganho ou perda de cromossomos intactos (aneuploidia, poliploidia).

Agentes que interagem com o DNA e ou com seus componentes celulares (fibras do fuso) e enzimas (topoisomerases) são designados genotóxicos. O termo genotoxicidade inclui formação de aductos no DNA, lesões na fita do DNA, síntese de DNA não programada, trocas entre cromátides-irmãs, enquanto que mutagenicidade   especificamente a indução de mutação ao nível g nico ou cromossômico. Enquanto os efeitos genotóxicos podem ser transit rios, os efeitos mutagênicos são persistentes. Portanto, mutagenicidade   uma alteração permanente no conteúdo ou na estrutura do material genético de um organismo (DEARFIELD *et al.*, 2002).

As mutações podem ser espontâneas ou induzidas por xenobióticos. Segundo LEE & STEINERT (2003), compostos químicos que causam danos no DNA podem ser agrupados em quatro grupos: (1) aqueles que agem diretamente sobre a molécula; (2) os que precisam ser metabolizados para causarem danos; (3) os que

promovem a produção de espécies reativas de oxigênio e (4) aqueles que causam inibição no reparo e na síntese do DNA.

Nos últimos 25 anos foram desenvolvidos mais de 200 testes de curta duração utilizando microrganismos, insetos, plantas e animais para identificar agentes que promovem dano genético (HOUK, 1992). Segundo MARTINEZ & CÓLUS (2002), biomarcadores podem fornecer medidas sensíveis e específicas da exposição de organismos a agentes genotóxicos, permitindo avaliar a saúde dos organismos no ambiente.

Entre os vários biomarcadores envolvidos para detectar efeitos em células somáticas estão as alterações na atividade de enzimas ou no nível de um composto biogênico específico, eventos de formação de aductos por ligações covalentes no DNA, os rearranjos do DNA em trocas entre cromátides-irmãs (SCEs), quebras nas fitas do DNA e a formação de micronúcleos (MARTINEZ & CÓLUS, 2002).

Tais biomarcadores avaliam danos no material genético ocorridos espontaneamente ou causados por agentes químicos, físicos e biológicos, sendo que as perturbações no material genético, em geral, são deletérias aos organismos e podem levar a conseqüências severas e irreversíveis para a saúde (BICKHAM *et al.*, 2000; MARTINEZ & CÓLUS 2002).

A seleção do ensaio apropriado para um determinado estudo depende das características da amostra a ser testada, da validade do sistema-teste e de sua base

de dados acumulados, da utilidade do ensaio para amostras ambientais complexas, de seu custo relativo e de sua simplicidade (HOUK, 1992).

Segundo RABELLO-GAY *et al.* (1991), embora testes de mutagenicidade em muitos microrganismos apresentem boa correlação com os seus potenciais carcinogênicos em animais superiores e ofereçam vantagens quanto ao custo e a rapidez, essa associação falha em alguns casos, devido à simplicidade da estrutura e da capacidade metabólica do sistema. Então, geralmente, são mais relevantes os ensaios feitos *in vitro* ou *in vivo*, utilizando, respectivamente, células eucariotas ou organismos superiores.

### **1.2.1 GENÉTICA TOXICOLÓGICA AQUÁTICA**

A ecotoxicologia descreve as mudanças danosas sobre a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas causadas por substâncias químicas. Uma das dificuldades da ecotoxicologia é relacionar os perigosos efeitos dos poluentes químicos sobre animais e plantas com as conseqüências ecológicas (MOORE, 2002).

Durante décadas a comunidade científica tem se dado conta do aumento de estressores ambientais com impactos de grande duração sobre a saúde humana e a sustentabilidade do ecossistema. Tal fato ocorreu devido ao aumento dramático de informações sobre destruição da camada de ozônio, a mudança climática global, aumento dos níveis de nitrogênio, lançamentos acidentais de substâncias químicas industriais e gases radioativos e derrames de óleo; conjunto de fatores que pode

levar à perda da diversidade biológica (BICKHAM *et al.*, 2000). O ambiente aquático é o último recipiente desta gama crescente de contaminantes antropogênicos (JHA *et al.*, 2004) e a consequência da contaminação das águas resultante das atividades humanas é o comprometimento dos recursos dulcícolas. Existem centenas, talvez milhares de poluentes que afetam o meio ambiente aquático e cujos efeitos são preocupantes (MARTINEZ & CÓLUS, 2002). Assim, estudos ecotoxicológicos têm sido desenvolvidos para melhor avaliar a contaminação química na vida aquática e, conseqüentemente, suas implicações à saúde animal e humana (SCARPATO *et al.*, 1990).

De forma geral, os poluentes podem agir nos organismos de várias maneiras, dependendo de suas características, do corpo d'água receptor e da comunidade biológica presente no local. Em alguns casos, podem matar os animais; em concentrações menores podem exercer efeitos subletais sobre eles (MARTINEZ & CÓLUS 2002). Segundo BICKHAM *et al.* (2000), tais poluentes podem mostrar seus efeitos tóxicos ao nível molecular, como também iniciar uma cascata de respostas que incluem tecidos, saúde do organismo, reprodução, demografia e genética da população e, finalmente, levar a processos evolutivos que incluem a extinção.

Diversos poluentes presentes em águas poluídas são conhecidos por serem capazes de interagir com o DNA de células vivas e, dessa forma, causarem efeitos genotóxicos (FRENZILLI *et al.*, 2004).

A genética toxicológica aquática tem a intenção de determinar o efeito de xenobióticos, isto é, de substâncias de estrutura e origem estranhas encontradas em

um organismo, sobre a função e a estrutura de ecossistemas aquáticos, e um de seus objetivos principais é o desenvolvimento de técnicas capazes de medir a contaminação ambiental (BICKHAM *et al.*, 2000; MARTINEZ & CÓLUS 2002).

De acordo com BICKHAM *et al.* (2000), para avaliação dos efeitos ecológicos subletais de poluentes, o emprego de biomarcadores tem sido considerado uma ferramenta de extrema sensibilidade.

HOUK (1992) descreveu a importância dos testes genotóxicos e mutagênicos nos estudos de biomonitoramento ambiental e para a saúde humana. Assim, ensaios de toxicidade e citotoxicidade têm sido empregados para avaliar a qualidade da água em estudos de biomonitoramento de rios, como também na avaliação da genotoxicidade de poluentes em ensaios de laboratório ou no campo (BICKHAM *et al.*, 2000).

Apesar do pouco conhecimento sobre o potencial de poluentes como agentes promotores de efeitos genotóxicos em organismos aquáticos, estes têm sido considerados bons indicadores de poluição aquática (SCARPATO *et al.*, 1990).

Dentre os organismos empregados como sentinelas, os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, pois alertam sobre o perigo potencial de novas substâncias químicas ou para a possibilidade de poluição ambiental (POWERS, 1989) e podem indicar o potencial de exposição das populações humanas a substâncias genotóxicas presentes na água, pois são um excelente modelo para estudos

carcinogênicos e mutagênicos em amostras de água. Sendo vertebrados aquáticos, metabolizam poluentes que são carregados pela água, respondendo de forma similar aos vertebrados superiores quando expostos a substâncias tóxicas (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

Ensaio de genotoxicidade *in vivo* têm empregado, com freqüência, tais organismos como modelo para avaliar os riscos à saúde de vertebrados superiores (POWERS, 1989). Esses animais podem facilmente ser mantidos em laboratório e expostos a compostos químicos. O uso de biomarcadores em peixes, como índices de efeitos de poluição, é de extrema importância, pois eles podem permitir uma detecção precoce de problemas ambientais aquáticos (VAN DER OOST *et al.*, 2003; FRENZILLI *et al.*, 2004).

O uso de exemplares de espécies nativas de peixes para a avaliação da mutagenicidade de xenobióticos é relevante, visto que há a necessidade de preservar tais espécies, além do que, através da alimentação, muitos deles são agentes de transferência de contaminantes ao homem (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

### **1.3. ENSAIO COMETA**

Técnicas que permitem uma detecção sensível de danos e reparo do DNA são extremamente importantes no campo da toxicologia. Danos induzidos por agentes tóxicos são, freqüentemente, tecidos e tipo celulares específicos e é de grande importância o desenvolvimento de metodologias que possam detectar tais

danos no DNA em células individuais, não dependendo de características cromossômicas e de divisão celular (SINGH *et al.*, 1988; PANDRANGI *et al.*, 1995; RUSSO *et al.*, 2004).

O ensaio do Cometa tem sido proposto para estudos de Toxicogenética devido às suas vantagens e peculiaridades quando comparado a outros testes que detectam substâncias genotóxicas, sendo uma ferramenta fundamental de investigação em estudos de reparo de DNA, biomonitoramento ambiental e teste de genotoxicidade (ROSS *et al.*, 1995).

O ensaio do Cometa (SCGE) mensura quebras primárias na fita de DNA em células individuais (SINGH *et al.*, 1988) e é relativamente rápido, simples, de custo-efetivo baixo (BELPAEME *et al.*, 1998).

As vantagens de se empregar o ensaio do Cometa para avaliar danos no DNA incluem: (1) mensuração de danos em células individuais; (2) o baixo número de células necessário para a realização do teste; (3) capaz de ser realizado em qualquer tipo de célula eucariótica nucleada; (4) ser um método muito sensível para detectar danos no DNA (LEE & STEINERT, 2003).

No teste do Cometa, células são suspensas em agarose de baixo ponto de fusão sobre uma lâmina de vidro para microscopia. As lâminas são colocadas em solução de lise para permitir o relaxamento do DNA e em seguida é realizada a eletroforese. Durante a eletroforese, os fragmentos de DNA danificados migram para além do core nuclear, formando um cometa com cauda; os fragmentos danificados

migram mais rapidamente do que as moléculas de DNA intacto e as células que não foram expostas a um agente genotóxico não formam cauda (PANDRANGI *et al.*, 1995). Assim, quanto maior o dano, maior a cauda do cometa.

O ensaio pode ser conduzido sob condições neutras (pH=12,1) e alcalinas (pH = 13). Em condições neutras, descrita primeiramente por RYDBERG E JOHANSON (1978), pode-se mensurar quebras de fitas duplas do DNA, enquanto em condições alcalinas, descrita por SINGH *et al.* (1988), o teste mede quebras de fita simples e lesões em sítios álcali – lábeis (LEE & STEINERT, 2003). O Teste do Cometa ou Ensaio de Eletroforese em Microgel é, portanto, um teste sensível e potencialmente poderoso para a detecção de danos no DNA (LOVELL *et al.*, 1999).

O grau de dano no DNA que o teste considera pode ser descrito de várias maneiras, como a quantidade de DNA na cauda, o comprimento da cauda, o momento da cauda e a porcentagem de células com diferentes classes de danos (TICE, 1995).

O ensaio de eletroforese em microgel tem sido amplamente aplicado em eritrócitos e linfócitos do sangue periférico porque estes tipos celulares podem ser facilmente amostrados e a dissociação celular não é necessária (BELPAEME *et al.*, 1998).

O teste do Cometa, por suas diversas vantagens já citadas e por ser rápido, relativamente econômico, preciso e reproduzível, torna-se um sistema-teste

adequado para o biomonitoramento ambiental e na genética toxicológica (TICE, 1995).

O impacto de materiais tóxicos sobre a integridade e o funcionamento do DNA celular tem sido investigado em muitos organismos sob condições de campo (BOMBAIL *et al.*, 2001). As quebras nas fitas do DNA é um indicador relativamente sensível, rápido e amplo da exposição de organismos expostos no campo a poluentes (MARTINEZ & COLÚS, 2000).

Dados de estudos usando o ensaio Cometa em peixes vêm se acumulando nos últimos anos em estudos de campo como os de DE FLORA *et al.* (1993), ALSABTI *et al.* (1995), MINISSI *et al.* (1996), BELPAEME *et al.* (1998), HAYASHI *et al.* (1998), RUSSO *et al.* (2004) dentre outros e em laboratório, como os de PANDRANGI *et al.* (1995), DEVAUX *et al.* (1998) e BELPAEME *et al.* (1998).

PANDRANGI *et al.* (1995) detectaram quebras na fita de DNA em eritrócitos do peixe *Ameiurus nebulosus* em três dos sete diferentes locais avaliados nos Grandes Lagos (Canadá), os quais se mostravam altamente poluídos com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA) e bifenilas policloradas (BPC). Neste mesmo estudo, os autores observaram um maior número de cometas em eritrócitos de carpas (*Cyprinus carpio*) provenientes de locais contaminados do que em carpas oriundas de locais não poluídos.

NACCI *et al.* (1992) relataram a presença de quebras nas fitas de DNA das células de brânquias de moluscos (*Mytilus edulis*) e ostras (*Crassostrea virginica*)

retirados de estuários norte-americanos altamente poluídos por BPC e cobre. Outros autores também avaliaram organismos aquáticos expostos a BPCs e HPAs usando o teste do Cometa (THEODORAKIS *et al.*, 1992; DI GIULIO *et al.*, 1993; BELPAEME *et al.*, 1998).

Essa metodologia tem se mostrado uma ferramenta bastante útil na avaliação do potencial genotóxico de áreas impactadas com petróleo e seus derivados. Exemplo disso pode ser visto nos estudos de HAMOUTENE *et al.* (2002), que aplicaram a técnica em invertebrados expostos a uma mistura de hidrocarbonetos, mostrando que mesmo uma baixa quantidade de hidrocarbonetos foi capaz de lesionar o DNA dos organismos testados.

#### **1.4. TESTE DO MICRONÚCLEO**

O Teste do Micronúcleo serve como o primeiro passo no estudo de qualquer substância mutagênica. É um teste rápido e de sensível indicação, tanto para detectar alterações cromossômicas estruturais como numéricas (HEDDLE *et al.*, 1983). Também é um ensaio citogenético comumente usado em vários sistemas biológicos para o monitoramento de genotoxicidade ambiental (MERSCH & BEAUVAIS, 1997).

Os micronúcleos são massas de cromatina citoplasmática com a aparência de pequenos núcleos que surgem da condensação de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos acêntricos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal, perdidos na anáfase (HEDDLE *et al.*, 1983; AL-SABTI & METCALFE, 1995). Os

micronúcleos se assemelham ao núcleo principal e podem ser observados facilmente em todos os tipos celulares após um ciclo de divisão celular (SCHMID, 1976; HEDDLE *et al.*, 1991; AYLLÓN & GARCIA-VAZQUEZ, 2000). Promovem a evidência de quebras cromatídicas ou cromossômicas e de disfunção nas fibras do fuso causada por clastógenos e venenos do fuso, respectivamente (MERSCH & BEAUVAIS, 1997).

Os micronúcleos têm origem espontânea, mas segundo HEDDLE *et al.* (1983), sua indução é normalmente usada na detecção de danos resultantes da ação de agentes mutagênicos.

O teste do Micronúcleo em peixes possui algumas vantagens além da rapidez e simplicidade, tais como o fato dos micronúcleos serem observados em células interfásicas; o número de células a serem analisadas ser limitado; as conclusões de análise serem facilmente reconhecidas e o tempo de amostragem ser menos crítico devido à persistência dos micronúcleos até a próxima interfase. Assim, a visualização de um micronúcleo se dá após um ciclo de divisão celular e a frequência de micronúcleos dentro da população celular é altamente dependente da cinética de divisão celular (HEDDLE *et al.*, 1983; AL-SABTI & METCALFE, 1995).

A grande limitação do uso de micronúcleos para a identificação de danos citogenéticos é que agentes ou substâncias que não quebram cromossomos ou não causam a perda destes na anáfase, não serão detectados, como por exemplo, as aberrações que envolvem rearranjo cromossômico sem ocorrência de fragmento acêntrico (HEDDLE *et al.*, 1983).

Segundo BRUNETTI *et al.* (1988), a freqüência de micronúcleos na avaliação da poluição ambiental é um marcador sensível da presença de contaminantes genotóxicos. Monitorar efeitos clastogênicos de poluentes é um dos primeiros interesses da mutagênese ambiental aquática para determinar a relação da poluição com o estresse em organismos vivos (HYUN & KIM, *in press*).

O teste do Micronúcleo tem se mostrado uma técnica proveitosa *in vivo* para avaliar a mutagenicidade e tem potencial para avaliar a qualidade de água (AL-SABTI & METCALFE, 1995; GRISOLIA & STARLING, 2001).

Os organismos aquáticos mais utilizados no teste do Micronúcleo em laboratório são os anfíbios, moluscos e peixes (STAHL, 1991). O teste do Micronúcleo é aplicável a peixes marinhos e aos de água doce e, além dos eritrócitos, podem ser analisados em células do rim, do fígado e das brânquias. Segundo HAYASHI *et al.* (1998), esse último tipo celular é mais sensível a agentes indutores de micronúcleos que as células hematopoiéticas.

No monitoramento ambiental há um crescente interesse no uso de bioindicadores, e para este propósito os peixes são considerados organismos adequados, porque eles possuem diferentes papéis na cadeia trófica e respondem a mutágenos em baixos níveis de concentração, tais como os poluentes ambientais (MINISSI *et al.*, 1996).

AL-SABTI & METCALFE (1995) propuseram que a freqüência de micronúcleos parece estar fortemente relacionada com a qualidade da água dos diferentes

ambientes examinados. O efeito citogenético devido a mutágenos tem sido estudado em eritrócitos de peixes (MANNA *et.al.*, 1985), o que não causa sofrimento ao animal e não despende muito tempo.

Vários estudos têm demonstrado que eritrócitos periféricos de peixes têm uma alta incidência de micronúcleos após a exposição a diversos poluentes sobre condições de campo (MINISSI *et al.* 1996; BOMBAIL *et al.*, 2001; RUSSO *et al.* 2004) e de laboratório (HOOFTMAN & DE RAAT, 1982; MANNA *et al.*,1985; MATSUMOTO & CÓLUS, 2000; AYLLÓN & GARCIA-VAZQUEZ, 2001; ÇAVAS & ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; HYUN & KIM, *in press*).

Por esta razão, o teste do micronúcleo em peixes parece ser um teste promissor nas investigações de mutagênese ambiental (AL-SABTI & METCALFE, 1995) e um indicativo de danos citogenéticos de curta duração (MINISSI *et al*, 1996).

### 3. OBJETIVO

Atualmente existem muitos estudos sobre a toxicidade de hidrocarbonetos do petróleo em organismos aquáticos marinhos, enquanto que estudos em organismos dulcícolas são ainda raros. No Brasil ainda são escassas as pesquisas empregando peixes neotropicais para avaliação de efeitos genotóxicos de poluentes aquáticos, e ainda mais raros os estudos avaliando tais organismos quanto à exposição a derivados de petróleo, em especial ao óleo diesel.

Assim, é extremamente importante avaliar parâmetros mutagênicos e ou genotóxicos nesses organismos expostos a poluentes, visando preservar a diversidade biológica e alertar as comunidades que possam se beneficiar do ecossistema em questão. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo principal:

- Avaliar os potenciais genotóxico e mutagênico da fração solúvel do óleo diesel em eritrócitos de peixes neotropicais da espécie *Prochilodus lineatus*, em exposições estáticas agudas e exposição estática sub-crônica, empregando o ensaio alcalino do Cometa e o teste do Micronúcleo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ESPÉCIE

Neste estudo foram utilizados peixes neotropicais da espécie *Prochilodus lineatus*, pertencentes à Ordem Characiformes e à Família Prochilodontidae (Valenciennes, 1847), vulgarmente conhecidos no Brasil, como: curimba, curimbatá ou grumatã (CASTRO & VARI, 2003) (Figura 1).

Espécies de peixes do gênero *Prochilodus* são abundantes e amplamente distribuídas nos rios de águas doces da América do Sul, que fluem para o Oceano Atlântico. São de ampla distribuição nos rios do Paraná e Paraguai e habitam profundidades de até 5 metros. Os peixes desta espécie são detritívoros, ou seja, se alimentam tanto de partículas suspensas na coluna d'água como daquelas que se acumulam no sedimento. Curimbas são peixes de extensos hábitos migratórios, são de grande valor comercial e consumo humano (ORTÍ *et al.*, 2001).

Os exemplares avaliados no presente trabalho foram peixes jovens, com comprimento e peso médio de  $18,79 \pm 11,60$ cm e  $32,15 \pm 14,97$ g, respectivamente. Tais exemplares foram cultivados e fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL).



**FIGURA 1:** Exemplar jovem de *Prochilodus lineatus*.

### **3.2. ÓLEO DIESEL**

No presente estudo foi utilizado o óleo diesel automotivo do tipo "B" com, no máximo, 0,35% de enxofre, adquirido em posto de gasolina comercial de Londrina (PR), que abastece os veículos da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

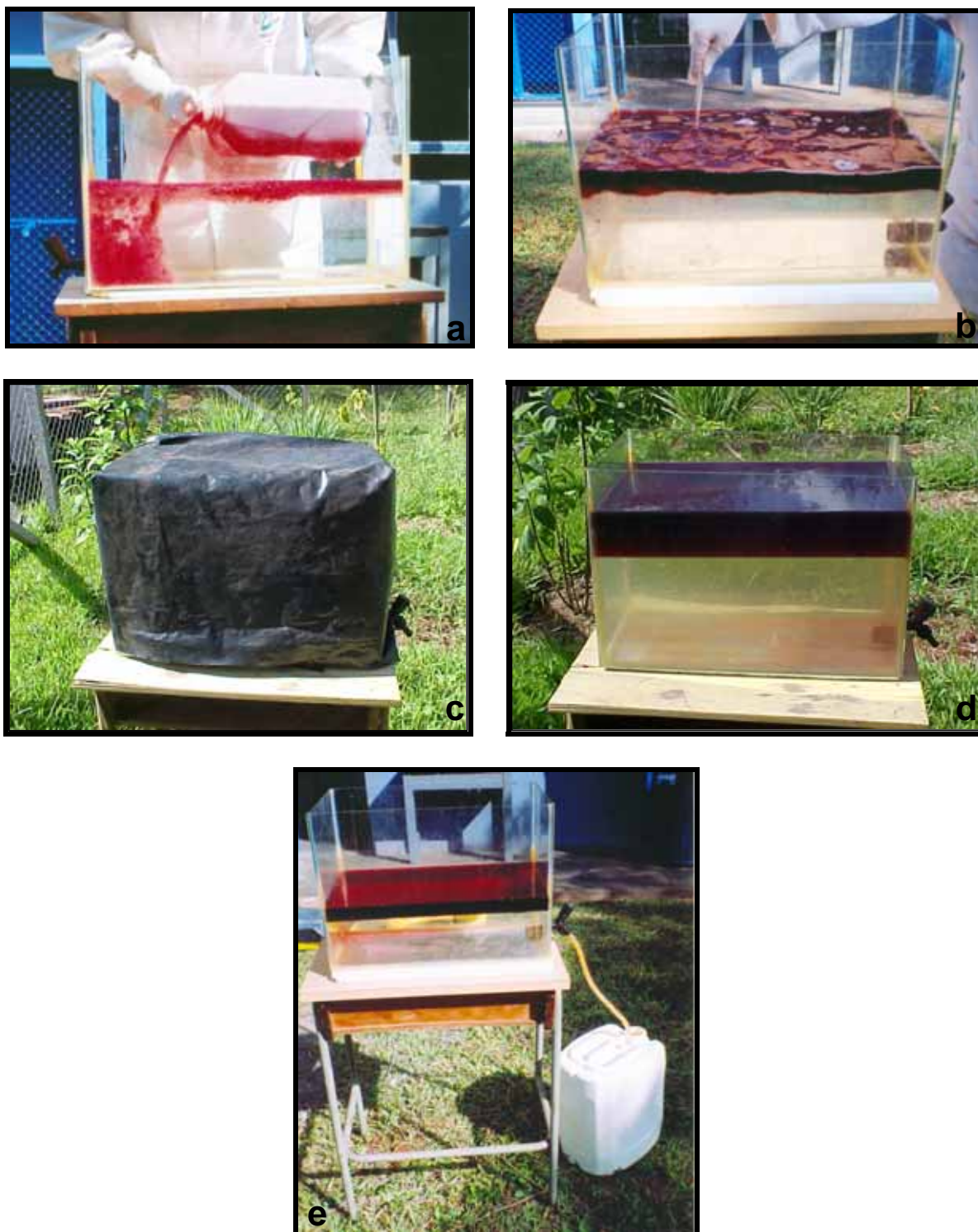
### **3.3. SIMULAÇÃO DE ACIDENTE AMBIENTAL COM DERRAME DE ÓLEO DIESEL**

A simulação do derrame com óleo diesel seguiu a metodologia proposta por NICODEM *et al.* (1998) em escala de laboratório (Figura 2) e foi realizada no Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética Eletrônica (LAFLURPE) do Departamento de Química da UEL, estando resumida abaixo:

O derrame foi realizado em duplicata, empregando-se 5 litros de diesel comercial e 20 litros de água de poço artesiano (1 : 4 v/v) em dois aquários de vidro, com capacidade de 50L cada. Após breve agitação com bastão de vidro, o derrame permaneceu por 16 horas sem exposição à luz; nesta fase, somente os compostos hidrossolúveis passam do óleo diesel para a coluna de água. No final desse processo o derrame foi exposto por 6 horas à luz solar intensa. Tal exposição promove a fotodegradação do óleo diesel e, assim, os compostos decorrentes desta degradação se dissolvem na coluna d'água. Em seguida, a fração superior insolúvel foi descartada e a fração solúvel do diesel (FSD) foi recolhida em galões opacos e armazenada em câmara fria (por no máximo cinco dias) até o momento de utilização. No início dos experimentos, a FSD proveniente do derrame realizado foi

diluída 50% com água de poço artesiano e então, distribuída em aquários com capacidade de 100L.

A FSD (antes e após a diluição) foi qualificada em Espectrofluorímetro Shimadzu (RF-5310 PC), pelo LAFLURPE (UEL) quanto à presença de hidrocarbonetos mono e poliaromáticos para todos os tempos de amostragem.



**FIGURA 2:** Simulação do derrame de óleo diesel (a – e); **a.** derrame do óleo em aquário de vidro de 50l; **b.** agitação; **c.** etapa de escuro (16 h); **d.** etapa de irradiação solar (6h); **e.** coleta da fração solúvel do diesel em água (FSD).

### **3.4. EXPOSIÇÃO DOS PEIXES AO ÓLEO DIESEL**

Os curimbas provenientes da EPUEL foram transferidos para o Laboratório de Bioensaios do Centro de Ciências Biológicas da UEL (CCB), onde ocorreu a aclimação por sete dias em tanque de 600L, contendo água de poço artesiano com aeração e temperatura constantes. Ração pelitizada foi empregada como alimentação, sendo esta interrompida 24 horas antes do início dos experimentos.

Após o período de aclimação os peixes foram submetidos aleatoriamente aos testes de toxicidade estático agudos (6, 24 e 96 horas) e sub-crônico (15 dias). Para cada intervalo experimental amostrado, oito peixes foram colocados em aquários de vidro (100L) contendo a solução-teste e para cada um foi constituído um grupo controle, onde oito animais foram expostos apenas à água de poço artesiano. Para cada grupo experimental foi realizada uma repetição (com exceção do experimento de 15 dias). Os dados físico-químicos (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade) das águas nos diferentes grupos de tratamento foram obtidos diariamente.

### 3.5. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CELULARES

Os curimbas amostrados nos respectivos tempos de exposição foram anestesiados com benzocaína (5g / 70ml álcool absoluto / 5l de água), pesados e medidos; em seguida foram coletadas amostras de sangue da veia caudal, utilizando seringas tipo insulina (1ml) descartáveis previamente heparinizadas.

### 3.6. ENSAIO ALCALINO DO COMETA

No ensaio alcalino do Cometa foi empregada a metodologia descrita por SINGH *et al.* (1988) com modificações de SPEIT & HARTMANN (1999). Lâminas de vidro com extremidade fosca receberam, primeiramente, um filme de agarose de ponto de fusão normal 1,5% (300mg / 20ml de PBS) a 60°C; as lâminas gelatinizadas secaram a temperatura ambiente por 24 horas e foram armazenadas sob refrigeração. Para o preparo das lâminas contendo o material biológico, 10µl de sangue total da veia caudal de *Prochilodus lineatus* foram transferidos para um microtubo contendo 1000µl de solução salina para peixe (7,4g de NaCl, 0,36g de KCl, 0,17g de CaCl, 0,31g de NaHCO<sub>3</sub>, 1,6g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> para 1L de água destilada). Em outro microtubo, 15µl da solução acima descrita foi misturada a 120µl de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (100mg / 20ml PBS – 0,2g de KCl, 0,2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,0g de NaCl, 1,15g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> para 1L de água destilada), mantida a 37°C em banho-maria. A mistura contendo agarose de baixo ponto de fusão e a suspensão celular foi colocada sobre cada lâmina pré-gelatinizada e estas foram cobertas com lamínulas 24mm x 60mm e mantidas por 20 minutos em geladeira a 4°C para solidificação do gel. Em seguida, as lamínulas

foram gentilmente removidas e foram imediatamente colocadas em uma cuba de vidro horizontal, tipo Koplín, contendo solução de lise gelada e recém-preparada (1 ml de Triton X-100, 10ml de DMSO e 89ml de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: 146,1g de NaCl 2,5M, 37,2g de EDTA 100mM, 1,2g de Tris 10mM, 8,0g de NaOH sólido, 10g de Lauril sarcosinato de sódio para 1 litro). A cuba foi envolvida com papel alumínio para proteção contra a luz. As lâminas permaneceram nessa solução por 1 hora sob refrigeração (4°C). Na etapa de lise são removidas as membranas celulares e proteínas. Após a lise, as lâminas foram lavadas com água destilada e levadas para uma cuba de eletroforese horizontal mantida em banho gelado em torno de 4°C. Nesta cuba as lâminas foram dispostas lado a lado, mantendo os lados esmerilhados voltados para o pólo negativo. Posteriormente à organização das lâminas na cuba, estas foram cobertas com tampão de eletroforese alcalino gelado (NaOH 300mM, EDTA 200mM, pH ~ 13,0), onde permaneceram em repouso no escuro por 20 minutos para a denaturação do DNA. Em seguida, foi realizada a eletroforese com corrente de 25 V e 300 mA (0,8-1,0 V/cm) por 20 minutos. Terminada a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com tampão de neutralização (Tris 0,4M – HCl, pH 7,5) por 5 minutos (três vezes) para retirada de detergentes e sais. Posteriormente as lâminas foram fixadas com etanol absoluto por 10 minutos em cuba horizontal e após secagem foram guardadas em caixas adequadas e mantidas sob refrigeração até o momento das análises citológicas.

No momento da análise, a coloração das lâminas foi feita com 90 µL de solução aquosa de brometo de etídio (0,20mg / ml de H<sub>2</sub>O), um agente intercalante de DNA que emite fluorescência sob luz ultravioleta. A análise citológica foi realizada

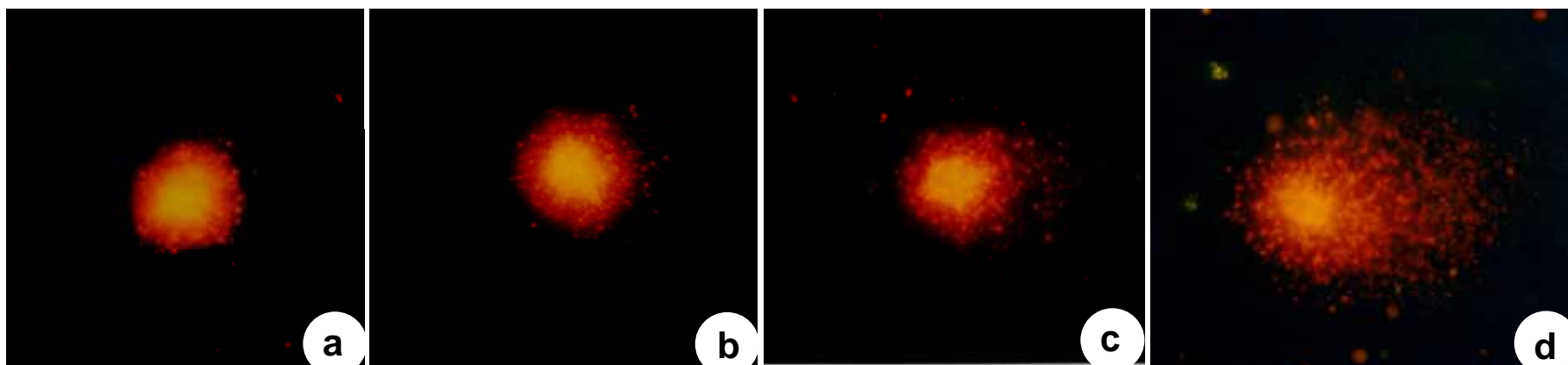
ao microscópio de fluorescência (Nikon) em objetiva de 100x, com filtro de excitação de 515 - 560nm de comprimento de onda e filtro de barreira de 590 nm.

Na eletroforese os fragmentos do DNA que foram danificados pelo poluente migraram do nucleóide e formaram uma “cauda”; quanto maior o dano devido ao DNA, maior a cauda do nucleóide (PANDRANGI *et al.*, 1995).

Foram analisados 100 nucleóides por animal em cada grupo experimental anotando-se as classes de Cometa (0: sem dano; 1: com dano mínimo; 2: com dano médio; 3: com dano máximo) segundo KOBAYASHI *et al.* (1995). Para cada um dos intervalos experimentais o total de nucleóides danificados (classes 1, 2 e 3) obtido para os grupos expostos à FSD e seus respectivos controles foi dividido pelo número de animais amostrados, obtendo-se valores médios de nucleóides danificados por animal. O número de células obtidas em cada classe foi multiplicado pelo valor de cada classe, obtendo-se assim o escore, de acordo com a fórmula:

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

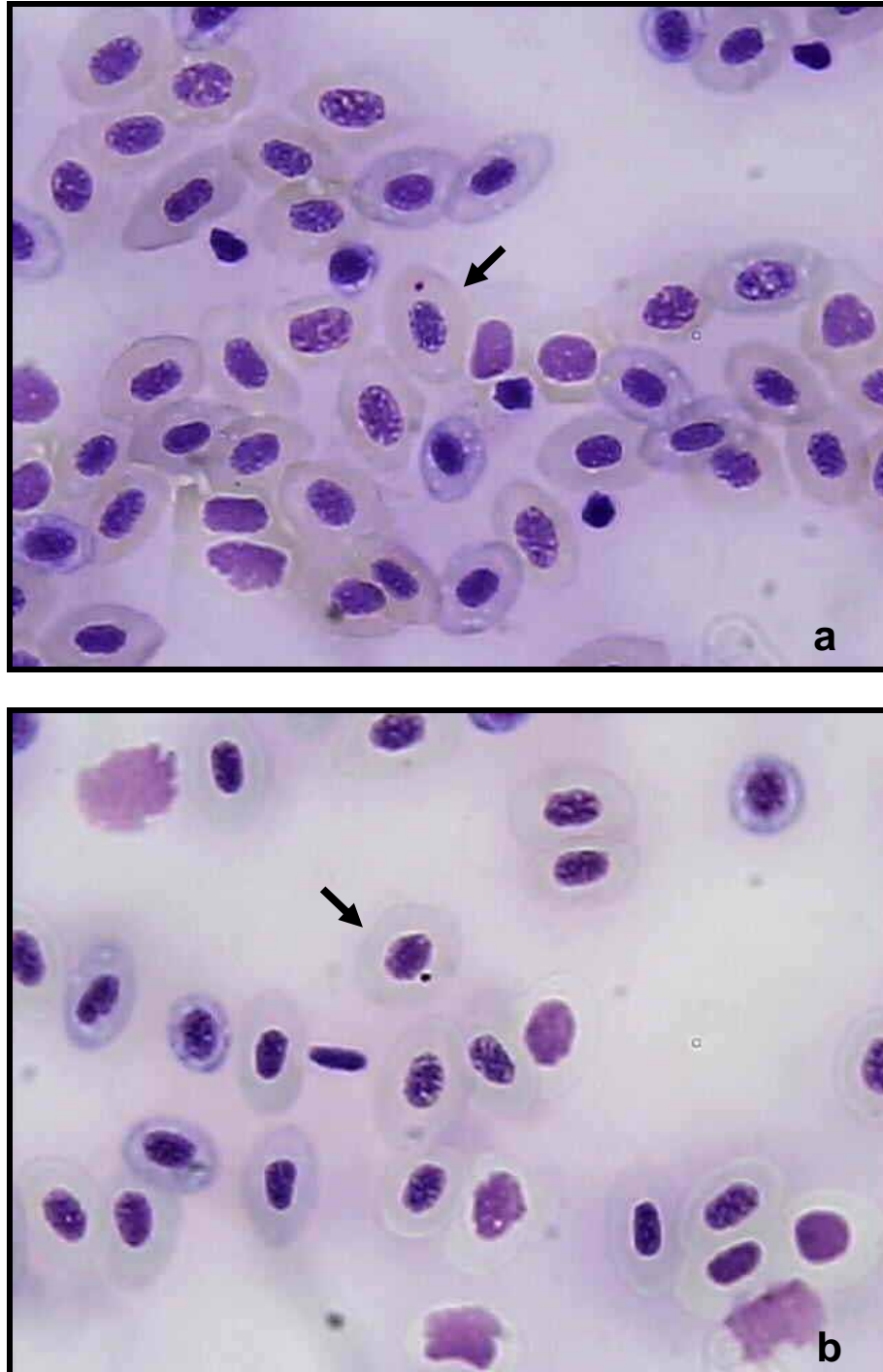
Onde, A, B, C e D são os números de células encontradas para cada categoria analisada. As classes de cometas analisadas estão apresentadas na Figura 3.



**FIGURA 3:** Classes de cometas em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* após exposição à fração solúvel do óleo diesel (FSD), **a.** Classe 0; **b.** Classe 1; **c.** Classe 2; **d.** Classe 3. Aumento de 1000x. Classificação Segundo Kobayashi *et al.* (1995).

### 3.7. TESTE DO MICRONÚCLEO

Uma gota de sangue foi colocada em uma das extremidades de uma lâmina de vidro limpa e seca e, com auxílio de uma lamínula encostada em ângulo de 45°, o sangue foi espalhado uniformemente, formando uma camada delgada. Para cada animal duas extensões sangüíneas foram confeccionadas. As lâminas secaram a temperatura ambiente e após 24 horas foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos. Em seguida, foram coradas com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8 (4,0827g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 7,099g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  para 1L de água) por 20 minutos. As lâminas foram, então, lavadas com água destilada e secaram a temperatura ambiente para que, posteriormente, fossem preparadas com Entellan para uso permanente. A análise citológica foi realizada em microscópio óptico de luz (Nikon) com objetiva de 100 vezes. Para cada animal foram analisados 3000 eritrócitos, anotando-se as freqüências de micronúcleos. A Figura 4 ilustra eritrócitos micronucleados dos curimbas expostos à FSD.



**FIGURA 4:** Eritrócitos do sangue periférico de *Prochilodus lineatus* (a e b) corados com Giemsa 5% em aumento de 1000x.

As setas indicam eritrócitos micronucleados.

### 3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos para os grupos expostos à FSD e seu respectivo controle, em um mesmo intervalo experimental, foram comparados entre si utilizando o teste estatístico não paramétrico de Mann – Whitney. Os resultados obtidos para um mesmo tratamento experimental (FSD ou Controle), nos diferentes períodos de exposição (6, 24, 96 horas e 15 dias) foram comparados entre si utilizando o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foram considerados significativos valores de  $P < 0,05$ .

Os dois testes estatísticos empregados no presente estudo foram realizados segundo ZAR (1996) e utilizando programa GraphPad InStat versão 3.00 para Windows 95, GraphPad Software, San Diego California USA.

## CAPÍTULO 1

### EFEITOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL. \*

---

\* Este capítulo será enviado para o periódico científico **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**

## **EFEITOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO ÓLEO DIESEL EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL.**

Vanzella, T.P<sup>1</sup>; Martinez, C.B.R<sup>2</sup>; Cólus, I.M.S<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, <sup>2</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas,  
Universidade Estadual de Londrina - UEL – Paraná, Brasil.

\* correspondência: Tel.: +55-43-3371-4417; fax: +55-43-3371-4527

E-mail: [colus@sercomtel.com.br](mailto:colus@sercomtel.com.br)

## RESUMO

A poluição ambiental têm se tornado um problema global e crescente que afeta, direta ou indiretamente, a saúde e a sobrevivência dos seres vivos. No Brasil, o ecossistema aquático é constantemente agredido por descargas de lixo e efluentes decorrentes de inúmeras atividades humanas, como o petróleo e seus derivados. O óleo diesel, um dos derivados do petróleo, possui fração solúvel (FSD) composta por hidrocarbonetos aromáticos (BTEX e PAHs), conhecidos contaminantes do meio aquático. Nos últimos cinco anos, acidentes envolvendo vazamento óleo diesel vêm ocorrendo em rios neotropicais. Contudo, poucos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar os efeitos de seus hidrocarbonetos sobre o ambiente dulcícola e a biota associada. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos mutagênicos e genotóxicos da exposição aguda (6, 24, 96 horas) e sub-crônica (15 dias) da fração solúvel do óleo diesel na espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, empregando o Teste do Micronúcleo (MN) e o Ensaio do Cometa. Animais expostos apenas à água de poço artesiano (controle negativo) foram amostrados em cada intervalo experimental, simultaneamente aos expostos à água contaminada. Como controle positivo empregou-se a Ciclofosfamida ( $20\text{mg.Kg}^{-1}$ ). O teste do micronúcleo indicou atividade mutagênica da fração solúvel do diesel para curimbas nas exposições agudas (6, 24, e 96 horas) e subcrônica (15 dias) quando comparados aos seus respectivos controles negativos. No Ensaio alcalino do Cometa os resultados obtidos nos grupos experimentais também mostraram-se estatisticamente diferentes de seus controles negativos. Dessa forma, esses resultados indicam que a ocorrência de um derrame de óleo diesel em ambiente tropical deve acarretar, a curto e médio prazo, efeitos mutagênicos e genotóxicos nas células sangüíneas de peixes neotropicais brasileiros.

**Palavras – Chave:** óleo diesel, genotoxicidade, mutagenicidade, *Prochilodus lineatus*, micronúcleos

## 1. INTRODUÇÃO

A poluição aquática tem se tornado um problema global [1] devido a um aumento contínuo da produção, do consumo e do depósito de resíduos antropogênicos decorrentes do crescimento populacional e do desenvolvimento industrial [2].

As atividades, normais ou acidentais, que mais contribuem para a alta liberação e concentração de substâncias tóxicas no ambiente aquático são as industriais, urbanas, agrícolas, provenientes de estações de tratamento de águas municipais, refinarias, indústrias de energia elétrica e as atividades portuárias [3, 4, 5]. A grande proporção dos contaminantes aquáticos de origem antropogênica é composta de substâncias potencialmente genotóxicas e carcinogênicas [2].

O petróleo e seus produtos refinados são encontrados por toda parte do mundo [6], o que justifica a preocupação global recente com a poluição decorrente de vazamentos de óleo que podem resultar na deposição de grandes quantidades de hidrocarbonetos aromáticos no ecossistema aquático [7]. No Brasil, acidentes envolvendo derrames de óleo têm ocorrido com frequência, decorrentes de vazamentos em petroleiros e rompimentos de oleodutos [8]. Vazamentos de óleo são, portanto, uma fonte de poluição para a coluna de água; já que a mancha de óleo pode alcançar rios e outros ambientes aquáticos produzindo sérios problemas de poluição [9]. Assim, a avaliação e predição dos efeitos desses vazamentos sobre o meio ambiente aquático tem se tornado, um assunto importante e urgente [10].

O petróleo pode ser destilado em diversos produtos, como óleo diesel, gasolina, óleo cru, gás natural, dentre outros. A toxicidade do petróleo é, em sua maioria, atribuída à sua parte solúvel [11], que contém compostos polares de baixo peso molecular, denominados hidrocarbonetos aromáticos (mono ou poliaromáticos), que podem ser classificados em dois grupos toxicológicos: compostos BTEX (tolueno, benzeno, etilbenzeno e xileno) e pequenos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (naftalenos) [9].

O óleo diesel é uma mistura complexa de centenas de substâncias químicas, e seus principais componentes podem ser divididos em duas classes: hidrocarbonetos alifáticos e hidrocarbonetos aromáticos. No óleo diesel o naftaleno (PAH mais simples) e seus derivados são os mais freqüentemente encontrados (0,4%) [9].

Atualmente existem inúmeros estudos que avaliaram a genotoxicidade de hidrocarbonetos do petróleo e seus derivados em organismos aquáticos, sendo que, a maioria deles foi realizada empregando espécies de bivalves e peixes [12, 13, 14, 15, 16]. A biotransformação dos PAHs por peixes promove o surgimento de compostos intermediários capazes de induzir toxicidade aguda e alterações genéticas e sua presença nos sedimentos está ligada a neoplasias de fígado em espécies bentônicas [2, 4]. A maioria dos estudos sobre a toxicidade do petróleo e seus derivados tem sido realizados em organismos marinhos, sendo a toxicidade dos hidrocarbonetos do petróleo em organismos dulcícolas pouco conhecida [17]. Trabalhos utilizando espécies de peixes dulcícolas para avaliar danos decorrentes

da exposição a hidrocarbonetos do petróleo são bastante escassos [18, 19, 20, 21] e o emprego de peixes neotropicais neste tipo de estudo é ainda mais raro.

Diante dos inúmeros acidentes que têm ocorrido nos rios brasileiros envolvendo derrames de óleo, da carência de dados sobre a resposta genotóxica de peixes neotropicais a esses eventos e, conseqüentemente, da prevalência na literatura, de dados para peixes marinhos e de clima temperado, que não oferecem possibilidade de comparações adequadas, o presente estudo teve como objetivo avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade da fração solúvel do óleo diesel em uma espécie de peixe neotropical dulcícola do Brasil, sob condições de laboratório, empregando o ensaio cometa (SCGE) e o teste do micronúcleo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. ESPÉCIE ESTUDADA

Espécimens jovens de *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae), vulgarmente conhecido como curimba, com peso e comprimento médio de  $18,79 \pm 11,60$ cm e  $32,15 \pm 14,97$ g, respectivamente, foram expostos à fração solúvel do óleo diesel em testes de toxicidade. Os exemplares empregados no presente estudo foram cedidos pela estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL).

### 2.2 SIMULAÇÃO DE DERRAME COM ÓLEO DIESEL

No presente estudo foi utilizado o óleo diesel automotivo do tipo "B", com no máximo 0,35% de enxofre, adquirido em posto de gasolina comercial de Londrina (PR – Brasil). A simulação de derrame foi realizada em escala de laboratório de acordo com a metodologia de NICODEM *et al.* [22], no Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética Eletrônica (LAFLURPE) da UEL. No derrame o diesel comercial foi misturado à água de poço artesiano na proporção 1 : 4 (v/v) em aquários de vidro, permanecendo por 16 horas no escuro antes da exposição por 6 horas à luz solar intensa (9:00 às 15:00h), simulando um derrame de diesel em ambiente tropical. Em seguida, a fração superior insolúvel foi descartada e a fração solúvel do diesel (FSD) restante foi coletada e armazenada em recipientes opacos, em câmara fria, por no máximo cinco dias, até o momento dos experimentos. Para cada grupo experimental, a FSD foi diluída para 50% com água de poço artesiano e

distribuída em aquários com capacidade de 100L. A FSD (antes e após a diluição) foi qualificada em Espectrofluorímetro Shimadzu (RF-5310 PC) pelo LAFLURPE (UEL), quanto à presença de hidrocarbonetos mono e poliaromáticos para todos os tempos de amostragem.

### **2.3 EXPOSIÇÃO DOS PEIXES E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CELULARES**

Os curimbas cedidos pela EPUEL foram transferidos para o Laboratório de Bioensaios onde foram aclimatados em tanque de cimento - amianto com capacidade para 600L por sete dias, contendo água de poço artesiano com aeração e temperatura constantes ( $21\pm 1^\circ\text{C}$ ). Ração peletizada foi administrada aos animais, sendo interrompida 24 horas antes do início dos experimentos. Os peixes foram divididos aleatoriamente em dez grupos experimentais contendo oito peixes cada. Para a realização dos testes de toxicidade estáticos agudos (6, 24 e 96 horas) e estático sub-crônico (15 dias), os animais foram colocados em aquários de vidro (100L) contendo a mistura da FSD e água de poço artesiano. Para cada um dos grupos experimentais foi constituído um grupo controle-negativo, onde os animais foram expostos apenas à água de poço artesiano e dois grupos controles-positivos (6 e 24 horas) onde os animais foram injetados intraperitonealmente com o agente clastogênico Ciclofosfamida ( $20\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , Sigma – CAS nº 64-86-8). Os experimentos agudos (grupos experimentais e respectivos controles) foram realizados com repetição.

Os parâmetros temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade da água utilizada nos testes de toxicidade foram monitorados continuamente. No momento da

amostragem os peixes foram anestesiados com benzocaína ( $1\text{g.L}^{-1}$ ), pesados e medidos. Em seguida foram coletadas amostras de sangue da veia caudal, utilizando seringas tipo insulina (1mL) descartáveis previamente lavadas com Liquemine.

## **2.4. ENSAIO COMETA**

### **a) PREPARO DAS LÂMINAS**

No ensaio alcalino do cometa foi empregada a metodologia descrita por SINGH *et al.* [23] com modificações de SPEIT & HARTMANN [24]. Lâminas de vidro com extremidade fosca receberam, primeiramente, um filme de agarose de ponto de fusão normal 1,5% a  $60^{\circ}\text{C}$ , secaram à temperatura ambiente por 24 horas e foram armazenadas à  $4^{\circ}\text{C}$ . Para o preparo das lâminas contendo o material biológico,  $10\mu\text{L}$  de sangue total da veia caudal de *Prochilodus lineatus* foram transferidos para um microtubo contendo  $1000\mu\text{L}$  de solução salina para peixes (7,4g de NaCl, 0,36g de KCl, 0,17g de CaCl, 0,31g de  $\text{NaHCO}_3$ , 1,6g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,4g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  para 1 litro de água). Em outro microtubo,  $15\mu\text{L}$  da solução acima descrita foram misturados a  $120\mu\text{L}$  de agarose de baixo ponto de fusão 0,5%, mantida a  $37^{\circ}\text{C}$  em banho-maria. A mistura contendo agarose de baixo ponto de fusão e a suspensão celular foi colocada sobre cada lâmina pré-gelatinizada, e estas foram cobertas com lamínulas (24mm x 60mm) e mantidas por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para solidificação do gel.

### **b) DESESPIRALIZAÇÃO E ELETROFORESE**

Ao término da gelatinização as lamínulas foram gentilmente removidas e imediatamente foram colocadas em uma cuba de vidro tipo Koplín horizontal, contendo solução de lise gelada (4°C) e recém-preparada. As lâminas permaneceram nessa solução por uma hora sob refrigeração e protegidas de luz. Após a lise, as lâminas foram lavadas com água destilada e levadas para uma cuba de eletroforese horizontal, cobertas com tampão de eletroforese alcalino gelado (pH ~ 13,0), onde permaneceram em repouso no escuro por 20 minutos para a denaturação do DNA. Em seguida ocorreu a eletroforese com corrente de 25 V e 300 mA (0,7-1,0 V/cm) por 20 minutos. Terminada a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com tampão de neutralização por 5 minutos (três vezes). Posteriormente as lâminas foram fixadas com etanol absoluto por 10 minutos, secaram à temperatura ambiente e foram mantidas sob refrigeração até o momento das análises citológicas.

### **c) ANÁLISE CITOLÓGICA**

Após a coloração com 90 µL de solução aquosa de brometo de etídio (0,20mg.mL<sup>-1</sup>) a análise citológica foi realizada ao microscópio de fluorescência (Nikon) em objetiva de 100X. Foram analisados 100 nucleóides por animal em cada grupo experimental anotando-se as classes de Cometa (0: sem dano; 1: com dano mínimo; 2: com dano médio; 3: com dano máximo) segundo KOBAYASHI *et al.* [25]. Para cada um dos intervalos experimentais o total de nucleóides danificados (classes 1, 2 e 3) obtido para os grupos expostos à FSD e seus respectivos controles foi dividido pelo número de animais amostrados, obtendo-se valores médios de nucleóides danificados por animal. O número de células obtidas em cada

classe foi multiplicado pelo valor de cada classe, obtendo-se assim o escore, de acordo com a fórmula:

Escore:  $(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$ . Onde, A, B, C e D são os números de células encontradas para cada categoria analisada.

## **2.5 TESTE DO MICRONÚCLEO**

### **a) PREPARO DAS LÂMINAS**

O teste do micronúcleo foi realizado segundo a metodologia de [26]. Uma gota de sangue total, coletada da veia caudal dos animais, foi colocada em uma das extremidades de uma lâmina de vidro limpa e seca e realizada, com auxílio de uma lamínula, duas extensões sangüíneas para cada animal, em cada um dos experimentos. As lâminas secaram à temperatura ambiente e após 24 horas foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos. Em seguida, foram coradas com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8 por 20 minutos. As lâminas foram, então, lavadas com água destilada e secaram a temperatura ambiente para que, posteriormente, fossem preparadas com Entellan para uso permanente.

### **b) ANÁLISE CITOLÓGICA**

A análise citológica foi realizada em teste cego sob microscópio óptico de luz (Nikon) com objetiva de 100 vezes. Para cada animal foram analisados 3000 eritrócitos, anotando-se as freqüências de micronúcleos encontradas.

## 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos para os grupos expostos à FSD e seu respectivo controle, em um mesmo intervalo experimental, foram comparados entre si utilizando o teste estatístico não paramétrico de Mann – Whitney. Os resultados obtidos para um mesmo tratamento experimental (FSD ou Controle), nos diferentes períodos de exposição (6, 24, 96 horas e 15 dias) foram comparados entre si utilizando o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foram considerados significativos valores de  $P < 0,05$ . Os dois testes estatísticos empregados no presente estudo foram realizados segundo [27].

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. ANÁLISE DA ÁGUA

A qualificação da FSD evidenciou a presença de hidrocarbonetos monoaromáticos e poliaromáticos em todos os tempos de exposição. Os picos de emissão de fluorescência evidenciados indicaram uma predominância de compostos que normalmente são encontrados na FSD, como, benzeno, tolueno, xileno, naftaleno, fluoreno e fenantreno. As características físico-químicas da água dos grupos experimentais e controles, para todos os períodos experimentais mantiveram-se estáveis e os valores médios obtidos foram (média  $\pm$  EP): temperatura  $22,63 \pm 0,10^{\circ}\text{C}$ ; pH  $6,97 \pm 0,03$ ; OD  $6,59 \pm 0,08 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ ; condutividade  $111,89 \pm 2,36 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.2. ENSAIO DO COMETA

Os resultados obtidos com o ensaio do cometa em eritrócitos de *P. lineatus* expostos à fração solúvel do óleo diesel (FSD) e seus respectivos controles negativos e positivos estão apresentados na Tabela I.

Nas exposições agudas de 6, 24 e 96 horas e sub-crônica (15 dias) a frequência média de nucleóides danificados em cada grupo experimental foi estatisticamente maior ( $p < 0,05$ ) do que nos respectivos controles-negativos. As frequências médias obtidas para os animais dos grupos controles-positivos para os tempos de exposição de 6 e 24 horas foram, respectivamente, igual e maior estatisticamente do que os grupos expostos à FSD e maiores do que os grupos

controles-negativos. Os valores médios de nucleóides danificados por animal de cada grupo experimental foram muito próximos entre si, sendo as médias obtidas para os grupos de 6h e 15 dias; 24h e 96h; 96h e 15 dias estatisticamente semelhantes.

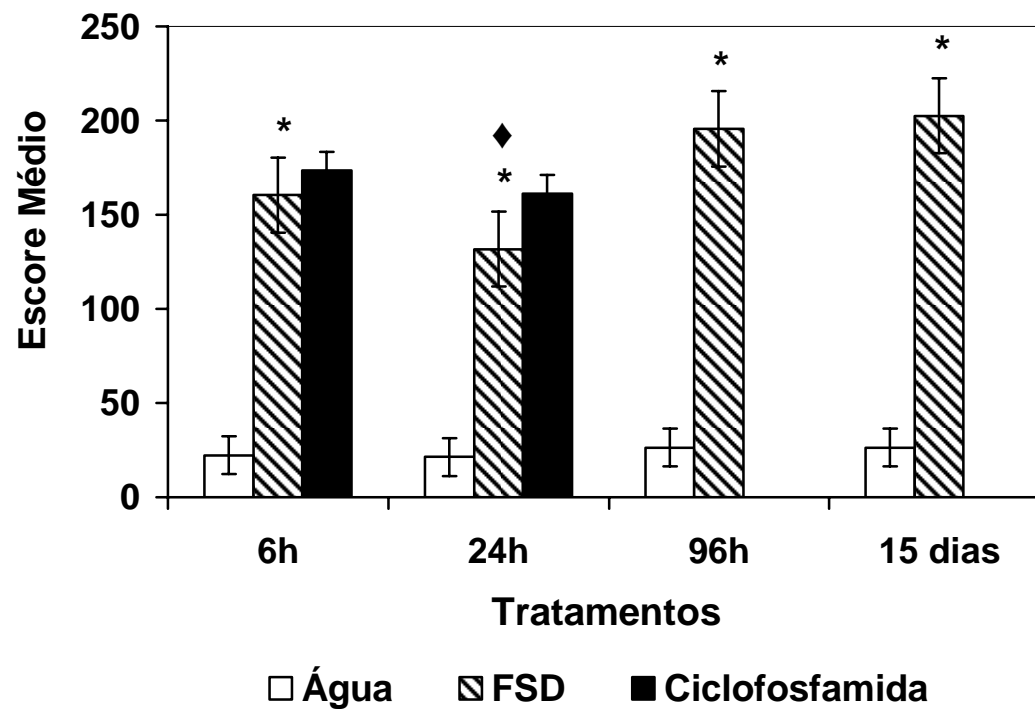
Os valores médios de escore foram calculados para os grupos experimentais e para seus respectivos controles negativos e positivos (Figura 1). Os escores médios dos peixes expostos à FSD sob tratamentos agudos e sub-crônico foram estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que os valores obtidos para os animais expostos somente à água de poço artesiano (controle-negativo). Os animais tratados com ciclofosfamida por 6 e 24 horas, respectivamente, apresentaram valores médios de escores idênticos e diferentes aos obtidos nos respectivos grupos submetidos à FSD (Figura 1).

A comparação dos escores médios dos grupos experimentais entre si revelou que o valor obtido após 24h de exposição à FSD foi estatisticamente menor do que os obtidos para os tempos de 96h e 15 dias (Figura 1).

TABELA I: Número de nucleóides observados em cada classe de cometa (0, 1, 2, 3) e média de nucleóides danificados por animal em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* expostos a fração solúvel do óleo diesel (FSD), considerando-se o número total de animais analisados (N) para cada tratamento experimental (agudo ou sub-crônico) e seus controles negativos e positivos. Foram analisadas 100 células por animal.

Tempo de Amostragem	Tratamentos	N	CLASSES DE COMETAS				MÉDIA DE NUCLEÓIDES DANIFICADOS POR ANIMAL (± Desvio padrão)
			0	1	2	3	
6 horas	FSD	16	57	637	788	118	96,438±4,381 * , a
	Controle-negativo	16	1299	249	50	2	18,813±12,150
	Controle-positivo	6	2	208	337	53	99,667±0,516
24 horas	FSD	14	141	752	428	79	89,929±4,411 * , b
	Controle-negativo	14	1110	282	8	0	20,714±3,384
	Controle-positivo	7	4	310	340	46	99,429±0,535
96 horas	FSD	16	161	349	490	600	89,938±8,250 * , b, c
	Controle-negativo	12	950	196	54	0	20,833±11,052
15 dias	FSD	6	13	134	278	175	97,833±2,137 * , a, c
	Controle-negativo	7	535	146	19	0	23,571±7,345

\* Diferentes estatisticamente de seus respectivos controles-negativos ( $p < 0,05$ ).  
 Letras iguais não diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).



**Figura 1:** Escores Médios obtidos no ensaio do Cometa para curimbas expostos à Fração Solúvel do Óleo Diesel (FSD) sob tratamentos agudos e sub-crônico e, seus respectivos controles-negativos e positivos.

\* diferente estatisticamente do controle-negativo ( $p < 0,05$ ).

◆ diferente dos valores obtidos para os grupos expostos à FSD por 96h e 15 dias ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. TESTE DO MICRONÚCLEO

Na Tabela II estão apresentadas as frequências médias de micronúcleos em 3000 eritrócitos analisados por animal em cada um dos grupos experimentais e controles, assim como o cálculo das frequências de micronúcleos para 1000 células analisadas em cada grupo experimental. As frequências médias de micronúcleos obtidas após as exposições dos peixes à FSD sob tratamentos agudos (6, 24 e 96 horas) diferiram de seus respectivos controles-negativos ( $p < 0,05$ ). Na exposição sub-crônica (15 dias) os curimbas expostos também apresentaram frequência média de micronúcleos significativamente maior do que seu respectivo controle-negativo ( $p < 0,05$ ). A comparação entre as frequências médias de micronúcleos obtidas para cada tempo de exposição à FSD indicou o maior valor no tempo de 24h, que foi semelhante ao obtido em 96h e diferente dos demais. O menor valor observado para este parâmetro ocorreu após 6h de exposição ao diesel e não diferiu estatisticamente do valor obtido após o tratamento sub-crônico (15 dias).

TABELA II: Frequência (média e %) de eritrócitos micronucleados obtidos em *Prochilodus lineatus* após exposições agudas (6, 24, 96 horas) e sub-crônica (15 dias) à fração solúvel do óleo diesel (FSD) e seus respectivos controles negativos e positivos. Foram analisados 3000 eritrócitos por animal.

Tempo de Amostragem	Tratamentos	N	TOTAL DE MICRONÚCLEOS OBSERVADOS	FREQÜÊNCIA MÉDIA DE MICRONÚCLEOS ± DESVIO PADRÃO	FREQÜÊNCIA DE MICRONÚCLEOS OBSERVADA (%)
6 horas	FSD	16	52	3,250 ± 2,266 <sup>*, a</sup>	1,083
	Controle-negativo	15	13	0,8667 ± 1,125	0,289
	Controle-positivo	6	28	4,0 ± 0,8165	1,333
24 horas	FSD	16	233	16,643 ± 4,781 <sup>*, b</sup>	5,548
	Controle-negativo	15	27	1,80 ± 0,7746	0,600
	Controle-positivo	7	34	4,857 ± 1,069	1,619
96 horas	FSD	16	163	10,188 ± 2,949 <sup>*, b, c</sup>	3,396
	Controle-negativo	12	14	1,167 ± 1,193	0,389
15 dias	FSD	6	36	6,00 ± 1,673 <sup>*, a, c</sup>	2,000
	Controle-negativo	7	13	1,857 ± 1,069	0,619

\* Diferentes de seus respectivos controles-negativos (p<0,05).

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

N = total de animais amostrados

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O petróleo e seus produtos destilados, como por exemplo o óleo diesel, possuem baixa solubilidade em água [9]. Após um derrame, o filme de óleo na superfície da água torna-se menos tóxico devido à perda de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) [28], enquanto que a fração solúvel torna-se mais tóxica devido à formação de componentes polares decorrentes de irradiação solar do óleo combustível. A fração solúvel em água do petróleo pode causar distúrbios químicos nos organismos, sendo considerados, mesmo em baixas concentrações, poluentes ambientais perigosos [11].

Inúmeros derrames e/ou vazamentos de petróleo e derivados vêm ocorrendo em rios brasileiros, como o vazamento de 1,5 milhões de litros de óleo combustível no rio Alambari (São Paulo) e diversos vazamentos de óleo cru: 3 mil litros no rio Negro (Amazonas), 500 mil litros no rio Paraíba (SP), 4 milhões de litros nos rios Birigui e Iguaçu (Paraná), dentre muitos outros [29]. Contudo, ainda são poucos os estudos que avaliam os danos causados na ictiofauna desses ambientes impactados, principalmente em peixes neotropicais brasileiros.

O presente estudo evidencia danos genotóxicos e mutagênicos em exemplares da espécie *Prochilodus lineatus* (curimbas) expostos à fração solúvel do óleo diesel. No Ensaio do Cometa as elevadas freqüências médias de células danificadas (Tabela I) obtidas nos grupos expostos ao óleo diesel, frente aos valores obtidos com os peixes controles, indicam uma alta genotoxicidade da FSD, comparável à observada nos tratamentos de 6 e 24 horas com a ciclofosfamida

(controle-positivo). Esta alta frequência de nucleóides danificados observada em todos os tempos amostrais indica que não houve uma relação tempo-resposta dos animais expostos ao poluente.

Estudos de biomonitoramento de ambientes contaminados com efluentes de petróleo de origem industrial [4, 7, 15] ou acidental [13, 30] em peixes ou moluscos marinhos mostraram que os contaminantes derivados do petróleo induziram altos índices de danos no DNA pelo ensaio do Cometa. Estudos com espécies dulcícolas expostas à HPAs, BPCs ou derivados de petróleo, como os realizados por [18, 31, 32] também confirmam a genotoxicidade destes poluentes em organismos de água doce.

A contaminação de exemplares de *Prochilodus lineatus* com óleo diesel observada no presente estudo pode resultar em diferentes danos biológicos. Sendo estes peixes de grande valor comercial e consumo humano [33], podem servir como vetores de transferência de contaminantes do meio para a espécie humana e outros vertebrados. A disponibilidade de PAHs e a ocorrência de danos genotóxicos em mamíferos após o consumo de mexilhões contaminados com estes poluentes foram relatados por [34].

Sabe-se que o processo de biotransformação dos PAHs do petróleo e seus derivados nos peixes, envolve a atividade de enzimas monooxigenases dependentes de citocromo P450 (fase 1) e a conjugação dos metabólitos com moléculas endógenas como o tripeptídeo glutatona (GSH), na tentativa de remover o poluente do organismo [10, 20].

O processo de biotransformação dos PAHs nos peixes, ao contrário do que ocorre com a maioria dos compostos químicos, converte estes xenobióticos em intermediários reativos altamente tóxicos [35] que podem causar danos oxidativos no DNA. Os efeitos genéticos como quebras na cadeia do DNA e micronúcleos podem levar à mutagenicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade e mais tarde a alterações populacionais [20, 36].

Os danos celulares observados nos curimbas expostos à FSD no presente trabalho podem ter sido resultado destes processos oxidativos, onde os hidrocarbonetos monoaromáticos e poliaromáticos (PAHs) presentes na FSD testada podem ter produzido compostos eletrofílicos que se associaram aos sítios nucleofílicos da molécula do DNA e causaram as inúmeras lesões observadas.

No presente estudo as altas freqüências de células danificadas encontradas em *P. lineatus* após 6h de exposição à FSD sugerem que, provavelmente, o tempo de exposição não foi suficiente para que houvesse um aumento significativo na expressão das enzimas responsáveis pela conjugação e detoxificação dos hidrocarbonetos presentes na FSD, como a Glutathione-S-Transferase (GST). A GST é uma enzima envolvida na detoxificação de contaminantes lipofílicos, pela ativação das reações de conjugação com a glutathione reduzida (GSH), que resultam no aumento da solubilidade dos xenobióticos na água e nas suas taxas de eliminação, reduzindo a probabilidade destes compostos se ligarem a outras macromoléculas celulares como o DNA [36]. Alguns trabalhos mostram que a atividade desta enzima no fígado de *P. lineatus* expostos à FSD aumenta após 96 horas de exposição [37]. Assim, este fato sugere que a menor disponibilidade de xenobióticos no organismo

dos peixes pode ter contribuído para o decréscimo nos valores médios de nucleóides danificados observado após 24 e 96 horas de exposição à FSD. Estes resultados concordam com os achados de [15] em peixes marinhos, nos quais também ocorreram danos significativos no DNA sangüíneo de animais expostos por 8h a águas contaminadas com PAHs e PCBs; os autores também observaram um aumento das enzimas citocromo P450 e GSTs e redução de danos no DNA após 48h de exposição. A elevação da atividade da enzima GST também foi relatada por [14] em ostras expostas ao óleo diesel.

No presente estudo, quando os animais foram expostos por 15 dias à FSD, a frequência de nucleóides se igualou novamente à observada após a exposição dos peixes à FSD por 6 horas. Estes mesmos animais apresentaram um aumento na atividade de GST no fígado, indicando, portanto, danos oxidativos [37]. Assim, apesar da ativação das defesas antioxidantes, os danos observados no DNA de células sangüíneas dos animais expostos à FSD durante 15 dias devem refletir a ocorrência de estresse oxidativo (Tabela I, Figura 1).

Como no ensaio do Cometa é possível quantificar e distinguir células com diferentes índices de danos no DNA, a análise do score em cada grupo se torna muito importante. No presente estudo, houve a predominância de nucleóides classes 0 e 1 em todos os grupos controles-negativos.

Nas exposições agudas de 6 e 24 horas ao óleo diesel houve a predominância de nucleóides de classes 1 e 2, caracterizando danos mínimos e médios no DNA dos peixes. Nas exposições aguda de 96 horas e sub-crônica (15

dias) à FSD prevaleceram nucleóides de classes 2 e 3, sendo que estes últimos caracterizam danos máximos no DNA. Dessa forma o cálculo dos escores médios para todas as exposições à FSD confirma os dados obtidos para a frequência média de células danificadas (Tabela I). Os dados deste trabalho corroboram os achados de [38], que descreveram altos índices de danos no DNA em eritrócitos de *Anguilla anguilla* tratados, em laboratório, com diferentes hidrocarbonetos. Altos índices de danos também foram relatados no DNA em eritrócitos de *Zoarces viviparus* coletados em um estuário na Suíça, onde o sedimento era contaminado com inúmeros compostos, incluindo HPAs e BPCs [4].

A consequência de perturbações na estrutura do DNA, tais como aductos, quebras de fita simples e dupla são capazes de resultar em lesões que podem se tornar permanentes. Assim, o emprego de ensaios citogenéticos, como o teste do Micronúcleo, são ideais para avaliar danos permanentes no material genético. Este teste, segundo [32] vem sendo usado com grande sucesso desde a década de 80 para avaliar poluentes ambientais e diferentes compostos químicos. Em ambientes de água doce é aplicado principalmente em vertebrados [39, 40] e sua frequência parece estar fortemente relacionada com a qualidade da água a ser examinada [3, 41, 42, 43, 44].

No presente estudo a avaliação da indução de micronúcleos em células sanguíneas de curimbas expostos à fração solúvel do óleo diesel de forma aguda e sub-crônica, mostrou que este teste foi eficiente para detectar componentes mutagênicos presentes na fração testada.

A indução de micronúcleos ocorreu após todos os tempos de exposição testados, mas as menores frequências de micronúcleos foram obtidas após 6 horas e 15 dias de exposição. Uma hipótese para este achado seria que 6 horas de exposição não foram suficientes para que os danos ocorridos nas células que estavam em intérfase ou no início do ciclo celular se manifestassem como um micronúcleo no momento da amostragem, refletindo a cinética do ciclo celular da maioria dos peixes. Quanto à baixa frequência de células micronucleadas observadas após a exposição dos peixes à FSD por 15 dias, podemos sugerir dois mecanismos. O primeiro seria a ocorrência de seleção celular. A alta porcentagem de células apoptóticas foi descrita em peixes marinhos expostos a efluente de refinaria de petróleo [4]. Este fenômeno ocorre quando os danos celulares são intensos e os mecanismos de defesa não conseguem repará-los. Em consequência, o número de células micronucleadas disponíveis para a análise, também decresceria. Durante a cinética das células sanguíneas, os eritrócitos são continuamente renovados e, segundo [45], os eritrócitos danificados tendem a ser eliminados do organismo mais rapidamente do que aqueles não danificados.

Apesar dos micronúcleos serem freqüentemente relatados como biomarcadores sensíveis de genotoxicidade em peixes, muitos estudos de exposição por longa duração de peixes a poluentes mostram que as frequências de eritrócitos micronucleados tendem a diminuir após o décimo quinto ou vigésimo primeiro dia de exposição [46, 47, 48]. Assim, o segundo mecanismo para explicar a diminuição da frequência de micronúcleos observada após 15 dias de exposição à FSD seria a resposta adaptativa dos animais às condições de exposição. As baixas frequências de micronúcleos observadas em peixes (silvestres e introduzidos) expostos por três

semanas em áreas contaminadas por hidrocarbonetos aromáticos foram atribuíram à adaptação dos animais aos poluentes [20].

Este fenômeno parece não ser aplicável a todos os organismos aquáticos, pois [32] analisaram a genotoxicidade de moluscos da espécie *Dreissena polymorpha* expostos, por 30 dias, à águas provenientes de locais impactados com óleo cru e verificaram altos índices de hemócitos micronucleados. O aumento na frequência de micronúcleos foi observado tanto em células de brânquias quanto em eritrócitos do sangue periférico de peixes da espécie *Oreochromis niloticus* expostos, por 3, 6 e 9 dias, a efluentes de refinaria de petróleo [49]

No presente estudo as maiores frequências de micronúcleos foram observadas após expor os animais a 24 e 96 horas ao óleo diesel. Parece que o tempo de amostragem de 24h é o mais adequado para a avaliação de mutações em *Prochilodus lineatus*, pois neste intervalo de tempo as lesões celulares ocorridas, possivelmente, não foram reparadas e originaram células micronucleadas.

A frequência de micronúcleos em células sangüíneas de *Cyprinus carpio* coletados em três locais da bacia do rio Tejo (Espanha), contaminados com PAHs, tiveram um aumento significativo quando foram comparadas com as frequências obtidas em animais de locais não poluídos [19]. Aumentos significativos nas frequências de micronúcleos em células sangüíneas de moluscos (*Perna viridis*) e peixes (*Dicentrarchus labrax*) expostos por diferentes tempos ao benzo(a)pireno foram observadas, respectivamente, por [12] e [50].

A estimativa de danos no DNA usando o ensaio do cometa é resultado da complexa interação entre dois processos: danos no DNA e reparo (ativação ou inibição). O dano observado indica neste caso, uma resposta recente ao poluente. Ao contrário, os micronúcleos, quando formados, persistem ao longo da vida da célula [32]. Portanto, a combinação destes dois ensaios no presente estudo se mostrou adequada e vantajosa para a avaliação da genotoxicidade da fração solúvel do óleo diesel devido às suas complementaridades. Em conclusão, este estudo revelou que peixes neotropicais foram seriamente afetados pela FSD. Os dados obtidos podem estimular outros experimentos nesta área, possibilitando um melhor entendimento dos efeitos genéticos de um derrame de óleo diesel em peixes neotropicais.

## **AGRADECIMENTOS**

As autoras agradecem ao Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, à Estação de Piscicultura da UEL (EPUEL) pelo fornecimento dos peixes. Um agradecimento especial à Dra. Carmem L. C. Guedes pelo preparo da fração solúvel do diesel. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil (CT-Petro / CNPq 502238/2003-8) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## REFERÊNCIAS

- [1] M.A. Mazon, E.A.S. Monteiro, G.H.D. Pinheiro, M.N. Fernandes. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*, Brazilian J. Biol. 62 (2002) 621-631.
- [2] A.N. Jha. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview, Mutat. Res. 552 (2004) 1-17.
- [3] K. Al-Sabti, C.D. Metcalfe. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in Water, Mutat. Res. 343 (1995) 121-135.
- [4] G. Frenzilli, V. Scarelli, I. DEL Barga, M. Nigro, L. Förlin, C. Bolognesi, J. Sturve. DNA in eelpout (*Zoarces viviparous*) from Göteborg harbour, Mutat. Res. 552 (2004) 187-195.
- [5] T. Ohe, T. Watanabe, K. Wakabayashi. Mutagens in the surface water: a review, Mutat. Res. 567 (2004) 109-149.
- [6] P.H. Albers, Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Jr-Burton, J. Jr-Cairns (Eds.). Handbook of ecotoxicology. 2. ed. Boca Raton, Florida. (2002) 341-371.
- [7] D. Hamoutene, J. F. Payne, A. Rahimtula, K. Lee. Use of the Comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons, Mar. Environ. Res. 54 (2002) 471-474.
- [8] CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Portal do Governo do Estado de São Paulo. São Paulo, 2005 Emergências Químicas, Vazamentos de óleo. Disponível em: [www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/vazamento/asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/vazamento/asp)  
Acesso em: 13 out. 2005.
- [9] M. Pacheco, A.M. Santos. Biotransformation, Endocrine, e Genetic Responses of *Anguilla anguilla* L. to Petroleum Distillate Products and Environmentally Contaminated Waters, Ecotoxicology and Environmental Safety 49 (2001) 64 – 75.

- [10] J.F. Zhang, X.R. Wang, H.Y. Guo, J.C. Wu, Y.Q. Xue. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of goldfish, *Carassius auratus*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58 (2004) 110-116.
- [11] V. M. F. Almeida e Val, W. P. Duncan, A. L. Val. Crude oil effects on fish of the amazon: Current Status. in: *Tropical Fish: News and Reviews*. International Congress on The Biology of Fish. University Of British Columbia, Vancouver, CANADA. (July. 2002) pp. 49 - 60.
- [12] W.H.L. Siu, J. Cao, R.W. Jack, R.S.S. Wu, B. J. Richardson, L. Xu, P.K.S. Lam. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*), *Aquat. Toxicol.* 66 (2004) 381-392.
- [13] I.C. Taban, R.K. Bechmann, S. Torgrimsen, T. Baussant, S. Sanni. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to oil using comet assay, *Mar. Environ. Res.* 58 (2004) 701-705.
- [14] A. Zacaron da Silva, J. Zanette, J.F. Ferreira, J. Guzinski, M. R. F. Marquez, A. C. D.Bayni. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62 (2005) 376-382.
- [15] V.L. Maria, A.C. Correia, M.A. Santos. Genotoxic and biochemical responses in caged eel (*Anguilla anguilla* L.) after short-term exposure to harbour waters, *Environ. International* 29 (2003) 923-929.
- [16] C. Gravato, & M.A. Santos. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51 (2001) 115-127.
- [17] C. A. Pollino, D.A. Holdway. Hydrocarbon-induced changes to metabolic and detoxification enzymes of the Australian crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*), *Environ. Toxicol.* 18 (2003) 21-28.
- [18] M.J. Winter, N. Day, R.A. Hayes, E.W. Taylor, P.J. Butler, J.K. Chipman. DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK, *Mutat. Res.* 552 (2004) 163-175.

- [19] M.T. Llorente, A. Martos, A. Castano. Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp, *Ecotoxicology* 11 (2002) 27-34.
- [20] A. Tuvikene, S. Huuskonen, K. Koponen, O. Ritola, U. Mauer, P. Lindström-Seppä. Oil shale processing as a source of aquatic pollution: Monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 745-752.
- [21] M. Pacheco, A.M. Santos. Induction of liver EROD and Erythrocytic Nuclear Abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40 (1998) 71-76.
- [22] D.E. Nicodem, C.L.B. Guedes, R.J. Correa. Photochemistry of petroleum. I. Systematic study of a brazilian intermediate crude oil, *Mar. Chemistry* 63 (1998) 93-104.
- [23] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider. A Single Technique for Quantification of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells, *Experim. Cell Res.* 175 (1988) 184-191.
- [24] G. Speit, A. Hartmann The Comet Assay (Single Cell Gel Test) – A Sensitive genotoxicity Test for Detection of DNA Damage and Repair. *Methods in Molecular Biology* 113 (1999), DNA-repair Protocols: Eucaryotic Systems Ed. Henderson, D. S. Human Press Inc.; Totowa, NY.
- [25] H. Kobayashi, C. Suguyama, Y. Morikawa, M. Hayashi, T. Sofuni. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis, *MMS Comm.* 3 (1995) 103-115.
- [26] R.N. Hoofman & W.K. de Raat. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by the ethyl methanesulphonate. *Mutat. Res.* 104 (1982) 147-152.
- [27] J.H. Zar. In: W. D. McElroy, C.P. Swanson (Eds.). *Bioestatistical analysis*, 3 ed. New Jersey, USA: Prentice Hall (1996) 662p.

- [28] D.E. Nicodem, C.Z. Fernandes, C.L.B. Guedes, R.J. Correa. Petrochemical processes and the environmental impact of petroleum spills, *Biogeochemistry* 39 (1997) 121-138.
- [29] Ambiente Brasil. Principais acidentes da indústria petrolífera no mundo, Principais acidentes com petróleo e derivados no Brasil. Disponível em [www.ambientebrasil.com.br/agua/salgada/vazamentos](http://www.ambientebrasil.com.br/agua/salgada/vazamentos). Acesso em: 31 out. 2005.
- [30] Bombail, V.; Dennis, A.W.; Gordon, E.; J. Batty. Application of the Comet and Micronucleus Assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) Erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland, *Chemosphere* 44 (2001) 383-392.
- [31] R. Pandrangi, M. Petras, S. Ralph, M. Vrzoc. Alkaline Single Cell Gel (comet) Assay and Genotoxicity Monitoring using Bullheads and Carp, *Environ. Mol. Mutagen.* 26 (1995) 345-356.
- [32] G.I.V. Klobucar, M. Pavlica, R. Erben, D. Papes. Application of the micronucleus and the comet assay to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments, *Aquatic Toxicol.* 64 (2003) 15-23.
- [33] G. Ortí, A. Arjun, E. Bermingham. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Mol. Ecol.*,10 (2001) 407-417.
- [34] S. Lemiere, C. Cossu-Leguille, A. Bispo, M-J Jourdain, M-C Lenhers, D. Burnel, P. Vasseur. DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the 'Erika' oil-spill, *Mutat. Res.*, 581 (2005) 11-21.
- [35] V.L. Maria, A.C. Correia, M.A. Santos. *Anguilla anguilla* L. Biochemical and genotoxic responses to benzo[a]pirene, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53 (2002) 86-92.
- [36] R. Van Der Oost, J. Beyer, N.P.E. Vermelen. Fish bioaccumulation and biomarkers in risk assessment: a review, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13 (2003) 57-149.

- [37] J. D. Simonato, A. C. Albinati, C. B. R. Martinez. Effects of the Water Soluble Fraction of Diesel Fuel Oil on some Functional Parameters of the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes, Bull. Environ. Contamination and Toxicology, article *in press*.
- [38] M. Nigro, G. Frenzilli, V. Scarcelli, S. Gorbi, F. Regoli. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*, Mar. Environ. Res. 54 (2002) 517-520.
- [39] K. Belpaeme, L. Delbeke, L. Zhu, M. Kirsch-Volders. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay, Mutagenesis 11 (1996) 485-492.
- [40] C.K. Grisolia, F.L.R.M. Starling. Micronuclei monitoring of fishes from lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges, Mutat. Res. 491 (2001) 39-44.
- [41] S. Minissi, E. Ciccotti, M. Rizzoni. Micronucleus Test in Erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei Pisces) from to Natural Environments: A Bioassay for the *in situ* Detection of Mutagens in Freshwater, Mutat. Res. 367 (1996) 245-251.
- [42] F. Ayllon, E. Garcia-Vazquez. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test, Mutat. Res. 467 (2000) 177-186.
- [43] A. Rodriguez-Cea, F. Ayllon, E. Garcia-Vazquez. Micronucleus test in freshwater fish species: na evaluation of its sensitivity for application in the field surveys, Ecotoxicol. Environ. Saf. 56 (2003) 442-448.
- [44] C. Russo, L. Rocco, M. A. Morescalchi, V. Stingo. Assessment of environmental stress by the Micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments, Ecotoxicol. Environ. Saf. 57 (2004) 168-174.
- [45] S. de Flora, L. Viganó, F.D. Agostini, A. Camoirano, M. Bagnasco, C. Bennicelli, F. Melodia, A. Arillo. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water, Mutat. Res. 319 (1993) 167-177.

- [46] M.A. Campana, A.M. Panzeri, V.J. Moreno, F. Dulout. Genotoxic evaluation of the pirethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*, *Mutat. Res.* 438 (1999) 155-161.
- [47] C. Torres de Lemos, M.P. Rdel, N.R. Terra, B. Erdtmann. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 1320-1324.
- [48] T. Çavas, S. Ergene-Gözükara. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents, *Aquatic Toxicol.* 74 (2005) 264-271.
- [49] T. Çavas, S. Ergene-Gözükara. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment, *Environ. Mol. Mutagen.* 46 (2005) 64-70.
- [50] C. Gravato, & M.A. Santos. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55 (2003) 352-358.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação da genotoxicidade / mutagenicidade da fração solúvel do óleo diesel (FSD) em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* foi realizada após a simulação de derrame de óleo em ambiente tropical. Os dados obtidos são de grande importância para o entendimento da resposta genética de peixes neotropicais após acidentes, já que tais eventos têm se tornado freqüentes em nosso país e os dados em organismos dulcícolas são praticamente inexistentes. Os ensaios genéticos empregados no presente estudo: Cometa e Micronúcleo indicaram que as quebras no DNA, promovidas pela FSD em peixes expostos por 6 horas ao poluente não foram convertidas em micronúcleos visualizáveis, devido ao tempo de amostragem. Após 24 e 96 horas de exposição à FSD os valores médios de escores no ensaio Cometa diminuíram em relação ao tempo de 6 horas e houve um aumento na freqüência de células micronucleadas. A análise conjunta destes dados confirma que o ciclo celular nos eritrócitos desta espécie está em torno de 24 horas e que os intervalos de amostragem de 24 e 96 horas são os mais adequados para estudos de mutagenicidade.

Os peixes expostos por 15 dias à FSD apresentaram uma média de células micronucleadas baixa e alta freqüência de lesões primárias nos DNAs. É possível que as células lesionadas estejam sendo direcionadas à morte celular ou que um processo adaptativo dos animais às condições de exposição ao poluente esteja se iniciando.

O presente trabalho sugere que derramamentos de óleo diesel podem causar danos genéticos tanto reversíveis (lesões primárias no DNA) como irreversíveis

(micronúcleos) em peixes dulcícolas neotropicais. Portanto, é extremamente importante que tais derramamentos sejam evitados, pois as alterações genéticas detectados no presente estudo podem levar a uma menor sobrevivência dos exemplares afetados ou ao desenvolvimento de doenças degenerativas, como neoplasias. As mutações, se persistirem, podem levar também, a longo prazo, à uma redução da biodiversidade e, em casos extremos, à extinção da população exposta.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERS, P.H.; Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER B. A.; Jr-BURTON., G. A.; Jr-CAIRNS., J. (Eds.). **Handbook of ecotoxicology**. 2. ed. Boca Raton, Florida: cap. 14, p. 341-371, 2002.
- ALLOWAY, B.J.; AYRES, D.C. **Chemical Principles of Environmental Pollution** 2.ed. London: Chapman and Hall, p. 17-62, 1997.
- ALMEIDA - VAL, V. M. F.; DUNCAN, W. P.; VAL, A. L. Crude oil effects on fish of the Amazon: Current Status. In: Tropical Fish: News and Reviews. International Congress on The Biology of Fish. University Of British Columbia, Vancouver, CANADA. p. 49: July, 2002.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in Water. **Mutation Reserarch**, v. 343, p. 121-135,1995.
- AMBIENTE BRASIL. Principais acidentes da indústria petrolífera no mundo. Principais acidentes com petróleo e derivados no Brasil. Disponível em [www.ambientebrasil.com.br/agua/salgada/vazamentos](http://www.ambientebrasil.com.br/agua/salgada/vazamentos). Acesso em: 31 out. 2005.
- AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**,v. 467, p. 177-186, 2000.
- BELPAEME, K.; DELBEKE, L.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 11, p. 485-492,1996.

- BHATTACHARYYA, S., KLERKS, P.L., NYMAN, J.A. Toxicity to freshwater organisms from oils and oil spill chemical treatments in laboratory microcosms. **Environmental Pollution**, v. 122, p. 205-215, 2003.
- BICHKHAM, J.W.; SANDHU, S.; HEBERT, P.D.N.; CHIKHI, L.; ATWHWAL,R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**, v. 463, p. 33-51, 2000.
- BOMBAIL, V.; DENNIS, A.W.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the Comet and Micronucleus Assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) Erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, p.383-392, 2001.
- BRUNETTI, R.; MAJONE, F.; GOLLA, I.; BELTRAME, C. The Micronucleus Test: Examples of Application to Marine Ecology. **Marine Ecology Progress Series**, v.44, p. 65-68, 1988.
- CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. Family Prochilodontidae (Flannel mouth characiformes) In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; Jr-FERRARIS, C. J. (Orgs.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 65-70, 2003.
- ÇAVAS , T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 46, p. 64-70, 2005a.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 264-271, 2005.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents. **Aquatic Toxicology**. v. 74, p. 264-271, .2005b.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo (Estado). Portal do Governo do Estado de São Paulo. Emergências Químicas, Vazamentos de óleo. Disponível em: [www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/vazamento/asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/vazamento/asp)  
Acesso em: 13 out. 2005.

DE FLORA, S.; VIGANÒ, L.; AGOSTINI, F.D.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutation Research**, v. 319, p. 167-177, 1993.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v. 521, p. 121- 135, 2002.

DEVAUX, A.; FLAMMARION, P.; BERNADON, V.; GARRIC, J; MONOD, G. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and Cytochrome P4501A induction in Chub (*Leuciscus cephalus*). **Marine Environmental Research**, v. 46, p. 257-262, 1998.

DI GIULIO, R. T.; HABIG, C.; GALLAGHER, E. P. Effects of Black Rock harbour sediments on in indexes of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. **Aquatic Toxicology**, 26 (1-2): 1-22,1993.

FLEEGER, J.W.; CARMAN, K.R.; NISBET, R.M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **The Science of the Total Environment**, v. 317, p. 207-233, 2003.

FRENZILLI, G.; SCARELLI, V.; DEL BARGA, I.; NIGRO, M.; FÖRLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. DNA in eelpout (*Zoarces viviparous*) from Göteborg harbour. **Mutation Research**, v.552, p. 187-195, 2004.

GRAVATO, C. & SANTOS, M.A. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 55, p. 352-358, 2003.

- GRAVATO, C. & SANTOS, M.A. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 51, p. 115-127, 2001.
- GRISOLIA, C.K.; STARLING, F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, v. 491, p. 39-44, 2001.
- HAMOUTENE, D.; PAYNE, J. F.; RAHIMTULA, A.; LEE, K. Use of the Comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 471-474, 2002.
- HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y. F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, v. 399, p. 125-133, 1998.
- HEDDLE, J. A.; CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M.D.; TUCKER, J.D.; VANPARYS, P.H.; MCGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, p. 277-291, 1991.
- HEDDLE, J. A.; HITE, M.; JRKHART, B.; MCGREGOR, J. T.; SALAMONE, M. F. The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. **Mutation Research**, v. 123, p. 61-118, 1983.
- HOOFTMAN, R.N. & RAAT, W.K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v. 104, p. 147-152, 1982.
- HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: A review. **Mutation Research**, v. 277, n. 2, p. 91-138, 1992.

- JHA, A.N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. **Mutation Research**, v. 552, p. 1-17, 2004.
- JOBLING, M. Human Impacts on Aquatic Environments. In: **Environmental Biology of Fishes**. Fish and Fisheries Series, London: Chapman & Hall, v. 16, p. 415-436, 1996.
- KIM, I-Y. & HYUM, C-K. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for the genotoxicity monitoring using aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, article *in press*.
- KLOBUCAR, G.I.V.; PAVLICA M.; ERBEN, R.; PAPES, D. Application of the micronucleus and the comet assay to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic Toxicology**, v. 64, p. 15-23, 2003.
- 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 Commun.**, v.3, p. 103-115,1995.
- LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v. 544, p. 43-64, 2003.
- LEMIERE, S.; COSSU-LEGUILLE, C.; BISPO, A.; JOURDAIN, M-J, LENHERS, M-C; BURNEL, D.; VASSEUR, P. DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the 'Erika' oil-spill. **Mutation Research**, v. 581, p. 11-21, 2005.
- LLORENTE, M.T.; MARTOS, A.; CASTANO, A. Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. **Ecotoxicology**, v. 11, p. 27-34, 2002.

- LOVELL, D. P.; THOMAS, G.; DUBOW, R. Issues Related to the Experimental Design and Subsequent Statistical Analysis of In Vivo and In Vitro Comet Studies. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 19, p. 109-119, 1999.
- MANNA, G. K.; BANERJEE, G.; GUPTA, S. Micronucleus Test in The Peripheral Erythrocytes of The Exotic Fish, *Oreochromis mossambica*. **The Nucleus**, 28: 3,176-179, 1985.
- MARIA, V.L.; CORREIA, A.C.; SANTOS, M.A. *Anguilla anguilla* L. Biochemical and genotoxic responses to benzo[a]pirene. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 53, p. 86-92, 2002.
- MARIA, V.L.; CORREIA, A.C.; SANTOS, M.A.. Genotoxic and biochemical responses in caged eel (*Anguilla anguilla* L.) after short-term exposure to harbour waters. **Environment International**, v. 29, p. 923-929, 2003.
- MARTINEZ, C.B.R. & CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: **A bacia do rio Tibagi**, cap. 29, p. 551-557, 2002.
- MATSUMOTO, F.E. & CÓLUS, I.M.S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 489-492, 2000.
- MAZON, M.A.; MONTEIRO, E.A.S.; PINHEIRO, G.H.D.; FERNANDES, M.N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Brazilian Journal Biology**, v. 62, p. 621-631, 2002.
- MERSCH, J.; BEAUVAIS, M-N. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. **Mutation Research**, v. 383, p. 141-149, 1997.
- MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus Test in Erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei Pisces) from to Natural Environments: A Bioassay for the *in*

- situ* Detection of Mutagens in Freshwater. **Mutation Research**, v. 367, p. 245-251, 1996.
- MOORE, M. N.; Biocomplexity: The post-genome challenge in ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, 59: 1-15, 2002.
- NACCI, D.; NELSON, S.; NELSON, W.; JACKIM, E. Application of the DNA alkaline unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves. **Marine Environmental Research**, 33: 83-100, 1992.
- NICODEM, D.E.; FERNANDES, C.Z.; GUEDES, C.L.B.; CORREA, R.J. Petrochemical processes and the environmental impact of petroleum spills. **Biogeochemistry**, v.39, p. 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**, v. 63, p. 93-104, 1998.
- NIGRO, M.; FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; GORBI, S.; REGOLI, F. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 517-520, 2002.
- OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in the surface water: a review. **Mutation Research**, v. 567, p. 109-149, 2004.
- ORTÍ, G.; ARJUN, A.; BERMINGHAM, E. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v.10, p. 407-417, 2001.
- PACHECO, M. & SANTOS, A.M. Induction of liver EROD and Erythrocytic Nuclear Abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. **Ecotoxicology. Environmental Safety**, v. 40, p. 71-76, 1998.
- PACHECO, M.; SANTOS, A.M. Biotransformation, Endocrine, e Genetic Responses of *Anguilla anguilla* L. to Petroleum Distillate Products and Environmentally

- Contaminated Waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 64 – 75, 2001.
- PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline Single Cell Gel (comet) Assay and Genotoxicity Monitoring using Bullheads and Carp. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 345-356, 1995.
- POLLINO, C. A.; HOLDWAY, D.A. Hydrocarbon-induced changes to metabolic and detoxification enzymes of the Australian crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). **Environmental Toxicology**, v. 18, p. 21-28, 2003.
- POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, v. 246, p. 352-358, 1989.
- RABELLO-GAY, M.N.; RODRÍGUEZ, M.A.R.; MONTELEONE-NETO, R. Testes com organismos superiores. In: Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, **Revista Brasileira de Genética**, p. 59 e 75, 1991.
- RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**, Canoas: Ulbra, p. 21-28, 2003.
- RODRIGUEZ-CEA, A.; AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleus test in freshwater fish species: a evaluation of its sensitivity for application in the field surveys. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 56, p. 442-448, 2003.
- ROSS, G. M.; McMILLAN, T. J.; WILCOX, P.; COLLINS, A. R. The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (comet assay): Technical Aspects and Applications. Report on the 5 th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research. **Mutation Research**, 337: 57-60, 1995.
- RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M. A.; STINGO, V. Assessment of environmental stress by the Micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 168-174, 2004.

- RYDBERG, B.; JOHANSON, K.B. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: P.C. Hanawalt; E.C. Friedberg, & C.F. Fox (Eds). **DNA repair mechanisms** New York , Academic Press, p. 465-468, 1978.
- SCARPATO, R.; MIGLIORI, L.; BARALE, R. The Micronucleus Assay in *Anodonta cygnea* for the detection of Drinking Water Mutagenicity. **Mutation Research**, v. 245, p. 231-237, 1990.
- SCHIMID, W. The Micronucleus Test for Cytogenetics Analysis. In: Hollander, A. (ed.) **Chemical Mutagens; Principles and Methods for Their Detection**. New York: Plenum Press, v. 6, p. 31- 53, 1976.
- SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the Water Soluble Fraction of Diesel Fuel Oil on some Functional Parameters of the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, article *in press*.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A Single Tecnique for Quantification of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SIU, W.H.L.; CAO, J.; JACK, R.W.; WU, R.S.S.; RICHARDSON, B. J.; XU, L.; LAM, P.K.S. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 381-392, 2004.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single Cell Gel Test) – A Sensitive genotoxicity Test for Detection of DNA Damage and Repair. **Methods in Molecular Biology**, DNA-repair Protocols: Eucaryotic Systems. New York, Henderson, D. S. Human Press Inc.: Totowa, v. 113, 1999.
- STAHL, R. Jr.; The Genetic Toxicology of Organic Compounds in Natural Waters and Waste Waters. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 22, p. 94-125, 1996.

- TABAN, I.C.; BECHMANN, R.K.; TORGRIMSEN, S.; BAUSSANT, T.; SANNI, S. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to oil using comet assay. **Marine Environmental Research**, v. 58, p. 701-705, 2004.
- THEODORAKIS, C. W.; D'SURNEY, S. J.; BICKHAM, J. W.; LYNE, T. B.; BRADLEY, B. P.; HAWKINS, W. L.; FARKAS, W. L.; MCCARTHY, J. F. Sequential expression of biomarkers in bluegill sunfish exposed to contaminated sediment. **Ecotoxicology**, v.1, p. 45-73, 1992.
- TICE, R. The Single Cell/ Comet Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. In: PHILLIPS, D. H.; VENNIT, S. (Eds.). **Environmental Mutagenesis**. Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford, UK; p. 315-339, 1995.
- TORRES DE LEMOS, C; RDEL, M.P.; TERRA, N.R.; ERDTMANN, B. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. **Environment Toxicology Chemistry**, v. 20, p. 1320-1324, 2001.
- TUVIKENE, A.; HUUSKONEN, S.; KOPONEN, K.; RITOLA, O.; MAUER, U.; LINDSTRÖN-SEPPA, P. Oil shale processing as a source of aquatic pollution: Monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish. **Environmental Health Perspective**, v. 107, p. 745-752, 1999.
- VAL, A. L.; ALMEIDA - VAL, V. M. F. Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon. In: Val, A.L.; ALMEIDA - VAL, V. M. F (Eds.), **Biology of Tropical Fish**, INPA, Manaus, p.277-291, 1999.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMELEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p. 57-149, 2003.
- WINTER, M.J.; DAY, N.; HAYES, R.A.; TAYLOR, E.W.; BUTLER, P.J.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. **Mutation Research**, v. 552, p. 163-175, 2004.

WRIGHT, R. T.; NOBEL, B.T. In: **Environmental Science: The Way World Works**. 7. ed., cap. 18, 2000.

ZACARON DA SILVA, A.; ZANETTE, J.; FERREIRA, J.F.; GUZENSKI, J.; MARQUEZ, M. R. F.; BAYNI, A. C. D. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 62, p. 376-382, 2005.

ZAR, J.H. In: McELROY, W. D.; SWANSON, C.P. (Eds.). **Bioestatistical analysis**, 3 ed. New Jersey, USA: Prentice Hall (1996) 662p.

ZHANG, J.F.; WANG, X.R.; GUO, H.Y.; WU, J.C.; XUE, Y.Q. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 58, p. 110-116, 2004.