
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

BIOMARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS PARA AVALIAR OS EFEITOS DO
BIODIESEL POR MEIO DE TESTES DE TOXICIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO*

DALITA GOMES SILVA MORAIS CAVALCANTE

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular)

DALITA GOMES SILVA MORAIS CAVALCANTE

**BIOMARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS PARA AVALIAR OS EFEITOS
DO BIODIESEL POR MEIO DE TESTES DE TOXICIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO***

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular)

Orientador: Prof. Dra. Maria Aparecida Marin- Morales

Co – Orientador: Prof. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Rio Claro/SP
2012

574.5 Cavalcante, Dalita Gomes Silva Morais
C376b Biomarcadores genéticos e bioquímicos para avaliar os efeitos do biodiesel, por meio de bioensaios in vivo e in vitro / Dalita Gomes Silva Morais Cavalcante. - Rio Claro : [s.n.], 2012
150 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Maria Aparecida Marin- Morales

Co-Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez

1. Ecologia. 2. Ecotoxicologia. 3. Biocombustível. 4. Contaminação ambiental. 5. Peixe. 6. Linhagem celular. 7. Alterações celulares. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

DALITA GOMES SILVA MORAIS CAVALCANTE

**BIOMARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS PARA AVALIAR OS EFEITOS
DO BIODIESEL, POR MEIO DE TESTES DE TOXICIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO***

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular)

Comissão Examinadora:

Prof. Dra. Maria Aparecida Marin- Morales – UNESP/Campus Rio Claro

Prof. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti – UNESP/Campus Rio Claro

Prof. Dr. Edson Luis Maistro – UNESP/ Campus Marília

Prof. Dra. Grasiela Dias de Campos Severi Aguiar – UNIARARAS/ Araras

Prof. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus – UEL/ Londrina

Rio Claro, 22 de maio de 2012

“Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre”

Charles

AGRADECIMENTOS

Quatro anos se passaram e agora finalmente estou finalizando o doutorado. O tão sonhado título acadêmico de Doutora Dalita está aí, ao alcance de minhas mãos. Mas preciso deixar aqui expresso que sozinha jamais conseguiria. Muitas e muitas pessoas me ajudaram para eu chegar até aqui. Gostaria agora de agradecer a todos com muito carinho. Dizer: Muito obrigada!

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Rio Claro;

À coordenação do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular;

À Universidade Estadual de Londrina/PR, onde realizei os meus experimentos práticos;

À Capes pela concessão da bolsa de doutorado;

À Capes e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro para a realização dos experimentos;

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) e aos pesquisadores desta instituição: Dr. Bill Jorge Costa; Dra. Patricia Raquel Silva e o químico industrial Wellington Vechiatto, pelo fornecimento do biodiesel utilizado neste estudo; meu muito obrigada!

À banca examinadora, tanto da qualificação quanto da defesa, que aceitou contribuir e dar sugestões para a melhoria deste trabalho;

Ao professor Dr. Paulo César Meletti, que sempre que tinha dúvidas, me atendia com toda disposição !;

À professora Dra. Marta Marques de Souza, que acompanhou toda a saga para a implantação das células ZFL no laboratório e me ajudou sempre com dicas úteis e palavras de ânimo. Muito obrigada Marrrrrtaa!!;

À Professora Dra. Maria Aparecida Marin-Morales que aceitou me orientar, e me deu a oportunidade de fazer o doutorado. Sempre que precisei, me atendeu com toda atenção e respeito. Meu muito obrigada!!;

À Professora Dra Silvia Helena Sofia que pra mim é um exemplo de profissional e de pessoa. Meu muito obrigada pelos puxões de orelha, que me fizeram crescer e também pelas demonstrações de carinho, que me deram força!!!;

À Professora Dra Claudia Bueno dos Reis Martinez que me orientou durante todo o doutorado sempre com muuuuuita paciência. Meu muito obrigada por me ajudar a crescer profissionalmente, pelos ensinamentos diários de como ser uma grande pesquisadora e pela oportunidade e confiança que depositou em mim todos esses anos;

Às meninas do laboratório de Mutagênese da UNESP, campus Rio Claro: Thais Fernandes, Jaqueline Bianchi e Márcia Hoshina, que sempre que precisei, sempre estavam prontas a ajudar. Meu muito obrigada!!;

À Vanessa Monteiro, Rafael Palhano e Nelissa Torrezani, que me ajudaram no início do doutorado. Meu muito obrigada pelo auxílio e pela amizade!!!;

Às minhas amigas: Cylene Garcia, Thais Graciano e Natália Cestari, que me ajudaram nos experimentos. Muito obrigada pelas conversas, desabafos e palavras de carinho!!!;

Às amigas Juliana Marcarini e Marcela Tsuboy, que fizeram doutorado junto comigo. Meu muito obrigado pela companhia, pelas conversas e pelas aventuras que vivemos no pensionato do Seu Sebastião !!!;

Aos amigos do LAGEA, em especial à Karen Suzuki e Alessandra Alves, que sempre me atenderam com muito carinho, quando eu ia até o LAGEA pegar alguma coisa ou tirar alguma dúvida. Muito Obrigada!!;

Aos Amigos do LEFA: Cássia, Claudinha, Lú, Juliana, Lindalva, Francine, Débora, Andréa, Alexandre, Fernanda, Kelly, Bruna, Wagner, Angélica e Carol pela ajuda e pelos momentos de alegria !!!;

À Natara, minha fiel escudeira, que sempre estava pronta para me ajudar. Muito obrigada: a sua ajuda foi muito importante nos experimentos !!!;

Ao meu namorado Agnaldo, que me acompanhou nesta fase final do doutorado, sempre me ouvindo nos momentos difíceis, com muita paciência. Muito obrigada pela força e pelo carinho!!;

Aos meus avós, Seu José e D. Maria, que sempre torceram por mim. Vó muito obrigada pelas várias velas acendidas !!;

Aos meus pais Ednilton e Eloiza e os meus irmãos Danilo e Denise, que são o meu pilar de sustentação. Muito obrigada por tudo, por cada momento, por cada atenção, por cada carinho. Amo vocês!!;

À Deus, que sempre quando eu perdia as forças para continuar, ELE me dizia, de alguma forma; “Filha, me dê a mão, que Eu te ajudo a caminhar !!”.

CAVALCANTE, D.G.S.M. **Biomarcadores genéticos e bioquímicos para avaliar os efeitos do biodiesel, por meio de testes de toxicidade *in vivo* e *in vitro***. 2012. 150 p. TESE (Doutorado em Ciências Biológicas – área de concentração em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP - Campus Rio Claro/SP/Brasil

RESUMO

O biodiesel é um combustível definido como monoalquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, derivado de fontes renováveis, tais como óleos vegetais ou gorduras animais. Com o aumento da utilização do biodiesel, cresce a preocupação acerca de seus efeitos sobre a saúde de seres humanos e outros organismos, porém poucos são os estudos na literatura sobre os possíveis efeitos biológicos decorrentes da contaminação de biodiesel. Assim, o objetivo deste trabalho foi tentar identificar biomarcadores relacionados com a presença de biodiesel, produzidos por duas diferentes rotas (etilica e metílica), utilizando como sistema teste o peixe neotropical *Prochilodus lineatus* e a linhagem celular derivada de hepatócitos de Zebrafish (ZFL). Os resultados obtidos nos testes *in vivo* com *P. lineatus* mostraram que ambas as frações solúveis do biodiesel (etilica e metílica), induziram aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), causaram a ativação da enzima de biotransformação glutationa-S-transferase (GST) e da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), além de aumentar a frequência de danos no DNA de células branquiais e eritrócitos nos peixes expostos. Além disso, a fração solúvel do biodiesel produzida por rota etilica causou aumento na concentração de glutathione reduzida (GSH) e a fração solúvel do biodiesel, produzida por rota metílica causou a ativação hepática das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutathione peroxidase. Os resultados dos testes *in vitro* com ZFL mostraram que ambas as frações solúveis promoveram aumento na produção de ERO, ativação da enzima de biotransformação GST e danos na molécula de DNA nas células ZFL expostas. A fração solúvel do biodiesel produzida por rota metílica se mostrou mais citotóxica do que aquela produzida por rota etilica, além de produzir danos oxidativos na molécula de DNA. Com base nesses resultados, é possível inferir que o biodiesel pode causar alterações biológicas nos organismos aquáticos que entram em contato com ele, sendo, portanto perigoso para a biota aquática. Assim, a afirmação de que o biodiesel é um biocombustível ecologicamente correto precisa ser feita com cautela.

Palavras – Chaves: Biocombustível, contaminação ambiental, biomarcador, peixe, linhagem celular, alterações celulares.

CAVALCANTE, D.G.S.M. **Genetic and biochemical biomarkers to evaluate the effects of biodiesel by toxicity test *in vivo* and *in vitro***. 2012. 150 p. Thesis (Ph.D. in Biological Sciences- Area of Concentration in Cellular and Molecular Biology) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP - Campus Rio Claro/SP/Brazil

ABSTRACT

Biodiesel fuel is defined as monoalkyl esters of long chain fatty acids derived from renewable sources such as vegetable oils or animal fats. With the increased use of biodiesel, growing concern about its effects on the health of humans and other organisms, but there are few studies in the literature that attempt to elucidate the possible biological effects resulting from contamination of biodiesel. The objective of this study was to try and identify biomarkers related to the presence of biodiesel produced by two different routes (methyl and ethyl), using as test system neotropical fish *Prochilodus lineatus* and cell line derived from Zebrafish hepatocytes (ZFL). The results obtained *in vivo* tests with *P. lineatus* showed that both soluble fractions of biodiesel (methyl and ethyl), induced increased production of reactive oxygen species (ROS), caused activation of biotransformation enzyme glutathione-S-transferase (GST) and antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD), and increase the frequency of DNA damage in gill cells and erythrocytes in fish exposed. Moreover, the soluble fraction of the biodiesel produced by ethylic route caused an increase in the concentration of reduced glutathione (GSH) and the soluble fraction of the biodiesel produced by methylic route caused the activation of hepatic antioxidant enzymes catalase (CAT) and glutathione peroxidase. The results of *in vitro* tests (ZFL) showed that both soluble fractions led to an increase in the production of ROS, activation of biotransformation enzyme GST and damage to the DNA molecule in ZFL cells exposed. The soluble fraction of the biodiesel produced by methylic route was more cytotoxic than that produced by ethylic route, besides producing oxidative damage in the DNA molecule. Based on these results, it is possible to infer that biodiesel can cause biological changes in the aquatic organisms that come in contact with it, and therefore it can be dangerous to the aquatic biota. Thus, the statement that biodiesel is an environmentally friendly fuel must be made with caution.

Key - Words: Biofuel, contamination, fish, cell line, biological alteration

SUMÁRIO

1 - Introdução.....	09
2 – Objetivos.....	12
3 – Revisão de Literatura.....	14
3.1 – Biodiesel.....	14
3.2 – Impacto Ambiental do biodiesel.....	18
3.3 – Modelos biológicos para o monitoramento ambiental.....	20
a) <i>Prochilodus lineatus</i>	
b) Linhagem Celular de hepatócitos do peixe Zebrafish (ZFL)	
3.4 – Biomarcadores.....	25
a) Enzimas de biotransformação	
b) Espécies reativas de oxigênio, respostas antioxidantes e estresse oxidativo	
c) Danos no DNA	
4 – Material e Métodos.....	34
4.1 - Biodiesel estudado.....	34
4.2 - Preparo da fração solúvel do biodiesel (FSBd).....	34
4.3 - Modelos experimentais e delineamento experimental.....	35
A) <i>Prochilodus lineatus</i>	
A1 – Obtenção e aclimação dos peixes estudados	
A2 – Diluição da Fração solúvel do biodiesel (FSBd)	
A3 - Testes de toxicidade	
A4 – Amostragem	
A5 - Análise dos parâmetros	
B) Linhagem Celular ZFL	
B1 - Obtenção da linhagem celular estudada	

B2 – Experimentos de toxicidade

B3 – Metodologia empregada

4.4 – Análise Estatística.....	51
5 - Resultados e Discussão.....	53
5.1 <u>Manuscrito 1</u> : The water soluble fraction of biodiesel promotes genotoxic and biochemical effects on a neotropical fish.....	53
5.2 <u>Manuscrito 2</u> : Avaliação da utilização de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos em peixes expostos a derrames de biodiesel no ambiente aquático.....	81
5.3 <u>Manuscrito 3</u> : Avaliação de efeitos citotóxicos, bioquímicos e genotóxicos em células ZFL expostas a dois biodieseis produzidos por rotas de produção diferentes.....	110
6 - Considerações Finais.....	138
7 - Referências Bibliográficas Gerais.....	141

1. INTRODUÇÃO

O biodiesel está inserido na matriz energética mundial como fonte alternativa de energia, em substituição aos derivados de petróleo. Este composto vem sendo indicado como uma possível solução tanto para os problemas sócio-econômicos quanto para os problemas ambientais. O Brasil vem explorando este recurso energético, tendo finalizado o ano de 2011 como o maior mercado consumidor de biodiesel do mundo, passando a Alemanha, como indica a reportagem a seguir do Jornal Folha de São Paulo, de 26/10/2011:

26/10/2011 - 07h15

Brasil vira o maior consumidor de biodiesel do mundo

País vai consumir 2,8 bilhões de litros do combustível, 17% mais que em 2010, segundo associação do setor

“ O Brasil vai terminar o ano como o maior mercado consumidor de biodiesel do mundo, passando a Alemanha. Segundo projeções da Aprobio (Associação dos Produtores de Biodiesel do Brasil), o país vai produzir e consumir 2,8 bilhões de litros do combustível, 17% mais do que no ano passado. No país europeu, o consumo deve passar de 2,4 bilhões de litros para 2,6 bilhões de litros. A Alemanha também perderá a posição de maior produtor, mas para a Argentina. A produção argentina vai saltar de 2,1 bilhões de litros para 3,2 bilhões de litros - - O setor defende a adoção de um novo plano nacional de biodiesel, com um aumento gradual da participação do produto renovável na mistura final do diesel, para 20% até 2020.....”

Para reforçar a imagem positiva deste combustível, são descritas algumas vantagens ambientais do biodiesel em comparação aos derivados de petróleo, como o fato de ser uma fonte de energia renovável, ser biodegradável e contribuir também com a diminuição de emissão de gases de efeito estufa, e por isso, contribuindo com o controle do aquecimento global. Vários adjetivos também estão sendo frequentemente associados a esse biocombustível, como diesel ecológico, combustível ecologicamente correto, energia verde ou ouro verde. Porém é preciso cautela com esse tipo de associação, pois a idéia de que esse combustível não agride o meio ambiente pode não ser tão verdadeira quando se espera.

Com o aumento da utilização do biodiesel, crescem as chances deste combustível atingir o meio ambiente e promover impactos. No ambiente aquático, o biodiesel pode alcançar os lençóis freáticos ou os corpos de água superficiais, como rios e lagos, pelo

vazamento durante o seu armazenamento ou transporte por caminhões-tanque, levando a contaminação do ambiente e dos organismos aquáticos. Como exemplo desta situação, pode-se citar o acidente ocorrido no município de Palmas (TO), como descreve a reportagem a seguir, extraída da Revista BiodieselBR de janeiro de 2012 :

Quinta, 19 janeiro 2012 .

Caminhão com biodiesel tomba e contamina lago em Palmas (TO)

“Um caminhão carregado com 44 mil litros tombou próximo à Praia da Graciosa no município de Palmas (TO). Segundo informações do fiscal do Naturatins, Jesley Caetano, a situação já está sob controle apesar de cerca de 10 mil litros já terem contaminado o lago..... De acordo com informações do técnico do Naturatins, Pedro Rodrigues, o óleo derramado é de natureza vegetal, óleo de soja, o que é menos preocupante apesar de causar danos ao meio ambiente. "Se fosse óleo diesel ou gasolina o impacto seria muito maior", afirmou.....”.

Revista BiodieselBR, 2012

O biodiesel tem constituição diversificada, dependendo da matéria prima utilizada na sua produção, do processo de fabricação e da própria composição do biodiesel. Uma vez que o biodiesel pode conter contaminantes diferentes em sua composição, é necessário políticas bem estabelecidas para se controlar a qualidade do biodiesel que está sendo produzido, para se prevenir seus possíveis impactos ambientais. Deste modo, são necessários estudos experimentais sobre os possíveis efeitos dos diferentes tipos de biodieseis, para se definir limites máximos de concentração de contaminantes no biodiesel, assim como qual o tipo de biodiesel menos impactante para o meio ambiente.

Entre os organismos aquáticos, os peixes têm sido empregados como organismos - sentinelas em programas de biomonitoramento, devido à posição chave que ocupam na cadeia trófica e também por se mostrarem sensíveis a presença de contaminação ambiental. Porém, é preciso enfatizar que a maioria dos estudos que investigam o impacto de poluentes é realizadas com espécies da região temperada, tornando-se assim, de grande importância, os estudos com espécies presentes em ecossistemas tropicais. Para identificar sinais iniciais de danos aos peixes, os biomarcadores estão sendo utilizados como excelentes ferramentas, fornecendo informações sobre os efeitos biológicos dos poluentes, bem como pistas sobre os mecanismos de ação dos contaminantes. Entre os biomarcadores, os biomarcadores bioquímicos estão sendo bastante usados para a avaliação do impacto ambiental por

poluentes, pois são indicadores rápidos, permitindo a intervenção antes que efeitos irreversíveis se tornem inevitáveis (VAN DER OOST, 2003).

Nesta intenção, estudos utilizando biomarcadores bioquímicos para avaliar os efeitos do biodiesel em organismos aquáticos, em especial peixes, estão se iniciando (NOGUEIRA et al, 2011). Desse modo, investimentos em pesquisas experimentais sobre os possíveis efeitos do biodiesel ou de seus subprodutos, nos organismos aquáticos são importantes para dar subsídios a ações que garantam que o biodiesel não cause impactos negativos ao meio ambiente, em especial ao ecossistema aquático. Por fim, o Brasil está se tornando uma potência em termos de biocombustíveis. É preciso reavaliar alguns conceitos, como o de que o biodiesel é ecologicamente correto, para que se possa criar políticas ambientais que garantam uma segurança ambiental, em relação ao uso do biodiesel e, assim, este produto possa ser usado para fortalecer a economia nacional e também como uma opção para um desenvolvimento sustentável.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi identificar os possíveis efeitos biológicos de um biodiesel produzido a partir de girassol, por duas diferentes rotas (etílica e metílica), utilizando como sistema teste o peixe neotropical *Prochilodus lineatus* e a linhagem celular derivada de hepatócitos de Zebrafish (ZFL).

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

➤ Para *Prochilodus lineatus*:

- Realizar testes de toxicidade aguda (6, 24 e 48h) com juvenis de *P. lineatus* expostos à fração solúvel do biodiesel, produzido por rota etílica e metílica;
- Avaliar as enzimas de biotransformação (CYP1A e GST), a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GSH) em brânquias e fígado dos peixes expostos ao biodiesel;
- Avaliar a ocorrência de danos no DNA de brânquias e eritrócitos dos peixes expostos ao biodiesel, empregando-se o ensaio do cometa e a análise de alterações eritrocíticas nucleares;

➤ Para o sistema – teste ZFL:

- Realizar testes *in vitro* com células da linhagem ZFL;
- Avaliar a citotoxicidade de diferentes diluições da fração solúvel do biodiesel para as ZFL empregando - se o método de redução do MTT;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), a atividade de enzimas de biotransformação (GST) e das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) das ZFLs expostas ao biodiesel;
- Avaliar os danos no DNA das células ZFL expostas ao biodiesel empregando-se o ensaio do Cometa com adição de endonucleases específicas;

➤ Verificar se a rota de produção do biodiesel (etílica ou metílica) interfere nos efeitos biológicos causados pelo biodiesel.

- Comparar os dois modelos experimentais para verificar se um sistema teste é mais eficiente que o outro para a identificação de efeitos biológicos do biodiesel.

- Identificar biomarcadores para o biomonitoramento dos recursos hídricos associados a possíveis impactos ambientais causados pelo biodiesel.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biodiesel

O combustível biodiesel é uma fonte de energia alternativa aos combustíveis derivado do petróleo, e tem nos últimos anos, recebido grande atenção mundial. No Brasil, em outubro de 2005, o Ministério da Ciência e Tecnologia lançou o Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel – PROBIODIESEL. Esse programa tem por objetivos desenvolver as tecnologias de produção e aumentar o mercado de consumo de biocombustíveis (LIMA, 2004) (Figura 1).

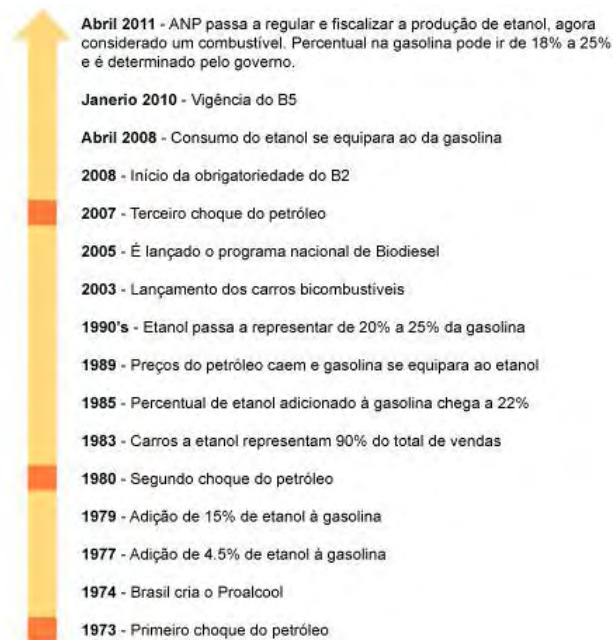


Figura 1 - Histórico mostrando a evolução cronológica dos bicombustíveis no Brasil (Fonte: ANP, 2011)

Biodiesel é definido como um monoalquil éster de ácidos graxos de cadeia longa derivado de fontes renováveis, tais como óleos vegetais ou gorduras animais, para uso em motores de ignição por compressão (MEHER et al., 2006). O biodiesel não contém compostos aromáticos como o diesel, mas contém ésteres com diferentes graus de saturação. O componente básico para a produção do biodiesel são os óleos, que podem ser de origem vegetal ou animal. Quimicamente esses óleos, independente de sua origem, são compostos de triacilgliceróis (KNOTHE et al., 2006). No Brasil, a produção de óleo a partir da soja é a mais utilizada para a produção de biodiesel. Algumas outras fontes para extração de óleo vegetal, com potencial para serem utilizadas na produção de biodiesel, são: baga de mamona, polpa do

dendê, amêndoa do coco de dendê, amêndoa do coco de babaçu, semente de girassol, amêndoa do coco da praia, caroço de algodão, grão de amendoim, semente de canola, semente de maracujá, polpa de abacate, caroço de oiticica, semente de linhaça, semente de tomate e de nabo forrageiro (Figura 2). Entre as gorduras animais com potencial para produção de biodiesel, destacam-se o sebo bovino, os óleos de peixes, o óleo de mocotó e a banha de porco, entre outros. Os óleos e gorduras residuais, resultantes de processamento doméstico, comercial e industrial, também podem ser utilizados como matéria prima. Os óleos de frituras também representam um grande potencial de oferta (LIMA, 2004).



Figura 2 – Fontes óleo vegetal para produção de biodiesel em todo território brasileiro (Fonte: Atlas do Biodiesel)

Entretanto, foi constatada que a aplicação direta dos óleos vegetais nos motores é limitada, por estes conterem algumas propriedades físicas inadequadas, tais como alta viscosidade, baixa volatilidade e caráter poliinsaturado, que implicam em alguns problemas nos motores, bem como em uma combustão incompleta. Assim, visando reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, diferentes alternativas têm sido consideradas, tais como diluição, microemulsão com metanol ou etanol, craqueamento catalítico e reação de transesterificação com etanol ou metanol. Entre essas alternativas, a transesterificação tem se apresentado como a melhor opção, visto que o processo é relativamente simples promovendo a obtenção de um combustível, denominado biodiesel, cujas propriedades são similares às do óleo diesel (FERRARI et al., 2005).

A transesterificação é a reação entre um óleo ou gordura com um álcool para formar ésteres e glicerol (Figura 3). Um catalisador é usualmente utilizado para melhorar a taxa da reação e seu rendimento. O hidróxido de sódio é o catalisador mais usado, tanto por razões econômicas como pela sua disponibilidade no mercado. Devido à reação ser reversível, excesso de álcool é usado para deslocar o equilíbrio para os produtos secundários (MA, HANNA; 1999). Somente álcoois simples, tais como metanol, etanol, propanol e o butanol, podem ser usados na transesterificação. O metanol é mais freqüentemente utilizado por razões de natureza física e química (cadeia curta e polaridade). Contudo, o etanol está se tornando mais popular, pois ele é renovável e muito menos tóxico que o metanol (LIMA, 2004). Dependendo do tipo de álcool empregado na reação, o biodiesel pode ser do tipo metil-éster (oriundo da utilização do metanol) ou etil-éster (etanol). A experiência internacional indica uma tendência à adoção da transesterificação com a utilização do metanol (rota metílica). Uma rota alternativa aventada no Brasil utiliza o etanol (rota etílica) na mistura, mas essa tecnologia ainda necessita de aperfeiçoamentos no processo produtivo em escala comercial (PRATES et al., 2007).

Detalhando a reação de transesterificação para a produção de biodiesel, o álcool, o catalisador e o óleo são combinados em um reator e agitados por aproximadamente 1 hora a 60°C. Depois, o produto derivado deste reator passa por um processo de remoção da glicerina formada na reação. Após a remoção, o produto resultante entra em um segundo reator onde é adicionado mais álcool e catalisador. Os ésteres resultantes passam por uma etapa de neutralização, onde um ácido é adicionado para neutralizar qualquer catalisador residual e quebrar qualquer quantidade de sabão que tenha se formado durante a reação. Uma última etapa realizada, que é chamada de lavagem aquosa, tem o objetivo de remover qualquer quantidade residual de catalisador, sabões, metanol e glicerina livre (KNOTHE et al., 2006).

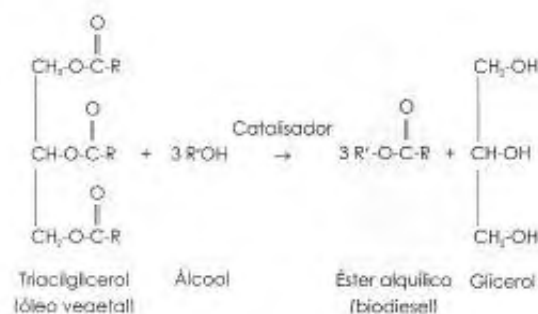


Figura 3 – Esquema mostrando a reação de transesterificação para a produção de biodiesel (Fonte: Knothe et al, 2006).

Porém é preciso ressaltar que resíduos podem ser encontrados no produto final. Algumas glicerinas livres podem permanecer dispersas como gotículas suspensas ou como uma pequena fração que pode ser capaz de se dissolver no biodiesel. O biodiesel ainda pode apresentar de 2 a 4 % de álcool residual (KNOTHE et al., 2006).

A qualidade do biodiesel pode sofrer variações conforme as estruturas moleculares dos seus ésteres constituintes ou devido à presença de contaminantes oriundos da matéria prima, do processo de produção ou formados durante a estocagem do biodiesel (DE QUADROS et al., 2011) (Tabela 1). Então, para padronizar o biodiesel que está sendo comercializado, é preciso que ele atenda a especificações. Essas especificações de padrão de qualidade do biodiesel variam de acordo com o país e região em questão. No Brasil a Portaria nº 255 da Agência Nacional do Petróleo (ANP 255, 2003) estabelece as especificação do biodiesel puro a ser adicionado ao óleo diesel automotivo para testes em frotas cativas ou para uso em processo industriais (Tabela 2).

Tabela 1 – Elementos que podem ser encontrados no biodiesel pronto para uso

Contaminantes	Elemento	Fonte de origem
Inorgânicos	Fósforo	podem estar presentes porque são extraídos, juntamente com os óleos vegetais, na forma de fosfolípidios e glucosinatos.
	Enxofre	
	Cálcio	são oriundos da matéria-prima ou da água empregada na lavagem do biodiesel na etapa de purificação.
	Magnésio	
	Sódio Potássio	
	Cu, Fe, Al, Mn, Ni, Cd	presença desses metais na matéria-prima ou introduzidos durante o processo de extração ou estocagem do óleo
Orgânicos	Glicerol livre	co-produto da transesterificação de óleos e gorduras com álcool
	mono, di e triacilgliceróis	a presença está relacionada com a transesterificação incompleta do óleo ou gordura com o álcool.
	etanol ou metanol	introdução proposital para que ocorra a reação de transesterificação

Fonte: (de Quadros et al, 2011)

Tabela 2 – Especificações da ANP 255 de padrão de qualidade do biodiesel para a comercialização de biocombustível no país. (Fonte: Knothe et al, 2006).

Propriedade	Limite
Ponto de fulgor ($^{\circ}\text{C}$)	100 (mín)
Água e sedimentos	0,02 (máx)
Cinzas sulfatadas (% m/m)	0,02 (máx)
Enxofre (% m/m)	0,001 (máx)
Resíduo de carbono	0,05 (máx)
Glicerina Livre (% m/m)	0,02 (máx)
Glicerina total (% m/m)	0,38 (máx)
Fósforo (mg/Kg)	10 (máx)
Alcool (% m/m)	0,50 (máx)
Monoglicerídeos	1,00 (máx)
Diglicerídeos	0,25 (máx)
Triglicerídeos	0,25 (máx)

Além dos elementos apresentados na Tabela 1, ainda podem ser aplicados ao biodiesel aditivos antioxidantes para aumentar a estabilidade oxidativa do biocombustível. Os principais antioxidantes utilizados são os compostos fenólicos sintéticos, tais como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), e naturais, como os tocoferóis (BORSATO et al, 2010). Além desses aditivos antioxidantes também podem ser adicionados ao biodiesel os biocidas, que possuem a função de inibir o crescimento microbiano no biocombustível.

3.2 Impacto Ambiental do biodiesel

Com o aumento da utilização do biodiesel, cresce a preocupação de seus efeitos potenciais sobre a saúde de seres humanos e outros organismos, porém poucos são os estudos que tentam elucidar os possíveis efeitos biológicos em seres vivos gerados pela contaminação de biodiesel. A maioria dos trabalhos sobre o assunto é feito com roedores, principalmente ratos. Entre as várias vias de exposição que um organismo pode entrar em contato com esse biocombustível, a via que trata da inalação de poluentes derivados da queima de biodiesel parece ser a mais estudada atualmente (BUNGER et al., 2000 ab, 2007; FINCH et al., 2002;

MCCORMICK et al., 2007; KRAHL et al., 2009; CHEUNG et al., 2010; HEMMINGSEN et al., 2011). Trabalhos avaliando a toxicidade oral do biodiesel também podem ser encontrados (POON et al., 2007)

Trabalhos que investiguem a toxicidade do biodiesel para organismos marinhos e dulcícolas ainda são escassos. É importante ressaltar que eventuais vazamentos de biodiesel, a partir de seu armazenamento ou durante o seu transporte por caminhões-tanque, podem alcançar os lençóis freáticos ou os corpos de água, como rios e lagos, levando a contaminação do ambiente e dos organismos aquáticos. Dada a carência de informações sobre os efeitos do biodiesel para peixes dulcícolas neotropicais, estudos experimentais sobre o impacto de concentrações ambientalmente realistas desse biocombustível nos ecossistemas aquáticos e em peixes dulcícolas se tornam extremamente necessários e urgentes.

A grande maioria dos estudos encontrados na literatura associando espécies aquáticas e contaminação por biodiesel teve como objetivo determinar a toxicidade aguda do biodiesel através do cálculo da concentração letal média (CL50). Em um estudo conduzido por Khan et al (2007), a CL50 (24 h) de biodiesel para *Daphnia magna* foi determinada como 4,65 ppm, para truta arco-íris a CL50 calculada para os tempos de 24, 48, 72 e 96 h foi de 1073,54, 756,68, 555,19 e 455,28 ppm de biodiesel puro respectivamente. Em outro estudo, realizado por Hollebhone e colaboradores (2007), foi determinada para truta arco-íris a CL50 (96 h) de biodiesel derivado de soja, canola ou de origem animal, e os resultados obtidos foram 390, 707 e de 660 ppm respectivamente. Leite et al (2011) determinaram a toxicidade de frações solúveis em água de três diferentes tipos de biodiesel (de óleo de mamona, óleo de palma e óleo de cozinha usado) obtidos por transesterificação, com metanol, para dois organismos marinhos. Neste trabalho, ouriços-do-mar e microalgas foram utilizados como organismos-teste e os resultados mostraram maior toxicidade do biodiesel produzido a partir do óleo de mamona, seguido pelo óleo de cozinha usado e por último o óleo de palma. O metanol foi o contaminante mais proeminentes encontrado nas frações solúveis testadas (LEITE et al, 2011).

Recentemente, foi publicado o primeiro estudo reportando os efeitos do biodiesel utilizando biomarcadores bioquímicos com organismos aquáticos (NOGUEIRA et al., 2011). Os pesquisadores expuseram peixes da espécie *Oreochromis niloticus* à duas concentrações de biodiesel (0,01 mL ou 0,1 mL de biodiesel puro por litro de água), durante 2 ou 7 dias. Nas análises bioquímicas com o fígado e com as brânquias, foram encontrados aumento em enzimas de biotransformação e em enzimas antioxidantes, inferindo que o biodiesel pode

causar alterações biológicas nos organismos expostos a ele e ser perigoso para a biota aquática.

Estudos utilizando biomarcadores bioquímicos para avaliar os efeitos do biodiesel em organismos aquáticos, em especial peixes, estão se iniciando. Desse modo, é de suma importância, estudos experimentais que avaliem os possíveis efeitos do biodiesel ou de seus subprodutos, como os efluentes aquosos gerados durante o processo de produção, nos ecossistemas aquáticos e em peixes dulcícolas.

3.3 - Modelos biológicos para o monitoramento ambiental

Na ecotoxicologia, define-se modelo biológico como o material biológico que pode ser utilizado para reproduzir o todo ou uma parte de um acontecimento biológico, fornecendo informações sobre as condições do ambiente em que está exposto. Podem ser utilizados como modelos biológicos tanto organismos inteiros, como os animais, ou partes desses organismos como as células. Os modelos biológicos estão sendo utilizados como ferramentas importantes para ajudar no monitoramento de ambientes, que estão sofrendo impactos de contaminação por poluentes.

Vários grupos de animais têm sido empregados em testes de toxicidade, gerando subsídios importantes para a melhor avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos de diversos agentes tóxicos. Dentre os principais grupos de organismos utilizados em ensaios laboratoriais, destacam-se microalgas, microcrustáceos, poliquetas, peixes, entre outros. A sensibilidade de um organismo frente à qualidade do ambiente usada no biomonitoramento, pode ser a nível bioquímico, fisiológico, morfológico, comportamental etc. (MAGALHÃES E FILHO, 2008). Em destaque, os peixes estão sendo escolhidos como modelos biológicos bioindicadores, devido à posição chave que esses organismos ocupam na cadeia trófica e também devido ao seu elevado valor comercial (VIARENGO et al., 2007). Entretanto, poucas espécies nativas têm sido utilizadas em testes de toxicidade no Brasil e assim, pouco se sabe sobre a sensibilidade das espécies de peixes neotropicais a diversas classes de poluentes em ecossistemas tropicais de água doce (MARTINEZ et al., 2004).

As linhagens celulares também podem ser usadas em testes para avaliação da qualidade ambiental. Os ensaios *in vitro* têm sido muito usados em estudos ecotoxicológicos, pois as culturas celulares oferecem algumas vantagens como ferramenta experimental, pela facilidade e boa reprodutibilidade na obtenção dos resultados. Além disso, produz menos resíduos tóxicos e reduz a utilização de animais em testes toxicológicos. As linhagens

celulares de peixes têm tido um importante papel em pesquisas toxicológicas, servindo como modelo para estudos moleculares de mecanismos de toxicidade e também como sistema-teste para se estudar efeitos tóxicos e monitoramento de contaminantes ambientais (Figura 5). Há várias linhagens celulares derivadas de diferentes espécies de peixes (Tabela 3) e normalmente os parâmetros: citotoxicidade, genotoxicidade, crescimento celular e metabolismo de xenobióticos, são os mais utilizados nestas linhagens, para avaliar a ação de um determinado poluente (BOLS et al., 2005).

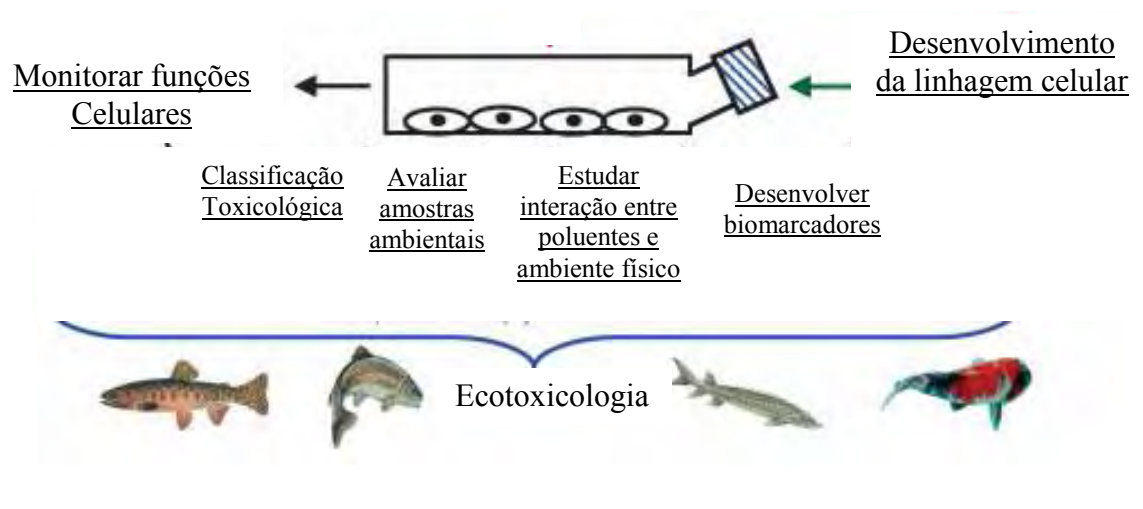


Figura 5 – Esquema mostrando a utilização da linhagem celular de peixes na ecotoxicologia (Modificado de Bols et al, 2005).

Tabela 3 – Coleção de linhagens celulares de peixes depositados no banco de células ATCC (American Type Culture Collection) até setembro de 2008.

Espécie	Sigla	Morfologia	Órgão – Fonte
<i>Carassius auratus</i>	CAR	Fibroblasto	Cauda
<i>Clarias batrachus</i>	G1B	Pleomórfica	Brânquias
<i>Clupea pallasii</i>	PHL	Epitelial	Larva
<i>Cyprinus carpio</i>	EPC	Epitelial	Epitelioma
<i>Danio rerio</i>	ZF4	Fibroblasto	Embrião
<i>Danio rerio</i>	ZEM2S	Fibroblasto	Embrião
<i>Danio rerio</i>	SJD.1	Fibroblasto	Cauda
<i>Danio rerio</i>	AB.9	Fibroblasto	Cauda
<i>Danio rerio</i>	ZFL	Epitelial	Fígado
<i>Fugu rubripes</i>	Fugu eye	Epitelial	Olho
<i>Fugu niphobles</i>	Fugu fry	Fibroblasto	Corpo todo
<i>Haemulon sciurus</i>	GF	Fibroblasto	Cauda
<i>Ictalurus nebulosus</i>	BB	Fibroblasto	Músculo
<i>Ictalurus punctatus</i>	1G8	Limfoblasto	Sangue Periférico
<i>Ictalurus punctatus</i>	3B11	Limfoblasto	Sangue Periférico
<i>Ictalurus punctatus</i>	28S.3	Limfoblasto	Sangue Periférico
<i>Ictalurus punctatus</i>	42TA	Macrófagos	Sangue Periférico
<i>Ictalurus punctatus</i>	G14D	Linfócitos	Sangue Periférico
<i>Ictalurus punctatus</i>	CCO	Fibroblasto	Ovário
<i>Lepomis macrochirus</i>	BF-2	Fibroblasto	Tronco caudal
<i>Morone chrysops</i>	WBE	Epitelial	Embrião
<i>Oncorhynchus keta</i>	CHH-1	Fibroblasto	Coração
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	RTH-149	Epitelial	Hepatoma
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	RTG-2	Fibroblasto	Ovários e Testículos
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	RTG-P1	Fibroblasto	Gônadas
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	SOB-15	Epitelial	Fígado
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	RTgill-W1	Epitelial	Brânquias
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	CHSE-214	Mix	Embrião
<i>Pimephales promelas</i>	FHM	Epitelial	Músculo
<i>Poeciliopsis lucida</i>	PLHC-1	Hepatócito	Carcinoma Hepatocelular
<i>Salmo salar</i>	ASK	Epitelial	Rim

(Fonte: Lee et al, 2009).

Como exemplo de modelo biológico para testes *in vivo* é possível citar o peixe *Prochilodus lineatus* e para testes *in vitro*, a linhagem celular de hepatócitos do peixe de *Danio rerio* conhecida como ZFL.

A) *Prochilodus lineatus* (Figura 6)

Na região Neotropical, a espécie de peixe *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847), conhecida popularmente como curimba, constitui uma espécie bioindicadora em potencial, pois sua distribuição está restrita a locais pouco impactados. Em um levantamento ictiofaunístico realizado na bacia do rio Tibagi (Estado do Paraná), Bennemann *et al.* (1995) mostraram que *P. lineatus* ocorria com maior frequência em Sapopema e Ipiranga, que correspondem às regiões menos impactadas ao longo do rio Tibagi. Esses autores não registraram a presença de *P. lineatus* em Telêmaco Borba, região onde se encontra a indústria de papel e celulose Klabin S.A



Figura 6 – Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus*.

De acordo com a classificação taxonômica atual, a espécie *Prochilodus lineatus* pertence à família Prochilodontidae, ordem Characiformes e superordem Ostariophysi. Quanto à biologia, esta espécie tem seu desenvolvimento inicial em lagoas marginais na planície de inundação, onde os ovos permanecem por cerca de 24 horas, dando origem a diminutas larvas que medem cerca de 3 mm de comprimento. Essas larvas se alimentam de zooplâncton, que se formam nas lagoas marginais. Após 25 dias de vida, a larva perde a primeira dentição e a boca se torna protáctil. Seu hábito alimentar muda, passando a ser detritívoro (PAIVA *et al.*, 2002) e o animal passa a consumir quase que exclusivamente finas partículas do lodo, onde estão contidos sedimentos inorgânicos, além de detritos orgânicos e diatomáceas (DOMINGUES; HAYASHI, 1998). Por se alimentar de detritos estes peixes

ficam mais expostos a substâncias químicas que, eventualmente, tenham ficado retidas no sedimento (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

Segundo Paiva et al. (2002), *P. lineatus* é uma espécie que precisa migrar contra a correnteza dos rios como estímulo para o desenvolvimento sexual, maturação das gônadas e para o próprio ato reprodutivo (desova). Como espécie migradora, este peixe está sujeito aos ambientes impactados por insumos agrícolas, durante seu deslocamento na piracema. Quanto à sua distribuição, *P. lineatus* é encontrado principalmente nos rios das regiões Sul e Sudeste do Brasil e em países limítrofes como Paraguai, Argentina e Uruguai.

B) Linhagem celular de hepatócitos do peixe *Danio rerio* (ZFL)

A linhagem celular ZFL é derivada de um grupo de cerca de 10 fígados de peixes adultos da espécie *Danio rerio*, vulgarmente conhecida como “zebrafish” ou paulistinha. Essa linhagem apresenta morfologia típica de células epiteliais. São células aderentes que podem ser mantidas a 28° C com CO₂ atmosférico. Em geral, o tempo de duplicação dessa linhagem de células é de aproximadamente 72 horas e o crescimento da linha celular ZFL é altamente dependente da densidade celular (HE, 2010). Sobre o número de cromossomos, essas células exibem um cariótipo hipodiplóide com número modal de cromossomos de 47 (2n = 50). Quanto às características bioquímicas, já foi descrito que as ZFL apresentam enzimas de tecido hepático, como o aspartato transaminase e a fosfatase alcalina, além de síntese de albumina sérica. A presença de proteínas relacionadas ao citocromo P4501A1 também já foi relatada. A expressão de níveis enzimáticos de EROD e da dimetilbenzantraceno hidroxilase (DMBA-OH), que são enzimas relacionadas com o citocromo P450, também já foi descrita para essas células. É importante ressaltar que as ZFL continuam a exibir propriedades características de células do parênquima hepático após 100 gerações em cultura e que assim podem fornecer um sistema *in vitro* para estudos de metabolismo e formação de metabólitos em células de fígado (GHOSH et al, 1994; MIRANDA et al, 1993).

Estudos toxicológicos envolvendo células ZFL estão sendo feitos e o uso dessas células nas pesquisas está atualmente em constante crescimento (CHAN et al., 2006; SEOK et al., 2007; CHEUK et al., 2008; SANDRINI et al., 2009; WAN et al., 2009; CHEN et al., 2011; COSTA et al., 2011)

3.4 Biomarcadores

Antes de atingir níveis superiores de organização biológica, como comunidades e ecossistemas, os efeitos dos contaminantes podem ser verificados em níveis inferiores de organização biológica, que ocorrem mais rapidamente (Figura 7), possibilitando a identificação de problemas antes que o ambiente como um todo seja afetado (JONSSON; CASTRO, 2005). Além disso, a especificidade das alterações biológicas e a compreensão sobre os efeitos dos contaminantes são, geralmente, maiores nos níveis mais baixos de organização (ARIAS et al., 2007).

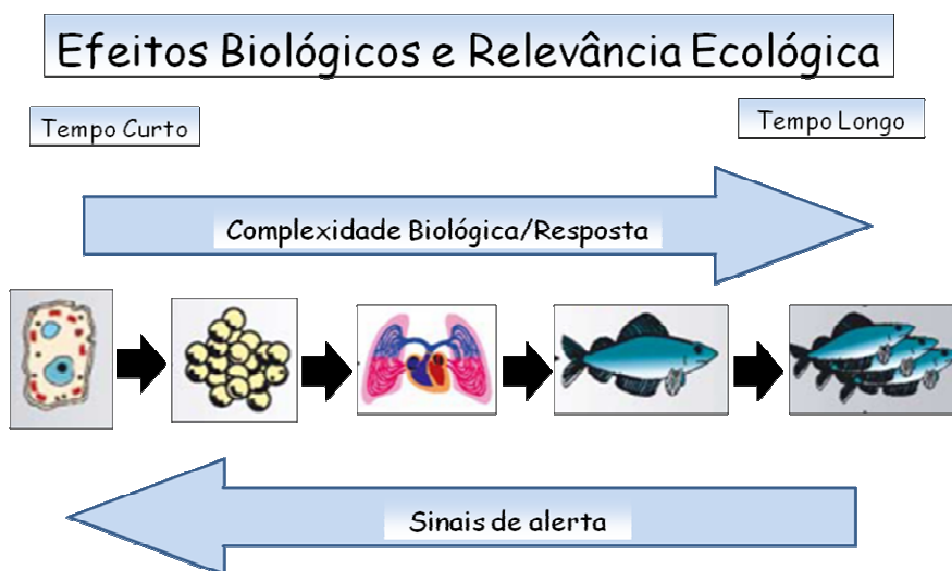


Figura 7 – Níveis de organização biológica que podem ser usados como sinal de alerta para o monitoramento ambiental (Adaptado de Moore et al., 2004)

Qualquer alteração biológica relacionada à presença de um composto químico no ambiente no nível sub-individual, medida dentro do organismo ou em seus produtos (urina, fezes, pêlos ou penas), que indica um desvio do estado normal e que não pode ser detectada no organismo intacto é definida como biomarcador (VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996). Desta forma, o biomarcador é utilizado como um sinal prévio refletindo a alteração biológica causada por uma substância (VAN DER OOST et al., 2003). Os biomarcadores podem ser verificados tanto em células isoladas mantidas em cultura como nos tecidos e órgãos de organismos expostos no ambiente ou em laboratório. Em ecotoxicologia, os biomarcadores são normalmente medidos em organismos inteiros, geralmente para avaliar a exposição. Para os peixes, a atividade da etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) e o conteúdo de

proteínas de estresse e de metalotioneínas são alguns dos biomarcadores que estão sendo mais usados. Porém, as linhagens celulares de peixes também podem ser utilizadas em conjunto para auxiliar na compreensão dos mecanismos de ação de um poluente. As linhagens celulares são importantes ferramentas de análise, porque as condições de exposição podem ser controladas e variadas com mais facilidade do que experimentos *in vivo* (BOLS et al, 2005).

Diferentes parâmetros biológicos são utilizados como indicadores para sinalizar as mudanças associadas à presença de contaminantes. Medidas bioquímicas, como a determinação de estresse oxidativo (danos no DNA e peroxidação lipídica) e respostas antioxidantes em espécies aquáticas estão sendo usadas como biomarcadores para identificar, mais rapidamente, mudanças antes que efeitos deletérios ocorram em níveis mais elevados de organização (MONSERRAT et al., 2003; 2007). Assim, o uso de biomarcadores associados a parâmetros genotóxicos, de biotransformação e estresse oxidativo fornecem informações importantes a respeito do efeito metabólico causado pelo poluente (VAN DER OOST et al., 2003).

Para se usar um parâmetro biológico como biomarcador é preciso conhecer sua função e seus níveis normais para que se possa comparar e detectar se ocorreu alguma alteração biológica. A seguir está apresentada uma breve explicação do funcionamento normal de alguns parâmetros biológicos que são usados como biomarcadores de contaminação ambiental.

a) Enzimas de biotransformação

A biotransformação de xenobióticos é um processo que envolve sistemas enzimáticos que possuem o papel principal de converter estruturas lipofílicas em estruturas hidrofílicas, deixando o composto numa forma menos tóxica e mais fácil para ser excretada. Porém, é preciso realçar que em alguns casos, os produtos metabólicos gerados podem ser até mais reativos que o próprio composto não metabolizado (VAN DER OOST et al., 2003).

Sem a biotransformação xenobióticos lipofílicos seriam excretados do corpo tão lentamente que acabariam por matar o organismo. Os xenobióticos exercem uma variedade de efeitos sobre sistemas biológicos e estes efeitos são dependentes de suas propriedades físicas e químicas. Em muitos casos, modificações químicas de um xenobiótico pelo processo de biotransformação alteram seus efeitos biológicos. Alguns produtos químicos estimulam a síntese de enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos e este processo, conhecido como indução enzimática, é uma resposta adaptativa e reversível com a exposição

de xenobióticos. Nos vertebrados, o fígado é o órgão mais rico de enzimas que catalisam reações de biotransformação. Dentro dos hepatócitos, essas enzimas estão localizadas principalmente no retículo endoplasmático, na fração solúvel do citoplasma (citosol) e em quantidades menores nas mitocôndrias, núcleos e lisossomos (PARKINSON E OGILVIE, 2008).

Didaticamente o processo de biotransformação é dividido em 2 fases. Na fase I, ocorrem reações de oxidação e redução de xenobióticos, que alteram e introduzem grupos funcionais, ou reações de hidrólise, que clivam aminas e ésteres para liberar grupos funcionais. Essas mudanças aumentam a polaridade dos xenobióticos e fornecem os sítios que permitem a ação das enzimas de fase II. O mais importante sistema enzimático envolvido no metabolismo de fase I é o sistema de monooxigenases do citocromo P450 (ZELDIN e SEUBERT, 2008). A reação básica catalisada pelo citocromo P450 é a monooxigenação, na qual um átomo de oxigênio molecular é incorporado ao substrato lipofílico RH, que corresponde ao xenobiótico, e o outro é reduzido à água, sendo os elétrons necessários para a redução fornecidos pelo NADPH. Nessa reação, o xenobiótico (RH) é convertido para um produto mais solúvel em água (ROH) após a incorporação de um átomo de oxigênio proveniente do oxigênio molecular (MARTINEZ, 2006).

O sistema do citocromo P450 abrange uma superfamília de enzimas que compreende muitas isoformas, que expressam várias subfamílias de genes. Para os peixes, a classe de isoenzimas da família do citocromo P450 responsável pela biotransformação de uma ampla variedade de xenobióticos (PAHs, PCBs, dioxinas, etc) é a subfamília CYP1A, que é induzida por xenobióticos. A resposta indutiva envolve um fator de transcrição citosólico conhecida como receptor aril-hidrocarboneto. Essa inducibilidade da CYP1A na presença de poluentes a torna um biomarcador de poluição ambiental. Todas as etapas da cascata de indução da CYP1A, como o mRNA, a proteína e sua atividade catalítica podem ser medidas (SARASQUETE e SEGNER, 2000). A atividade catalítica da CYP1A normalmente é detectada através da atividade da enzima etoxiresorufina-O-desetilase (EROD), que catalisa uma reação de O-desalquilação, no substrato 7-etoxiresorufina que é convertido em resorufina (ABRAHAMSON et al., 2007).

As reações de biotransformação de fase II incluem sulfonação, glucuronidação, acetilação, metilação, conjugação com a glutatona e conjugação com aminoácidos (glicina, taurina e ácido glutâmico). Os co-fatores para essas reações reagem com grupos funcionais que estão presentes nos xenobióticos ou que são introduzidos durante a fase de biotransformação I. Com exceção da metilação e acetilação, as reações de biotransformação

de fase II resultam em grande aumento na hidrofiliidade dos xenobióticos (PARKINSON E OGILVIE, 2008). A conjugação dos grupos funcionais, que estão presentes nos xenobióticos ou que são introduzidos durante a fase I da biotransformação, com moléculas endógenas tornam os xenobióticos mais solúveis em água, facilitando assim a sua excreção (VAN DER OOST et al., 2003).

Entre várias moléculas endógenas, o tripeptídeo glutathiona, que é composto por glicina, cisteína e ácido glutâmico, é utilizado na conjugação com xenobióticos. Substratos para a conjugação com a glutathiona incluem uma variedade enorme de xenobióticos eletrofílicos, ou xenobióticos que podem ser biotransformados em eletrófilos (PARKINSON E OGILVIE, 2008). A glutathiona é amplamente distribuída em plantas, animais, fungos, e bactérias em concentrações intracelulares variando de 0,1 a 10 mM. Este tripeptídeo antioxidante está presente principalmente na sua forma reduzida (GSH), e a relação entre a concentração de glutathiona na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) varia de 5 a 150, de acordo com a espécie e o tecido. A glutathiona é classicamente considerada como um substrato para as reações catalisadas por GPx e GST. A GSH também tem ação como antioxidante não-enzimático e pode reagir com vários radicais contendo carbono, oxigênio singlete e espécies reativas de nitrogênio (HERMES – LIMA, 2004).

A conjugação de xenobióticos com a glutathiona é catalisada por uma família de glutathiona S-transferases. Substratos para a glutathiona S-transferase possuem três características em comum: são hidrofóbicos, contêm um átomo eletrofílico e reagem com a glutathiona (PARKINSON E OGILVIE, 2008). As GSTs são amplamente distribuídas em todas as formas de vida, incluindo bactérias, fungos, plantas, e animais. Todos os animais investigados parecem ter GST ativa no citosol ou núcleo. Estudos estruturais e funcionais das GSTs de vertebrados têm dividido as várias isoenzimas em quatro grandes classes: alfa (α), mu (μ), pi (π) e teta. Essas classes são baseadas em sequências de aminoácidos N-terminal, especificidade de substrato, sensibilidade a inibidores, ponto isoelétrico, e análises imunológicas. A medida da "atividade da GST total" é baseada na reação de GSH com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), formando a glutathiona S-(2,4-dinitrofenil), que é quantificada a 340 nm. Este ensaio, contudo, não mede a classe teta de GSTs, devido à sua falta de reatividade para o CDNB (HERMES – LIMA, 2004).

b) Espécies reativas de oxigênio (ERO), defesas antioxidantes e estresse oxidativo.

O oxigênio molecular é essencial para todos os organismos aeróbicos, pois participa da respiração mitocondrial para a produção de energia. A redução do oxigênio durante esse processo requer 4 elétrons, e a transferência desses elétrons se dá um a um, ou seja, acontecem reduções univalentes no oxigênio. A primeira redução do oxigênio gera como produto o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é reduzido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é reduzido a radical hidroxil ($\cdot OH$), que finalmente é reduzido para a formação de água. Porém quando todas essas reduções a partir do oxigênio não acontecem adequadamente, esses produtos intermediários, ou seja, o anion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, podem ficar livres no organismo. Esses produtos são altamente reativos e potencialmente deletérios para o sistema biológico. O ânion superóxido e o radical hidroxil são também conhecidos como radicais livres, já peróxido de hidrogênio não é radical livre, pois não possui elétron desemparelhado, condição obrigatória para ser classificado com radical livre. Porém, o peróxido de hidrogênio é um importante precursor de radical hidroxil quando reage como anion superóxido (DI GIULIO et al, 1995).

Existem vários mecanismos de geração de ERO em sistemas biológicos. Na maioria dos casos, eles são produzidos como produtos colaterais do metabolismo do oxigênio. Mais de 90% do oxigênio consumido por organismos é usado na cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias em eucariontes, relacionadas com a produção de energia. Menos de 10% do oxigênio consumido é reduzida dando origem a ERO. O transporte de elétrons da cadeia de retículo endoplasmático é a segunda mais importante fonte de ERO. O catabolismo de produtos endógenos e exógenos pelo citocromo P450 é responsável pela produção de ERO no retículo endoplasmático. As ERO também são produzidas no citosol e peroxissomos por oxidases diferentes e também no “burst oxidativo” em células imunológicas para atacar microorganismos invasores. Além da produção basal de ERO, que é produzida pelo organismo por diversas vias, substâncias exógenas (xenobióticos) podem agir sobre essas diversas vias de geração de ERO, levando ao aumento na produção de ERO dentro da célula. Os poluentes mais bem conhecidos que agem sobre essa produção são os metais, hidrocarbonetos aromáticos, pesticidas, bifenilas policloradas, dioxinas e muitos outros (LUSHCHAK, 2010). Mesmo em condições basais, a produção de espécies reativas de oxigênio precisa ser inativada, pois estas ERO possuem o potencial de causar danos em todos os tipos de moléculas biológicas, incluindo DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos. Quando há um desbalanço a favor dos prooxidantes e desfavorecimento dos antioxidantes ocorre o que

é chamamos de estresse oxidativo. Esse estresse oxidativo pode estar envolvido em processos como mutagênese, carcinogênese, danos à membranas, a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e fragmentação, bem como danos de carboidratos (SIES, 1997). Como defesas contra as ERO existem as defesas antioxidantes primárias, de natureza enzimática, que lidam diretamente com as espécies reativas de oxigênio, e são representadas pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase selênio-dependente (GPx). A Figura 8 mostra que o sistema enzimático antioxidante funciona de maneira conjunta para proteger a célula das ERO.

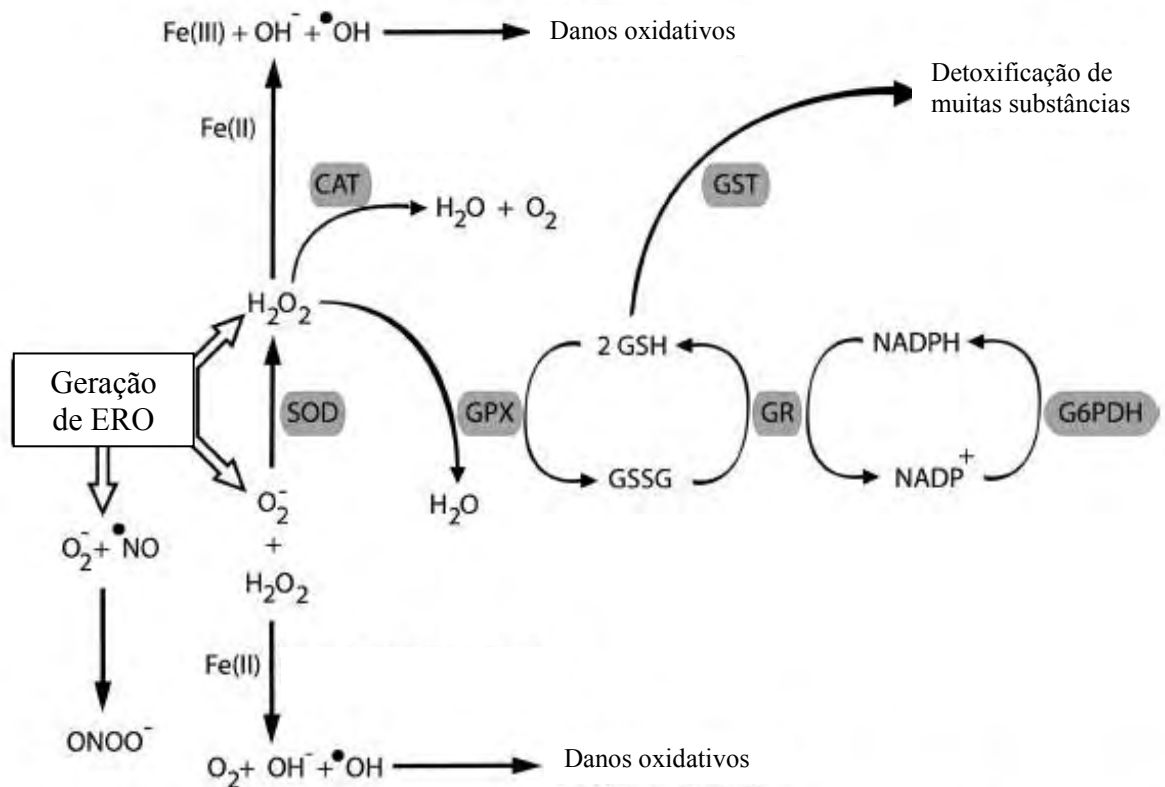


Figura 8 – Esquema mostrando o trabalho conjunto das defesas antioxidantes enzimáticas no combate às ERO (Retirado de HERMES- LIMA, 2004)

Observando a Figura 8 é possível notar que o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) é convertido, através da dismutação, em O_2 e H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD). Existem 4 diferentes tipos de enzimas SOD: duas formas de SOD cobre-zinco, uma SOD manganês e uma SOD ferro. Uma das SOD-cobre/zinco é encontrada no citoplasma, lisossomos, peroxissomos, núcleo e espaço intermembranoso das mitocôndrias de eucaritotes e no espaço periplasmático várias espécies de bactérias. O outro tipo de SOD-cobre/zinco é a SOD extracelular, que está vinculada à superfície das células, especialmente nos pulmões e vasos sanguíneos. A SOD/Manganês é amplamente distribuída nas mitocôndrias de bactérias,

leveduras, plantas e animais. A quarta forma da SOD é uma enzima contendo ferro (SOD/Fe), que foi detectada em bactérias e cloroplastos de plantas superiores. No entanto, a SOD/Ferro nunca foi observada no em animais (HERMES- LIMA, 2004)

O peróxido de hidrogênio formado pela dismutação do ânion superóxido precisa ser quebrado, por ser um composto tóxico para a célula. A enzima responsável pela decomposição deste é a catalase, que quebra o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Esta enzima está localizada principalmente nos peroxissomos e está presente na maioria dos organismos, incluindo vertebrados, invertebrados, plantas, fungos, e bactérias. Além da catalase, outra enzima responsável pelo controle na concentração de peróxido de hidrogênio é a glutathiona peroxidase (GPx). É sabido que concentrações intracelulares elevadas de H_2O_2 são controladas pela enzima catalase, enquanto pequenos aumentos de H_2O_2 parecem ser melhores controlados pela GPx dependente de selênio. A GPx, além de controlar o peróxido de hidrogênio, combate também hidroperóxidos orgânicos utilizando o tripeptídeo glutathiona em sua forma reduzida (GSH) como um co-substrato (HERMES- LIMA, 2004)

O metabolismo de ERO e as respostas oxidativas em animais aquáticos possuem todas as características encontradas em outros grupos de organismos, o que os torna um interessante grupo de estudo, pois além de muitas vezes serem modelos experimentais mais baratos, podem ajudar a esclarecer alguns princípios gerais do funcionamento dos sistemas de metabolismo de ERO. A quantificação de espécies reativas de oxigênio e de respostas antioxidantes em organismos aquáticos pode ser usada como biomarcador de poluição ambiental, avaliando os efeitos de águas naturais e poluídas, bem como de poluentes em potencial (LUSHCHAK, 2010).

c) Danos no DNA

O grau de integridade do DNA tem sido proposto como um indicador sensível de genotoxicidade e um biomarcador efetivo para monitoramento ambiental. Os danos no DNA dos organismos aquáticos que vivem em ambientes poluídos podem ser usados para avaliar a genotoxicidade de agentes tóxicos em organismos, como também para a avaliação de risco ecotoxicológico e ambiental (ZHU et al., 2005).

Qualquer composto que têm o potencial de causar danos no DNA dos organismos é chamado de genotóxico. Existem vários modos como a molécula de DNA pode ser lesada (Figura 9). Uma substância pode entrar na célula e agir diretamente na molécula de DNA, alterando a sua estrutura (Figura 9, seta 1). Este efeito pode ocorrer por rupturas na cadeia de

DNA, modificações nos nucleotídeos, aberrações cromossômicas e mutações de ponto (FRENZILLI et al., 2004). Esse mesmo composto pode passar pelo processo de biotransformação para se tornar um composto menos tóxico e mais facilmente excretado, porém, é sabido que produtos metabólicos gerados por esse processo podem ser até mais reativos que o próprio composto não metabolizado (VAN DER OOST et al., 2003). Quando se tornam mais reativos podem agir no DNA, lesionando sua estrutura (Figura 9, seta 2). É importante ressaltar que durante a biotransformação desses compostos ocorre freqüentemente a produção de substâncias reativas intermediárias, como as ERO, que são altamente tóxicas e podem ocasionar danos oxidativos ao DNA (Figura 9, seta 3). As ERO não são apenas produzidas durante o processo de biotransformação, elas são constantemente produzidas pelo metabolismo celular normal, representando os danos oxidativos basais encontrados em tecidos normais (Figura 9, seta 4). Das espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxil é o mais reativo com a molécula de DNA, reagindo com o DNA pela adição de ligações duplas nas bases nitrogenadas e pela remoção de um átomo de hidrogênio, tanto do grupo metil da base timina quanto de cada uma das ligações C-H da pentose desoxirribose (COOKE et al, 2003). Os organismos são dotados de um sistema de defesa antioxidante para proteger os tecidos contra lesões oxidativas, porém se a velocidade de produção de ERO exceder a capacidade dos mecanismos de defesa, pode ocorrer lesão nas células e no DNA (CADET et al, 2003).

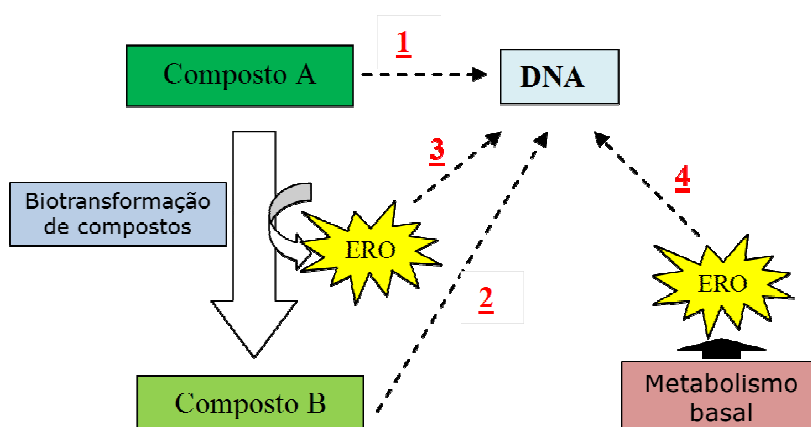


Figura 9 – Modos de lesão à molécula de DNA

Para avaliar o impacto de agentes potencialmente genotóxicos aos organismos uma variedade de metodologias pode ser usada, graças aos avanços na genética toxicológica (LYONS et al., 1997; BICKHAM et al., 2000; JHA, 2004). Nos últimos anos houve um aumento de interesse na metodologia do Ensaio do Cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*), pois este teste pode ser usado em vários estudos, tanto *in vivo* como *in*

vitro, para avaliar dano e reparo no DNA. Trata-se de um método rápido, no qual as lesões no DNA podem ser vistas na ausência da atividade mitótica. Essa técnica possui vantagens de utilização por necessitar de um pequeno número de células, ter boa reprodutividade e ser aplicável em qualquer organismo eucarioto (CASTRO, 2004). Na versão alcalina, pode-se visualizar além de quebras de fita dupla de DNA, também quebras de fita simples e sítios álcali-lábeis (TICE et al., 2000). O emprego de enzimas de restrição pode ser usado para aumentar a sensibilidade do teste, pois estas enzimas reconhecem bases específicas que foram oxidadas por ERO e criam quebras adicionais para auxiliar na detecção de danos oxidativos ao DNA. As endonucleases específicas, frequentemente usadas para avaliar danos oxidativos ao DNA induzidos por poluentes, são a DNA-formamidopirimidina glicosilase (FPG) e a endonuclease III (ENDOIII), que reconhecem respectivamente purinas e pirimidinas oxidadas.

Outra metodologia que tem sido amplamente empregada por um grande número de autores para avaliar alterações mutagênicas em diferentes organismos, incluindo peixes, é o Teste do Micronúcleo (MN) (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Os micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos compostos por material cromossômico presentes no citoplasma. Eles aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Esses micronúcleos podem ser resultantes de quebras cromossômicas ou de perdas de cromossomos inteiros, que podem não ser incorporados ao núcleo principal das células filhas após a mitose (RIBEIRO et al., 2003). Assim, os MN podem ser originados a partir de agentes clastogênicos, ou seja, compostos que induzem a perda de fragmentos cromossômicos, ou por agentes aneugênicos, que são aqueles que induzem a perda de cromossomos inteiros por segregação cromossômica anormal. Esta técnica permite detectar as propriedades genotóxicas de componentes presentes no ambiente aquático (UDROIU, 2006). De fato, o teste do micronúcleo em peixes tem mostrado ser útil em técnicas *in vivo*, para testar a mutagenicidade e também mostra potencial para monitoramento *in situ* da qualidade da água (AL-SABIT; METCALFE, 1995). Além da frequência de micronúcleos, a ocorrência de alterações nucleares nos eritrócitos também pode ser considerada como um indicador de danos genotóxicos. Estas alterações foram descritas, primeiramente, em eritrócitos de peixes por Carrasco et al. (1990) e foram classificadas em: 1) células binucleadas; 2) núcleo segmentado; 3) núcleo lobulado; 4) núcleo com constrição ou em “forma de rim” e 5) núcleos com vacúolos. Os mecanismos responsáveis pelas alterações eritrocíticas nucleares ainda não foram inteiramente explicados (ÇAVAS; KONEN, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Biodiesel estudado

Para a realização dos testes de toxicidade, as amostras de biodiesel foram cedidas pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Foram utilizados dois tipos de biodieseis diferentes, ambos extraídos do óleo vegetal de girassol, porém um foi feito através de transesterificação com a utilização do metanol (rota metílica) e o outro através de transesterificação utilizando etanol (rota etílica). Os biodieseis utilizados neste estudo estão dentro dos padrões de qualidade aceitáveis pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (Resolução ANP nº42), que podem ser conferidas no relatório enviado junto com as amostras de biodiesel pelo fornecedor (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultado da análise físico-químico do biodiesel (rota etílica) utilizado e as especificações da ANP

Ensaio	Resultados obtidos da amostra de biodiesel	Especificação Resolução ANP nº42
Aspecto	Límpido e isento de impurezas	Límpido e isento de impurezas
Estabilidade á oxidação a 110°C/h	0,17	6 (Min)
Índice de acidez: mgKOH/g	0,254	0,80(Máx)
Glicerina livre % massa	0,00	0,02 (Máx)
Glicerina Total % massa	0,52	0,38 (Máx)

4.2 - Preparo da fração solúvel do biodiesel (FSBd)

As frações solúveis do biodiesel (FSBd), tanto produzido pela rota etílica (FSBdET) quanto pela metílica (FSBdMT), foram preparadas separadamente utilizando-se a mesma metodologia. Para a preparação da FSBd uma parte de biodiesel (3,5L) foi misturada a uma parte de água destilada (3,5L) (1:1) (Figura 10) e a mistura permaneceu em agitação por 24 horas. A fração superior insolúvel foi descartada e a fração solúvel em água foi coletada e

armazenada em recipientes opacos, em câmara fria, por no máximo cinco dias, até o momento dos experimentos. Essa metodologia para a confecção das frações solúveis foi baseado em experimentos prévios realizados no laboratório para a confecção de frações solúveis de compostos derivados de petróleo. Para a realização dos experimentos as FSBd foram diluídas em várias proporções, de acordo com o modelo experimental utilizado.

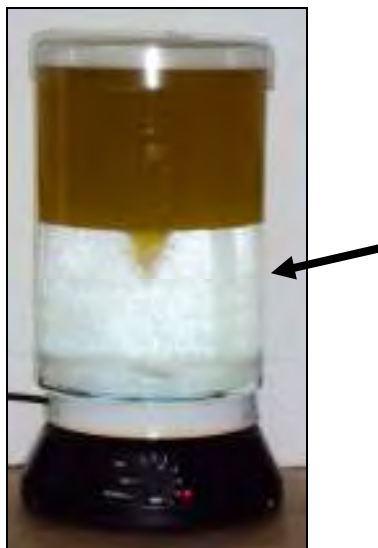


Figura 10 – Modo de preparação da fração solúvel do biodiesel. A seta indica a fração que foi utilizada nos experimentos

4.3 Modelos experimentais e delineamento experimental

Neste trabalho foram utilizados como modelo experimental o peixe da espécie neotropical *Prochilodus lineatus* e a linhagem celular de hepatócitos do peixe *Danio rerio* (ZFL). O delineamento experimental utilizado para cada sistema-teste esta descrito a seguir.

4.3.1-A) *Prochilodus lineatus*

A1 – Obtenção e aclimação dos peixes estudados

Para cada experimento foram usados exemplares juvenis de *P. lineatus* fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os peixes foram mantidos em aclimação por pelo menos 1 semana, em tanques de 300 L, com água continuamente aerada, temperatura de $20,8 \pm 2,1$ °C (média \pm DP), pH de $6,9 \pm 1,6$ (média \pm DP), com fotoperíodo de 14 h de escuro e 10 h de luz. Os animais foram alimentados com

ração apropriada a cada 48 horas, exceto durante e no dia anterior aos testes.

A2 – Diluição da Fração solúvel do biodiesel (FSBd)

Tanto a fração solúvel do biodiesel proveniente da rota etílica quanto da rota metílica foram diluídas para 5% com água desclorada (3L de FSBd para 57L de água descolorada) e distribuídas em aquários com capacidade de 100 L. A diluição de 5% foi definida após realização de testes pilotos.

A3 - Testes de toxicidade

Foram realizados testes de toxicidade independentes para cada tipo de biodiesel (etílico e metílico). Para cada um deles foram realizados três baterias de testes, uma para cada tempo de exposição (6, 24 e 48 horas), nas quais um grupo controle (CTR) e um grupo experimental (EXP) corriam simultaneamente. Para cada bateria de teste, após a aclimatação, os peixes eram divididos nos grupos CTR e EXP, contendo 8 peixes cada. Os animais eram mantidos em aquários de 100L, em uma densidade que não excedia a relação de 1g de peixe para cada litro de água (SEMA, 1988). O aquário do grupo CTR foi preenchido apenas com água desclorada, enquanto o aquário do grupo EXP foi preenchido com água contendo FSBd na diluição de 5%. Os animais foram sacrificados após serem expostos a fração solúvel do biodiesel por 6, 24 ou 48 h.

A4 – Amostragem

Imediatamente após serem retirados dos aquários, os animais foram anestesiados com benzocaína (0,12g/litro de água) e então foram medidos, pesados e sacrificados por secção medular. Os órgãos coletados para as análises foram:

- Sangue: para o ensaio do cometa, micronúcleo e para análise das alterações eritrocíticas nucleares (AENs). A coleta do sangue foi feita por meio da veia caudal, utilizando-se seringa heparinizada (Figura 11). Um volume de 10 μ L do sangue coletado dos peixes foi transferido para um tubo de microcentrífuga contendo 700 μ L de solução salina tamponada com fosfato (PBS: 126,6 mM NaCl, 4,8 mM KCL, 1,5

mM CaCl, 3,7 mM NaHCO₃, 8,9 mM Na₂HPO₄, 2,9 mM NaH₂PO₄) e mantido em gelo até o momento de se realizar o ensaio do cometa.

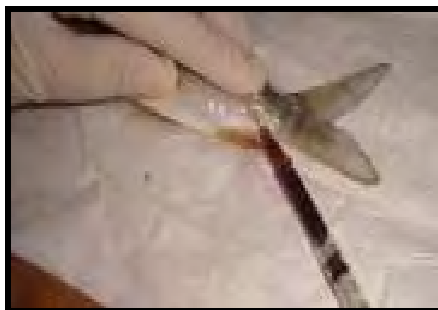


Figura 11 - Coleta de sangue dos peixes por meio da veia caudal

- Brânquias: foram divididas em 3 partes (Figura 12)
 - 4 arcos branquiais: foram homogeneizados para as análises bioquímicas
 - 2 arcos branquiais: foram removidos para o ensaio do cometa. Imediatamente após a remoção, os filamentos branquiais foram separados e limpos, com o auxílio de pincel e PBS para a retirada da maior quantidade possível de sangue. Em seguida, os filamentos branquiais foram armazenados em 700 µL PBS e mantidos em gelo até o momento da preparação da suspensão celular
 - 2 arcos branquiais: foram armazenados em gelo, para a determinação da produção de ERO, que foi realizada com o tecido fresco no mesmo dia da amostragem.

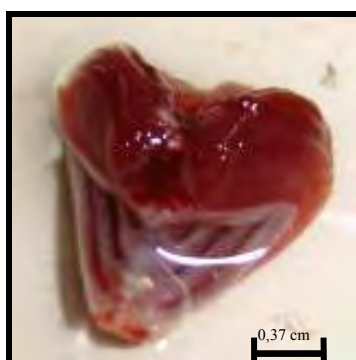


Figura 12 – Fotografia das brânquias de *P. lineatus* jovem

- Fígado: Foi dividido em 2 partes (Figura 13)
 - Metade foi homogeneizado para as análises bioquímicas

- Metade foi armazenado em gelo para a determinação da produção de ERO, que foi realizada com o tecido fresco no mesmo dia da amostragem

É importante ressaltar que na falta de material biológico para fazer as divisões das amostras descritas acima, devido ao tamanho de alguns animais, outros experimentos eram feitos para completar as amostras para as análises, mantendo as mesmas condições experimentais.

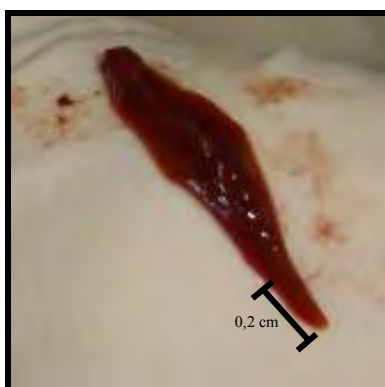


Figura 13– Fotografia de fígado de *P. lineatus* jovem

A5 - Análise bioquímicas

- Atividade de enzimas antioxidantes no fígado e nas brânquias - Os tecidos (brânquias e fígado) foram homogeneizados com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 (5x o volume para as brânquias e 10x o volume para o fígado). Os homogeneizados foram centrifugados a 14700g por 20 minutos em centrífuga refrigerada (4°C). O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade das enzimas SOD, CAT, GPx, EROD e GST e da concentração de GSH. Concentração de proteína: foi determinada pelo método de Bradford, em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando-se como padrão protéico albumina sérica bovina (Bradford 1976).
- Atividade da Superóxido dismutase (SOD): foi determinada de acordo com o método de McCord & Fridovich (1969), pela inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido, em 550 nm a 25° C em espectrofotômetro. A atividade desta enzima foi expressa em U de SOD.mg de proteína⁻¹. Uma unidade (U) de SOD representa a

quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição da taxa de redução do citocromo c.

- Atividade da Catalase (CAT): foi determinada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), seguindo-se a velocidade de decomposição do H_2O_2 , através do decréscimo de absorbância a 240 nm, em espectrofotômetro. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol } H_2O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$
 - Atividade da Glutaciona Peroxidase selênio-dependente (GPx): foi determinada pelo método de Hopkins e Tudhope (1973), baseado na oxidação do NADPH, em presença de peróxido de hidrogênio, em 340 nm, em espectrofotômetro. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$
 - Atividade da Etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) foi feita segundo o protocolo de Eggens e Galgani (1992). A conversão da 7-etoxiresorufina para resorufina foi monitorado em leitora de microplacas na fluorescência de 530 nm (excitação) e 590 nm(emissão). A atividade da EROD foi expressa em $\text{pmol de resorufina} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, baseada em uma curva padrão de resorufina
 - Atividade da Glutaciona - S - Transferase (GST): foi determinada seguindo-se a complexação da glutaciona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em 340 nm, em espectrofotômetro (Keen et al., 1976). A atividade da GST foi expressa em $\text{nmol de CDNB conjugado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$
 - A concentração total de Glutaciona Reduzida (GSH) foi determinada pela reação desta com o DTNB, formando o ânion tiolato, em 412 nm, de determinada de acordo com o método de Beutler e colaboradores (1963). O conteúdo de GSH foi expresso em $\mu\text{g de GSH} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, a partir de uma curva padrão de GSH.
- Determinação de produção de espécies reativas de oxigênio em homogeneizado de tecidos - A metodologia para a determinação de espécies reativas de oxigênio em tecidos foi baseada no protocolo de Ferreira – Cravo et al. (2007) com modificações. Para as medidas, as brânquias (1:5 – p/v) e os fígados (1:10 – p/v) foram

homogeneizados em tampão contendo Tris-HCl (100 mM, pH 7.75), EDTA (2 mM) e Mg^{2+} (5 mM) e centrifugados em 10000 g durante 20 minutos a 4°C. Os sobrenadante resultante da centrifugação foi usado para todas as análises. A concentração de proteínas totais do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (595nm). As amostras de brânquia e fígado foram diluídas para 2 e 4 mg de proteína.ml⁻¹ com o mesmo tampão usado para homogeneização. Cada uma das amostras (20 ul) foi inserida em um poço de microplaca preta de 96 poços. O tampão de reação (100 µl) contendo 30 mM HEPES (pH 7,2), 200 mM KCl e 1 mM MgCl₂ foi adicionado em todos os poços com as amostras. Após isso, a microplaca foi colocada em uma leitora de microplaca, programado para a temperatura de 28°C. Com esse procedimento, foi obtida a fluorescência espontânea de cada amostra, nos comprimentos de onda de 488 e 525nm, para excitação e emissão, respectivamente. Imediatamente após a leitura, foi adicionado aos poços 4,8 µl do composto fluorescente 2',7' diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) numa concentração final de 40 µM. A microplaca foi novamente colocada na leitora de microplacas e o composto fluorescente DCF foi detectado no comprimento de onda de 488 e 525 nm, para excitação e emissão, respectivamente. A formação da ERO foi monitorada por 30 minutos com leituras a cada 5 minutos. A produção de ERO foi calculada a partir da relação das unidades de fluorescência (UF) ao longo do tempo, após os dados da UF serem ajustados para uma função de segunda ordem polinomial e os resultados foram expressos como a área de UF× min.

- Determinação de danos genotóxicos no DNA pelo Ensaio do Cometa: A metodologia para a obtenção da suspensão de células brânquias foi baseada em protocolo descrito por Kilemade et al. 2004, com modificações (Cavalcante et al, 2008). Os filamentos foram seccionados com o auxílio de navalhas de aço descartáveis, sobre uma placa de cera e o material resultante foi colocado em um tubo de microcentrífuga. Para a dissociação das células foram adicionados 200 µL de tripsina a 0,05% (0,05 gramas de tripsina em pó + 100 mL de H₂O + 0,5 mL de EDTA 0,5M), à temperatura ambiente e foi feita homogeneização manual por inversão periódica, durante 15 min. Após esse período, foi acrescido aos tubos 200 µL de soro bovino fetal, que tem a função de inativar a ação da tripsina. Após 15 minutos, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o homogeneizado foi coletado e filtrado em malha de 30 um, para a obtenção da suspensão celular branquial. A metodologia empregada no ensaio alcalino do cometa

foi baseada no protocolo de Singh et al. (1988) com algumas modificações. Para as análises do sangue e das células das brânquias, respectivamente, 10 μ L e 15 μ L das soluções contendo as células destes tecidos foram misturadas com 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (100 mg em 20 mL PBS) e mantidas em banho-maria a 37°C. Em ambos os casos, da suspensão celular obtida desta mistura com agarose, 130 μ L foram divididos e pipetados sobre duas lâminas de vidro previamente cobertas com uma película de agarose normal 1,5% (300 mg em 20 mL PBS). Após serem cobertas com lamínula, a lâmina foi colocada no refrigerador por 30 min para permitir a completa solidificação da agarose com as células. Após a solidificação da agarose, a lamínula foi removida e a lâmina foi colocada em uma solução de lise recém preparada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, no mínimo, 1 h. Após a lise, a lâmina foi colocada em uma cuba de eletroforese horizontal e uma solução tampão recém preparada (0,3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) foi adicionada à cuba, que permaneceu por 30 minutos, em gelo dentro de um recipiente escuro, para evitar entrada de luz. A seguir, a lâmina foi exposta por 20 minutos, a 4°C, às condições de eletroforese: 25 V, com a corrente elétrica ajustada para 300 mA através da alteração lenta do nível de tampão da cuba. Após a eletroforese, a lâmina foi coberta com tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos. Este passo foi repetido por mais 2 vezes. Após a terceira neutralização, a lâmina foi seca em posição inclinada e fixada com etanol durante 10 minutos. As lâminas foram estocadas na geladeira por, no máximo, 30 dias. No momento da análise, as lâminas foram coradas com 50 μ l de solução de Gel Red (15ul Gel Red 10.000X em 5mL NaCl 1M e 45mL de água destilada). A análise foi feita em microscópio de fluorescência em objetiva de 40X com filtro de excitação de 510-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm e foram analisados 100 nucleóides por lâmina. De acordo com Kobayashi et al. (1995), os danos no DNA foram classificadas visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA em quatro classes: 0: nucleóide sem cauda com poucos fragmentos ao redor; 1: uma pequena cauda menor que o diâmetro do núcleo; 2: um comprimento de cauda de 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo; 3: um comprimento da cauda > duas vezes o diâmetro do núcleo. (Figura 14). Para o cálculo do escore de dano, o número de células em cada classe (0, 1, 2 ou 3) foi multiplicado pelo valor de cada classe e o escore foi calculado pela fórmula: $(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$, onde: A, B, C e D correspondem ao número de nucleóides em

cada uma das classes. Assim, o valor de escore pode variar de um mínimo de 0 e um valor máximo de 300.

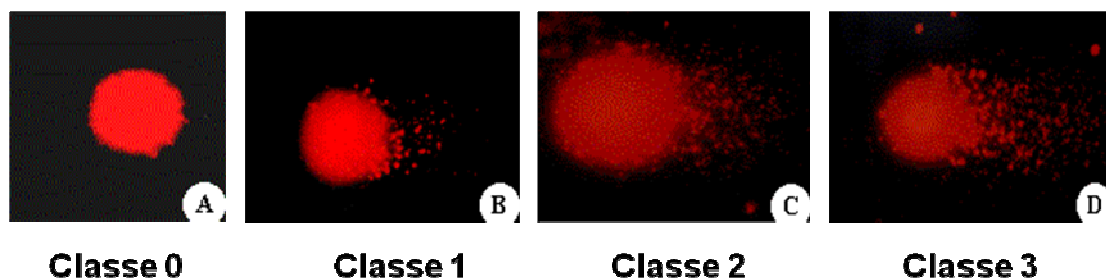


Figura 14 - Classificação dos nucleóides de acordo com a migração dos fragmentos de DNA (A: sem dano aparente; B: pequeno dano; C: médio dano e D: grande dano).

- Teste do micronúcleo (MN) e ocorrência de outras alterações eritrocíticas nucleares (AENs): O teste do micronúcleo foi realizado de acordo com a metodologia de Hooftman e Raat, 1982. Para a análise da ocorrência de AENs foram feitos esfregaços sanguíneos, a partir de uma alíquota de 5 μ L de sangue dos peixes e foram confeccionadas duas lâminas por animal. Após secagem por 24 horas em temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 min e, coradas com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8 (0,06 M Na₂HPO₄, 0,06 M KH₂PO₄), durante 20 minutos. Por fim, após lavagem com água destilada e secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram preparadas para o uso permanente. A análise citológica das lâminas foi realizada em microscópio de luz (Olympus), na objetiva de 100x. Para cada animal, foram analisados 3000 eritrócitos, anotando-se as frequências de micronúcleos e também a presença de alterações nos núcleos das células. As lâminas foram codificadas para se evitar uma análise tendenciosa. Para ser considerado um micronúcleo, as características observadas foram: 1) ser morfológicamente semelhante ao núcleo principal; 2) ter diâmetro entre 1/16 até 1/3 do núcleo principal; 3) não ser refringente; 4) não estar ligado ou conectado ao núcleo principal; 5) possuir a mesma intensidade de coloração do núcleo principal, embora às vezes possa apresentar coloração um pouco mais intensa (Figura 15-A). A classificação das outras alterações eritrocíticas nucleares foram baseadas em Carrasco et al. 1990 sendo: 1) núcleo com constrição ou em “forma de rim” (NR) (Figura 15 – B); 2) núcleo lobulado, onde o núcleo apresenta – se dividido em 2 lóbulos, de tamanhos

similares(NL) (Figura 15 – C) e 3) núcleo segmentado, onde o núcleo apresenta – se dividido em 2 lóbulos, de tamanhos diferentes (NS) (Figura 15 – D). Os resultados referentes à ocorrência de MN, NS, NL e NR estão apresentados como número de eritrócitos com alterações por cada 1000 células analisadas (em ‰). As análises comparativas foram feitas separadamente para os resultados de micronúcleo e para as AENs. Para a comparação da ocorrência de AENs considerou-se a soma dos eritrócitos com NS+NL+NR por animal.

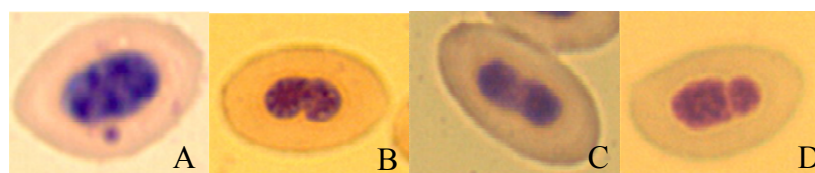


Figura 15 - Classificação das alterações analisadas nos eritrócitos de *P. lineatus* (A: micronúcleo; B: núcleo com constrição ou em “forma de rim”; C: núcleo lobulado; D: núcleo segmentado)

4.3.2-B) Linhagem Celular ZFL

B1 - Obtenção da linhagem celular estudada

A linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL- n^o do catálogo: BCRJ 0256) utilizada neste estudo foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro). Esta linhagem celular foi criada em 1992 a partir de um pool de cerca de 10 fígados de Zebrafish (*Danio rerio*) adultos, exibe algumas propriedades características de células do parênquima hepático e possui um ciclo celular de 72 horas (Figura 16). A linhagem celular de hepatócitos (ZFL) foi cultivada em 10 mL de meio de cultura contendo 50% de meio L-15 Leibovitz's, 40% de meio RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,1% de antibiótico e antimicótico, em frascos de 25 cm², mantidas em estufa sem CO₂ a 28°C (Figura 17).

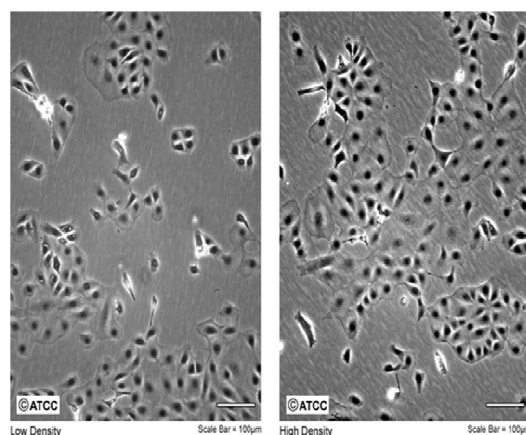


Figura 16 – Fotos das células ZFL em microscópio invertido (Fonte: ATCC)



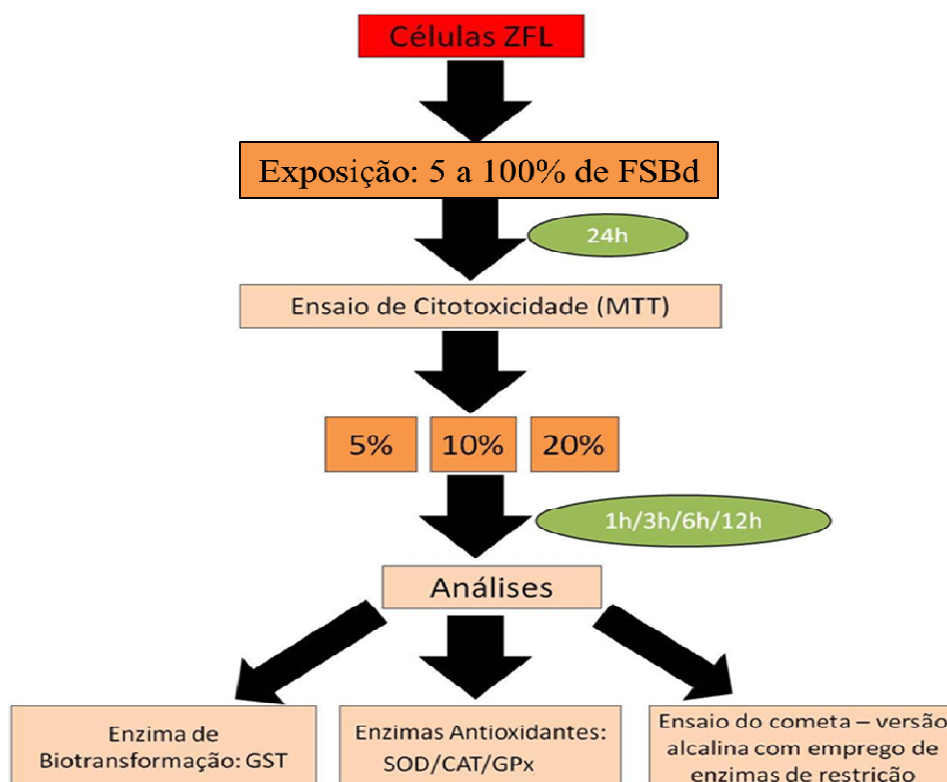
Figura 17 - Manutenção da linhagem celular de hepatócitos (ZFL) em estufa a 28°C

B2 – Experimentos de toxicidade *in vitro*

Em seguida será detalhada cada uma das etapas empregadas para a realização dos testes *in vitro* (Figura 18).

- Etapa 1: Primeiramente as células foram submetidas a um ensaio de citotoxicidade para avaliar o potencial citotóxico das frações solúveis obtidas tanto do biodiesel de girassol feito por rota etílica quanto pela rota metílica. Ambas as frações foram diluídas em água na proporção de 5%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80% e apenas biodiesel (100%). Em seguida foi adicionado a mesma quantidade de meio de cultura em todas as diluições, assim para cada 10 mL de fração diluída, independente da diluição, foi acrescentado: 0,081 g de RPMI, 0,0685 g de Leibovitz, 0,002 g de bicarbonato de sódio e o pH foi ajustado para 7,4 e em seguida filtrado.

- Etapa 2 : A partir dos resultados encontrados no ensaio de citotoxicidade, foram definidas as diluições para serem estudadas de 5%, 10% e 20% de ambas as frações solúveis. Nestas diluições foram determinados: quantidade de espécies reativas de oxigênio, atividade enzimática de enzimas de biotransformação e antioxidantes, além de danos no DNA através do ensaio do cometa.



B3 – Ensaio de Citotoxicidade baseado na atividade metabólica – MTT

A citotoxicidade da FSBd foi avaliada em testes *in vitro* pelo método de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5- difeniltetrazólio) (MOSMANN , 1983). Para tanto, células ZFL foram semeadas em uma densidade de $1,2 \times 10^5$ células por poço, em placa de 24 poços transparente. Após 48 h de estabilização em estufa sem CO₂ a 28° C, as células foram incubadas por 24 h, apenas com meio de cultura (controle negativo ou CTR) ou com diferentes diluições de FSBd (5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100%) misturadas sempre com a mesma concentração de meio de cultura. O controle positivo com metil metano sulfonato (MMS) na concentração de 1 mM também foi feito. Para confiabilidade dos resultados, foram feitas 2 réplicas (em períodos diferentes) de cada uma das condições experimentais, sendo que em cada condição experimental foram feitas 4 repetições. Após o período de incubação foi

adicionado o MTT e as células foram novamente incubadas por mais 4 h. Em seguida, o meio de cultura foi retirado, e foi adicionado DMSO para a precipitação do cristal de formazam e a absorbância correspondente a cada amostra foi determinada em leitora de microplaca a 540 nm (Figura 19). A absorbância obtida para as células do CTR foi considerada como 100% de viabilidade celular (VC). A VC das outras amostras foi determinada pela seguinte fórmula:

$$VC_{AF} = [(Abs_{AF} - Abs_{Br}) / (Abs_{CTR} - Abs_{Br})] \times 100.$$

Onde: VC_{AF} = Viabilidade Celular das células expostas a FSBd
 Abs_{AF} = Absorbância encontrada para as células expostas a FSBd
 Abs_{CTR} = Absorbância encontrada para as células do controle negativo
 Abs_{Br} = Absorbância encontrada para o branco (poço apenas com meio de cultura)

A partir dos resultados encontrados para a citotoxicidade da FSBd, foram definidas as diluições da FSBd, que não sejam letais para as ZFL, para serem usados nos outros ensaios *in vitro*. Foram consideradas como letais, as diluições da FSBd que como letais, as diluições que causaram 0% de viabilidade celular, indicando que as células estavam metabolicamente inativas.

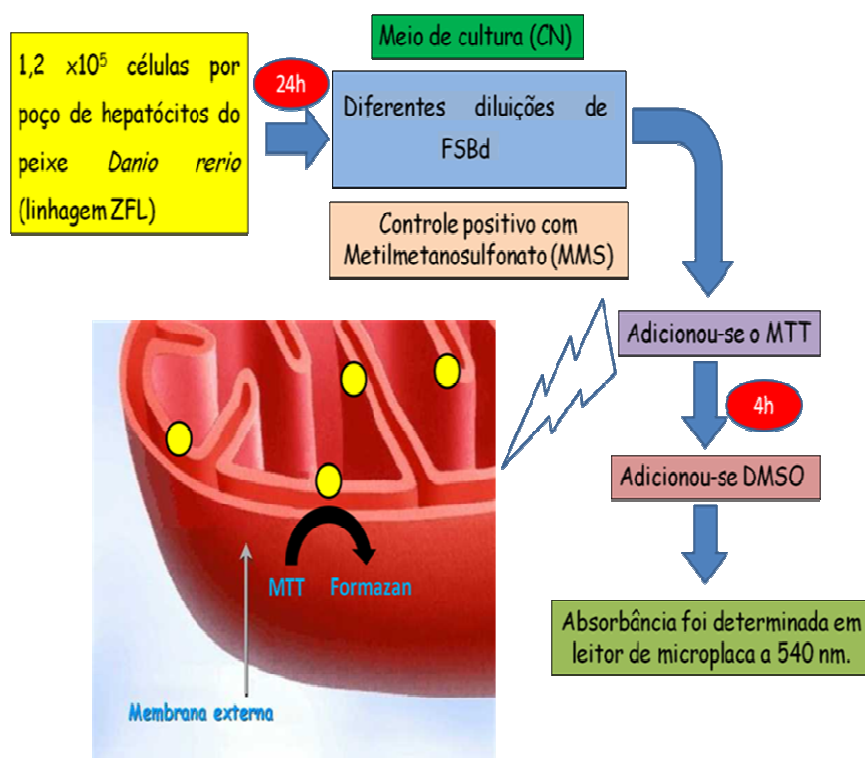


Figura 19 – Esquema das etapas seguidas para a realização do ensaio de citotoxicidade MTT

B4 – Análises bioquímicas

- Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO): As células ZFL foram semeadas em uma densidade de $9,0 \times 10^5$ células por poço em placa preta de 96 poços. Após 48h de estabilização em estufa sem CO₂ a 28° C, as células foram tratadas apenas com meio de cultura (CTR) ou com as diferentes diluições de FSBd misturados sempre com a mesma concentração de meio de cultura. Para confiabilidade dos resultados, foram feitas 2 réplicas (em períodos diferentes) de cada uma das condições experimentais, sendo que em cada condição experimental foram feitas 4 repetições. O experimento foi incubado por 1, 3, 6 e 12h. A escolha por exposições com durações curtas é devido ao fato de se observar na literatura científica que geralmente, os efeitos em testes *in vitro* aparecem mais rapidamente em tempos de exposição mais curtos do que em testes *in vivo*. A diferença entre os tempos pode ser explicado pelo fato de se tentar entender a cinética dos efeitos durante os tempos de exposição. Após esses períodos, o meio foi descartado e foi adicionado o tampão de reação (100µL) contendo 30 mM HEPES (pH 7,2), 200 mM KCl e 1 mM MgCl₂ em todos os poços com as amostras. Após isso, a microplaca foi colocada em um espectrofluorímetro de microplaca, programado para a temperatura de 28°C. Com esse procedimento, foi obtida a fluorescência espontânea de cada amostra, nos comprimentos de onda de 488 e 525 nm, para excitação e emissão, respectivamente. Imediatamente após a leitura da microplaca, foi adicionado aos poços o composto fluorescente 2',7' diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) numa concentração final de 40 µM. A microplaca foi novamente analisada e o composto fluorescente DCF foi detectado no comprimento de onda de 488 (excitação) e 525 (emissão)nm, . A formação da ERO foi monitorada por 30 minutos com leituras a cada 5 minutos (Figura 20). A produção de ERO foi calculada a partir da relação das unidades de fluorescência (UF) ao longo do tempo, após os dados da UF serem ajustados para uma função polinomial de segunda ordem e os resultados foram expressos como a área de UF × min.

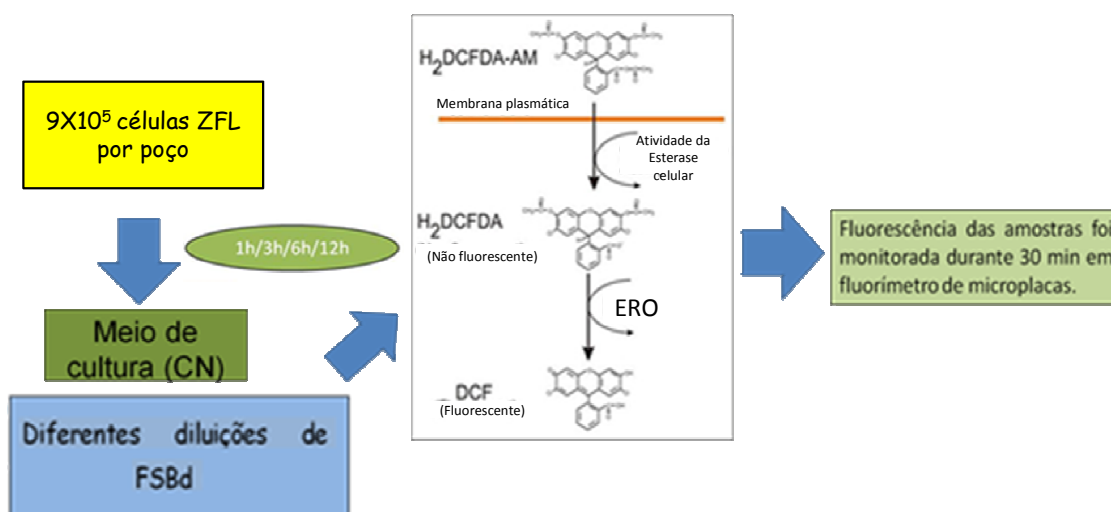


Figura 20 — Esquema das etapas seguidas para a realização do ensaio de geração de ERO

- Atividade de enzimas antioxidantes e de biotransformação: Células da linhagem ZFL (9×10^6) foram cultivadas em frascos de 75 cm², sempre em monocamada, em meio de cultura Leibovitz/RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal, e mantidas em estufa sem CO₂ a 28° C. Após 48 h de estabilização, as células foram tratadas apenas com meio de cultura (CTR) ou com as diferentes diluições de FSBd misturados sempre com a mesma concentração de meio de cultura. Foram feitos 6 frascos para cada condição experimental. O experimento foi incubado por 1, 3, 6 e 12 h. Após o término de incubação, o meio foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e desprendidas da parede do frasco com tripsina (0,125%). Após inativação da tripsina com meio de cultura, as amostras foram transferidas para microtubos e centrifugadas por 10 min a 10640 g. Após esse procedimento, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado 500 ul de PBS para ressuspensão do *pelet*. Para o rompimento das células, os microtubos foram colocados em um sonicador por 5 minutos, com pausa de 3 minutos, por 3 vezes. Para a certeza de rompimento das células, uma alíquota de cada uma das amostras foi colocada em câmara de Neubauer e visualizada em microscópio de luz na objetiva de 40X. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 10640 g e o sobrenadante coletado e mantido congelado a 80° C negativos até o momento das análises bioquímicas. A atividade da enzima de biotransformação glutathiona-S-transferase (GST) foi determinada seguindo-se a complexação da glutathiona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em 340 nm, de acordo com a metodologia descrita por Keen et al., (1976).

As enzimas antioxidantes que tiveram suas atividades medidas foram: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de McCord & Fridovich (1969), pela inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido, em 550 nm a 25° C. A atividade da CAT foi determinada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), seguindo-se a velocidade de decomposição da H₂O₂ através do decréscimo de absorvância a 240 nm. A atividade da GPx foi determinada pela oxidação do NADPH + H⁺ em presença de peróxido, de acordo com Hopkins e Tudhope (1973), em espectrofotômetro a 340 nm a 25° C. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford, em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando-se como padrão protéico albumina sérica bovina (Bradford 1976).

B5 – Análises genéticas

- Análise de danos no DNA – Ensaio do Cometa Versão Alcalina com adição de Endonucleases Específicas: As células ZFL foram semeadas em uma densidade de 1,0 x 10⁶ células em frascos de 25 cm², e mantidas em estufa sem CO₂ a 28°C. Após 48 h de estabilização, as células foram tratadas apenas com meio de cultura (CTR) ou com as diferentes diluições da FSBd (5%, 10%, 20%) , misturadas sempre com a mesma concentração de meio de cultura. O controle positivo com MMS na concentração de 0,5 mM também foi feito. Foram feitos 6 frascos para cada condição experimental. O experimento foi incubado por 1, 3, 6 e 12 h. Após esse período, foi descartado o meio dos frascos de cultura. A seguir, os frascos foram lavados duas vezes com 5 mL de PBS, para posteriormente ser adicionado 0,5 mL de tripsina (0,125%). Após 4 minutos, foi adicionado 5 mL de meio novo com soro bovino fetal. O conteúdo foi homogeneizado com o auxílio do pipetador e colocado em tubos de centrifuga para centrifugação por 5 minutos a 106,4g. O sobrenadante foi descartado, deixando-se apenas 0,5 mL de meio, que foi homogeneizado e usado para a confecção das lâminas do ensaio do cometa, seguindo o protocolo descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações. Para isso, alíquotas de 20 µL de cada uma das amostras foram adicionadas a 360 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Essa alíquota foi homogeneizada vagarosamente na agarose e dividida em 6 lâminas de vidro previamente recoberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%),

cobertas com lamínula e colocadas a 4°C, por 30 min, para solidificação da agarose. Após esse período, a lamínula foi removida e foi colocada uma segunda camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%), coberta com lamínula e novamente colocada a 4°C, por 30 minutos. Em seguida as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise gelada e recém preparada (2,5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10; Triton X-100 a 1% e DMSO a 10%). Após essa etapa foi utilizada a técnica que usa as enzimas endonuclease III (endoIII) e formamidopirimidina-DNA glicosilase (FPG) para detecção, respectivamente, de pirimidinas e purinas oxidadas, avaliando assim possíveis danos oxidativos no DNA. Então, após a etapa de lise, as lâminas foram lavadas em PBS e colocadas em tampão Flare (Hepes 40 mM, KCl 0,1M, albumina de soro bovino (BSA), 0,2 mg.mL⁻¹ e EDTA 0,5mM, pH 8) durante 15 min. Posteriormente, as lâminas foram organizadas e as 6 lâminas que foram feitas a partir de um mesmo frasco de cultura foram colocadas em câmara úmida e adicionado sobre duas delas 100 µL do tampão de reação das enzimas (Flare 10x, H₂O destilada e BSA; Controle), nas outras 2 lâminas, 100 µL de endo III (diluição 1:100), e nas 2 restantes 100 µL de FPG (diluição de 1:100), a fim de detectar os diferentes tipos de bases oxidadas no DNA. Todas as lâminas foram cobertas com lamínula e incubadas por 45 minutos a 37°C. Na seqüência, as lâminas foram colocadas em geladeira por 15 min para solidificação da agarose e, então, transferidas para cuba de eletroforese, que foi preenchida com tampão alcalino gelado e recém preparado (1mM EDTA e 300 mMNaOH, pH>13). Após um período de 30 min para a desespiralização do DNA e exposição dos sítios álcali-lábeis, a eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA por 20 min. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram colocadas por 15 minutos em solução de neutralização (0,4 M de Tris, pH 7,5), fixadas com etanol absoluto e secas a temperatura ambiente. No momento da análise, as lâminas foram coradas com 50 µL de solução de Gel Red (15uL Gel Red 10.000X em 5mL NaCl 1M e 45mL de água destilada). A análise foi feita em microscopia de fluorescência em objetiva de 40 X com filtro de excitação de 510-560nm e um filtro de barreira de 590nm e foram analisadas 100 nucleóides por lâmina. De acordo com Kobayashi et al. (1995), os danos no DNA foram classificadas visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA em quatro classes: 0: nucleóide sem cauda com poucos fragmentos ao redor; 1: uma pequena cauda menor que o diâmetro do núcleo; 2: um comprimento de cauda de 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo; 3: um comprimento da cauda > duas vezes o diâmetro do núcleo. O escore de cada tratamento foi verificado

multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe de dano pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3) e o valor de escore podia variar de um mínimo de 0 e um valor máximo de 300. Os resultados foram expressos pela média do escore de dano de DNA para cada grupo de tratamento, para cada período de exposição. Foram feitos 2 tipos de análises, onde a primeira foi chamada de ensaio do cometa padrão, com o objetivo de avaliar danos inespecíficos na molécula de DNA. Para isso, foram comparados entre si, os escores médios de CTR X FSBd X CP, das lâminas apenas expostas ao tampão de reação. A segunda análise, teve como objetivo, a quantificação de danos oxidativos, onde para isso, foi feita uma comparação estatística entre os escores médios encontrados nas lâminas feitas a partir de um mesmo frasco de cultura (mesma condição experimental) do seguinte modo:

$$\begin{array}{ccc}
 \boxed{\text{Escore médio das lâminas expostas ao tampão de reação}} & \times & \boxed{\text{Escore médio das lâminas expostas a Endo III}} \\
 \\
 \boxed{\text{escore médio das lâminas expostas ao tampão de reação}} & \times & \boxed{\text{Escore médio das lâminas expostas a FPG.}}
 \end{array}$$

Baseado nos resultados da análise estatística:

Tratamentos	Escore médio das lâminas expostas a Endo III	Escore médio das lâminas expostas a Endo III	Escore médio das lâminas expostas a FPG.	Escore médio das lâminas expostas a FPG.
Escore médio das lâminas expostas ao tampão de reação	Escore estatisticamente igual	Escore estatisticamente diferente	Escore estatisticamente igual	Escore estatisticamente igual
Resultado	Sem danos oxidativos nas bases nitrogenadas	Dano nas bases pirimídicas	Sem danos oxidativos nas bases nitrogenadas	Dano nas bases púricas

4.4 Análise Estatística

Para os testes *in vivo*, os resultados (CTR X FSBd (metílico ou etílico) foram comparados sempre dentro do mesmo tempo experimental usando o teste paramétrico teste – t ou o teste não paramétrico Mann -Whitney, dependendo da distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade da variância).

Para os testes *in vitro* , os resultados (CTR X diluições de FSBd (metílico ou etílico) X CP, quando for o caso) foram comparados entre si através de análise de variância paramétrica (ANOVA) pelo método de comparação de Student-Newman-Keuls ou pela análise não-paramétrica (Kruskall-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância).

Tanto nos testes *in vivo* quanto *in vitro* , valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos e os resultados foram expressos como média \pm SE (erro padrão).

5.1 Manuscrito 1

THE WATER SOLUBLE FRACTION OF BIODIESEL PROMOTES GENOTOXIC AND BIOCHEMICAL EFFECTS ON A NEOTROPICAL FISH

Dalita G. S.M. Cavalcante^{ab}, Maria A. Marin-Morales^b, Cláudia B. R. Martinez^{a*}

^aDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL) – Londrina, PR, Brasil

^bDepartamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brasil

*Corresponding author:

Tel.: +55-43-3371.4650

Fax: +55-43-3371.4650

E-mail: cbueno@uel.br

Resumo

Biodiesel tem sido considerado um combustível ecológico, no entanto, uma vez que é um composto relativamente novo no mercado, pouco se sabe sobre a ação deste combustível sobre o meio ambiente e quanto prejudicial é para os organismos vivos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar, através de um conjunto de biomarcadores genotóxicos e bioquímicos, se este biocombustível pode causar efeitos nos organismos aquáticos, utilizando como modelo um peixe neotropical de água doce. Em resposta a exposição à fração solúvel do biodiesel (BdWSF), observou-se efeitos tecidos – específicos, onde o fígado se mostrou mais sensível que as brânquias. Foi observado que BdWSF induziu geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), causou a ativação da enzima de desintoxicação glutathione S transferase (GST) e da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), aumento na concentração de glutathione reduzida (GSH), e produziu danos de DNA em células branquiais e eritrócitos de *P. lineatus*. Estes resultados mostram que o biodiesel promove alterações bioquímicas e genotóxicas em peixes de água doce e, portanto, pode ser perigoso para a biota aquática.

Palavras-chave: defesas antioxidantes, poluição aquática, biocombustíveis, biotransformação, danos ao DNA, estresse oxidativo.

Abstract

Biodiesel has been considered an ecological fuel, however, as it is a relatively new compound in the market little is known about the action of this fuel on the environment and how much harmful it is to the living organisms. Therefore, the objective of this work was to verify, through a set of genotoxic and biochemical biomarkers, whether this biofuel can cause effects on aquatic organisms, using as model a Neotropical freshwater fish. In response to biodiesel water soluble fraction (BdWSF) exposure it was observed tissue-specific effects and the liver showed to be more sensitive than the gills. It was observed that BdWSF induced the generation of reactive oxygen species (ROS), caused the activation of the detoxification enzyme glutathione S transferase (GST) and of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD), an increase in the concentration of reduced glutathione (GSH), and produced DNA damages in gill cells and erythrocytes of *P. lineatus*. These results show that biodiesel promotes biochemical changes and genotoxic effects on freshwater fish and thus it can be hazardous to aquatic biota.

Keywords: antioxidant defenses, aquatic pollution, biofuel, biotransformation, DNA damage, oxidative stress.

Introduction

New sources of energy, such as biofuels, are being increasingly used in an attempt to reduce the dependence on oil, which is a limited and expensive resource that may have negative impacts on the environment (Ma and Hanna . 1999; Hill et al. 2006). Biodiesel is a biofuel produced by the chemical reaction between vegetal oil or animal fat and alcohol, methanol or ethanol, which, in the presence of a catalyzer, such as sodium hydroxide, originates methyl or ethyl esters (Gerpen 2005). After the transesterification process, the alkyl esters of fatty acids are purified to eliminate products such as glycerin, methanol and water (Antolín et al. 2002). Brazil has gained prominence in the worldwide scene of biofuels as it is the holder of the first biodiesel patent (Lima 2004) and the largest biodiesel consumer in the world. Biodiesel is more frequently used mixed with diesel oil at rates of 2% (B2), 5% (B5) or 20% (B20), and may also be used as pure 100% biodiesel (B100) (Vasudevan and Briggs 2008). In Brazil, oleaginous plants, such as soy bean and sunflower, are commonly used as raw material for the production of biodiesel.

Biodiesel is considered a less pollutant fuel when compared to the petroleum derivatives, since it emits less toxic gases, contributing to the global warming control (Poon et al. 2007). However, occasionally biodiesel can leak from its production site, storage tanks or during transportation and reach water bodies, such as rivers and lakes, leading to the contamination of the aquatic environment. The increasing production and consumption of biodiesel has encouraged environmental researchers to assess its hazard and fate in the environment (Leme et al. 2012 a). As biodiesel is a compound of recent interest, works related to its toxicity and biological effects are still rare (Varsho 1996 ab; Bunger et al. 2000 ab, 2007; Finch et al. 2002 and Poon et al. 2007). Thus, experimental studies concerning the effects of biodiesel on aquatic ecosystems and freshwater fish are necessary and urgent.

In order to evaluate the quality of aquatic ecosystem, different biological parameters of fish can be used as indicators to signal changes associated to the presence of contaminants. Amongst them, biochemical measurements in aquatic species, such as the determination of antioxidants responses and oxidative stress through the analysis of reactive oxygen species production (ROS), lipid peroxidation and damages in DNA are being used as biomarkers to identify changes before a deleterious effect occurs at higher levels of biological organization (Monserrat et al. 2003; 2007). Thus, the use of genetic and biochemical biomarkers can provide important information regarding the effects caused by the xenobiotics (Van der Oost et al. 2003).

Hence, the objective of this work was to evaluate whether biodiesel can cause genetic and biochemical effects on the *Prochilodus lineatus*, which is a Neotropical fish with a well known biology. The combination of the parameters presented here may constitute a useful and sensible tool for the investigation of the effects of this biofuel, and the results obtained may be used for the environmental monitoring of the areas subject to biodiesel contamination.

Materials and methods

Test organisms

Juvenile specimens of *P. lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), weighing $11.2 \text{ g} \pm 2.3$ (mean \pm SD, $n = 96$), were supplied by the Universidade Estadual de Londrina Hatchery Station. Prior to the toxicity tests, fish were acclimated to laboratory conditions for a minimum of seven days in a 300 L tank with dechlorinated tap water. The water was constantly monitored for temperature ($21.4 \pm 1,8$), dissolved oxygen ($8.43 \pm 1,2$), ph ($7,1 \pm 2,7$), and conductivity ($112 \pm 5,7$). During this period, fish were fed with commercial pellet food every 48 h. The feeding was suspended 48 hours before the beginning of the experiments and during the tests.

Preparation of the water soluble fractions of biodiesel (BdWSF)

The biodiesel used for the experiments was produced from the sunflower oil by the transesterification process, using ethanol as alcohol (ethyl route). The quality standard report sent by the manufacturer (Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR, Brazil) showed that the visual analyses carried out in samples of this biofuel had determined that its aspect was limpid and free from impurities. The presence of mono, di and triglycerides and total glycerin was detected in acceptable amounts in the samples, according to the specifications of the Brazilian National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP). The biodiesel water soluble fraction was prepared by mixing biodiesel with water (1: 1) in constant shaking for 24 hours. After this period, the supernatant corresponding to the insoluble fraction was discarded and the biodiesel water soluble fraction (BdWSF) was collected and stored in translucent containers and kept in a cold chamber until the moment of the experiments. The storage time of the BdWSF on refrigeration has never exceeded 72 h. For each experimental

group, the BdWSF was diluted to 5% with dechlorinated water and distributed in 100-L aquaria.

Toxicity tests and sampling

After the acclimation, fish were transferred to 100-L glass aquaria (8 fish per aquarium) containing only water (CTR group) or BdWSF diluted to 5% (EXP group), for exposure for 6, 24 and 48 h. For each experimental time, independent experiments with replicates were carried out. During the tests, the water was constantly monitored for temperature, dissolved oxygen, pH, and conductivity. After each period of exposure, the fish were anesthetized with benzocaine for blood sampling from the caudal vein. The blood was used for the comet assay and for the analysis of micronucleus (MN) and other nuclear erythrocytic alterations (ENA). The animals were then killed by medullar section for the removal of the gills and liver. Part of the gill arches was used in the comet assay. The remainder of the gills and liver were divided in two parts; one of them was stored in an ultrafreezer (-80°C), for further biochemical analyses, and the other part was kept in ice for determination of the production of reactive oxygen species (ROS), which was accomplished with the fresh tissue on the same day of the sampling.

Determination of reactive oxygen species (ROS)

The methodology used for the determination of ROS generation in tissues was based on the method described by Ferreira-Cravo et al. (2007) with modifications. For the measurements, gills (1: 5 - w:v) and livers (the 1: 10 - w:v) were homogenized in buffer containing Tris-HCl (100 mM, pH 7.75), EDTA (2 mM) and Mg^{2+} (5 mM). The homogenates were centrifuged (10000 g, 4°C, 20 min) and the supernatants were employed for all measurements. The total protein content was determined through the Bradford method (595nm). The liver and gill samples were diluted to 2 and 4 mg of protein.mL⁻¹ with the same buffer used for homogenization. The ROS generation was determined by means of a fluorescence assay, through the production of a fluorescent compound 2', 7' - dichlorfluorescein (DCF), from the oxidation of the 2', 7' - dichlordihydrofluorescein (DCHF). The fluorescence intensity was determined during 30 min, with readings at every 5 min, at 25 °C, using a microplate fluorometer, with excitation and emission wavelength of

485 and 520 nm, respectively. Background fluorescence was determined previous to H₂DCF-DA addition. ROS production was calculated by integrating the fluorescence units (FU) along the time of the measurement, after adjusting FU data to a second order polynomial function and the results were expressed as the area of FU×min.

Biochemical Analyses

Liver and gill frozen samples were thawed and homogenized using a tissue homogenizer for small samples in an ice-cold K-phosphate buffer 0.1 M, pH 7.0 at a ratio of 1:10 (w:v) for liver and 1:5 (w:v) for gills. Homogenates were centrifuged (14700 g, 20 min, 4°C) to obtain the supernatant for biochemical assays. The induction of the CYP1A was determined by the analysis of the ethoxyresorufin-O-deethylase activity (EROD) through the method adapted from Eggens and Galgani (1992). The EROD activity was expressed in pmol resorufin.min⁻¹. mg protein⁻¹, based on a resorufin standard curve at 530 nm. The Glutathione-S-Transferase (GST) activity was determined as described by Keen et al (1976) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate. The change in absorbance was recorded at 340 nm and the enzyme activity was calculated as nM CDNB conjugate formed. min⁻¹. mg⁻¹ protein using a molar extinction coefficient of 9.6 mM.cm⁻¹. Total superoxide dismutase (SOD) activity was measured as the inhibition of the reduction rate of cytochrome c by the superoxide radicals generate by the xanthine/xanthine oxidase system at 550 nm and 25°C, according to McCord and Fridovich (1969). Values for SOD activities were expressed in units of SOD. mg protein⁻¹; where one unit of SOD corresponds to the amount of enzyme necessary to produce a 50% inhibition of the cytochrome c reduction rate. Catalase (CAT) activity was estimated from the rate of consumption of hydrogen peroxide (Beutler 1975). Change in absorbance was recorded at 240 nm and enzyme activity was expressed as μM H₂O₂ consumed. min⁻¹. mg protein⁻¹. Selenium-dependent glutathione peroxidase (GPx) activity was measured according to Hopkins e Tudhope (1973) by following the rate of oxidation of the reduced form of glutathione. The formation of oxidized glutathione was monitored by the decrease in the concentration of NADPH, measured at 340 nm and 25°C, due to the addition of glutathione reductase to the medium. GPx activity was expressed as μmol NADPH oxidized. min⁻¹.mg protein⁻¹ using a molar extinction coefficient of 6.22 mM.cm⁻¹. The GSH concentration was determined in accordance with the method of Beutler et al (1963), whereby glutathione reacts with the DTNB forming a yellowish thiolate measurable at 412 nm. The protein concentration was determined by the method of Bradford

in a spectrophotometer at 595 nm, using bovine serum albumin as a standard protein (Bradford 1976).

Genetic Analyses

The Comet assay was performed using the alkaline (pH > 13) version developed by Singh et al. (1988), with the modifications detailed by Cavalcante et al. (2008), using two cell types: erythrocytes and gill cells. For tissue dissociation gill filaments were sectioned and the pieces were transferred to microtubes, incubated for 15 min at 30°C in 0.05% trypsin (diluted in PBS Ca⁺² and Mg⁺² free) and homogenized by periodic manual inversion at room temperature. After that, the solution was filtered (30 µm mesh size) into a tube containing a fetal calf serum 10% to halt the enzymatic digestion. The resultant solution was centrifuged (10 min, 1000 g) and the pellet was resuspended in PBS to be used in the comet assay. Only blood and gill samples, with cellular viability greater than 80%, determined by the Trypan blue exclusion test, were used in the comet assay.

The basic steps of the comet assay for the two cell types were executed as follows: a) lysis: one hour, at 4°C, protected from light, in a lysis buffer (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO 10%, Triton X-1001 mL, pH 10.0); b) DNA unwinding: 30 min, in the dark, in an electrophoresis buffer (NaOH 0.3 N, EDTA 1 mM, pH > 13); c) electrophoresis: 20 min, 300 mA, 25V, 1 V.cm⁻¹; d) neutralization: three washes for 5 min each in buffer (Tris 0.4 M, pH 7.5). Slides were fixed with absolute ethanol for 10 min and kept under refrigeration until cytological analyses. The slides, stained with gel Red were analyzed with a Leica microscopy (DM 2500) adapted for fluorescence/epifluorescence, equipped with a blue excitation filter (450-490 nm) and a barrier filter of 515 nm at 1000x magnification. All slides were blind-reviewed. The extent of DNA damage was quantified by the length of DNA migration, which was visually determined in 100 randomly select and non-overlapping cells per fish. According to Kobayashi et al. (1995), DNA damage was classified in four classes 0: no visible damage; 1: a short tail smaller than the diameter of the nucleus; 2: a tail length 1 to 2 times the diameter of the nucleus; 3: a tail length > two times the diameter of the nucleus. The score of DNA damage for 100 comets was obtained by multiplying the number of cells in each class by the damage class, and ranged from 0 (all undamaged) to 300 (all maximally damaged). Results for DNA damage in each cell type were expressed as the mean score of DNA damage for each treatment group, for each exposure period.

The micronucleus test was carried through in accordance with the methodology of Hoftman and De Raat (1982). For MN tests and analysis of the occurrence of other erythrocyte nuclear alterations (ENA), blood smears from 5 μ L of fish blood were used for the preparation of two slides per animal. After drying for 24 hours at ambient temperature, the slides were fixed in absolute methanol for 10 min and stained with Giemsa 5% diluted in a pH 6,8 buffer solution (0.06 M 2HPO_4 , 0.06 M KH_2PO_4) for 20 minutes. Finally, after washing with distilled water and drying at ambient temperature, the slides were prepared for permanent use. The cytological analysis of the slides was carried out on a light optic microscope with a 100 X objective. For each animal, 3000 erythrocytes were analyzed, recording the micronuclei frequencies and also the presence of morphologic alterations in the nuclei of the cells. Both slides were codified to avoid a biased analysis. The classification of the erythrocyte nuclear alterations was based on Carrasco et al. (1990), as follows: 1) segmented nucleus (SN); 2) lobed nucleus (LN); and 3) constricted (N) or kidney-shaped nucleus (KSN).

Statistical analysis

The results obtained for the BdWSF exposed group at each experimental period were compared to their respective control group using either the Student's parametric t-test or the non parametric Mann-Whitney test, depending on the distribution of the data. The assumptions of normality and homogeneity of data were verified. Values of $P < 0.05$ were considered significant. Results are expressed as means \pm SE (standard error).

Results

Physical-chemical parameters of water e fish mortality

The results found during monitoring of physico chemical parameters of water during the experiments were: temperature (21.4 ± 1.8 °C), Dissolved oxygen (8.43 ± 1.2 mg $\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$), pH (7.1 ± 2.7), and conductivity (112 ± 5.7 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). During the experiments, the average mortality of animals was 10%.

Biotransformation Enzymes

The activity of the EROD enzyme (Fig.21A) in the gills of the fish exposed to BdWSF was not significantly modified, when compared to their respective controls at any experimental time. The GST activity in the gills of the animals exposed to BdWSF presented a significant increase at the 24 and 48 h exposure period in relation to their respective controls (Fig. 21B). The activity of the EROD enzyme (Fig. 22A) in the liver of the fish exposed to BdWSF for 6 h was significantly reduced in comparison to the respective control. On the other hand, liver GST showed a significant increase after 24 h exposure to BdWSF (Fig.22B).

Determination of Reactive Oxygen Species (ROS)

The calculated areas related to ROS generation in the gill (Fig. 23A) and liver (Fig. 23B) of fish exposed to BdWSF were significantly higher than the area of their respective control only at 24 h exposure.

Antioxidant Defenses

In the gills, the activity of the superoxide dismutase (Fig.24A), catalase (Fig. 24B) and glutathione peroxidase enzymes (Fig. 24C) of the fish exposed to BdWSF were not significantly modified when compared to their respective controls at any experimental time. The GSH gill content did not show any alterations in the fish exposed to BdWSF in comparison with the animals not exposed to BdWSF at any experimental time (Fig. 24D). In the liver, the activity of the SOD (Fig. 25A) was increased in the animals exposed to BdWSF, in relation to the control animals at the 3 experimental times. Significant alterations in the liver catalase and GPx activities (Fig. 25B and 25C) were not observed after BdWSF exposure. A significant increase in the liver GSH was observed in the fish exposed to BdWSF at 24 exposure time, in comparison with respective control (Fig.25D).

Damages in the DNA – Comet Assay

The results of the comet assay carried through with gill cells (Fig. 26A) showed that after 24 and 48 h exposure to BdWSF the damage scores were significantly higher in relation to their respective controls. When comparing the number of damaged nucleoids, significant differences between BdWSF group and respective control were found at 6 h (CTR: 35.8 ± 4.0 ;

EXP: 45.4 ± 4.9), 24 h (CTR: 30.0 ± 3.4 ; EXP: 51.7 ± 3.6) and 48 h (CTR: 24.7 ± 4.6 ; EXP: 43.7 ± 5.0) exposure. Among the nucleoids analyzed at the 3 periods of exposure, damages more frequently found were classified as class 1.

The comet assay carried through with erythrocytes showed that the damage scores of the experimental groups were significantly higher for all the exposure times, when compared to their respective negative controls (Fig. 26B). For the number of damaged nucleoids, significant differences were also found at all exposure times: 6h (CTR: 22.8 ± 4.3 . EXP: 81.2 ± 7.5), 24 h (CTR: 28.4 ± 5.7 ; EXP: 78.8 ± 5.0) and 48 h (CTR: 44.75 ± 4.3 ; EXP: 66.75 ± 4.5), when the experimental groups were compared to their respective controls. Among the analyzed nucleoids of the fish exposed to BdWSF for 6 h, the most frequently damage were classified as class 1 and 2 while for 24 and 48 h, the most frequent comet classes were 0 and 1.

Occurrence of micronuclei and other erythrocyte nuclear alterations (ENA)

The types of nuclear alterations found and the frequency of their occurrence are shown in Table 5. The analyses showed that the frequencies of MN and any the erythrocyte nuclear alterations observed at the different experimental times, as well as the frequency of erythrocytic alterations (Fig. 27) did not showed significant differences between the groups exposed to BdWSF and their respective negative controls (Figure 27). Among the types of nuclear abnormalities, the most frequently found was the constriction nucleus followed by the segmented nucleus. Among the slides analyzed, the presence of micronucleus in erythrocytes was observed only at the 6 h exposure time.

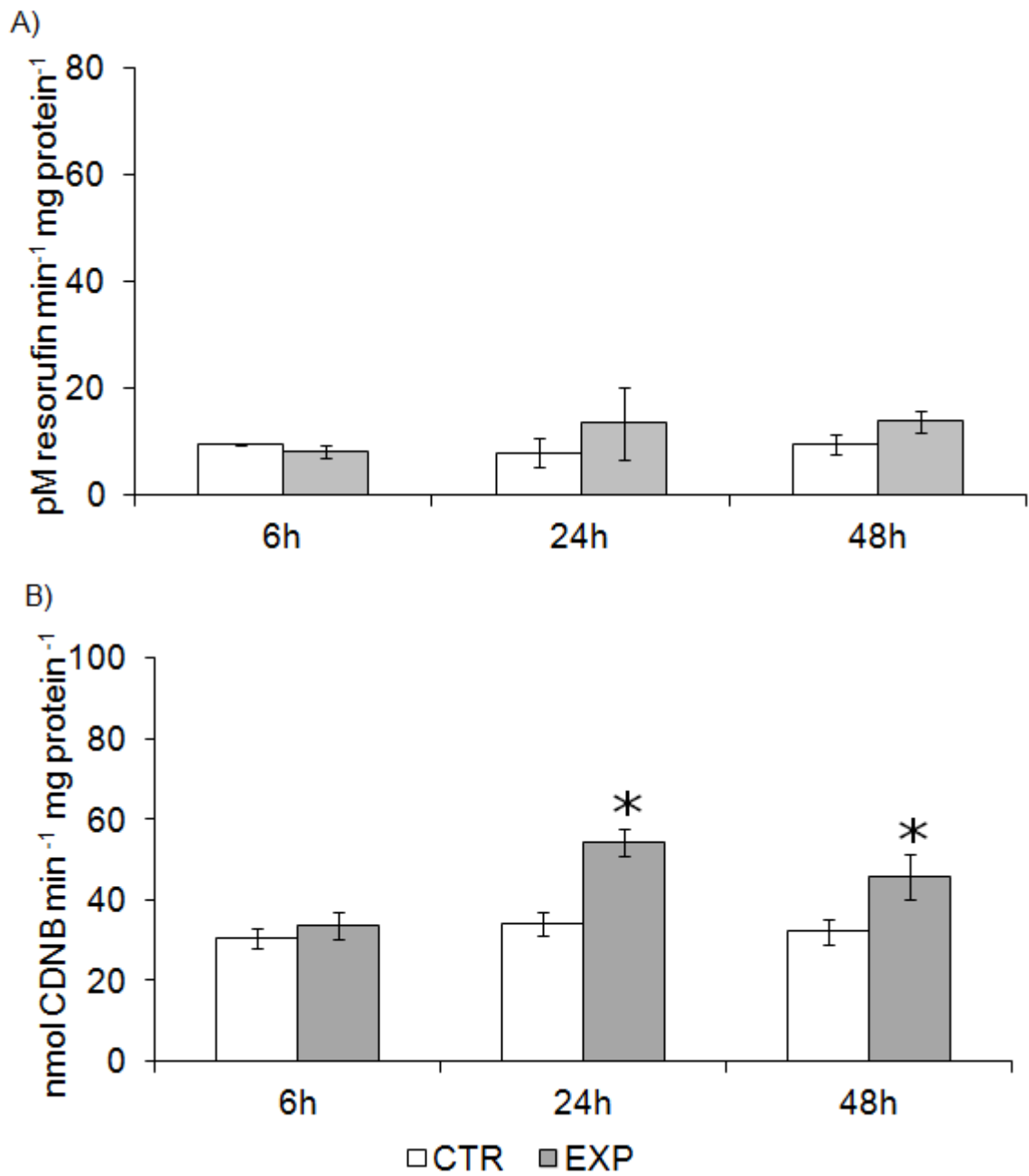


Fig. 21 Gill activity of (A) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and (B) glutathione S-transferase (GST) in *P. lineatus* exposed to BdWSF (EXP) or only water (CTR) for 6, 24 and 48 h. The columns represent the means and the vertical lines the standard errors. * indicate significant difference in relation to respective control ($P < 0.05$).

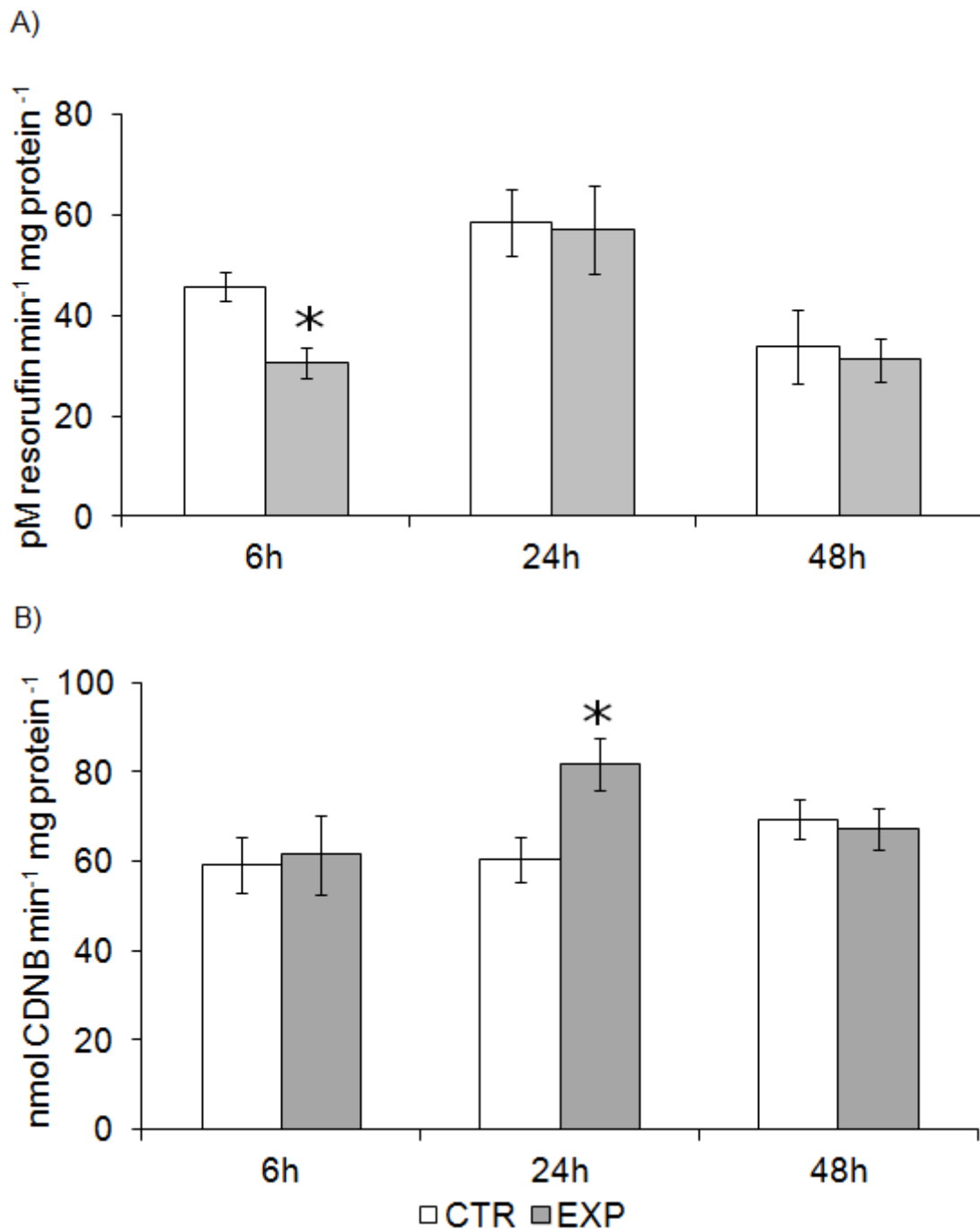


Fig. 22 Liver activity of (A) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and (B) glutathione S-transferase (GST) in *P. lineatus* exposed to BdWSF (EXP) or only water (CTR) for 6, 24 and 48 h. The columns represent the means and the vertical lines the standard errors. * indicate significant difference in relation to respective control ($P < 0.05$).

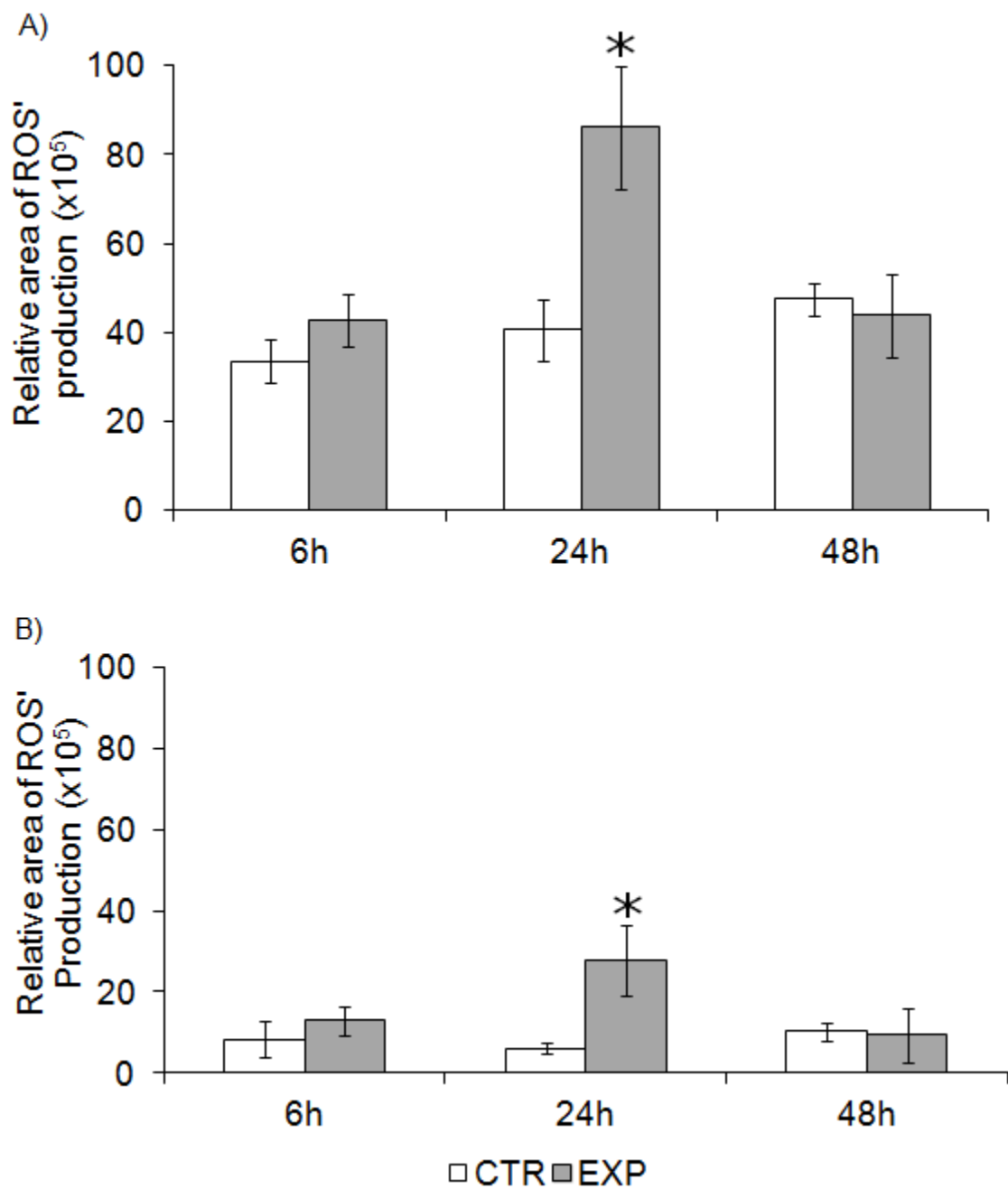


Fig.23 Generation of reactive oxygen species (ROS) in gills (A) and liver (B) of *P. lineatus* exposed to BdWSF (EXP) or only water (CTR) for 6, 24 and 48 h. The columns represent the means and the vertical lines the standard errors. * indicate significant difference in relation to respective control ($P < 0.05$).

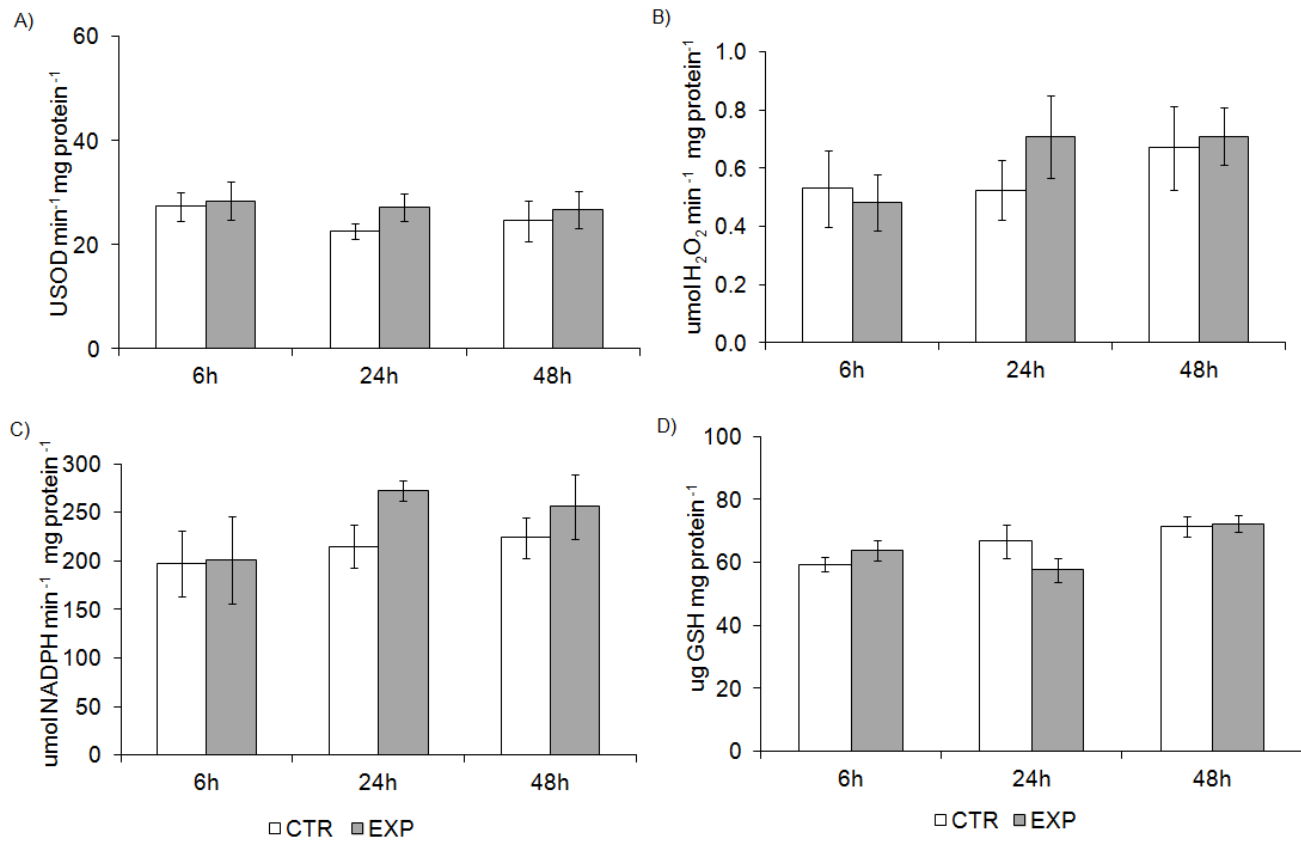


Fig. 24 Gill activities of (A) SOD, (B) CAT, (C) GPx and (D) gill GSH concentration in *P. lineatus* exposed to BdWSF (EXP) or only water (CTR) for 6, 24 and 48 h. The columns represent the means and the vertical lines the standard errors.

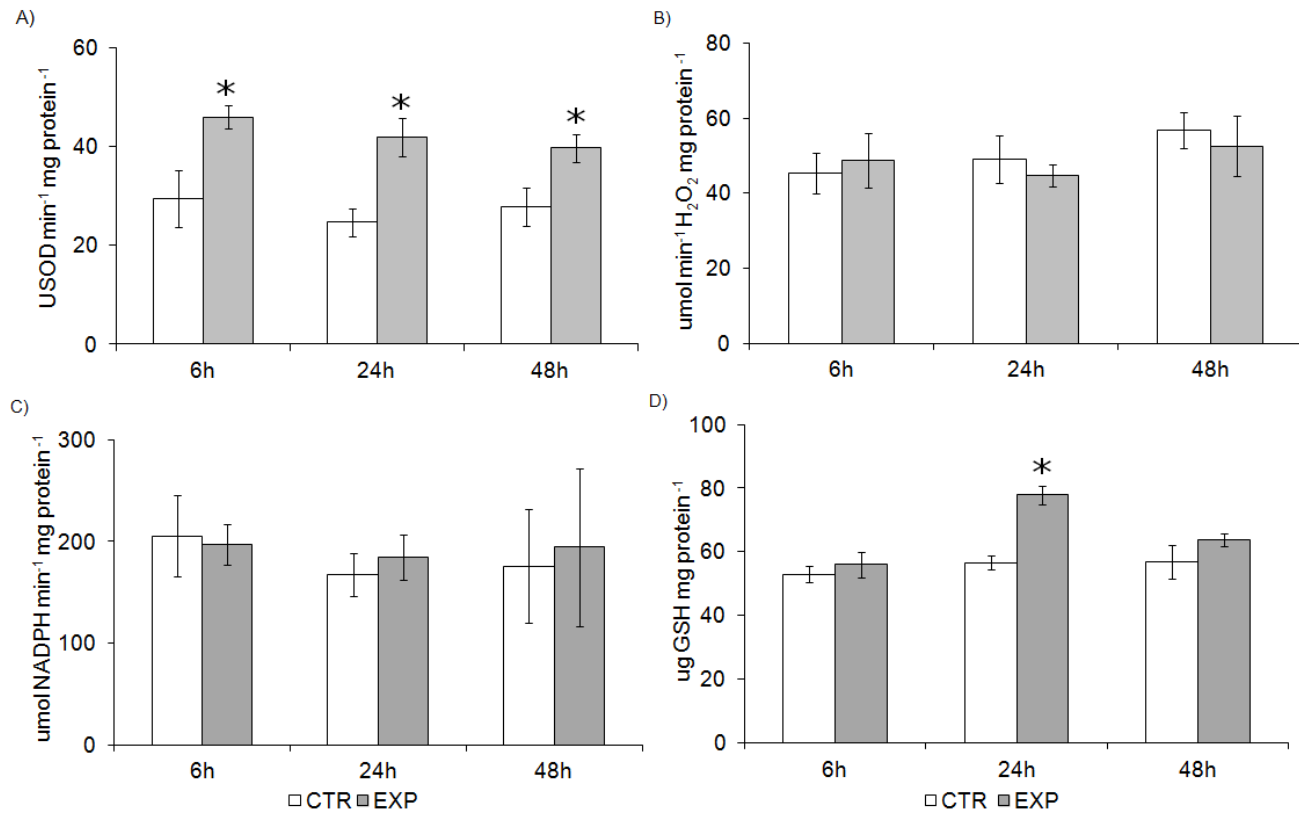


Fig. 25 Liver activities of (A) SOD, (B) CAT, (C) GPx and (D) liver GSH concentration in *P. lineatus* exposed to BdWSF (EXP) or only water (CTR) for 6, 24 and 48 h. The columns represent the means and the vertical lines the standard errors. * indicate significant difference in relation to respective control (P < 0.05).

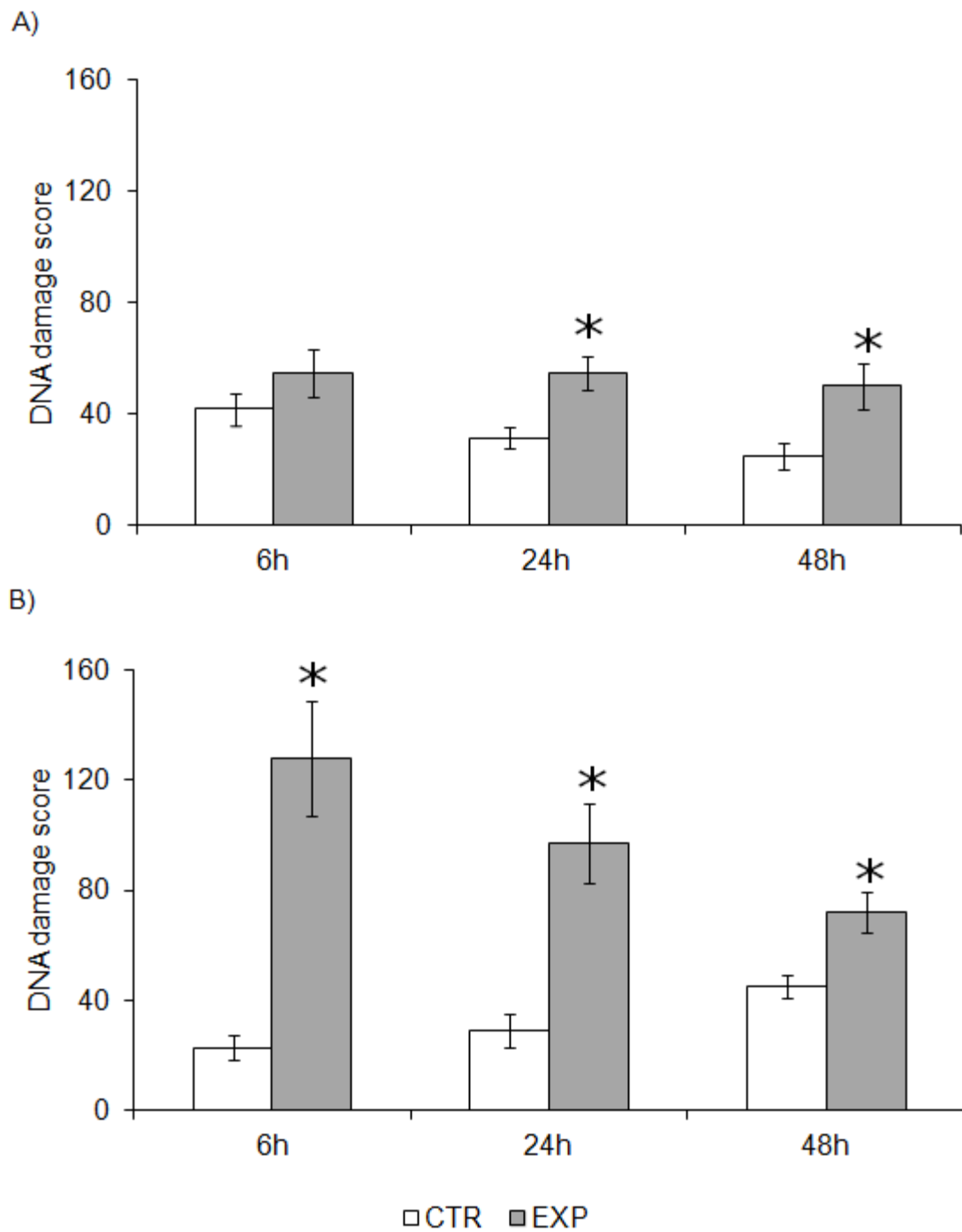


Fig.26 DNA damage score in (A) gills and (B) blood cells of *P. lineatus* exposed to BdWSF (EXP) or only water (CTR) for 6, 24 and 48 h. The columns represent the means and the vertical lines the standard errors. * indicate significant difference in relation to respective control ($P < 0.05$).

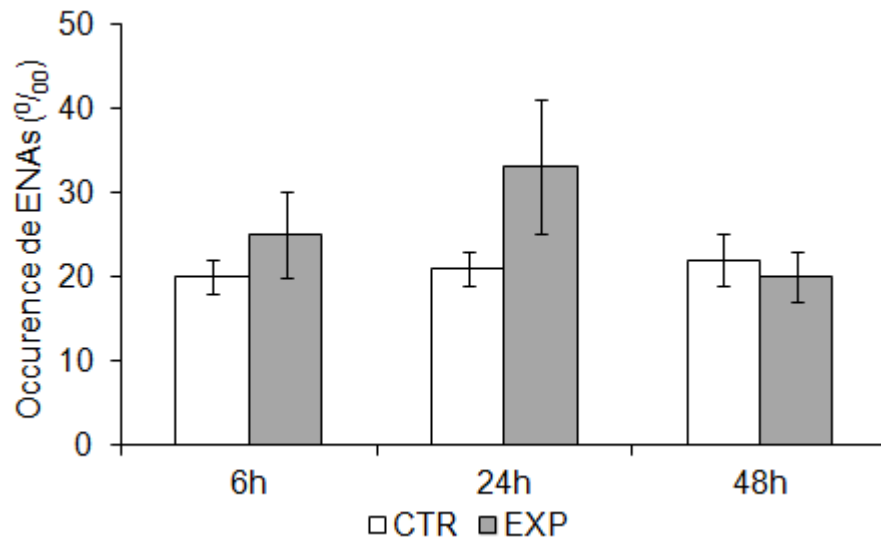


Fig .27 Frequency of ENA (constricted nuclei + segmented nuclei + lobed nuclei) in erythrocytes of *P. lineatus* exposed to BdWSF (EXP) or only water (CTR) for 6, 24 and 48 h. The columns represent the means and the vertical lines the standard errors.

Table 5 Frequencies of micronuclei, constricted nuclei, segmented nuclei and lobed nuclei in erythrocytes of *Prochilodus lineatus* exposed to BdWSF (EXP) or only water (CTR), taking into account the total number of fish (N) analyzed for each experimental period (6, 24 and 48 h). Three thousand erythrocytes were analyzed per fish and results are shown as mean \pm SE.

Nuclear alterations	Exposure time	Groups	N	Frequency of occurrence (mean \pm SE)	
Micronuclei	6h	CTR	7	0.14 \pm 0.14	
		EXP	8	0.12 \pm 0.12	
	24h	CTR	6	0.00 \pm 0.00	
		EXP	6	0.00 \pm 0.00	
	48h	CTR	6	0.00 \pm 0.00	
		EXP	5	0.00 \pm 0.00	
	Constricted nuclei	6h	CTR	7	14.1 \pm 2.00
			EXP	8	17.7 \pm 4.60
24h		CTR	6	15.5 \pm 1.60	
		EXP	6	22.3 \pm 5.40	
48h		CTR	6	19.3 \pm 3.00	
		EXP	5	17.4 \pm 3.30	
Segmented nuclei		6h	CTR	7	5.10 \pm 1.00
			EXP	8	4.00 \pm 0.70
	24h	CTR	6	5.70 \pm 1.40	
		EXP	6	8.10 \pm 2.70	
	48h	CTR	6	2.50 \pm 0.90	
		EXP	5	2.00 \pm 1.50	
	Lobed nuclei	6h	CTR	7	1.10 \pm 0.40
			EXP	8	0.50 \pm 0.30
24h		CTR	6	0.20 \pm 0.10	
		EXP	6	1.00 \pm 0.30	
48h		CTR	6	0.30 \pm 0.30	
		EXP	5	0.40 \pm 0.20	

Discussion

Biodiesel has been considered an ecological fuel, as it is considered to be biodegradable, less toxic than petroleum-derived fuels and it contributes to the reduction in CO₂ emission and to the decrease in global warming (Poon et al. 2007). However, these statements must be made with caution, as it is a relatively new compound in the market and little is known about the action of this fuel on the environment and how much harmful it is to the living organisms. Therefore, the objective of this work was to verify, through a series of biomarkers, whether this biofuel can cause impacts on the aquatic organisms, using as model a Neotropical freshwater fish. The biodiesel used in this paper was produced from the transesterification process using sunflower oil and ethanol. The choice for this type of biodiesel was due to the fact that in Brazil there is a tendency to use ethanol for the production of biofuels, although most of the world biodiesel is produced using methanol.

It was recently published in the scientific literature the first study reporting the effects of biodiesel using biochemical biomarkers in aquatic organisms (Nogueira et al., 2011). These authors exposed the fish *Oreochromis niloticus* to biodiesel for 2 or 7 days and found alterations in antioxidant (SOD) and biotransformation (GST) enzymes. The present study is then the second one using biochemical biomarkers in fish exposed to biodiesel and corroborates with the data found by the researchers above, also showing that biodiesel promotes biochemical changes in the fish *Prochilodus lineatus* and as thus can be hazardous to aquatic biota.

The tests carried out in this study were made with the soluble fraction of biodiesel (BdWSF). In the event of a spill or leak of biodiesel, besides the thick oil layer that stays on the water, some compounds can dissolve in the water and become available for the direct contact with the aquatic biota. However, studies quantifying the soluble compounds derived from biodiesel in water are scarce. Hollebone et al (2007), through the gas chromatographic analysis of the biodiesel water accommodated fraction (WAF), showed that the type of solute in the WAF varies, depending on the biodiesel production source. They also verified that amongst the components present in the WAF of the tested biodiesels there was no evidence of aromatic compounds, but the presence of alkanes ranging from C₂₆ to C₃₆. Thus, although not fully described, it can be inferred that there are compounds of biodiesel that are water soluble and can be available to aquatic organisms. Although the monitoring based on the physical and chemical characteristics of the water soluble compounds of biodiesel is

important, another way to evaluate its presence would be through the biological alterations that these compounds can cause to the living organisms. In this work, the possible biochemical and genetic effects related to the presence of soluble compounds from the soluble fraction of biodiesel in fish of the species *Prochilodus lineatus* were observed, indicating the presence of compounds in the fraction obtained after shaking the mixture biodiesel/water.

In this study, two important enzymes for the process of biotransformation were used: EROD (Ethoxyresorufin-O-Deethylase) and GST (Glutathione-S-Transferase), both enzymes are mostly used as biomarkers in fish, due to their suitable response in the presence of toxic substances. EROD is an enzyme that participates in phase I of the detoxification process and represents the catalytic activity of CYP1A, the class of isoenzymes of the cytochrome P450 family responsible for the biotransformation of a great variety of xenobiotics in fish. The measure of the EROD activity is a methodology commonly used to evaluate the induction of the CYP1A by contaminants (Van der oost et al 2003). Observing the results for the EROD activity in the two analyzed tissues, it was possible to notice a different response in the activity of this enzyme between them. In the gills, there were no significant alterations in the activity of the EROD at any experimental times, but in the liver tissue, there was a reduction in the activity of the EROD after 6 h exposure to BdWSF. With these results, it is possible to infer that BdWSF can act differently on the EROD activity, depending on the tissue analyzed.

GST showed an increased activity in the gills and livers of fish exposed to BdWSF. GST is an enzyme that participates in phase II of the detoxification process and is responsible for catalyzing the reaction of the xenobiotic conjugation in its original form or its metabolites with the tripeptide glutathione (GSH), generating xenobiotics more soluble and consequently less toxic in water (Van der Oost et al 2003). An increase in the concentration of GSH was also found in the liver of fish exposed to BdWSF for 24 h possibly because the GST enzyme needed more endogenous substrate, as its activity was increased and GSH biosynthesis was probably stimulated. Poon et al. (2007) evaluated the EROD and GSH activity in liver of male rats exposed by gavage to biodiesel from soy bean, five days a week for four weeks. These authors observed a significant increase in the activity of both enzymes tested. Thus, it is possible to suggest that compounds present in the BdWSF can stimulate enzyme GST in hepatocytes and gill cells of *P. lineatus*. Usually, xenobiotics, mainly those with lipophilic properties, are biotransformed by the reactions of phase I and II, but it is known that some xenobiotics have functional groups for direct metabolism by phase II enzymes (Parkinson and Ogilvie 2008). With the data found in this study, it is possible to infer that the compounds present in the BdWSF have functional groups that allow the conjugation to GSH by GST.

However, this statement can only be accurately made by means of a chemical analysis to detect the compounds present in the BdWSF.

Besides biotransformation enzymes, the capacity of a given contaminant to stimulate the production of reactive oxygen species has been used as a parameter to measure the toxicity of a pollutant in aquatic organisms (Livingstone 2001). The methodology used in this study using the DCFH compound has been frequently applied to measure ROS generation in cells (Rota et al 1999). The results obtained in this study indicate that the BdWSF stimulated ROS generation in the gill and liver of the fish. There are several mechanisms that might lead to an increase in the production of ROS in biological systems. One such mechanism would be the catabolism of chemicals and xenobiotics by cytochrome P450, which would lead to the production of ROS in the smooth endoplasmic reticulum (Lushchak 2010). However, this does not seem to be the case in this study, since the BdWSF did not cause any induction of CYP1A.

To deal directly with the production of ROS, there is a complex system of antioxidant defenses of enzymatic or non enzymatic nature (Hermes-Lima 2004). The key enzymes that are part of this antioxidant system are: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), all abundant in fish tissues (Lackner 1998). The results found in this study regarding the activity of antioxidant enzymes showed an expressive increase in SOD in the liver of the fish exposed to BdWSF at the three times of exposure. No increase in CAT and GPx activities was verified at any experimental condition in this study. With these results, it is possible to infer that the BdWSF stimulated the superoxide anion production which lead to an increase in the activity of SOD.

Another important biomarker for assessing the exposure to xenobiotics is the evaluation DNA damage (Halliwell and Gutteridge 2005, Jung et al 2011). The comet assay is a method widely used in genotoxic evaluations due to its sensitivity and rapidity in obtaining results. In this study, using the comet assay with erythrocytes of *P. lineatus*, it was found that the fish exposed BdWSF presented damage scores and frequency of nucleoid damages significantly higher when compared to respective controls for all the exposure times. These results showed that the BdWSF is genotoxic to fish. Higher DNA damage was found in the erythrocytes of fish exposed to BdWSF for 6 h, when compared to other exposure times. It is possible to infer that the reduction of the score of damage in the DNA of the fish exposed to BdWSF over time occurred due the action of the repair system of the fish acting on the DNA of the erythrocytes. Another explanation for this reduction is that the damaged cells have been removed from the spleen (Udroiu 2006). The results of the comet assay with gill cells showed

a significant increase in damage scores after 24 and 48 h exposure to BdWSF and there was no decrease in the frequency of DNA damages throughout the exposure time as occurred with the blood cells. This can be explained by the fact that the gill cells are continuously dividing and also because they are in direct contact with the contaminant in the aquatic environment (Al-Sabti and Metcalfe 1995). These lesions in fish DNA induced by BdWSF may result from oxidative damage caused by reactive oxygen species. It is important to remember that, in this study, the generation of ROS was evaluated and it was found that the BdWSF stimulated ROS production in the liver and gills of the fish only after 24 hours of exposure. This method was first described to measure the conversion of DCFH to DCF by the association of cellular peroxidase with H_2O_2 (Keston and Brandt 1965). However, it is known that the direct reaction with strong oxidizers, such as peroxyxynitrite, hypochloric acid, and hydroxyl radical can also perform this conversion (Hermes-Lima 2004). It is possible to suggest that one of the reactive oxygen species, which had its production stimulated, could also be the hydroxyl radical, which is a powerful oxidant of biomolecules, including the DNA (Keyer et al 1995). According to Leme et al (2012b), the genotoxic potential observed for BdWSF does not seem to be related to the biodiesel effects themselves, but to the presence of secondary contaminants in this biofuel resulting from the raw material source used in its production. Therefore, further studies must be carried out in order to corroborate the proposed hypothesis.

The Micronucleus Test (MN) is a methodology that has been widely used by many authors to evaluate mutagenic changes in different organisms, including fish (Al-Sabit and Metcalfe 1995). The absence of induction of micronuclei at the three experimental times tested in this work indicates that the sublethal concentration of 5% BdWSF used here was not mutagenic to *P. lineatus*. In the analyses of frequency of occurrence of other ENA accomplished in this work, no significant difference were found between the experimental groups and their respective controls after the three times of exposure. The occurrence of ENA was used in this study as these nuclear changes are being described as an indicator of cytogenetic damage in fish species (Ayllon and Garcia Vazquez 2001, Van Ngan et al 2007, Monteiro et al. 2011). Thus, the results of this study showed that studied FSBd no have potential for mutagenic and cytogenetic of *P. lineatus*.

Conclusions

In response to BdWSF exposure it was observed tissue-specific effects and that the liver showed to be more sensitive to BdWSF than the gills. As main conclusions of this study, it

can be stated that the BdWSF induced an increase in ROS production, caused the activation of the detoxification enzyme GST and of the antioxidant enzyme SOD, an increase in the concentration of the GSH, and produced DNA damages in gill cells and erythrocytes of *P. lineatus*. Based on these results, the assertion that biodiesel is an environmentally correct biofuel needs to be made with caution, as little is known about the action of this fuel on the environment and living organisms, especially on aquatic organisms. Thus, more studies are necessary to understand the biological effects caused by the soluble compounds present in biodiesel.

Acknowledgments

The authors thank the Hatchery Station of Universidade Estadual de Londrina for the supply the fish and the Technology Institute of Paraná (TECPAR) for the supply of Biodisel. This work is part of the PhD thesis of D.G.S.M. Cavalcante. CNPq, CAPES and Fundação Araucária provided financial support for this work. C.B.R. Martinez and M.A.Marin-Morales are research fellows from CNPq.

References

- ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (<http://www.anp.gov.br>)
- Al-Sabti K, Metcalfe C D (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res* 34:121-135
- Antolín G (2002) Optimization of Biodiesel Production by Sunflower Oil Transesterification. *BioresourceTechnol* 83:111-114
- Ayllon F, Garcia Vazquez E (2001) Micronucleus and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotox Environ Safe* 49:221-225
- Beutler E. *Red Cell Metabolism* (1975) A manual of biochemical methods. New York: Grune & Straton
- Beutler E, Durom O, Kelly B M (1963) Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61:882-890
- Bradford M (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Bunger J, Krahl J, Baum K, Schroeder O, Muller M, Westphal G, Ruhnau P, Schulz T G, Hallier E (2000a) Cytotoxic and mutagenic effects, particle size and concentration analysis of diesel engine emissions using biodiesel and petrol diesel as fuel. *Arch Toxicol* 74:490–498
- Bunger J, Muller M M, Krahl J, Baum K, Weigel A, Hallier E, Schulz T G (2000b) Mutagenicity of diesel exhaust particles from two fossil and two plant oil fuels. *Mutagenesis* 15:391–397
- Bunger J, Krahl J, Munack A, Ruschel Y, Schroder O, Emmert B, Westphal G, Muller M, Hallier E, Bruning T.(2007) Strong mutagenic effects of diesel engine emissions using vegetable oil as fuel. *Arch Toxicol* 81:599-603
- Carrasco K R, Tilbury K L, Myers M S (1990) Assessment of the piscine micronuclei test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat. Sci.* 47:2123-2136
- Cavalcante D G S M, Martinez C B R, Sofia S H (2008) Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat Res* 655: 41-46
- Eggens M L, Galgani F (1992) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: Fast determination within a fluorescence plate-reader. *Mar Environ Res* 33:213-221

- Ferreira-Cravo M, Piedras, F R, Moraes, T B, Ferreira, J L R, Freitas, D P S, Machado, M D, Geracitano, L A, Monserrat, J M (2007) Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). *Chemosphere* 66:1367-1374
- Finch G, Hobbs C H, Blair L, Barr E B, Hahn F F, Jaramillo R J, Kubatko J E, March T H, White R K, Krone J R, Ménache M G, Nikula K J, Mauderly J L, Van Gerpen J, Merceica M D, Zielinska B, Stankowski L, Burling K, Howell S (2002) Effects of subchronic inhalation exposure of rats to emissions from a diesel engine burning soybean oil-derived biodiesel fuel. *Inhal Toxicol* 14:1017–1048
- Gerpen J V (2005) Biodiesel processing and production. *Fuel Process Technol* 86:1097–1107
- Halliwell B, Gutteridge J M C (2005) *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press
- Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K B (ed.) *Functional metabolism: regulation and adaptation*. New York, John Wiley & Sons, Inc. pp 319-368
- Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S, Tiffany D (2006) Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *PNAS* 103: 11206-11210
- Hoftman R N, De Raat W K (1982) Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulfonate. *Mutat Res* 104:147-152.
- Hollebone B P B, Fieldhouse T C, Lumley M, Landirault K D, Jackman P (2007) Aqueous Solubility, Dispersibility and Toxicity of Biofuels. Environment Canada Arctic and Marine Oil Spill Program Technical Seminar (AMOP) Proceedings, pp 227-244
- Hopkins J, Tudhope G R (1973) Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Haematol.* 25: 563–575
- Jung D, Matson C, Collins L, Laban G, Stapleton H, Bickham J, Swenberg J, Di Giulio R (2011) Genotoxicity in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) from a PAH-contaminated Superfund site on the Elizabeth River, Virginia. *Ecotoxicology* 20: 1881-1889
- Keen J H, Habig W H, Jakobi W B (1976) Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *Biol Chem* 251: 6183-6188
- Keyer K, Gort A S, Imlay A (1995) Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 177: 6782-6790

- Keston A S, Brandt R (1965) The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 11: 1–5
- Kobayashi H, Suguyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T (1995) A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Commun.* 3:103–115
- Lackner R. (1998) Oxidative stress in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck T, Hinton D E, Streit B (eds). *Fish Ecotoxicology*. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland. 203 – 224
- Leme D M, Grummt T, Heinze R, Sehr A, Renz S, Reinel S, Oliveira D P, Ferraz E R A, Marchi M R R, Machado M C, Zocolo G.J, Marin-Morales M A (2012a) An overview of biodiesel soil pollution: data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. *J. Hazard Mater*, 199-200: 343-349
- Leme D M, Grummt T, Oliveira D P, Sehr A, Renz S, Reinel S, Ferraz E R A, Marchi M R R, Machado M C, Zocolo G J, Marin-Morales M A (2012b) Genotoxicity assessment of water soluble fractions of biodiesel and its diesel blends using the Salmonella assay and the in vitro MicroFlow kit (Litron) assay. *Chemosphere*, 88:512-520
- Lima P C R (2004) O biodiesel e a inclusão social. Consultoria Legislativa. Available at <http://www2.camara.gov.br/internet/publicacoes/>
- Livingstone D R (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 656–666
- Lushchak V I (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101:13–30
- Ma F, Hanna M A (1999) Biodiesel production: a review. *Bioresource Technol* 70: 1 – 15
- McCord J M, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *Biol Chem* 244: 6049 – 6055
- Monserrat J M, Geracitano L A, Bianchini A (2003) Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. *Comments Toxicol.* 9:55–269
- Monserrat J M, Martínez P E, Geracitano L A, Amado L L, Martins C M G, Pinho G L L, Chaves I S, Ferreira-Cravo M, Ventura-Lima J, Bianchini A (2007) Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.* 146C: 221–234
- Monteiro V, Cavalcante D G S M, Viléla M B F A, Sofia S H, Martinez C B R (2011) In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical fresh water fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat Toxicol.* 104: 291- 298

- Nogueira L, Sanches A L M, Silva D G H, Ferrizi V C, Moreira A B, Almeida E A (2011) Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. *Chemosphere* 85: 97 - 105
- Parkinson A, Ogilvie B W. (2008) Biotransformation of Xenobiotics in: Casarett and Doull's- Toxicology: The basic science of poisons (Klaassen CD ed), McGraw-Hill, Inc., New York City, NY.
- Poon R, Chu I, Valli V E, Graham L, Yagminas A, Hollebhone B, Rideout G, Fingas M (2007) Effects of three biodiesels and a low sulfur diesel in male rats – A pilot 4-week oral study. *Food Chem Toxicol* 45:1830- 1837
- Rota C, Chignell C F, Mason R P (1999) Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: Possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic Biol Med.* 27:873– 81
- Singh N P, McCoy M T, Tice, R R, Schneider E L (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184 – 191
- Udroiu I (2006) The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat Toxicol.* 79:201-204
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Phar* 13:57-149
- Van Ngan P, Gomes V, Passos M J A C R, Ussam K A, Campos D Y F, Rocha A J S, Pereira B A (2007) Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station “Comandante Ferraz,” King George Island. *Polar Biol* 30:209–217
- Varsho B J (1996a) Acute oral toxicity study of 100% REE in albino rats. WIL Research Laboratories, Inc. Ashland, OH, USA. Final Report (WIL-275003)
- Varsho, B.J. (1996b) Acute dermal toxicity study of 100% REE in albino rabbits. WIL Research Laboratories, Inc. Ashland, OH, USA. Final Report (WIL-275004)
- Vasudevan P T, Briggs M (2008) Biodiesel production: Current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biot* 35: 421-430

5.2 Manuscrito 2

Avaliação de biomarcadores bioquímicos e genéticos em peixes expostos a fração solúvel do biodiesel produzido por rota metílica

Dalita G. S. M. Cavalcante^{ab}, Maria A. Marin-Morales^b, Cláudia B. R. Martinez^{a*}

^aDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL) – Londrina, PR, Brasil

^b Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brasil

* Autor correspondente

Tel.: +55-43-33714650

Fax: 3371-4650

E-mail: cbueno@uel.br

RESUMO

O Biodiesel é um composto novo no mercado e a sua produção só tende a crescer pelo Brasil e pelo mundo. Devido à tendência ao aumento na utilização do biodiesel, é possível que eventuais vazamentos de biodiesel possam alcançar os rios e lagos, levando a contaminação do ambiente e dos organismos aquáticos. Assim, este trabalho teve como objetivos, identificar possíveis efeitos biológicos, através de biomarcadores genotóxicos e bioquímicos, que possam estar relacionados com a presença de biodiesel produzidos pela rota metílica, utilizando como organismo-teste o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Como resultados, foi encontrado que a fração solúvel do biodiesel produzida por rota metílica induziu um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, causou a ativação da enzima de desintoxicação glutatona-s-transferase (GST) e das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) no fígado, e produção de danos de DNA em células branquiais e eritrócitos de *P. Lineatus*. Sendo assim, é possível sugerir que alguns compostos do biodiesel podem se dissolver na água, tornando-se disponível para o contato direto com os organismos aquáticos, em especial, os peixes e causar prejuízos a esses organismos.

Palavras-chaves: biocombustível, *Prochilodus lineatus*, antioxidante, biotransformação, ensaio do cometa

1. INTRODUÇÃO

O Biodiesel é um composto relativamente novo no mercado e a sua produção só tende a crescer pelo Brasil e pelo mundo, pois trata - se de uma fonte de energia renovável, biodegradável e que contribui com a diminuição da emissão de gases de efeito estufa (POON et al, 2007). O biodiesel tem constituição diversificada, dependente da matéria prima utilizada na sua produção, do processo de fabricação e da própria composição do biodiesel. Então, uma vez que o biodiesel pode conter contaminantes diferentes em sua composição, à toxicidade e os possíveis efeitos dos diferentes tipos de biodieseis sobre os organismos vivos também podem ser diferentes. Entre os contaminantes do biodiesel, pode - se citar o álcool empregado durante a reação de transesterificação para a produção de biodiesel, que pode ser o metanol ou o etanol. A experiência internacional indica uma tendência à adoção da transesterificação com a utilização do metanol (rota metílica), mas no Brasil, devido a produção em larga escala de etanol, a tendência é pela utilização de etanol na produção de biodiesel (PRATES et al., 2007).

A contaminação dos organismos aquáticos por esse biocombustível pode acontecer devido a eventuais vazamentos de biodiesel, a partir de seu armazenamento ou durante o seu transporte por caminhões-tanque, alcançando os lençóis freáticos ou os corpos de água, como rios e lagos. Pela carência de dados relacionados aos efeitos do biodiesel a espécies aquáticas, estudos experimentais sobre o impacto de concentrações ambientalmente realistas desse biocombustível nos ecossistemas aquáticos se tornam extremamente necessários e urgentes. Entre os animais aquáticos, os peixes estão sendo escolhidos como bioindicadores, devido à posição chave que esses organismos ocupam na cadeia trófica e também devido ao seu elevado valor comercial (VIARENGO et al., 2007). Entretanto, poucas espécies nativas de peixes têm sido utilizadas em testes de toxicidade no Brasil e assim, pouco se sabe sobre a sensibilidade das espécies de peixes neotropicais a diversas classes de poluentes em ecossistemas tropicais de água doce (MARTINEZ et al., 2004). A espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847), conhecida popularmente como curimba, constitui uma espécie bioindicadora em potencial, pois sua distribuição está restrita a locais pouco impactados e possui uma biologia bem conhecida.

Na literatura científica atual é possível verificar que trabalhos que relacionam a toxicidade do biodiesel para organismos aquáticos ainda são poucos (HOLLEBONE et al, 2007; KHAN et al.,2007; LEITE et al., 2011). Estudos utilizando biomarcadores bioquímicos/genéticos para avaliar os efeitos do biodiesel em organismos aquáticos, em

especial peixes, estão se iniciando (NOGUEIRA et al, 2011). Desse modo, estudos experimentais sobre os possíveis efeitos do biodiesel ou de seus subprodutos, nos organismos aquáticos são importantes. Entre os parâmetros bioquímicos que estão sendo usados como biomarcadores em espécies aquáticas, para sinalizar as mudanças associadas à presença de contaminantes, podem ser citados parâmetros bioquímicas, como respostas antioxidantes, indicadores de estresse oxidativo e enzimas de biotransformação (MONSERRAT et al., 2003; 2007, VAN DER OOST et al., 2003). Os biomarcadores têm sido sugeridos por décadas para serem incluídos como ferramentas práticas para a gestão ambiental, mas a sua inclusão não foi aceita universalmente por causa de um número de perguntas não respondidas sobre a sua sensibilidade, praticidade e reprodutibilidade. Porém, lentamente, está sendo mostrado que os biomarcadores podem ser incorporados com sucesso, no âmbito dos quadros de avaliação de risco ambiental (HAGGER et al.,2006).

Cavalcante et al, 2012 mostraram que o biodiesel produzido por rota etílica promoveu alterações bioquímicas e efeitos genotóxicos em *P.lineatus* e, portanto, pode ser perigoso para a biota aquática. Já este trabalho teve como objetivo identificar possíveis efeitos biológicos, que possam estar relacionados com a presença de biodiesel, produzido pela rota metílica, utilizando o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, além de sugerir biomarcadores que possam ser utilizados como ferramentas de avaliação de risco, para auxiliar na tomada de decisões no caso de impactos ambientais causados por derrames de biodiesel.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Organismo-teste

Espécimes juvenis de *P. lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), com peso de $12,4g \pm 1,3$ (média \pm EP, n = 104), foram fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná. Antes dos testes de toxicidade, os peixes foram aclimatados às condições de laboratório por um mínimo sete dias em um tanque de 300 L com água desclorada. Os parâmetros físico-químicos da água (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade) foram constantemente monitorados. Durante este período, os peixes foram alimentados com ração a cada 48 h. A alimentação foi suspensa 48 h antes da realização dos experimentos e durante os testes.

2.2 Preparo da fração solúvel do biodiesel (FSBd)

O biodiesel utilizado para os experimentos foi produzido a partir do óleo de girassol, por meio de rota metálica. Relatório de padrão de qualidade enviado pelo fornecedor, mostrou que as análises visuais realizadas em amostras deste biocombustível determinaram que seu aspecto era límpido e isento de impurezas. Nas amostras também foram detectadas a presença de mono, di e triglicerídeos e glicerina total em quantidades aceitáveis, segundo a especificação da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Para a obtenção da fração solúvel do biodiesel, a mistura biodiesel e água (1:1) permaneceu em agitação constante por 24 h. Após esse período, o sobrenadante, correspondente a fração insolúvel foi descartada e a fração do biodiesel solúvel em água (FSBd) foi coletada e armazenada em recipientes translúcidos, em câmara fria, até o momento dos experimentos. O tempo de armazenamento da FSBd sobre refrigeração nunca ultrapassou 72 h. Para cada grupo experimental, a FSBd foi diluída para 5% com água desclorada e distribuída em aquários com capacidade de 100 L.

2.3 Testes de toxicidade e amostragem

Após a aclimação, os peixes foram transferidos para aquários de vidro de 100L (8 peixes por aquário) contendo apenas água (grupo CTR) ou FSBd diluída para 5% (grupo EXP), para serem expostos por 6, 24 e 48 h. Para cada tempo experimental foram realizados experimentos independentes com réplicas. Após cada tempo de exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína para coleta de sangue, pela veia caudal. O sangue coletado foi utilizado para a realização dos ensaios do cometa e para análise da ocorrência de micronúcleo (MN) e outras alterações eritrocíticas nucleares (AEN). Em seguida os animais foram sacrificados por secção medular para a remoção das brânquias e do fígado. Parte dos arcos branquiais foram usados no ensaio do cometa, o restante das brânquias e o fígado foram divididos em duas partes, uma parte foi armazenada em ultrafreezer (-80°C), para as análises bioquímicas, e a outra parte foi armazenada em gelo, para a determinação da produção de ERO, que foi realizada com o tecido fresco, no mesmo dia da amostragem.⁷

2.4 Determinação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A metodologia para a determinação de ERO em tecidos foi baseada no protocolo de Ferreira- Cravo et al (2007), com modificações. Para as medidas, as brânquias (1:5 – p/v) e os fígados (1:10 – p/v) foram homogeneizados em tampão contendo Tris-HCl (100 mM, pH

7,75), EDTA (2 mM) e Mg^{2+} (5 mM). Os homogeneizados foram centrifugados a 10000 g durante 20 min a 4°C e os sobrenadantes resultantes da centrifugação foram usados na análise. A concentração de de proteína total desses sobrenadantes foi determinada por meio de método de Bradford (1976) em 595nm. As amostras de brânquia e fígado foram diluídas para 2 e 4 mg of proteína.mL⁻¹ com o mesmo tampão usado para a homogeneização. O 2',7'-diclorodihidro-fluoresceína (DCFH₂) foi adicionado às amostras e a produção de ERO foi determinada por meio de ensaio de fluorescência, através da produção do composto fluorescente 2',7' - dicloro-fluoresceína (DCF), a partir da oxidação do DCFH₂, usando excitação de 485 nm e emissão de 520 nm, em fluorímetro de microplacas. A formação da ERO foi monitorada por 30 minutos, com leituras a cada 5 minutos. A produção de ERO foi calculada a partir da relação das unidades de fluorescência (UF) ao longo do tempo, após os dados da UF serem ajustados para uma função polinomial de segunda ordem e os resultados foram expressos como a área de UF × min.

2.5 Análises bioquímicas

As amostras de fígado e brânquias foram descongeladas e homogeneizadas com o auxílio do homogeneizador de tecidos em solução tampão fosfato de potássio gelada (0,1 M, pH 7,0). Os homogeneizados foram centrifugados durante 20 min a 14700g (4°C) para obter o sobrenadante para ensaios bioquímicos. A indução da CYP1A foi determinada pela análise da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) através do método adaptado de Eggens e Galgani (1992). A atividade da EROD foi expressa em pmol de resorufina.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, baseada em curva padrão de resorufina, a 530 nm. A atividade glutational-S-transferase (GST) foi determinada como descrito por Keen et al (1976) utilizando o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A alteração na absorvância foi registrada em 340 nm e a atividade da enzima foi expressa em nM CDNB conjugado formado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. A atividade da superóxido dismutase total (SOD) foi medida através da taxa de inibição da redução do citocromo c pelo radical superóxido, gerado pelo sistema xantina oxidase/xantina a 550 nm a 25°C, de acordo com McCord e Fridovich (1969). Os valores para a atividade da SOD foram expressos em unidade de SOD.min⁻¹.mg de proteína⁻¹; onde uma unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima necessária para produzir inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c. A atividade da catalase (CAT) foi estimada a partir da taxa de consumo de peróxido de hidrogênio (BEUTLER, 1975). A alteração na absorvância foi registrada a 240 nm e a atividade da enzima foi expressa como H₂O₂

consumido. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$. A atividade da glutathiona peroxidase selênio-dependente (GPx) foi medida de acordo com Hopkins e Tudhope (1973). A formação de glutathiona oxidada foi monitorizada por meio da diminuição na concentração de NADPH, em 340 nm a 25°C. A atividade da GPx foi expressa em mmol NADPH oxidado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$. A concentração de GSH foi determinada de acordo com o método de Beutler e colaboradores (1963), no qual a glutathiona reage com o DTNB, formando um tiolato de cor amarelada, mensurável em 412nm. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando-se como padrão protéico a albumina bovina sérica.

2.6 Análises genotóxicas

Para o ensaio do cometa, um volume de 10 μL do sangue coletado dos peixes foi transferido para um tubo de microcentrífuga contendo 700 μL de PBS (NaCl 126,6 mM, KCL 4,8 mM, CaCl 1,5 mM, NaHCO_3 3,7 mM, Na_2HPO_4 8,9 mM, NaH_2PO_4 2,9 mM) e mantido em gelo. A metodologia para a obtenção da suspensão de células brânquias foi baseada em protocolo descrito por Kilemade et al. (2004), com modificações. Os filamentos foram picotados com o auxílio de lâminas de aço, sobre uma placa de cera e o macerado resultante foi colocado em um tubo de microcentrífuga. Para a dissociação das células, foram adicionados 200 μL de tripsina a 0,05% (0,05 gramas de tripsina em pó + 100 mL de H_2O + 0,5 mL de EDTA 0,5 M), à temperatura ambiente, sendo homogeneizados manualmente por inversão periódica. Após 15 minutos, no mesmo tubo foram acrescidos 200 μL de soro bovino fetal e o tubo foi novamente gentilmente homogeneizado. Após 15 minutos, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o homogeneizado foi coletado e filtrado, para a obtenção da suspensão celular branquial. A metodologia empregada no ensaio alcalino do cometa foi baseada no protocolo de Singh et al. (1988), com algumas modificações. Foram confeccionadas duas lâminas por animal, sendo analisados um total de 100 nucleóides por animal. De acordo com Kobayashi et al. (1995), os danos no DNA foram classificadas visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA em quatro classes: 0: nucleóide sem cauda com poucos fragmentos ao redor; 1: uma pequena cauda menor que o diâmetro do núcleo; 2: um comprimento de cauda de 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo; 3: um comprimento da cauda > duas vezes o diâmetro do núcleo. O escore de cada tratamento foi verificado multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe de dano pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3), variando de um mínimo de 0 e um valor máximo de 300. Os

resultados foram expressos pela média do escore de dano de DNA para cada grupo de tratamento, para cada período de exposição.

O teste do micronúcleo foi realizado de acordo com a metodologia de Hooftman e Raat (1982). Para os testes do micronúcleo e análise da ocorrência de outras alterações eritrocíticas nucleares (AENs), foram feitos esfregaços sanguíneos, a partir de uma alíquota de 5 μ L de sangue dos peixes, e foram confeccionadas duas lâminas por animal. Após secagem por 24 horas em temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 min e coradas com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8 (0,06 M Na_2HPO_4 , 0,06 M KH_2PO_4), durante 20 minutos. Por fim, após lavagem com água destilada e secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram preparadas para o uso permanente. A análise citológica das lâminas foi realizada em microscópio de luz, na objetiva de 100x. Para cada animal foram analisados 3000 eritrócitos, anotando-se as frequências de micronúcleos e também a presença de alterações morfológicas nos núcleos das células. Ambas as lâminas foram codificadas para se evitar uma análise tendenciosa. A classificação das demais alterações eritrocíticas nucleares (AENs) foram baseadas em Carrasco et al. (1990) sendo: núcleo segmentado onde o núcleo apresenta – se dividido em 2 lóbulos, de tamanhos diferentes (NS), núcleo lobulado (NL), onde o núcleo apresenta – se dividido em 2 lóbulos, de tamanhos similares, e núcleo com constrição ou em “forma de rim”, onde o núcleo apresenta-se com uma evaginação, sem o núcleo ser dividido em lobulos (NR).

2.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos para o grupo EXP, em cada período experimental, foram comparados com o grupo CTR respectivo, utilizando o teste paramétrico *t de Student* ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade da variância). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados são expressos como média \pm SE (erro padrão).

3. RESULTADOS

3.1 Parâmetros físico-químicos de água e mortalidade de peixes

Os resultados encontrados durante o monitoramento dos parâmetros físico-químicas da água durante os experimentos foram: temperatura ($20,3 \pm 2,1$), oxigênio dissolvido ($8,05 \pm 1,06$), pH ($6,9 \pm 1,7$) e condutividade ($107 \pm 3,7$). Durante os experimentos, a mortalidade média dos animais foi de 5%.

3.2 Fígado

3.2.1 Enzimas de biotransformação

As atividade da enzima EROD (Fig. 28A) no fígado dos peixes expostos a FSBd (EXP) não se mostrou significativamente alterada, quando comparado com o seu respectivo controle (CTR), em nenhum tempo experimental. Já a GST se mostrou aumentada em 24 e 48 h nos peixes expostos a FSBd (EXP), quando comparado com o seu respectivo controle (CTR) (Fig. 28 B).

3.2.2 Determinação de ERO

A produção de ERO no fígado dos animais expostos à FSBd (EXP) foi significativamente maior em relação ao respectivo controle (CTR) somente no tempo de 24 horas (Fig.29).

3.2.3 Enzimas Antioxidantes

No fígado, a atividade da SOD (Fig. 30A) se mostrou aumentada para os animais expostos a FSBd (EXP), em relação aos animais controle (CTR), nos tempos experimentais de 24 e 48h. A atividade da CAT (Fig. 30B) se mostrou aumentada para os animais expostos a FSBd (CTR), em relação aos animais controle (CTR), no tempo experimental de 24 h. A atividade da GPx (Fig. 31A) se mostrou aumentada nos animais expostos a FSBd (EXP), em relação aos animais controle (CTR), no tempo experimental de 24 h. Não foram observadas

alterações significativas na concentração de GSH hepática nos animais EXP, em relação aos seus respectivos CTR, nos 3 tempos experimentais (Fig. 31B).

3.3 Brânquias

3.3.1 Enzimas de biotransformação

Tanto a atividade da enzima EROD (Fig.32A), quanto à atividade da GST (Fig. 32B) nas brânquias dos peixes expostos a FSBd (EXP) não se mostraram significativamente alteradas, quando comparadas com os seus respectivos controles (CTR), em nenhum tempo experimental analisado.

3.3.2 Determinação de ERO

A produção de ERO nas brânquias (Fig. 33) dos animais expostos ao FSBd (EXP) não variou significativamente em relação ao seu respectivo controle (CTR), em nenhum tempo experimental.

3.3.3 Enzimas Antioxidantes

Nas brânquias, a atividade das enzimas SOD (Fig. 34A), CAT (Fig.34B) e GPx (Fig. 35A) dos peixes expostos a FSBd não se mostraram significativamente alteradas quando comparadas com os seus respectivos controles, para nenhum tempo experimental analisado. A concentração de GSH branquial também não se mostrou alterada nos peixes expostos a FSBd (EXP) em comparação aos animais controle (CTR), em nenhum tempo experimental (Fig. 35B).

3.3.4 Danos no DNA

Os resultados do ensaio do cometa realizado com células branquiais (Fig. 36) mostraram que para o tempo de 6 horas de exposição não houve diferença significativa na média de escore de danos entre o grupo experimental (EXP), com seu respectivo controle (CTR). Já para os tempos de 24 horas e 48 horas de exposição, os escores de danos nos peixes

expostos a FSBd (EXP), mostraram-se significativamente superiores, em relação aos seus respectivos controles (CTR).

3.4 Eritrócitos

3.4.1 Danos no DNA

O teste do cometa realizado com eritrócitos mostrou, para todos os tempos experimentais, que os escores de danos no DNA dos grupos experimentais (EXP) foram significativamente maiores, quando comparados com seus respectivos controles (CTR) (Fig. 37A). Para o teste do MN (dados não mostrados) e das AENs, as análises mostraram que as frequências de ocorrência de MN e de AENs, obtidas nos diferentes tempos experimentais, não diferiram estatisticamente entre os grupos FSBd (EXP) e seus respectivos controles (CTR) (Figura 37B).

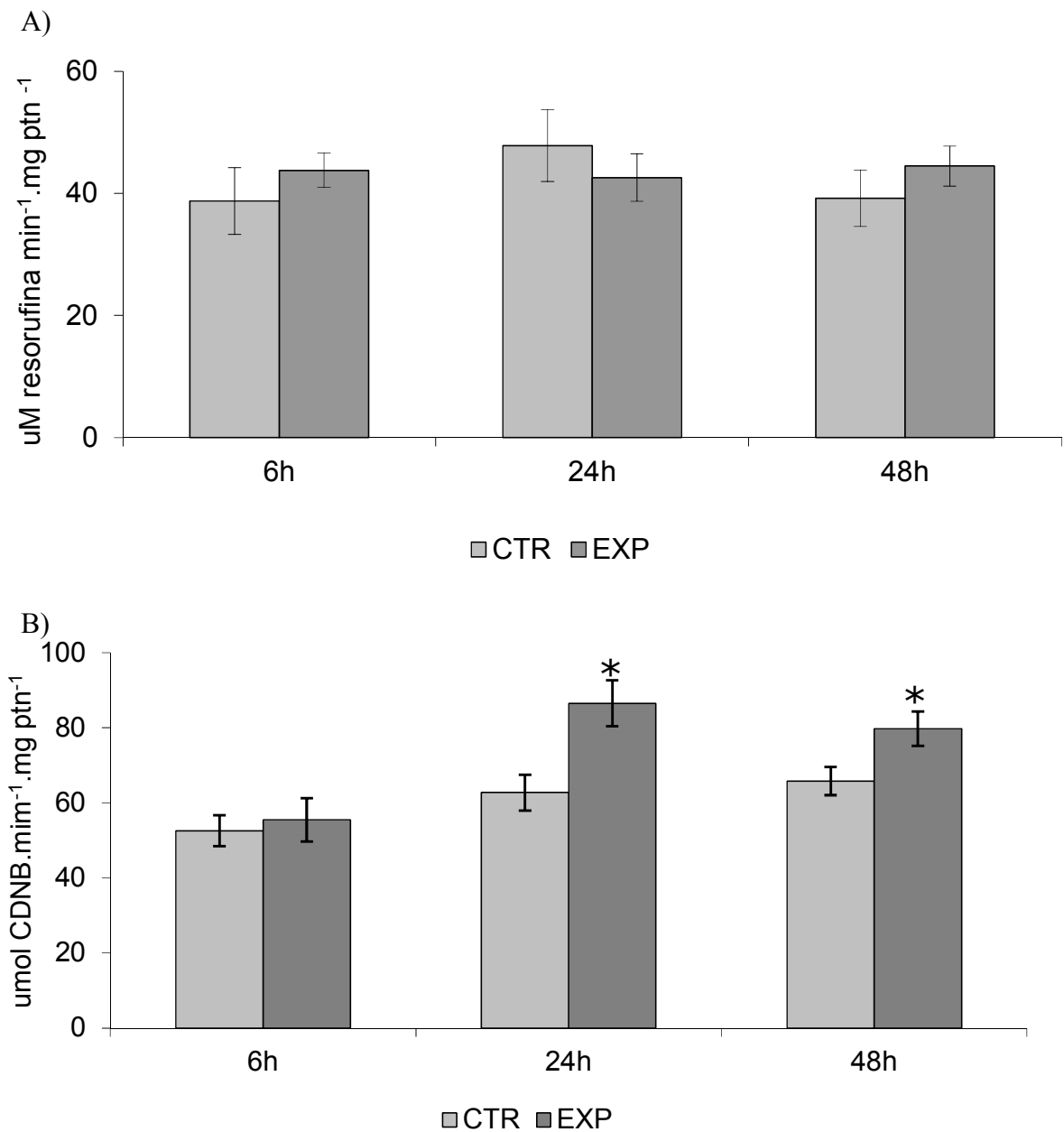


Figura 28 - Atividade da EROD (A) e da GST (B) no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do biodiesel (EXP) ou somente a água (CTR), durante 6, 24 e 48 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão. *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$).

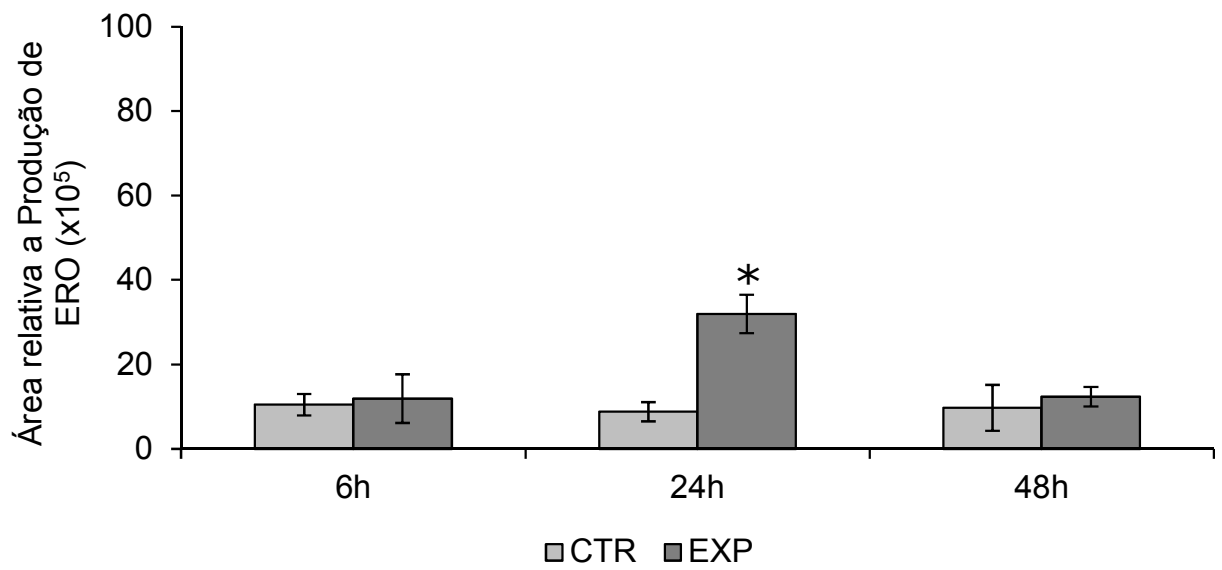


Figura 29 – Produção de ERO no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do biodiesel (EXP) ou somente a água (CTR), durante 6, 24 e 48 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão. *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$).

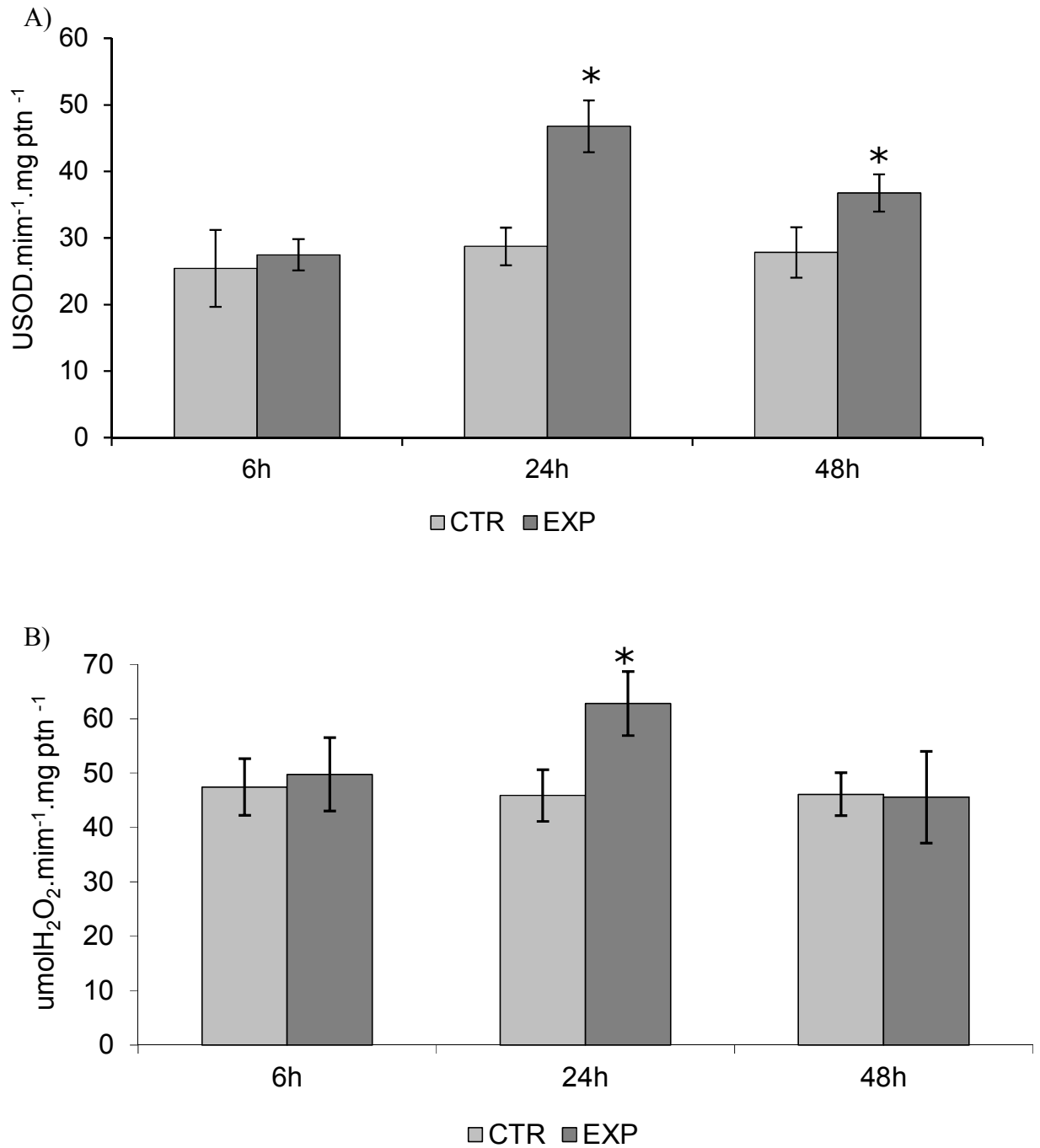


Figura 30 - Atividade da SOD (A) e da CAT (B) no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do biodiesel (EXP) ou somente a água (CTR), durante 6, 24 e 48 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão. *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$).

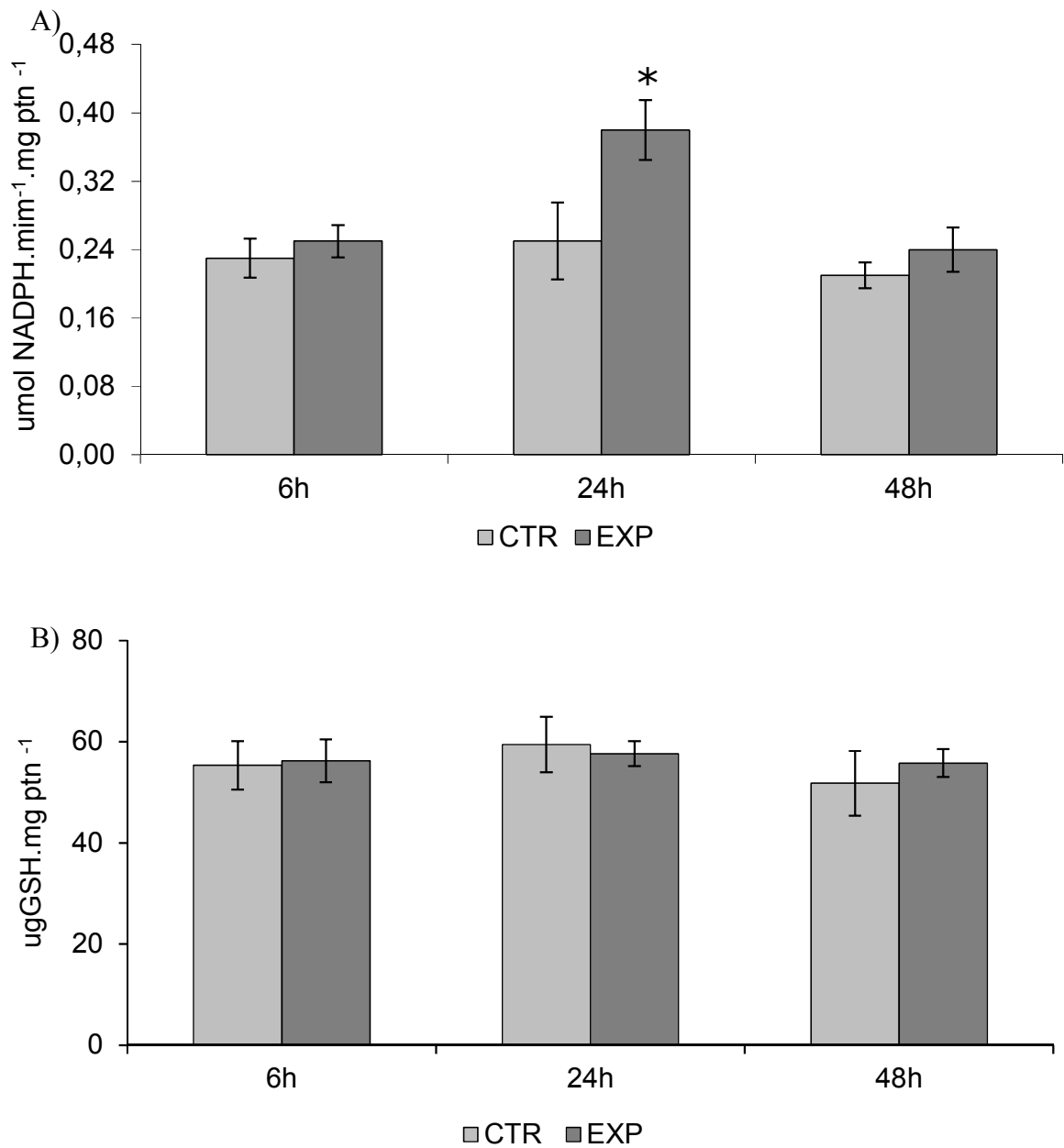


Figura 31 - Atividade da GPx (A) e concentração de GSH (B) no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do biodiesel (EXP) ou somente a água (CTR), durante 6, 24 e 48 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$).

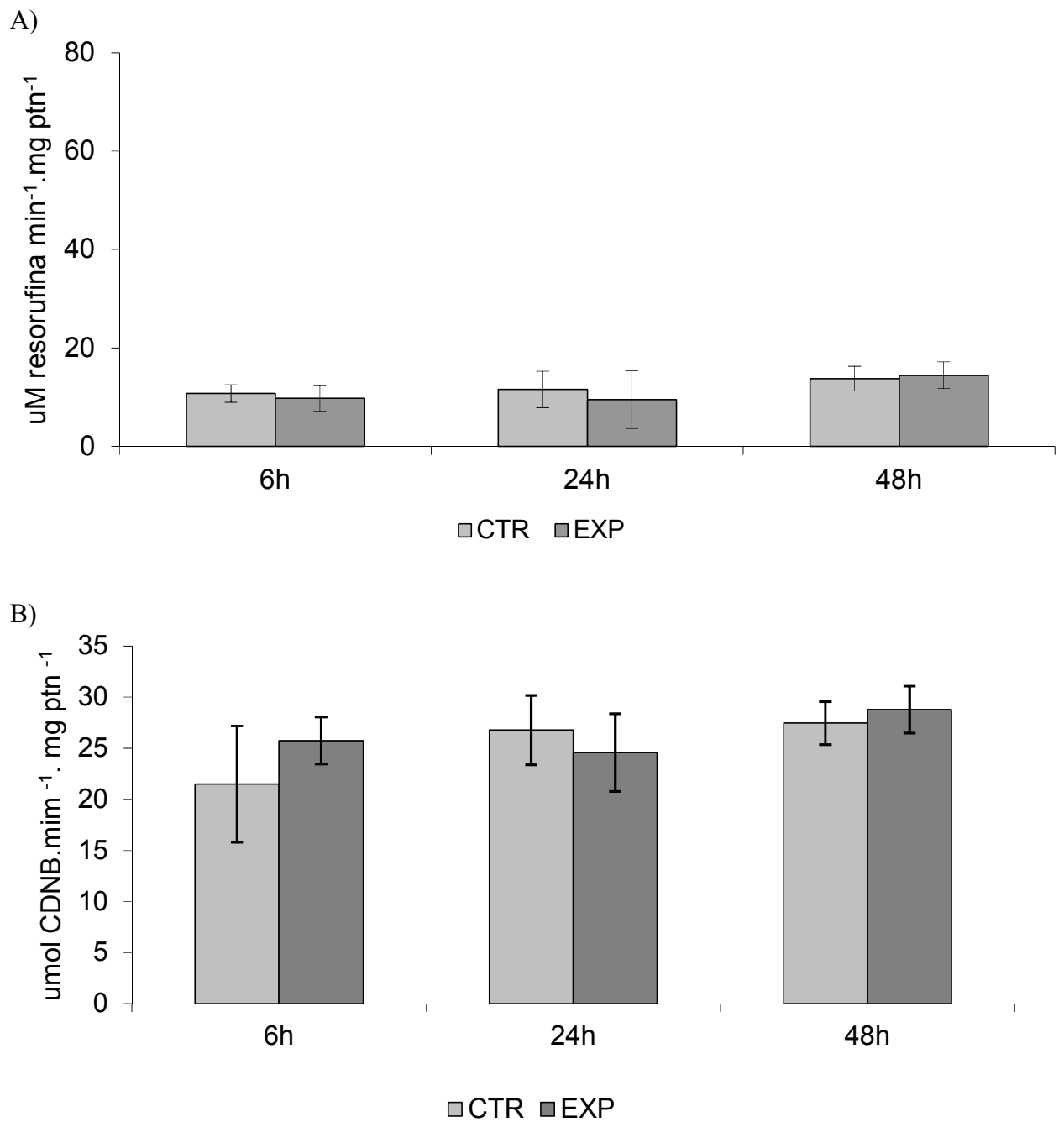


Figura 32 - Atividade da EROD (A) e da GST (B) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do biodiesel (EXP) ou somente a água (CTR), durante 6, 24 e 48 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$).

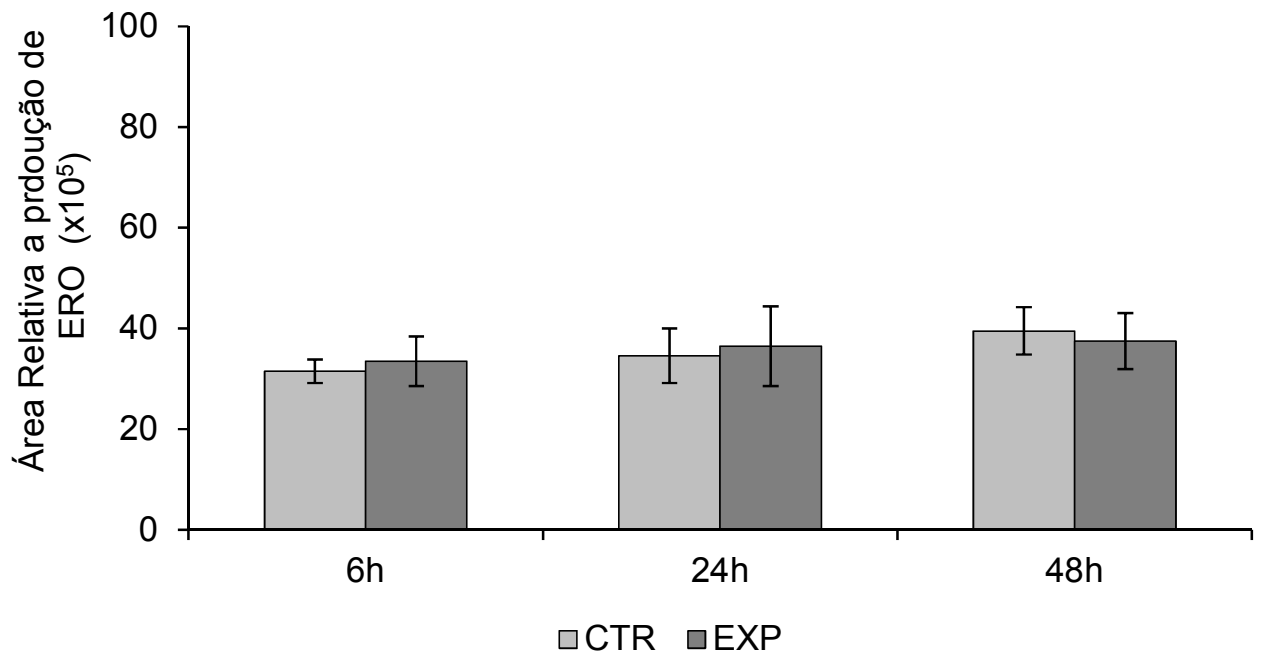


Figura 33 – Produção de ERO nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do biodiesel (EXP) ou somente a água (CTR), durante 6, 24 e 48 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão.

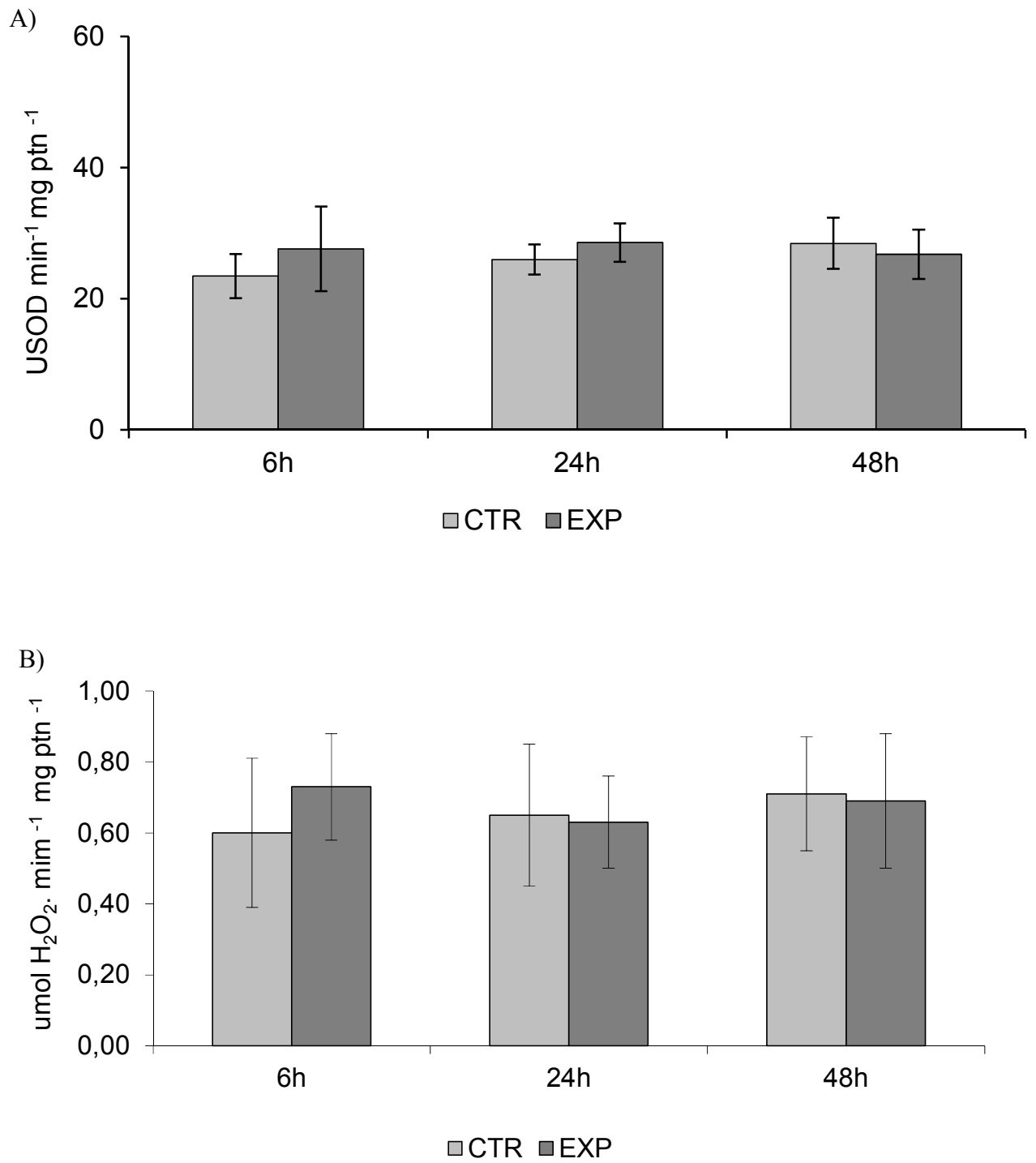


Figura 34 - Atividade da SOD (A) e da CAT (B) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do biodiesel (EXP) ou somente a água (CTR), durante 6, 24 e 48 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão

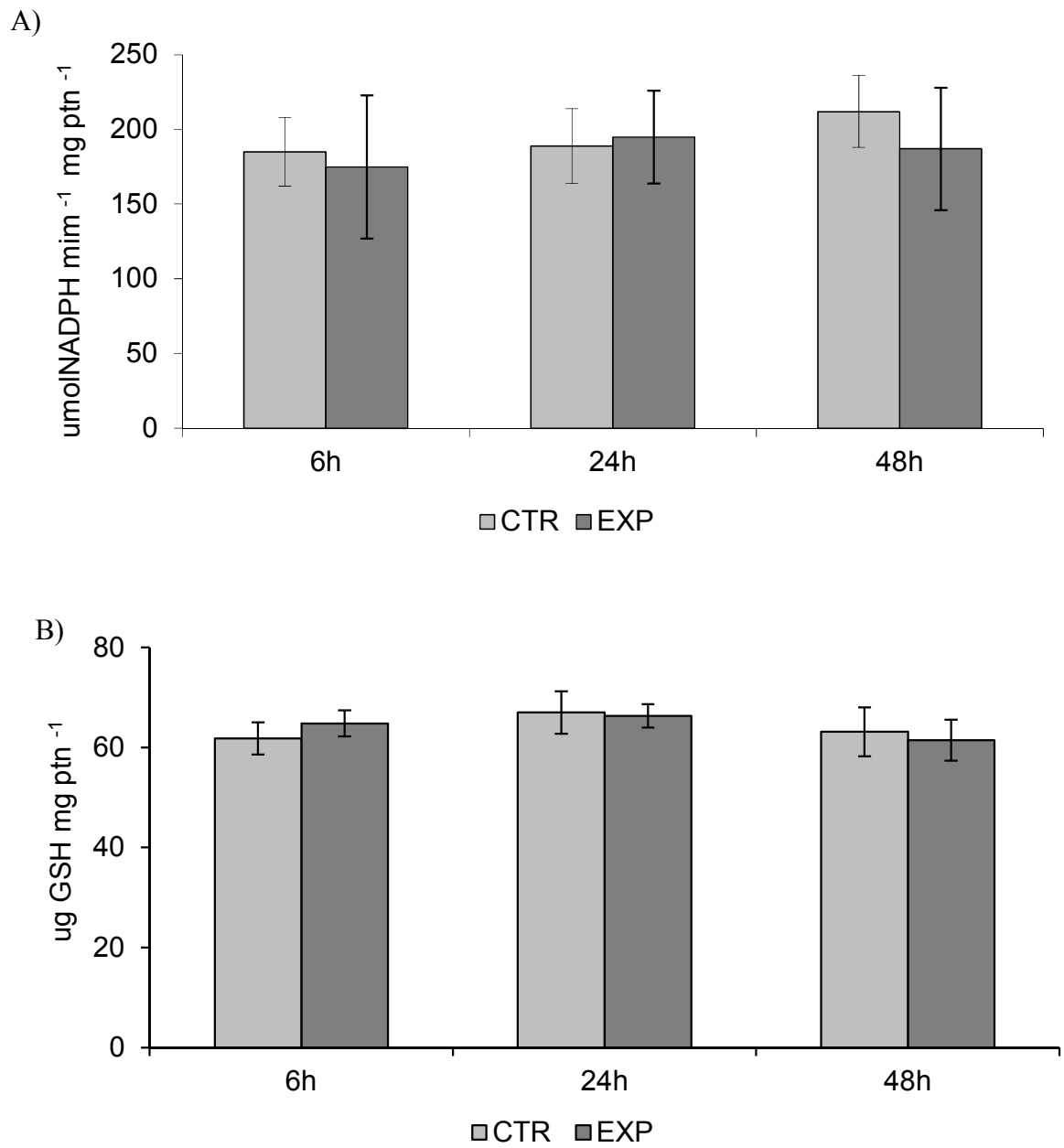


Figura 35 - Atividade da GPx (A) e concentração de GSH (B) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do biodiesel (EXP) ou somente a água (CTR), durante 6, 24 e 48 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão

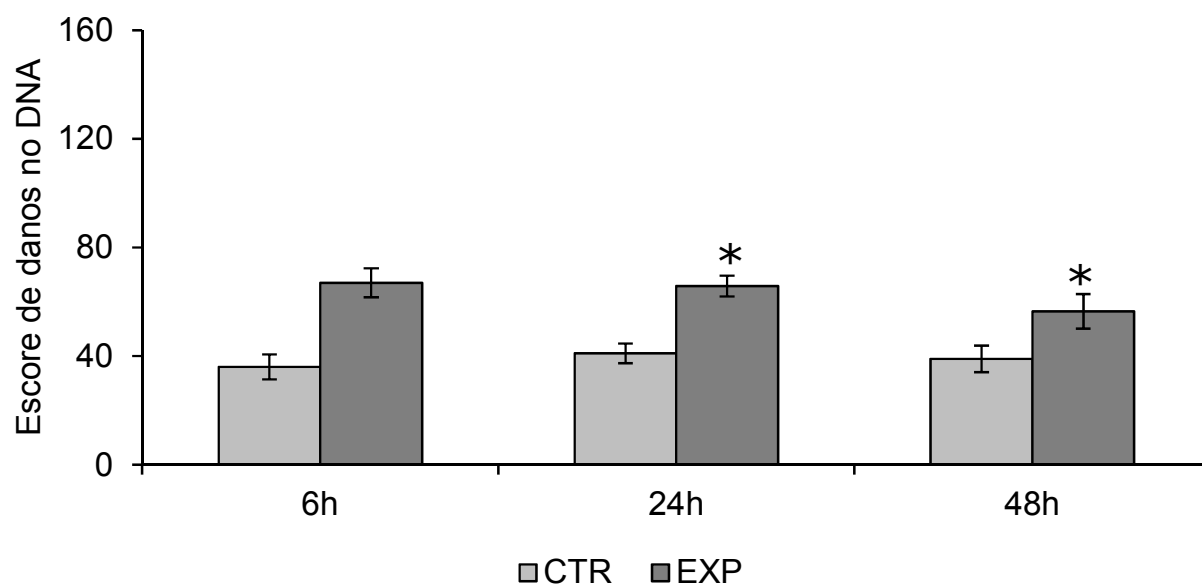


Figura 36 - Escores de danos em células branquiais de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do biodiesel (EXP) ou somente a água (CTR), durante 6, 24 e 48 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$).

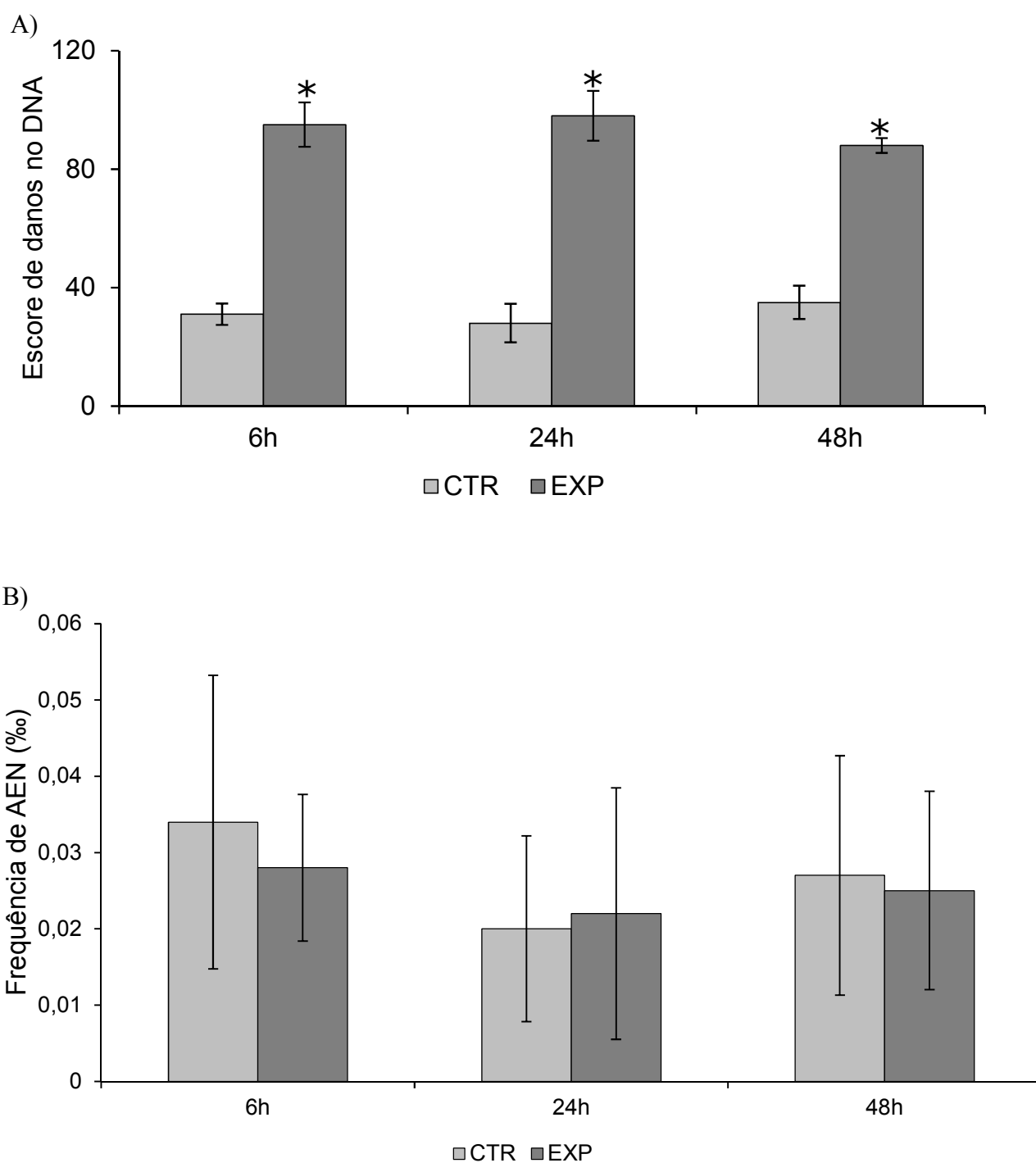


Figura 37 Frequencia de escores de danos no DNA (A) e frequência de AEN (B) em células sanguíneas de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do biodiesel (EXP) ou somente a água (CTR), durante 6, 24 e 48 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão

4. DISCUSSÃO

No Brasil ainda não existem metodologias específicas de avaliação de risco de contaminação por derramamentos de derivados de petróleo, tampouco de biodiesel. Quando necessário, a avaliação de risco é baseada em metodologias norte-americana ou holandesa (PEDROZO et al., 2002). Uma das primeiras etapas para se realizar uma avaliação de risco ambiental de um determinado composto é conhecer suas propriedades físico-químicas, seu comportamento no ambiente e dados de sua toxicidade. Daí, o propósito de se produzir literatura científica com dados toxicológicos importantes para auxiliar na avaliação de risco ambiental. Sendo assim, esse estudo se enquadra nesses objetivos, de gerar conhecimento para subsidiar possíveis medidas a serem tomadas no caso de um derramamento de biodiesel no ambiente aquático.

O uso de biomarcadores em estudos de impactos biológicos no campo e dentro do laboratório não é uma novidade. Os biomarcadores são utilizados como um sinal prévio refletindo a alteração biológica causada por um composto (VAN DER OOST et al., 2003). Diferentes parâmetros biológicos são utilizados como indicadores para sinalizar as mudanças associadas à presença de contaminantes. Medidas bioquímicas, como a determinação de estresse oxidativo (danos no DNA, produção de ERO) e respostas antioxidantes em espécies aquáticas estão sendo usadas como biomarcadores para identificar, mais rapidamente, as mudanças antes que efeitos deletérios ocorram em níveis mais elevados de organização (MONSERRAT et al., 2003; 2007). Assim, o uso de biomarcadores genéticos e bioquímicas, fornecem informações importantes a respeito do efeito metabólico causado pelo poluente. A escolha pelos biomarcadores empregados neste estudo, deve-se ao fato de serem biomarcadores bem conhecidos e documentados na literatura científica em várias situações e organismos diferentes (VAN DER OOST et al., 2003).

A escolha do órgão fígado para as análises neste estudo deve-se ao fato que esse órgão está relacionado à biotransformação de xenobióticos (JIMENEZ e STEGEMAN, 1990; VAN DER OOST et al., 2003). Neste órgão, os resultados encontrados neste estudo, mostraram que não houve aumento da atividade da enzima etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) nos peixes expostos a FSBd (EXP). A enzima EROD é normalmente tratada como a atividade catalítica da CYP1A (ORREGO et al., 2005), da família do citocromo P450, que é responsável pela biotransformação de uma ampla variedade de xenobióticos. A não indução da CYP1A nos peixes expostos a FSBd sugere que os compostos contidos na FSBd não passam pela fase I do processo de biotransformação. Na fase I, ocorrem reações de

oxidação e redução de xenobióticos, que alteram e introduzem grupos funcionais, ou reações de hidrólise, para liberar grupos funcionais. Essas mudanças aumentam a polaridade de xenobióticos e fornecem os sítios que permitem a ação das enzimas de fase II (ZELDIN e SEUBERT, 2008). Já para a enzima GST, foi verificado um aumento no fígado dos peixes expostos a FSBd (EXP) em relação ao CTR nos tempos de exposição de 24 e 48 h. As GSTs são amplamente distribuídas em todas as formas de vida e são responsáveis em catalisar a conjugação de xenobióticos com a glutathione, para deixar o xenobiótico mais solúvel e mais fácil de ser excretado (HERMES – LIMA, 2004). Para que um composto seja substrato para a GST, ele precisa possuir três características em comum: ser hidrofóbico, conter um átomo eletrofílico e reagir com a glutathione (PARKINSON E OGILVIE, 2008). Como houve aumento na atividade da GST nos peixes expostos a FSBd é possível inferir que alguns compostos contidos nessa fração possuíam essas características.

Outro biomarcador importante, que também foi analisado no fígado dos peixes expostos a FSBd foi a geração de ERO. Esse parâmetro foi escolhido porque já está bem documentado na literatura que várias substâncias exógenas, como metais, hidrocarbonetos aromáticos e pesticidas, podem agir sobre o metabolismo e aumentar a produção de ERO (LUSHCHAK, 2011). De fato, no fígado dos peixes expostos a FSBd foi encontrado aumento na produção de ERO nos tempos de 24h, indicando que a FSBd pode interferir no metabolismo, levando ao aumento da geração de ERO. É possível sugerir que o aumento na produção de ERO não esteja relacionado com a fase I do processo de biotransformação, já que não houve aumento da atividade da CYP1A nos peixes expostos a FSBd. É sabido que a biotransformação de xenobióticos é uma importante fonte de ERO, que correspondem aos produtos da redução do oxigênio molecular, como o ânion radical superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (STEGEMAN et al. 1992). Como defesas contra as ERO existem as defesas antioxidantes primárias, de natureza enzimática, que lidam diretamente com as espécies reativas de oxigênio e, que funcionam de maneira conjunta para proteger a célula das ERO (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005, LUSHCHAK, 2011). Os resultados do presente trabalho mostraram um aumento na atividade hepática da SOD, da CAT e da GPX nos peixes expostos a FSBd, indicando que essa fração ativou as defesas antioxidantes dos peixes em contato com a FSBd. A ativação da enzima SOD indica a presença do ânion superóxido na célula. Com isso pode-se inferir que após a exposição à FSBd, nos tempos de 24 e 48h, houve a produção de ânion superóxido nas células hepáticas, que precisa ser combatido através da dismutação deste em O_2 e H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD). O peróxido de hidrogênio produzido pela dismutação do ânion

superóxido precisa ser removido, por ser este um composto que causa danos em moléculas biológicas como as membranas biológicas e o DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005). A catalase é a enzima responsável por combater o peróxido de hidrogênio, quando a concentração intracelular deste se apresenta elevada. Além da catalase, a GPx é outra enzima do sistema de defesa antioxidante que também é responsável por metabolizar o H_2O_2 (HERMES-LIMA, 2004). O fígado apresentou aumento significativo das enzimas CAT e GPx nos peixes expostos à FSBd no tempo de 24h, o que reflete a necessidade de eliminação de peróxido de hidrogênio hepático. Esses resultados indicam que o fígado dos peixes expostos a FSBd aumentou suas defesas antioxidantes para combater as ERO produzidas durante a exposição ao biocombustível.

Outro órgão escolhido para ser analisado neste estudo foram as brânquias, que representam o primeiro órgão de contato com os contaminantes presentes na água e como tal, uma via de entrada de poluentes dada sua grande superfície de contato e permeabilidade (WENDELAAR BONGA, 1997). Neste estudo, os biomarcadores testados neste órgão foram os mesmos testados para o fígado, porém nas brânquias não houve aumento significativo em nenhum parâmetro analisado, com exceção do ensaio do cometa. Isto indica que a FSBd não alterou a produção de ERO e a atividade das enzimas de biotransformação e antioxidantes das células brânquiais expostas, mas causou danos no DNA dessas células.

A metodologia do Ensaio do Cometa é um teste que está sendo usado em vários estudos, tanto *in vivo* como *in vitro*, para avaliar dano e reparo no DNA. Na versão alcalina, pode-se visualizar além de quebras de fita dupla de DNA, também quebras de fita simples e sítios álcali-lábeis (TICE et al., 2000). No presente estudo, o teste do cometa revelou um aumento significativo de danos no DNA das células branquiais dos animais expostos a FSBd durante os tempos experimentais de 24 e 48 h. Além das células branquiais, outro tipo celular, os eritrócitos, foram escolhidos para se analisar danos no DNA. Isto se justifica, porque em peixes, um tecido frequentemente escolhido para se realizar o ensaio do cometa é o sangue em virtude da facilidade de coleta e não ser necessária a etapa de isolamento das células (KILEMADE et al., 2004). No presente estudo, o teste do cometa revelou um aumento significativo de danos no DNA dos eritrócitos para os animais expostos a FSBd durante os três tempos experimentais. Estes resultados mostram que a FSBd têm o potencial de causar danos no DNA dos peixes expostos, se tratando então de um agente genotóxico. Um dos prováveis modos de lesionar a molécula de DNA, seria pela ação de ERO. Sabe-se que a produção de ERO são altamente tóxicas e podem ocasionar danos oxidativos ao DNA. Das espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxil é o mais reativo com a molécula de DNA,

reagindo com o DNA pela adição de ligações duplas nas bases nitrogenadas e pela remoção de um átomo de hidrogênio, tanto do grupo metil da base timina quanto de cada uma das ligações C-H da pentose desoxirribose (COOKE et al, 2003). Porém, é possível inferir que as lesões encontradas na molécula de DNA das células branquiais dos peixes expostos a FSBd não foi causada por ERO, já que não foi encontrado aumento na produção de ERO nas brânquias dos peixes expostos à FSBd e sim, que as lesões no DNA das células brânquias podem estar relacionadas com os compostos presentes na FSBd, que agiram diretamente na molécula de DNA.

Neste estudo, além do ensaio do cometa com os eritrócitos, também foi realizado o teste do micronúcleo e das AENs. O Teste do Micronúcleo (MN) é uma metodologia que tem sido amplamente empregada por um grande número de autores para avaliar alterações mutagênicas em diferentes organismos, incluindo peixes (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Além da frequência de micronúcleos, a ocorrência de outras alterações nucleares nos eritrócitos também foi considerada como um indicador de danos genotóxicos (ÇAVAS; KONEN, 2007). Neste trabalho não foram encontradas diferenças estatística na frequência de MN e nem de AEN nos peixes expostos a FSBd em relação ao CTR, indicando que a FSBd não possui ação mutagênica.

De modo geral, a fração solúvel do biodiesel produzida por rota metílica induziu aumento na produção de ERO, causou a ativação da enzima de desintoxicação GST e das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx no fígado, e produção de danos de DNA em células branquiais e eritrócitos de *P. lineatus*. Sendo assim, é possível sugerir que alguns compostos deste biodiesel podem se dissolver na água, tornando-se disponível para o contato direto com os organismos aquáticos, em especial, os peixes, causando prejuízos a esses organismos. Tratando-se de biodiesel produzido por rota metílica, pode-se sugerir que o metanol seja um dos causadores dos efeitos biológicos encontrados, pois já é sabido que esse composto é tóxico. Já foi verificado que é possível ocorrer reversão na transesterificação, que é o processo de produção de biodiesel, que na presença de água, resulta na produção de metanol, que pode aumentar durante a degradação de biodiesel (NASCIMENTO et al, 2009, LEITE et al., 2011). Observando os resultados como um todo é possível dizer que a contaminação por biodiesel pode ser avaliada através da utilização de biomarcadores. Com base nos resultados, sugere-se que o biomarcador mais eficiente para a avaliação de sinais prévios de alteração biológicas em peixes em contato com o biodiesel são os danos no DNA, avaliados pelo ensaio do cometa. A escolha por esse marcador se deve a fato de ser uma técnica fácil e rápida de ser executada, além de responder bem em vários tecidos. No caso deste estudo, através do ensaio

do cometa, foi se verificado danos no DNA dos peixes expostos a FSBd nos 2 tipos celulares analisados: células branquiais e eritrócitos. Quanto aos parâmetros bioquímicos, o fígado se mostrou mais responsável aos efeitos da FSBd quando comparado as brânquias, indicando que o fígado é o órgão mais apropriado para esse tipo de análise. Por fim, sugere-se que os biomarcadores sejam incluídos nas legislações ambientais brasileiras como ferramentas de avaliação de risco, para auxiliar na tomada de decisões no caso de impactos ambientais com combustíveis em geral, em especial o biodiesel.

REFERÊNCIAS

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutat. Res.** 34:121-135, 1995.

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (<http://www.anp.gov.br>)
BEUTLER, E. Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods. New York: **Grune & Stratton** 1975

BEUTLER, E; DUROM, O; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.** 61:882-890, 1963.

BRADFORD, M A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem** 72:248-254, 1976.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; YERS, M.S. Assessment of the piscine micronuclei test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can J Fish Aquat. Sci.** 47:2123 – 2136, 1990.

ÇAVAS, T.; KONEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, 22:263-268, 2007.

COOKE, M.S.; EVANS, M.D.; DIZDAROGLU, M.; JOSEPH, L. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB J.** 17:1195-1214, 2003.

EGGENS, M.L.; GALGANI, F. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: Fast determination within a fluorescence plate-reader. **Mar Environ Res** 33:213-22, 1992.

FERREIRA-CRAVO, M.; PIEDRAS, F.R.; MORAES, T.B.; FERREIRA, J.L.R.; FREITAS, D.P.S.; MACHADO, M.D.; GERACITANO, L.A.; MONSERRAT, J.M. Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laonereis acuta* (Nereididae). **Chemosphere** 66:1367-1374, 2007.

HAGGER, J.A.; JONES, M.B.; LEONARD, P.; OWEN, R.; GALLOWAY, T.S. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? **Integrat Environ Assessm and Managem** 2:312–329, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, **Oxford University Press**. 2005.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K B (ed.) **Functional metabolism: regulation and adaptation**. New York, John Wiley & Sons, Inc. pp 319-368. 2004.

HOFTMAN, R.N.; DE RAAT, W.K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulfonate. **Mut. Res.** 104:147-152, 1982.

HOPKINS, J.; TUDHOPE, G.R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **J. Haematol.** 25: 563–575, 1973.

JIMENEZ, B.D.; STEGEMAN, J.J. Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. In: Adams, S.M. (Ed.). *Biological Indicators of Stress in Fish*. Bethesda: **Amer. Fish. Symp.** 8: 67-79, 1990.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H, JAKOBI, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. **Biol. Chem.** 251: 6183-6188, 1976.

KILEMADE, M.F.; HARTL, M.G.J.; SHEEHAN, D.; MOTHERSILL, CAVAN PELT, F.N.A.M.; O'HALLORAN, J.; O'BRIEN, N.M. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus l.*) as measured by the comet assay. **Environ. Mol. Mutagenesis**, 44: 56-64, 2004.

KOBAYASHI, H.; SUGUYAMA, 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** 3:103–115, 1995.

LEITE, M.B.N.L.; ARAÚJO, M M.S.; NASCIMENTO, I.A.; CRUZ, .A.C.S.; PEREIRA, S.A.; NASCIMENTO, N.C. Toxicity of water-soluble fractions of biodiesel fuels derived from castor oil, palm oil, and waste cooking oil. **Environ. Toxicol. Chem.** 30:893–897, 2011.

LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquat. Toxicol.** 101:13–30, 2011.

MARTINEZ, C.B.R; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.V.; ZAIA, D.A.M. Acute morphological and physiological affects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian. J. Biol.**, 64: 797-807, 2004.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyuprein (hemocuprein). **Biol.Chem.** 244: 6049 – 6055, 1969.

MONSERRAT, J.M.; GERACITANO, L.A.; BIANCHINI, A. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. **Comments Toxicol.** 9:55–269, 2003.

MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M. G.; PINHO, G.L.L.; CHAVES, I.S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.** 146C: 221–234, 2007.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L.; CRUZ, A. C. S. ; Santos, J. M ; Veras, T.F.; BARROS, D.A.; ALVAREZ, H. M. ; NASCIMENTO, M. A. Is Biodiesel an Eco-Compatible Fuel? Toxicity Estimation Organisms of Diferent Trophic Levels. In: Harry Newbury; William de Lome.. (Org.). **Industrial Pollution Including Oil**. Nova York: Nova Science Publishers, v.01, p. 01-30, 2009.

ORREGO, R.; JIMÉNEZ, B.; BORDAJANDI, L.R.; GAVILÁN, J.F.; INZUNZA, B.; ABAD, E.; GONZÁLEZ, M.J.; RIVERA, J.; BARRA, R. EROD induction and PCDD/F levels in fish liver from the Biobio River in Chile. **Chemosphere**. 60:829-35, 2005

PARKINSON, A.; OGILVIE, B.W. Biotransformation of Xenobiotics in: **Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons** (Klaassen CD ed), McGraw-Hill, Inc., New York City, NY, 2008.

PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M., CORSEUIL, H.X.; SCHNEIDER, M.R. LINHARES, M.M. Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, **Série Cadernos de Referência Ambiental**, v. 12. 246 p, 2002.

POON, R.; CHU, I.; VALLI, V.E.; GRAHAM, L.; YAGMINAS, A.; HOLLEBONE, B.; RIDEOUT, G.; FINGAS, M. Effects of three biodiesels and a low sulfur diesel in male rats – A pilot 4-week oral study. **Food Chem. Toxicol.** 45:1830- 1837, 2007.

SINGH, N. P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.** 175:184 – 191, 1988.

STEGEMAN, J.J.; BROWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÓRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.P. & Bergman, H .L. (Ed.), **Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Eds. Lewis Publishers. Chelsea, MI, USA, pp. 235-335. 1992.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology Testing. **Environ and Mol Mutagenesis** 35: 206-221, 2000.

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

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 146 :281–300, 2007.

ZELDIN, D.C.; SEUBERT, J.M. Structure, Mechanism, and Regulation of Cytochromes P450. In: **Molec. Biochem. Toxicol**, Fourth Edition, 2008.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Phy. Rev.** 77:591- 620, 1997.

5.3 Manuscrito 3

Efeitos citotóxicos, bioquímicos e genéticos de dois biodiesel produzidos por rotas de produção diferentes na linhagem celular de peixe ZFL

Dalita G. S. M. Cavalcante^{ab}, Natara D.G da Silva^a, Maria A. Marin-Morales^b,
Cláudia B. R. Martinez^{a*}

^aDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL) – Londrina, PR, Brasil

^bDepartamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brasil

* Autor correspondente

Tel.: +55-43-33714650

Fax: 3371-4650

E-mail: cbueno@uel.br

RESUMO

A transesterificação tem se apresentado como a melhor opção para a obtenção do biodiesel, e dependendo do tipo de álcool empregado na reação, o biodiesel pode ser do tipo metil-éster (oriundo da utilização do metanol) ou etil-éster (etanol). Por meio de eventuais vazamentos de biodiesel pode - se alcançar os lençóis freáticos ou os corpos de água, levando a contaminação do ambiente e dos organismos aquáticos, em especial os peixes. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram avaliar se a fração solúvel do biodiesel produzido tanto por rota etílica (FSBdET) quanto por rota metílica (FSBdMT) podem causar alterações citotóxicas, bioquímicas e genotóxicas na linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL), através do método de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5- difeniltetrazólio), das atividades de enzimas antioxidantes e de biotransformação e pelo Ensaio do Cometa Versão Alcalina com adição de Endonucleases Específicas, respectivamente. Os resultados obtidos mostram que ambas as frações solúveis aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio, causaram ativação da enzima de biotransformação glutationa – S – Transferase, e danos na molécula de DNA. A FSBdMT se mostrou mais citotóxica que a FSBdET, além de produzir danos oxidativos na molécula de DNA. De um modo geral, ambas as frações solúveis parecem ser fatores estressantes para as células, levando estas a recorrerem a um conjunto de sistemas de controle homeostático para compensar as perturbações e se adaptarem ao ambiente inóspito. O biodiesel produzido tanto por rota etílica quanto rota metílica podem causar alterações citotóxicas, bioquímicas e genéticas nas células ZFL, porém o tipo e a intensidade das alterações encontradas na ZFL parecem ser dependentes da rota de produção do biodiesel.

Palavras – Chaves: biocombustível, estresse oxidativo, ensaio in vitro, ensaio do cometa

1. INTRODUÇÃO

Para a obtenção do biodiesel, a transesterificação tem se apresentado como a melhor opção, visto que é um processo relativamente simples e que gera um combustível, cujas propriedades são similares às do óleo diesel (FERRARI et al., 2005). Para a realização deste processo, é preciso reagir o óleo vegetal com álcool para formar ésteres e glicerol. Dependendo do tipo de álcool empregado na reação, o biodiesel pode ser do tipo metil-éster (oriundo da utilização do metanol) ou etil-éster (etanol). A experiência internacional indica uma tendência à adoção da transesterificação com a utilização do metanol (rota metílica). Uma rota alternativa aventada no Brasil utiliza o etanol (rota etílica) na mistura, mas essa tecnologia ainda necessita de aperfeiçoamentos no processo produtivo em escala comercial (PRATES et al., 2007). O metanol é mais freqüentemente utilizado por razões de natureza física e química (cadeia curta e polaridade). Contudo, o etanol está se tornando mais popular, pois ele é renovável e muito menos tóxico que o metanol (LIMA, 2004). Embora o biodiesel seja considerado um combustível ambientalmente correto, há poucos estudos relacionando os possíveis impactos do biodiesel sobre os ecossistemas, como por exemplo, os ambientes aquáticos. Com o avanço crescente da indústria do biodiesel é de suma importância avaliar o perigo ambiental deste biocombustível, para evitar impactos deletérios sobre os seres vivos (LEME et al, 2011).

As células representam um nível chave de organização biológica para a detecção e entendimento de mecanismos comuns de toxicidade (CASTAÑO et al, 2003). As interações de substâncias químicas antropogênicas com a biota ocorrem em primeiro lugar no nível celular, fazendo com que respostas celulares não só sejam as primeiras manifestações de toxicidade, mas também que podem ser usadas como ferramentas apropriadas para a detecção precoce e sensível de exposição a substâncias químicas (FENT, 2001). A análise da viabilidade celular vem sendo utilizada no campo da ecotoxicologia na avaliação de efeitos tóxicos provocados por poluentes ambientais (BOPP E LETTIERI, 2008). As linhagens celulares de peixes tem tido um importante papel em pesquisas toxicológicas, servindo como modelo para estudos moleculares de mecanismos de toxicidade e também como sistema-teste para se estudar efeitos tóxicos e monitoramento de contaminantes ambientais (BOLS et al, 2005). Dentre as principais ferramentas que estão sendo utilizadas em linhagens celulares de peixes, para a avaliação da toxicidade das substâncias antrópicas, são os testes de viabilidade celular, como o método de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) (CASTAÑO et al, 2005). Com o método do MTT, se avalia se as células

estão metabolicamente ativas e com isso indiretamente conclui – se que as células estão viáveis. A genotoxicidade de substâncias no ambiente aquático também está sendo monitorada em linhagens de células de peixes. O ensaio cometa, que detecta quebras nas fitas de DNA, tem recebido atenção considerável nesta avaliação, por ser um método rápido e barato (BOLS et al, 2005). Já a investigação de mudanças em parâmetros oxidativos em linhagens celulares de peixes, como produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e atividade das enzimas de biotransformação e antioxidantes ainda são escassos na literatura. A avaliação de parâmetros oxidativos em células é importante, porque indica se o mecanismo de ação de um determinado contaminante está relacionado com a produção de ERO, aumentando as chances de ocorrência de estresse oxidativo, caso essas ERO não sejam neutralizadas, podendo causar danos em todos os tipos de moléculas biológicas das células, incluindo no DNA (LUSHCHAK, 2011).

Levando-se em conta que a de produção de biodiesel está em ascensão e com isso a possibilidade deste combustível alcançar os lençóis freáticos ou os corpos de água, levando a contaminação do ambiente e dos organismos aquáticos, em especial os peixes, é de suma importância que se compreenda a toxicidade desse biocombustível . A grande maioria dos estudos encontrados na literatura associando espécies aquáticas e contaminação por biodiesel, apresenta como objetivo a análise da toxicidade do biodiesel através da CL50 (HOLLEBONE et al, 2007; KHAN et al.,2007; LEITE et al., 2011).. Estudos utilizando biomarcadores bioquímicos e genéticos para avaliar os efeitos do biodiesel em organismos aquáticos ainda estão iniciando (NOGUEIRA et al, 2011). Sendo assim, os objetivos deste estudo foram avaliar se o biodiesel produzido tanto por rota etílica quanto rota metílica podem causar alterações citotóxicos, bioquímicas e genéticas na linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) e comparar se essas alterações são semelhantes, independente da rotas de produção do biodiesel. Este é o primeiro trabalho que se propõe avaliar os efeitos do biodiesel utilizando uma linhagem celular de peixe imortalizada (ZFL).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Biodiesel estudado

Para a realização dos testes de toxicidade, amostras de biodiesel foram cedidas pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Foram utilizados dois tipos de biodiesel diferentes, ambos extraídos do óleo vegetal de girassol, porém um foi feito através de

transesterificação com a utilização do metanol (rota metílica) e o outro através de transesterificação utilizando etanol (rota etílica). Os biodieseis utilizados neste estudo estão dentro dos padrões de qualidade aceitáveis pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).

2.2 - Preparo da fração solúvel do biodiesel (FSBd)

As frações solúveis do biodiesel (FSBd), tanto produzido pela rota etílica (FSBdET) quanto pela metílica (FSBdMT), foram preparadas separadamente utilizando-se a mesma metodologia. Para a preparação da FSBd uma parte de biodiesel foi misturada a uma parte de água destilada (1:1) e a mistura permaneceu em agitação por 24 horas. A fração superior insolúvel foi descartada e a fração solúvel em água foi coletada e armazenada em recipientes opacos, em câmara fria, por no máximo cinco dias, até o momento dos experimentos. Para a realização dos experimentos as FSBd foram diluídas em várias proporções.

2.3 Modelo experimental

A linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) utilizada neste estudo foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ). Esta linhagem celular foi criada em 1992 a partir de um pool de cerca de 10 fígados de Zebrafish (*Danio rerio*) adultos, e exibe algumas propriedades características de células do parênquima hepático, com um ciclo celular de 72 horas. A linhagem celular de hepatócitos (ZFL) foi cultivada em 10 mL de meio de cultura Leibovitz/RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal em frascos de 25 cm², mantidas em estufa sem CO₂ a 28°C.

2.4 Testes de toxicidade *in vitro*

Primeiramente as células foram submetidas a um ensaio de quantificação da atividade metabólica celular (ver item 2.5) para avaliar se as frações solúveis obtidas tanto do biodiesel de produzido por rota etílica quanto pela rota metílica podem alterar a atividade metabólica das ZFL e levar a diminuição da viabilidade celular dessas células. Ambas as frações foram diluídas em água para 5% (5% de FSBd em 95% de água), 10% (10% de FSBd em 90% de água), 20% (20% de FSBd em 80% de água), 40% (40% de FSBd em 60% de água, 60% (60% de FSBd em 40% de água, 80% (80% de FSBd em 20% de água) e 100% (100% de

FSBd). Em seguida foi adicionado a mesma quantidade de meio de cultura em todas as diluições: para cada 10 ml de fração diluída foi acrescentado: 0,081 g de RPMI, 0,0685 g de Leibovitz, 0,002 g de bicarbonato de sódio e o pH foi ajustado para 7,4 e em seguida filtrado em seringa descartável de 20 mL com membrana filtrante de 0,22µm. A partir dos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade, foram definidas as diluições a serem testadas nos testes de toxicidade *in vitro*: 5%, 10% e 20% de ambas as frações solúveis. Para as células expostas à estas diluições das FSBd foram determinados os seguintes parâmetros: quantidade de espécies reativas de oxigênio (ver item 2.6), atividade enzimática de enzimas de biotransformação e antioxidantes (ver item 2.7), além de danos no DNA, através do ensaio do cometa (ver item 2.8).

2.5 Quantificação da atividade metabólica da célula relacionando viabilidade celular pelo Ensaio MTT

O potencial citotóxico da FSBdET e da FSBdMT foi avaliada em testes *in vitro* pelo método de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5- difeniltetrazólio) segundo MOSMANN, 1983. Para tanto, células da linhagem ZFL foram semeadas em placa de 24 poços transparente, em uma densidade de $1,2 \times 10^5$ células por poço. Após 48 h de estabilização em estufa sem CO₂ a 28°C, as células foram incubadas por 24 h, apenas com meio de cultura (controle negativo ou CTR) ou com diferentes diluições de FSBdET ou FSBdMT (5%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100%), mantendo-se sempre com a mesma concentração de meio de cultura. Um controle positivo com metil metano sulfonato (MMS) também foi feito, na concentração de 1 mM. Para confiabilidade dos resultados, foram feitas 2 réplicas (em períodos diferentes) de cada uma das condições experimentais, sendo que em cada condição experimental foram feitas 4 repetições. Após o período de incubação foi adicionado 0,005 g de MTT e as células foram novamente incubadas por mais 4 h. Em seguida, o meio de cultura foi retirado, adicionado 200 µL dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância correspondente a cada amostra foi determinada em leitora de microplaca a 540 nm. A absorbância obtida para as células do CTR foi considerada como 100% de viabilidade celular (VC). A VC das outras amostras foi determinada pela seguinte fórmula: $VCAF = [(AbsAF - AbsBr)/(AbsCTR - AbsBr)] \times 100$, onde: VAF = Viabilidade Celular das células expostas ao FSBd; AbsAF = Absorbância encontrada para as células expostas ao FSBd; AbsCTR = Absorbância encontrada para as células do controle negativo; AbsBr = Absorbância encontrada para o branco (poço apenas com meio de cultura)

2.6 Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO)

As células ZFL foram semeadas em uma densidade de $9,0 \times 10^5$ células por poço em placa preta de 96 poços. Após 48 h de estabilização em estufa sem CO₂ a 28°C, as células foram tratadas apenas com meio de cultura (CTR) ou com as diferentes diluições (5%, 10%, 20%) de FSBdET ou FSBdMT, misturados sempre com a mesma concentração de meio de cultura. Para confiabilidade dos resultados, foram feitas 2 réplicas (em períodos diferentes) de cada uma das condições experimentais, sendo que em cada condição experimental foram feitas 4 repetições. O experimento foi incubado por 1, 3, 6 e 12 h. Após esse período, o meio foi descartado e foi adicionado o tampão de reação (100 µL) contendo 30 mM HEPES (pH 7,2), 200 mM KCl e 1 mM MgCl₂ em todos os pocinhos com as amostras. Após isso, a microplaca foi colocada em um espectro-fluorímetro de microplaca, programado para a temperatura de 28°C. Com esse procedimento, foi obtida a fluorescência espontânea de cada amostra no comprimento de onda de 488 e 525 nm, para excitação e emissão, respectivamente. Imediatamente após a leitura da microplaca, foi adicionado aos poços o composto fluorescente 2,7 diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) numa concentração final de 40 µM. A microplaca foi novamente analisada e o composto fluorescente DCF foi detectado nos comprimentos de onda de 488 e 525 nm, para excitação e emissão, respectivamente. A formação de ERO foi monitorada por 30 minutos com leituras a cada 5 minutos e calculada a partir da relação das unidades de fluorescência (UF) ao longo do tempo, após os dados da UF serem ajustados para uma função polinomial de segunda ordem e os resultados foram expressos como a área de UF × min (FERREIRA – CRAVO et al., 2007).

2.7 Atividade de enzimas antioxidantes e de biotransformação

Células da linhagem ZFL (9×10^6) foram cultivadas em frascos de 75 cm², sempre em monocamada, em meio de cultura Leibovitz/RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal, e mantidas em estufa sem CO₂ a 28°C. Após 48 h de estabilização, as células foram tratadas apenas com meio de cultura (CTR) ou com as diferentes diluições (5%, 10%, 20%) de FSBdET ou FSBdMT, misturados sempre com a mesma concentração de meio de cultura. Foram feitos 6 frascos para cada condição experimental. O experimento foi incubado por 1, 3, 6 e 12 h. Após o término de incubação, o meio foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS (126,6 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂; 3,7 mM NaHCO₃; 8,9 mM Na₂HPO₄; 2,9 mM NaH₂PO₄) e desprendidas da parede do frasco com tripsina (0,125%). Após inativação da tripsina com meio de cultura, as amostras foram transferidas para

microtubos e centrifugadas por 10 min a 10640g. Após esse procedimento, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado 500 uL de tampão fosfato (PBS) para ressuspensão do pellet. Para o rompimento das células, as amostras foram sonicadas por 3 vezes por 5 minutos, com pausa de 3 min. Para a certeza de rompimento das células, uma alíquota de cada uma das amostras foi colocada em câmara de Neubauer e visualizada em microscópio de luz em 400 X, sendo considerado células rompidas quando não era visualizadas células na câmara de newbauer Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 10640 g e o sobrenadante coletado e mantido congelado a 80°C negativos até o momento das análises bioquímicas. Para as análises bioquímicas foram utilizadas 20 uL de amostra, para cada ensaio. A atividade da enzima de biotransformação glutathiona-S-transferase (GST) foi determinada seguindo-se a complexação da glutathiona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), no comprimento de 340 nm em espectrofotômetro, de acordo com a metodologia descrita por Keen et al., (1976). As enzimas antioxidantes que tiveram suas atividades medidas foram: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de McCord & Fridovich (1969), pela inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido, observado no comprimento de onda de 550 nm a 25°C, em espectrômetro. A atividade da CAT foi determinada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), seguindo-se a velocidade de decomposição da H₂O₂ através do decréscimo de absorvância a 240 nm em espectrofotometro. A atividade da GPx foi determinada pela oxidação do NADPH + H⁺ em presença de peróxido, de acordo com Hopkins e Tudhope (1973), em espectrofotômetro a 340 nm a 25°C. A concentração de proteína total desses sobrenadantes foi determinada por meio de método de Bradford (1976) em 595nm.

2.8 Análise de danos no DNA – Ensaio do Cometa Versão Alcalina com adição de Endonucleases Específicas

As células ZFL foram semeadas em uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células em frascos de 25 cm², e mantidas em estufa sem CO₂ a 28°C. Após 48 h de estabilização, as células foram tratadas apenas com meio de cultura (CTR) ou com as diferentes diluições (5%, 10%, 20%) de FSBdET ou FSBdMT, misturados sempre com a mesma concentração de meio de cultura. O controle positivo com MMS na concentração de 0,5 mM também foi feito. Foram feitos 6 frascos para cada condição experimental. O experimento foi incubado por 1, 3, 6 e 12 h. Após esse período, foi descartado o meio dos frascos de cultura. A seguir, os frascos foram lavados

duas vezes com 5 mL PBS, para posteriormente ser adicionado 0,5 mL de tripsina. Após 4 minutos, foi adicionado 5 mL de meio novo com soro bovino fetal. O conteúdo foi homogeneizado e centrifugados por 5 minutos a 106,4 g. O sobrenadante foi descartado, deixando-se apenas 0,5 mL de meio, que foi homogeneizado e usado para a confecção das lâminas do ensaio do cometa, seguindo o protocolo descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações. Para isso, alíquotas de 20 μL de cada uma das amostras foram adicionadas a 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Essa alíquota foi homogeneizada vagarosamente na agarose e dividida em 6 lâminas de vidro previamente recobertas com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobertas com lamínula e colocada a 4°C, por 30 min, para solidificação da agarose. Após esse período, a lamínula foi removida e foi colocada uma segunda camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%), coberta com lamínula e novamente colocada a 4°C, por 30 minutos. Em seguida as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise gelada e recém preparada (2,5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10; Triton X-100 a 1% e DMSO a 10%). Após essa etapa foi utilizada a técnica com as enzimas endonuclease III (endo III) e formamidopirimidina-DNA glicosilase (FPG) para detecção, respectivamente, de pirimidinas e purinas oxidadas, avaliando assim possíveis danos oxidativos no DNA. Após etapa de lise, as lâminas foram lavadas em PBS e colocadas em tampão Flare (Hepes 40 mM, KCl 0,1 M, albumina de soro bovino 0,2 mg.mL⁻¹ e EDTA 0,5 mM, pH 8) durante 15 min. Posteriormente, as lâminas foram organizadas de modo que as 6 lâminas feitas a partir de um mesmo frasco de cultura foram colocadas em câmara úmida e foi adicionado sobre duas delas 100 μL do tampão de reação das enzimas (Flare 10x, H₂O destilada e BSA), nas outras 2 lâminas, 100 μL de endo III (diluição 1:100), e nas 2 restantes 100 μL de FPG (diluição de 1:100), a fim de detectar os diferentes tipos de bases oxidadas no DNA. Todas as lâminas foram cobertas com lamínula e incubadas por 45 minutos a 37°C. Na seqüência, as lâminas foram colocadas em geladeira por 15 min para solidificação da agarose e, então, transferidas para cuba de eletroforese, que foi preenchida com tampão alcalino gelado e recém preparado (1mM EDTA e 300 mM NaOH, pH>13). Após um período de 30 min para a desespiralização do DNA e exposição dos sítios álcali-lábeis, a eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA por 20 min. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram colocadas por 15 minutos em solução de neutralização (0,4 M de Tris, pH 7,5), fixadas com etanol absoluto e secas a temperatura ambiente. No momento da análise, as lâminas foram coradas com 50 μL de solução de Gel Red (15ul Gel Red 10.000X em 5mL NaCl 1M e 45mL de água destilada). A análise foi feita em microscópio de fluorescência na objetiva de 40 X, com filtro de excitação de 510-560 nm

e um filtro de barreira de 590 nm, e foram contadas 100 nucleóides por lâmina. De acordo com Kobayashi et al. (1995), os danos no DNA foram classificadas visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA em quatro classes: 0: nucleóide sem cauda com poucos fragmentos ao redor; 1: uma pequena cauda menor que o diâmetro do núcleo; 2: um comprimento de cauda de 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo; 3: um comprimento da cauda > duas vezes o diâmetro do núcleo. O escore de cada tratamento foi verificado multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe de dano pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3) e o valor de escore podia variar de um mínimo de 0 e um valor máximo de 300. Os resultados foram expressos pela média do escore de dano de DNA para cada grupo de tratamento, para cada período de exposição. Foram feitas 2 tipos de análises, onde a primeira foi chamada de ensaio do cometa padrão, com o objetivo de avaliar danos inespecíficos na molécula de DNA. Para isso, foram comparados entre si, os escores médios de CTR X FSBd X CP, das lâminas apenas expostas ao tampão de reação. A segunda análise, teve como objetivo, a quantificação de danos oxidativos, e para isso foram comparados os escores médios das lâminas expostas ao tampão de reação com o escore médio das lâminas expostas a Endo III e o escore médio das lâminas expostas ao tampão de reação das enzimas com o escore médio das lâminas expostas a FPG. Se a análise estatística não indicar diferença significativa, não houve danos oxidativos. Porém se indicar diferença significativa, há danos oxidativos nas bases púricas ou pirimídicas.

2.9 Análise Estatística

Os resultados (CTR X diluições de FSBd (metílico ou etílico) X CP, quando for o caso) foram comparados entre si através de análise de variância paramétrica (ANOVA) pelo método de comparação de Student-Newman-Keuls ou pela análise não-paramétrica (Kruskall-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos e os resultados foram expressos como média \pm SE (erro padrão).

3. RESULTADOS

3.1 Viabilidade Celular baseado na atividade metabólica

Os resultados mostraram que a viabilidade celular baseado na atividade metabólica das células expostas às diluições de 5% e 10% tanto da FSBdMT quanto da FSBdET (Figura 38) não mostraram diferença estatística quando comparado com a viabilidade celular baseado na atividade metabólica das células não expostas as frações (CTR). Já nas diluições de 20 e 40% foi detectado um aumento de viabilidade celular baseado na atividade metabólica nas células expostas a ambas as frações solúveis. Na diluição de 60%, viabilidade celular baseado na atividade metabólica das células expostas a FSBdMT se mostrou totalmente citotóxica (viabilidade de 0%), enquanto nesta mesma diluição, as células expostas a FSBdET mostrou uma redução de 30% na viabilidade celular baseado na atividade metabólica. Nas diluições de 80 e 100%, as viabilidades celulares baseado na atividade metabólica das células expostas a ambas as frações solúveis foram totalmente reduzidas a 0%. O MMS 1mM (CP) foi totalmente citotóxico (viabilidade de 0%) para as células expostas quando comparados ao CTR.

3.2 Determinação da Produção de ERO

Os resultados mostram um aumento na produção de ERO nas células expostas a 5, 10 e 20% da FSBdMT no tempo experimental de 6 horas, quando comparado ao seu respectivo controle negativo. No período de 12 horas, houve aumento de produção de ERO nas células expostas a diluições de 10 e 20% da FSBdMT quando comparado ao seu respectivo controle negativo (Figura 39A). Para a FSBdET, foi encontrado um aumento na produção de ERO, nas células expostas as diluições de 10 e 20% no tempo de exposição de 6 horas e também nas células expostas as diluições de 5, 10 e 20% no período de 12 horas, ambos sempre comparados com o seu respectivo controle negativo (Figura 39B).

3.3 Enzimas antioxidantes e de biotransformação

Para a FSBdMT, a atividade da GST se mostrou aumentada estatisticamente nas células expostas as diluições de 5, 10 e 20% nos tempos de 3h e 6 h e nas diluições de 5 e 20% no tempo de 12 horas, em comparação com os seus respectivos controle negativo (Figura 40A). Para a FSBdET, a atividade da GST se mostrou aumentada apenas nas células expostas as diluições de 10 e 20% durante 12 h, quando comparado ao seu respectivo controle negativo (Figura 40B). A atividade da SOD das células não mostrou diferença estatística em relação

aos seus respectivos controles negativos em nenhuma diluição e em nenhum tempo de exposição de ambas as frações solúveis (Figura 41A e 41B). Para a FSBdMT, a atividade da catalase se mostrou significativamente aumentada nas células expostas a 10 e 20% durante 6 h e se mostrou significativamente diminuída nas diluições de 10 e 20% no tempo de 12 h, quando comparado ao seu respectivo controle negativo (Figura 42A). Para a FSBdET, a atividade da CAT das células não mostrou diferença estatística em relação aos seus respectivos controles negativos em nenhuma diluição e em nenhum tempo de exposição (Figura 42B). A atividade da GPx das células não mostrou alteração significativa em relação aos seus respectivos controles negativos em nenhuma diluição e em nenhum tempo de exposição de ambas as frações solúveis do biodiesel (Figura 43A e 43B).

3.4 Danos no DNA

No ensaio de cometa padrão, para a FSBdMT, foi encontrado um aumento significativo de danos no DNA, nas diluições de 10 e 20% no período de 1 h, na diluição de 20% no período de 3 h e nas diluições de 5, 10 e 20% nos períodos de 6 e 12 h, sempre comparando-se com seus respectivos CTR (Figura 44 A). O MMS 0,5 mM (CP) foi genotóxico em todos os tempos de exposição, mostrando-se escore de dano significativamente maior que o CTR negativo. Para o ensaio do cometa com o emprego das enzimas de restrição, foi encontrado um aumento estatístico de danos no DNA nas células tratadas com FPG na diluição de 20% nos tempos experimentais de 6 e 12 horas, sempre comparando com os seus respectivos controles negativos, indicando que houve bases púricas oxidadas (Figura 44 B). No ensaio de cometa padrão, para a FSBdET, foi encontrado um aumento significativo de danos no DNA, nas diluições de 5 e 20% no período de 1 h, nas diluições de 10 e 20% no período de 3 h e nas diluições de 5, 10 e 20% no período de 6 h e 12 h, sempre comparando com os seus respectivos controles negativos (Figura 45 A). Para o ensaio do cometa com o emprego das enzimas de restrição, não foi encontrado diferença estatística em nenhuma diluição e em nenhum tempo de exposição sempre comparando com os seus respectivos controles negativos, indicando que não houve bases púricas e pirimídicas oxidadas (Figura 45 B).

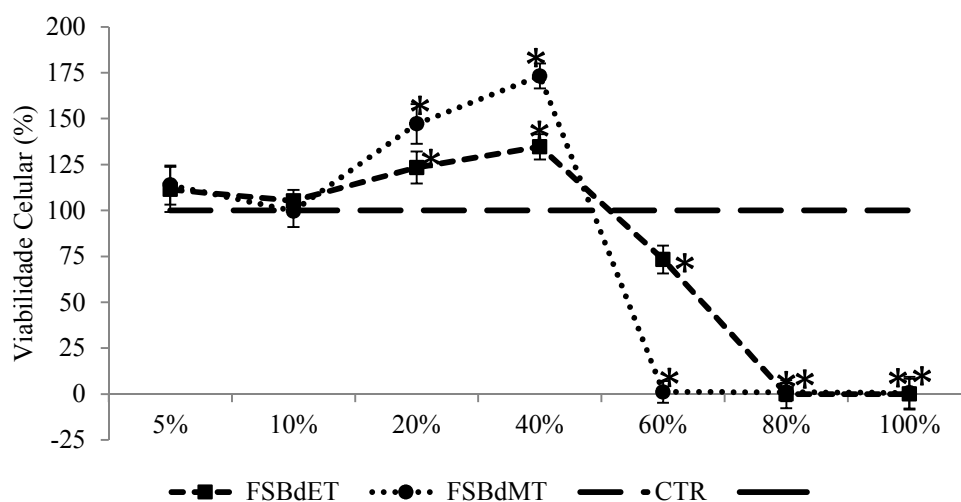


Figura 38 – Viabilidade Celular (%) das células ZFL expostas às diferentes diluições da FSBdMT ou da FSBdET; ou somente ao meio de cultura (CTR), por 24 horas. As linhas horizontais representam a média e a linha vertical o erro padrão * indica diferença significativa em relação ao CTR, que foi considerado 100% ($P < 0.05$).

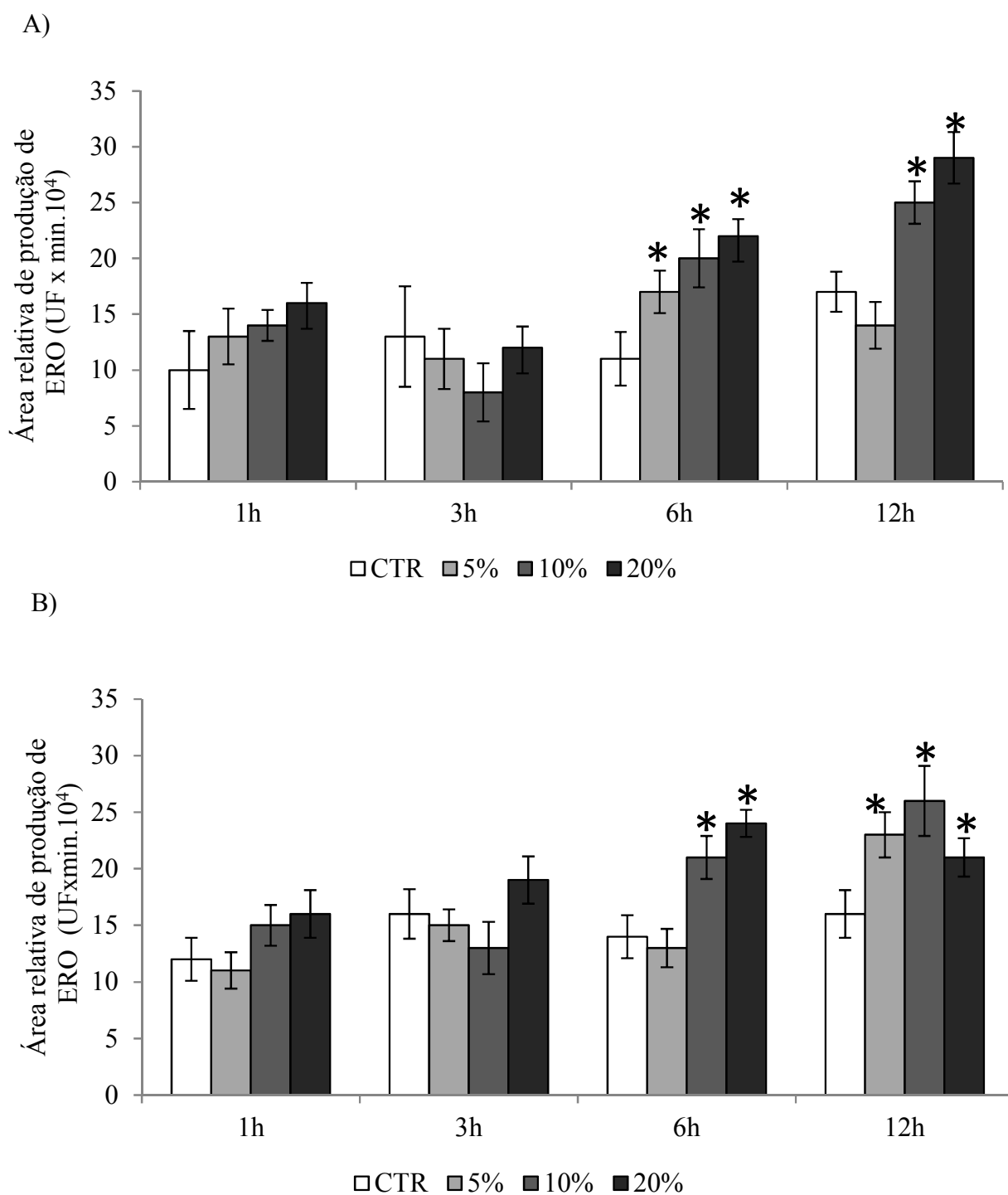


Figura 39 – Produção de ERO em células ZFL expostas às diluições de 5, 10 e 20 % da FSBdMT (A) e da FSBdET (B), ou somente ao meio de cultura (CTR), nos tempos experimentais de 1, 3, 6 e 12 horas. As colunas representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao seu respectivo ao CTR ($P < 0.05$).

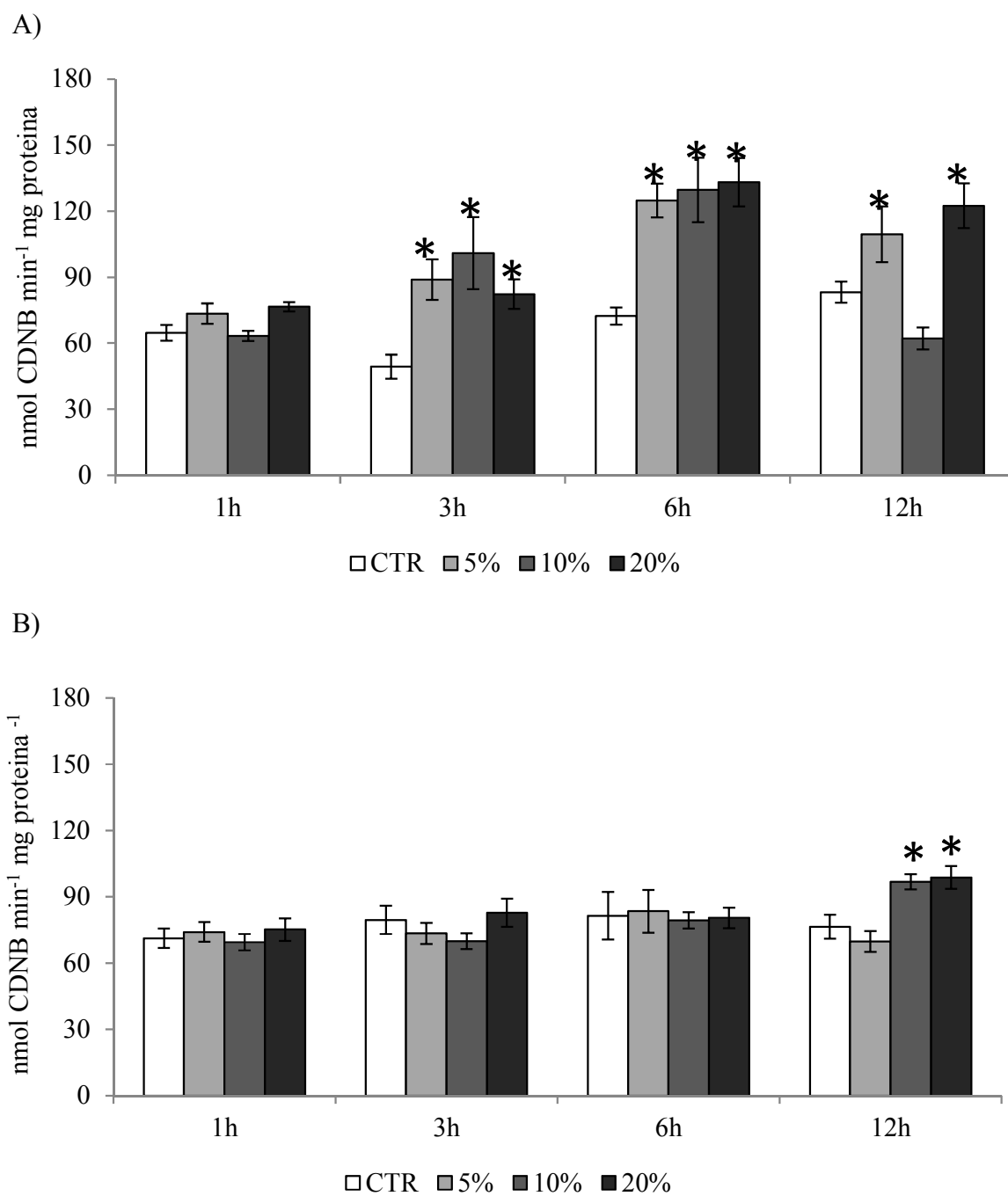


Figura 40 – Atividade da GST em células ZFL expostas às diluições de 5, 10 e 20 % da FSBdMT (A) e da FSBdET (B); ou somente ao meio de cultura (CTR), nos tempos experimentais de 1, 3, 6 e 12 horas. As colunas representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao seu respectivo CTR ($P < 0.05$).

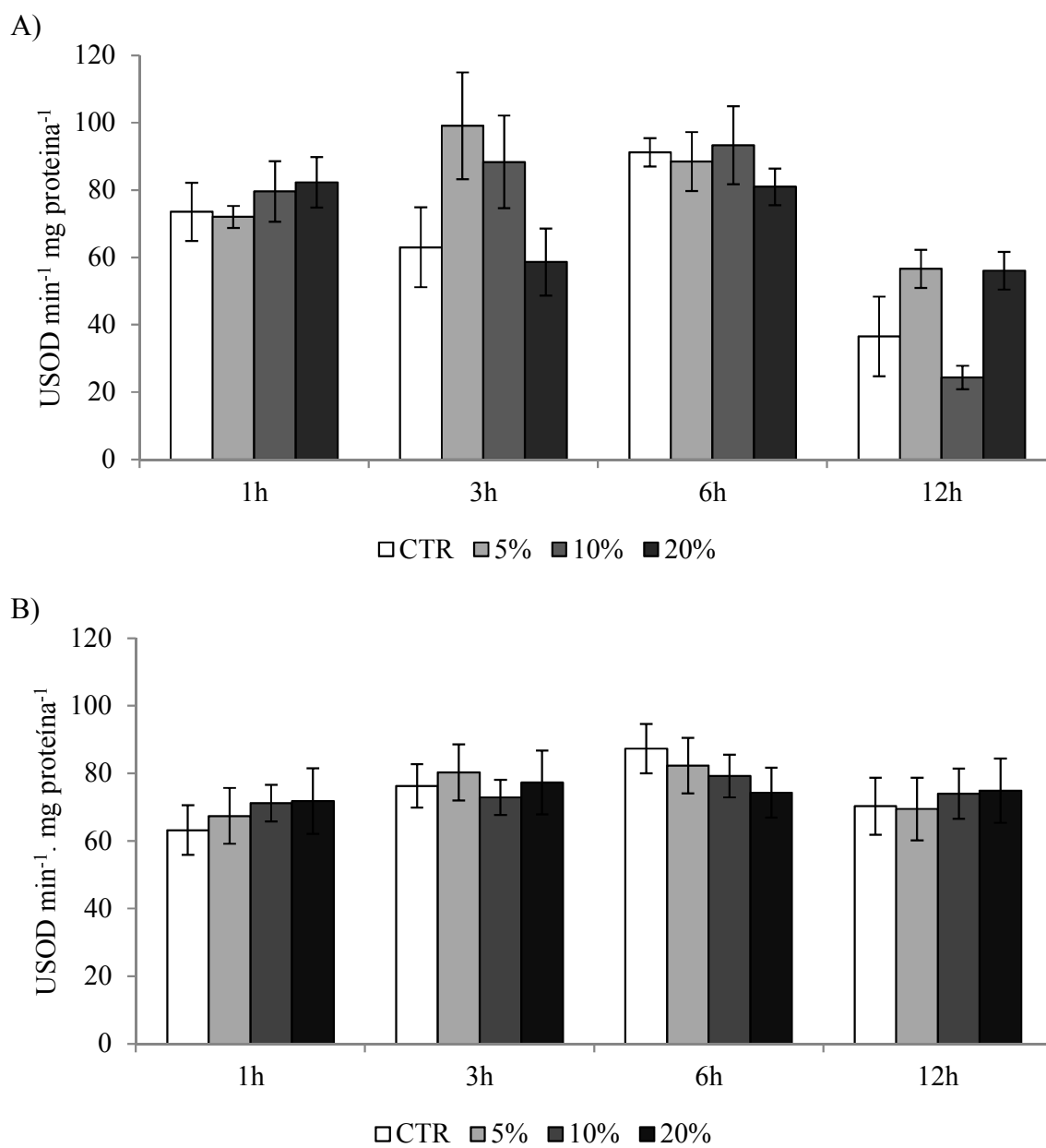


Figura 41 – Atividade da SOD em células ZFL expostas às diluições de 5, 10 e 20 % da FSBdMT (A) e da FSBdET (B); ou somente ao meio de cultura (CTR), nos tempos experimentais de 1, 3, 6 e 12 horas. As colunas representam a média e a linha vertical o erro padrão.

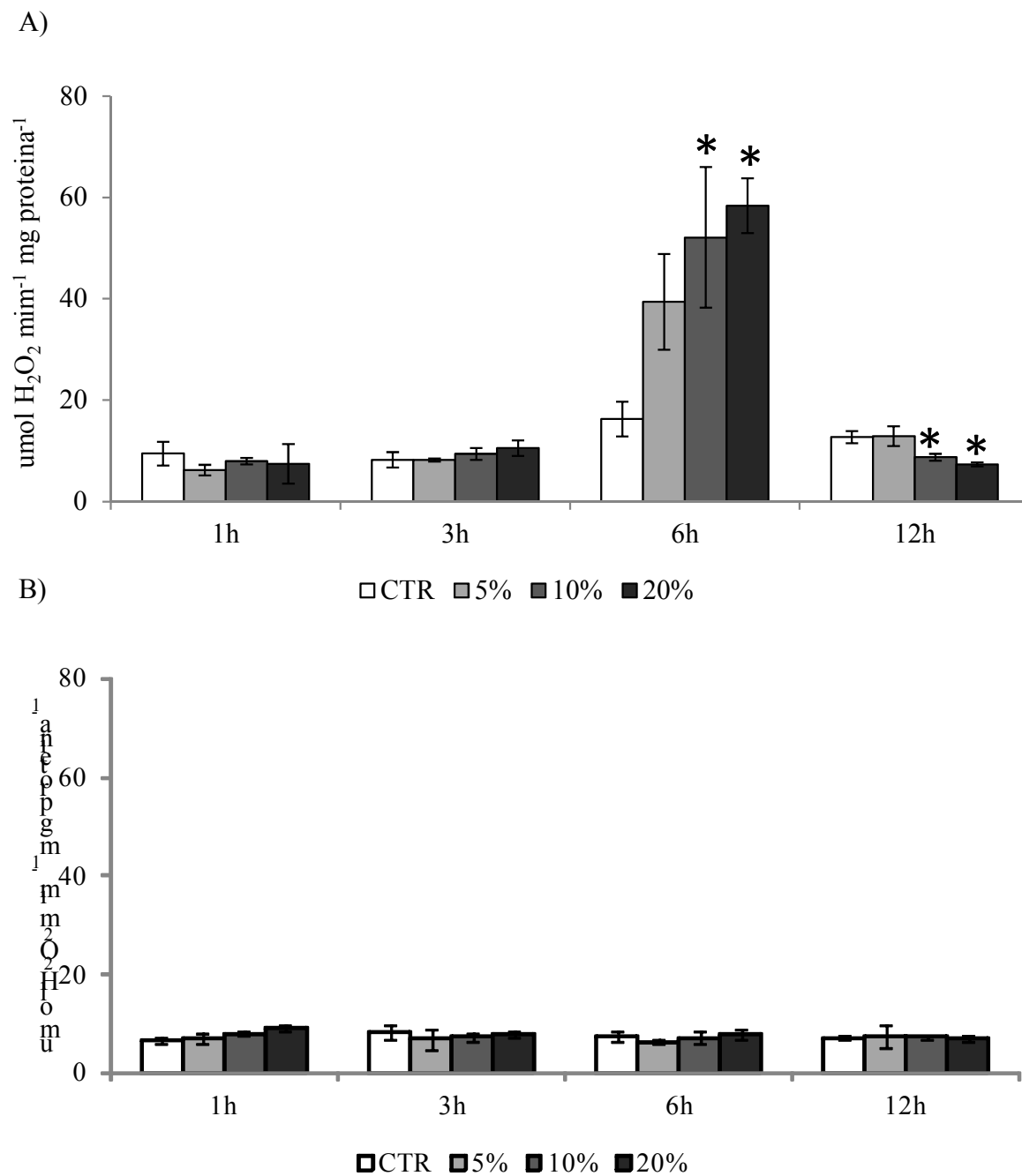


Figura 42 – Atividade da CAT em células ZFL expostos às diluições de 5, 10 e 20 % da FSBdMT (a) e da FSBdET (b); ou somente ao meio de cultura (CTR), nos tempos experimentais de 1, 3, 6 e 12 horas. As colunas representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao seu respectivo CTR ($P < 0.05$).

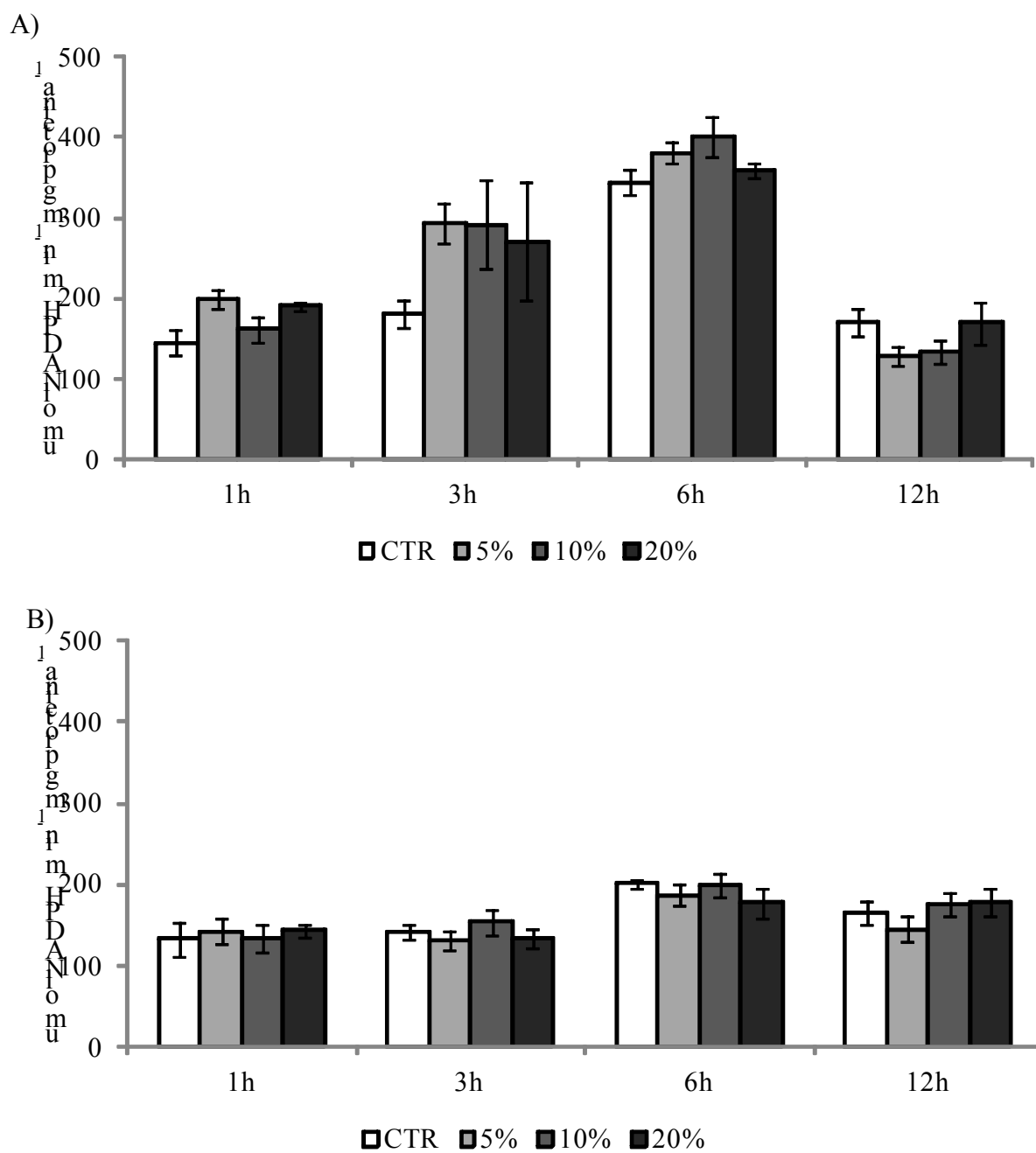
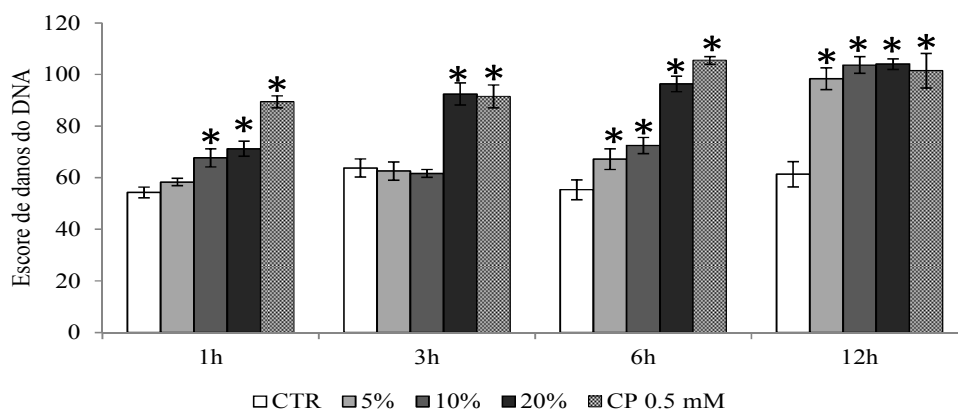
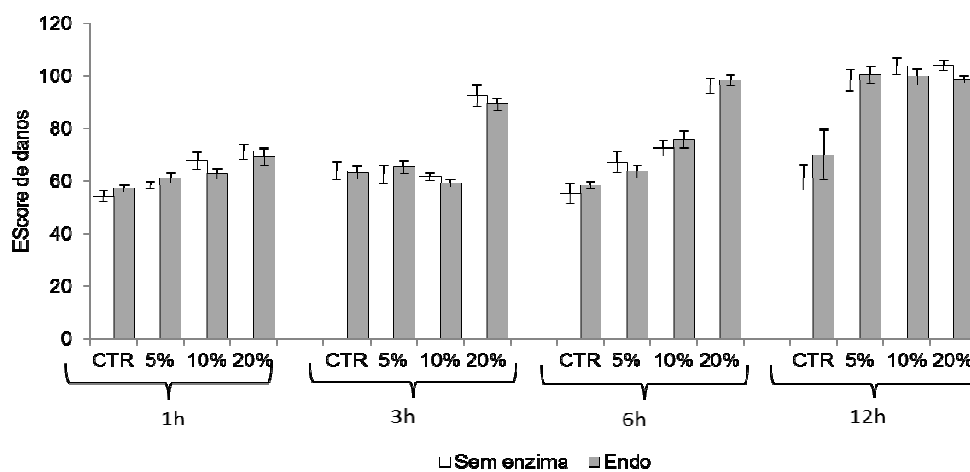


Figura 43 – Atividade da GPx em células ZFL expostas às diluições de 5, 10 e 20 % da FSBdMT (A) e da FSBdET (B); ou somente ao meio de cultura (CTR), nos tempos experimentais de 1, 3, 6 e 12 horas. As colunas representam a média e a linha vertical o erro padrão.

A)



B)



C)

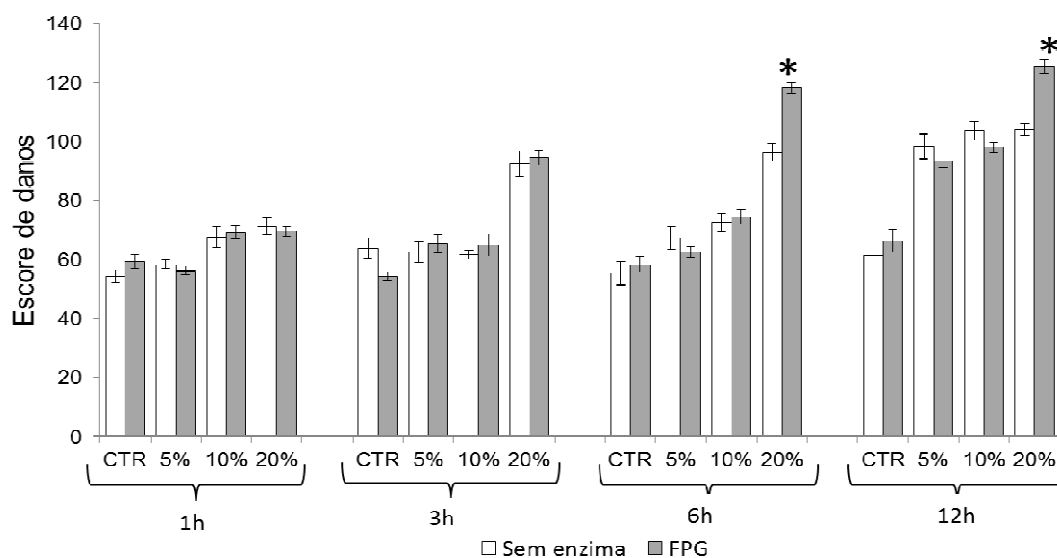


Figura 44 - Escore de danos no DNA em células ZFL expostas às diluições de 5, 10 e 20 % da FSBdMT nos tempos experimentais de 1, 3, 6 e 12 horas quantificados pelo ensaio do cometa padrão (A) e pelo Ensaio do cometa com o emprego da enzima endonuclease III (B) e FPG (C). As colunas representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao seu respectivo controle negativo no ensaio do cometa padrão ou indica diferença significativa em relação a condição sem enzima no Ensaio do cometa com o emprego da enzimas

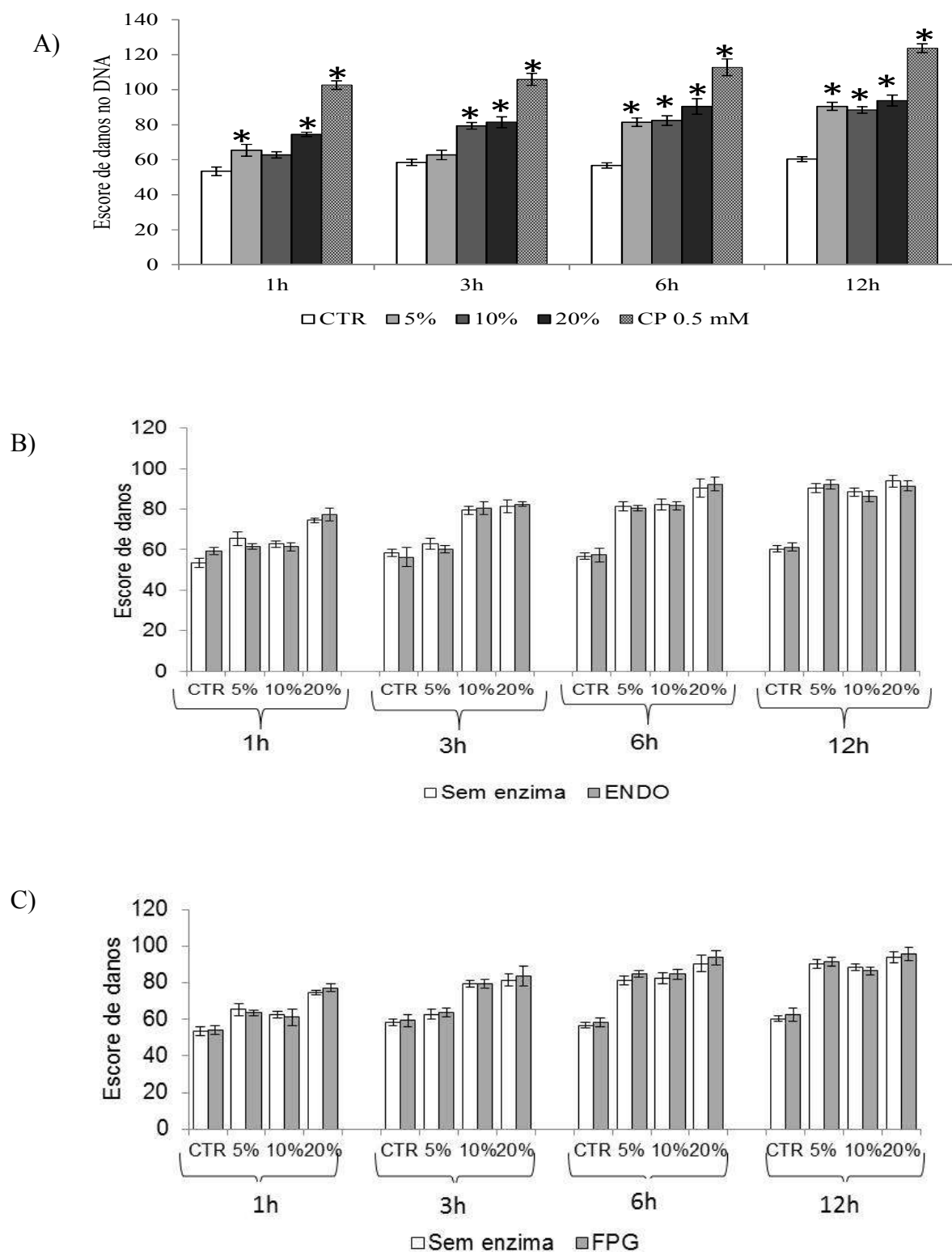


Figura 45 - Escore de danos no DNA em células ZFL expostas às diluições de 5, 10 e 20 % da FSBdET nos tempos experimentais de 1, 3, 6 e 12 horas quantificados pelo ensaio do cometa padrão (A) e pelo Ensaio do cometa com o emprego da enzima endonuclease III (B) e FPG (C). As colunas representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao seu respectivo controle

4. DISCUSSÃO

O ensaio com MTT é um ensaio que avalia a viabilidade celular de maneira indireta, por meio da quantificação da atividade metabólica da célula. A redução do MTT não está somente associado a enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias, mas também à enzimas oxidoreductases dependentes de NADP, localizadas no citoplasma e membranas não-mitocondriais incluindo o lisossomo e a membrana plasmática (BERRIDGE et al, 2005). Este ensaio tem sido usado com sucesso em linhagens celulares de peixes, inclusive as ZFL (BOPP e LETTIERI, 2008, SEOK et al 2007). No presente estudo, os resultados do ensaio com MTT mostraram que as células ZFL expostas tanto a FSBd metílica, quando a FSBd etílica nas diluições de 5 e 10% continuaram viáveis, assim como as células expostas apenas ao meio de cultura. Já nas células expostas às diluições de 20 e 40% tanto da FSBd metílico quanto da FSBd etílico, foi possível observar um aumento na atividade metabólica quando comparado com as células não expostas. Para a diluição de 20% de FSBd metílico e de FSBd etílico houve um aumento de 47% e 23% na atividade metabólica respectivamente, enquanto que para a diluição de 40%, a atividade metabólica aumentou em 73% e 35% respectivamente. Uma das possíveis explicações para esses aumentos seria que a FSBd induz a proliferação celular, hipótese esta não confirmada através da contagem de células em câmara de Neubauer (dados não mostrados aqui). Outra causa seria que a FSBd poderia de algum modo alterar o metabolismo das células, fazendo com que essas reduzissem em maior quantidade o tetrazólio em formazan, levando ao aumento da intensidade da coloração azulada e conseqüentemente da leitura da absorbância durante os experimentos. Huang e Huang, 2011 encontram que o metabolismo das ZFL foi alterado devido à super – expressão de uma subunidade da succinato desidrogenase em células ZFL expostas ao metil paration e postularam que esse aumento foi um mecanismo compensatório para enfrentar a diminuição de energia e biossíntese após tratamento com metil paration. A partir da exposição à 60% à FSBd metílico, a viabilidade das células começou a decair e a FSBd mostrou-se totalmente citotóxicas. Já para a FSBd etílica, a exposição de 60% não se mostrou totalmente citotóxica, havendo uma perda de viabilidade celular de 30%. Para a FSBd etílico, a citotoxicidade de 100% só foi observada a partir da diluição de 80%. A citotoxicidade da FSBd deve estar relacionada com compostos solúveis oriundos do biodiesel, como gotículas dispersas de ésteres de ácidos graxos, resíduos de álcool (etanol ou metanol dependendo da rota de produção) ou ainda devido a presença de contaminantes oriundos da matéria prima, do processo de produção ou formados durante a estocagem do biodiesel (DE QUADROS et al,

2011). Os resultados deste trabalho mostram que a FSBd metílica reduz 100% a atividade metabólica das células em uma diluição menor quando comparada com a FSBd etílica. Isto pode estar relacionado com o tipo de álcool utilizado na produção de cada um dos biodiesel, dado que o metanol apresenta uma toxicidade maior que o etanol e isto pode ter influenciado no potencial citotóxico das frações solúveis empregadas neste teste.

Observando a cinética do ensaio com MTT com as células nas diferentes diluições das FSBd, é possível notar que nas diluições mais baixas (5 e 10%) não ocorreram alterações drásticas no metabolismo das células expostas. Com o aumento da diluição do contaminante (20 e 40%), as células responderam, aumentando o seu metabolismo celular e se mantiveram vivas. Já em diluições altas, as células expostas a ambas as frações não sobreviveram (ou se mostraram metabolicamente inativas). Esse tipo de curva está sendo descrita em inúmeros estudos toxicológicos pelo nome de hormesis, onde a curva dose resposta se mostra bifásica. Esse tipo de comportamento foi mostrado pela primeira vez em 1888, por Schulz, que mostrou que o cloreto de mercúrio em baixas concentrações aumenta a capacidade fermentativa da levedura enquanto que em altas concentrações, o mesmo cloreto de mercúrio se torna citotóxico e inibe a capacidade fermentativa desses fungos (CONOLLY; LUTZ, 2004). Os mecanismos que levam a ocorrência de hormesis ainda não estão bem esclarecidos. Zhang et al (2008) sugerem a hipótese que respostas adaptativas podem levar a hormesis. Segundo estes autores, estressores ambientais normalmente perturbam o meio intracelular estável, mas os sistemas biológicos possuem um conjunto de sistemas de controle homeostático, tanto em nível celular quanto fisiológicos, que são ativados para compensar perturbações, adaptando os organismos a ambientes estressantes. Porém, essa adaptação celular só acontece enquanto o nível de indução de genes anti-estresse ainda não saturaram. Sob baixas doses de exposição ao estressor, é esperado um forte controle homeostático, com mudanças coordenadas na expressão dos genes, mantendo as funções celulares muito parecidas com as células que não foram perturbadas. Com exposições de nível intermediário, o sistema é menos capaz de manter a homeostase, porque os genes anti-estresse estão se aproximando de indução máxima. Em altos níveis do estressor ocorre a superação da capacidade celular de lidar com o estressor, levando a morte celular (ZHANG et al 2008). Já foi descrito o efeito hormético relacionado com viabilidade celular em linhagens de peixes como a PLHC-1 exposta ao cádmio, (RYAN; HIGHTOWER, 1994), RTG-2 exposta a sais de zinco (NI' SHU'ILLEABHA'IN et al., 2004), RTG 2 exposta a compostos fenólicos (DAVOREN, FOGARTY; 2006), CCO exposta ao cromo e GCF exposta ao cobre (TAN et al 2008).

Além da produção basal de ERO, que são produzidas pelo organismo por diversas vias, substâncias exógenas (xenobióticos) podem agir sobre a geração de ERO. Os poluentes mais conhecidos que agem sobre essa produção são os metais, hidrocarbonetos aromáticos, pesticidas, bifenilas policloradas, dioxinas e muitos outros (LUSHCHAK, 2010). É possível inferir que a FSBd, seja de origem metílica ou etílica, é um agente estressor que altera a produção de ERO, levando ao aumento nos níveis da ERO dentro da célula. O aumento pode estar relacionado com a biotransformação dos compostos das frações solúveis, já que a enzima GST teve a sua atividade aumentada em ambas as frações solúveis. A família das glutathione S-transferases catalisa a conjugação de xenobióticos com a glutathione, tornando – os mais solúveis em água, facilitando assim a sua excreção, antes da fase I de biotransformação que pode levar a geração de ERO (VAN DER OOST et al., 2003). As células vivas têm vários mecanismos para restabelecer o estado redox original após uma exposição temporária a níveis de ERO aumentadas. O principal mecanismo de homeostase redox é baseado em cascatas sinalizadoras redox-sensíveis que levam ao aumento da expressão de enzimas antioxidantes. Concentrações elevadas de ERO induzem em muitas células, a expressão de genes cujos produtos apresentam atividade antioxidante. Agora se o aumento de ERO é relativamente pequeno, a resposta antioxidante pode ser suficiente para compensar – lo e para repor o equilíbrio original (DROGE, 2002). Os resultados do presente estudo são mais condizentes com o segundo caso, onde o aumento na produção de ERO foi detectado tanto nas células expostas FSBd metílica quanto etílica, mas essa elevação parece não ter sido suficiente para ativar os genes responsáveis pela produção de enzimas antioxidantes. Houve apenas o aumento da catalase nas células expostas as diluições de 10% e 20% da FSBd metílica em 6 e 12 h, indicando que uma das ERO aumentadas seja o peróxido de hidrogênio.

O grau de integridade do DNA tem sido proposto como um indicador sensível de genotoxicidade e um biomarcador efetivo para monitoramento ambiental. Os danos no DNA dos organismos aquáticos que vivem em ambiente poluídos podem ser usados para estudar a genotoxicidade de agentes tóxicos, como também para a avaliação de risco ecotoxicológico e ambiental (ZHU et al., 2005). Vários mecanismos genéticos foram monitorados em linhagens de células de peixes para avaliar a genotoxicidade de substâncias no ambiente aquático. O ensaio cometa tem recebido considerável atenção e tem sido usado com sucesso em diversas linhagens de peixes (BOLS et al, 2005). Porém, na literatura ainda não há registro do ensaio do cometa feito com a linhagem ZFL. Os nossos resultados mostraram que tanto a FSBd metílica quando a etílica foi genotóxica para as células ZFL. Na versão alcalina do ensaio

cometa padrão, foram encontrados lesões no DNA das células expostas a FSBd metílico em todas as condições experimentais, já para as células ZFL expostas a FSBd etílica, não houve danos no DNA das células expostas a menor diluição. As lesões no DNA detectadas pelo ensaio do cometa são quebras de fita dupla e simples e sítios álcali – lábeis (TICE et al., 2000). Para aumentar a sensibilidade do ensaio cometa é possível adicionar ao processo as endonucleases de restrição, que reconhecem lesões no DNA e convertem essas lesões não reparadas em quebras de DNA adicionais (KIENZLER et al., 2012). Com a utilização das endonucleases, foi possível detectar um aumento de danos no DNA, quando comparado com o ensaio do cometa padrão, no período de 12 horas, nas células expostas a diluição de 20% de FSBd metílica. Esse aumento se deve ao aparecimento de quebras relacionadas com sítios sensíveis a enzima FPG. É sabido que essa enzima detecta bases púricas oxidadas, como a 8 oxi-guanina (COLLINS et al, 1996). É possível inferir que, pelo menos em parte, os danos encontrados no DNA das células expostas a FSBd metílica sejam de origem oxidativa. O aumento na produção de ERO e o aparecimento de quebras relacionadas com sítios sensíveis a enzima FPG encontrados neste estudo, sustentam essa hipótese. Para evitar o estresse oxidativo, as células são equipadas com um conjunto de enzimas antioxidantes que mantém as ERO intracelulares em níveis adequados (ZHANG et al 2008). Porém, como visto neste estudo, a elevação de ERO encontradas nas células expostas a ambas as frações, parece não ter sido suficiente para ativar os genes responsáveis pela produção de enzimas antioxidantes. Então para combater os danos no DNA das ZFL causados pelas ERO, é possível supor que o sistema de reparo tenha auxiliado no reparo, já que as células nas diluições testadas (5, 10 e 20%) continuaram viáveis. Sandrini e colaboradores (2009) encontraram a ativação de dois genes do sistema de reparo de excisão de bases em células ZFL expostos a luz ultra violeta. Um deles é o Apex1, que está ligado ao reparo de lesões oxidativas no DNA.

Em conclusão, é possível observar que o padrão de resposta das células expostas a FSBdMT e FSBdET foram semelhantes, porém os efeitos da FSBdMT parecem ter sido mais intensos. De um modo geral, ambas as frações solúveis parecem ser fatores estressantes para as células, levando estas a recorrerem a um conjunto de sistemas de controle homeostático para compensarem as perturbações e se adaptarem ao agente estressor. As perturbações encontradas nas células expostas a ambas as frações solúveis, foram alterações na produção de ERO, ativação da enzima de biotransformação GST e danos na molécula de DNA. A FSBdMT se mostrou mais citotóxica que a FSBdET, além de produzir danos oxidativos na molécula de DNA. Sendo assim, o biodiesel produzido tanto por rota etílica quanto rota metílica podem causar alterações citotóxicas, bioquímicas e genotóxicas nas células ZFL,

porém o tipo e a intensidade das alterações encontradas na ZFL parecem ser dependentes da rota de produção do biodiesel.

REFERÊNCIAS

- ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (<http://www.anp.gov.br>)
- BERRIDGE, M.V.; HERST, P. M. TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotech. Annual: Review** 11: 127–152, 2005.
- BEUTLER, E. Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods. New York: **Grune&Straton** 1975.
- BOLS, N.C.; DAYEH, V.R.; LEE, L.E.J.; SCHIRMER, K. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. **Biochem. Molec. Biol. of Fishes** 6: 43-84, 2005.
- BOPP, S.K.; LETTIERI, T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. **BMC Pharmacol.** 30: 8:8, 2008.
- BRADFORD, M A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254, 1976.
- CASTAÑO, A.; BOLS, N.; BRAUNBECK, T. The use of fish cells in ecotoxicology. The report and recommendations of ECVAM workshop no. 47. **Altern. Lab. Anim.** 31:317-351, 2003.
- COLLINS, A.R.; DUSINSKA, M.; GEDIK, C.M.; STETINA, R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? **Environ. Health Perspect.** 104:465–469, 1996.
- CONOLLY, R.B.; LUTZ, W.K. Nonmonotonic dose-response relationships: Mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. **Toxicol. Sci.** 77:151–157, 2004
- DAVOREN, M.; FOGARTY, M. In vitro cytotoxicity assessment of the biocidal agents sodium o-phenylphenol, sodium o-benzyl-p-chlorophenol, and sodium tertiary amylphenol using established fish cell lines. **Toxicol. in Vitro** 20: 1190–1201, 2006.
- DE QUADROS, D.P.C.; CHAVES, E.S.; SILVA, J.S.A.; TEIXEIRA, L.S.G.; CURTIUS, A.J.; PEREIRA, P.A.P. Contaminantes em Biodiesel e Controle de Qualidade. **Revista Virtual de Química** 3, 2011.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev** 82:47-95, 2002.
- FENT, K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. **Toxicol. in Vitro** 15:477–488, 2001.
- FERRARI, R.A; OLIVEIRA, V.S; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. **Química Nova** 28:19-23, 2005.

FERREIRA-CRAVO, M.; PIEDRAS, F.R.; MORAES, T.B.; FERREIRA, J.L.R.; FREITAS, D.P.S.; MACHADO, M.D.; GERACITANO, L.A.; MONSERRAT, J.M. Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). **Chemosphere**. 66:1367-1374, 2007.

HOPKINS, J.; TUDHOPE, G.R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **J. Haematol.** 25: 563–575, 1973.

HUANG, Q.; HUANG, H. Alterations of protein profile in zebrafish liver cells exposed to methyl parathion: A membrane proteomics approach. **Chemosphere**. 87:68–76, 2011.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H, JAKOBI, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. **Biol. Chem** 251: 6183-6188, 1976.

KIENZLER, A. Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. **Toxicol. in Vitro**. 2012

KOBAYASHI, H.; SUGUYAMA, 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** 3:103–115, 1995.

LEME, D.M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; SKERSWETAT, M.; MARCHI, M.; MACHADO, M.C.; OLIVEIRA, D.P.; MARIN-MORALES, M.A. Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicol. Environ. Safety** 74:2148–2155, 2011.

LIMA, P.C.R. O biodiesel e a inclusão social. 2004. **Consultoria Legislativa**. Disponível em: <http://www2.camara.gov.br/internet/publicacoes/>; acesso em 29 de outubro de 2010.

LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquat. Toxicol.** 101:13–30, 2010.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein). **Biol. Chem.** 244: 6049 – 6055, 1969.

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

SHÚILLEABHÁIN, N.Í.; MOTHERSILL, C.; SHEEHAN, D.; O'BRIEN, N.M.; O'HALLORAN, J.; VAN PELT, F.N.A.M.; DAVOREN, M. *In vitro* cytotoxicity testing of three metal salts using established fish cell lines. **Toxicol. in Vitro**, 18:365–376, 2004.

PARKINSON, A.; OGILVIE, B.W. Biotransformation of Xenobiotics in: **Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons** (Klaassen CD ed), McGraw-Hill, Inc., New York City, NY, 2008.

PRATES, C. P.; PIEROBON, E. C.; COSTA, R. C. Formação do mercado de biodiesel no Brasil. **BNDES Setorial**, n. 25, p. 39-64, mar. 2007.

RYAN, J.A.; HIGHTOWER, L.E. Evaluation of heavy metal ion toxicity in fish cells using a combined stress and cytotoxicity assay. **Environ. Toxicol. Chem.** 13:1231–1240, 1994.

SANDRINI, J.Z.; TRINDADE, G.S.; NERY, L.E.M.; MARINS, L.F. Time-course expression of DNA repair-related genes in hepatocytes of zebrafish (*Danio rerio*) after UV-B exposure. **Photochem. Photobiol.** 85:220–226, 2009.

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

SINGH, N. P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.** 175:184 – 191, 1988.

TAN, F.; WANG, M.; WANG, W.; LU, Y. Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals *in vitro*. **Toxicol. in Vitro** 22: 164–170 2008.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology Testing. **Environ. and Mol. Mutagenesis** 35: 206-221, 2000.

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

ZHANG, Q.; PI, J.; WOODS, C.G.; JARABEK, A.M.; CLEWELL, H.J.; ANDERSEN, M.E. Hormesis and Adaptive Cellular Control Systems. **Dose-Response J.** 6:196 – 208, 2008.

ZHU, L.; HUANG, Y.; LIU, G. Using DNA damage to monitor water environment. **Chinese J. of Oceanol. and Limnol.** 23:340-348, 2005.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram identificados alguns efeitos biológicos que podem estar relacionados com a presença de biodiesel, produzidos tanto por rota etílica quanto pela rota metílica, utilizando como sistema-teste o peixe neotropical *Prochilodus lineatus* e a linhagem celular derivada de hepatócitos de Zebrafish (ZFL).

Para o peixe *Prochilodus lineatus*, foi encontrado que a fração solúvel do biodiesel produzida por rota etílica induziu um aumento na produção de ERO, causou a ativação da enzima de desintoxicação GST e da enzima antioxidante SOD, aumento na concentração da GSH, e aumentou a frequência de danos no DNA em células branquiais e eritrócitos; e que a fração solúvel do biodiesel produzida por rota metílica induziu um aumento na produção de ERO, causou a ativação da enzima de desintoxicação GST e das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, e aumentou a frequência de danos no DNA em células branquiais e eritrócitos. Comparando os resultados em um mesmo modelo experimental foi possível verificar que os efeitos biológicos causados pelos biodieseis produzidos pelas rotas etílica e metílica são semelhantes quanto à produção de ERO, ativação da GST, ativação da SOD e danos no DNA dos peixes. O fato desses parâmetros responderem a presença de contaminação por biodiesel, independente da rota de produção, faz deles possíveis candidatos a biomarcadores para a avaliação de risco em ambientes aquáticos, que sofreram impactos ambientais por biocombustíveis.

Para as células ZFL, ambas as frações solúveis promoveram aumento na produção de ERO, ativação da enzima de biotransformação GST e danos na molécula de DNA. A fração solúvel do biodiesel produzida por rota metílica se mostrou mais citotóxica que a fração solúvel do biodiesel produzida por rota etílica, além de produzir danos oxidativos na molécula de DNA. Esses resultados mostram que os parâmetros, produção de ERO, atividade da GST e danos no DNA responderam a presença de contaminação de biodiesel, confirmando a utilização desses biomarcadores para a avaliação de risco em impactos em ambientes aquáticos causados por biocombustíveis.

Comparando os efeitos entre os dois modelos experimentais, *P. lineatus* e ZFL, é possível inferir que ambos os sistemas-teste são eficientes para a identificação de efeitos biológicos relacionados à contaminação do biodiesel. Porém, as células ZFL, além de mostrar efeitos gerais da exposição a ambas frações solúveis, como produção de ERO, ativação da enzima de biotransformação GST e danos na molécula de DNA, também mostrou efeitos específicos, dependente da rota de produção do biodiesel, pois através deste sistema-teste,

pode-se verificar que a fração solúvel do biodiesel produzida por rota metílica é mais citotóxica que a fração solúvel do biodiesel produzida por rota etílica. Esses resultados ressaltam a importância da utilização de vários bioindicadores e vários biomarcadores na avaliação de impactos ambientais, para se ter uma visão mais detalhada e completa da ação do xenobiótico.

Para facilitar a comparação entre efeitos encontrados na exposição aos 2 tipos de biodieseis, segue abaixo 2 tabelas, mostrando os resultados encontrados em ambos os sistemas testes analisados:

a)

Brânquias			Fígado			Sangue		
	FSBd ET	FSBd MET		FSBd ET	FSBd MET		FSBd ET	FSBd MET
EROD	=	=	EROD	-	=	DNA	+	+
GST	+	=	GST	+	+	MN	=	=
GSH	=	=	GSH	+	=	AEN	=	=
ERO	+	=	ERO	+	+			
SOD	=	=	SOD	+	+			
CAT	=	=	CAT	=	+			
GPX	=	=	GPX	=	+			
DNA	+	=						

b)

	FSBdMT	FSBdET
MTT VC : 0%	60%	80%
ERO	+ (6 e 12h)	+ (6 e 12)
GST	+ (3, 6 e 12h)	+ (12h)
SOD	=	=
CAT	+ (6h) e - (12h)	=
GPX	=	=
Danos do DNA inespecíficos	+ (1, 3, 6 e 12h)	+ (1,3,6 e 12h)
Danos em pirimidinas	=	=
Danos em purinas	+ (6 e 12h)	=

Tabela 6 – a) Resumo dos resultados encontrados no *Prochilodus lineatus* expostos a ambas as frações testadas, nos 3 tecidos analisados; b) Resumo dos resultados encontrados nas células ZFL expostas a ambas as frações testadas. (+) significa aumento significado em relação ao CN; (=) significa sem diferença estatística em relação ao CN

Generalizando os resultados encontrados neste estudo é possível sugerir um modelo, sugerindo um possível mecanismo de ação para o biodiesel dentro das células. Segue abaixo, esse possível modelo:

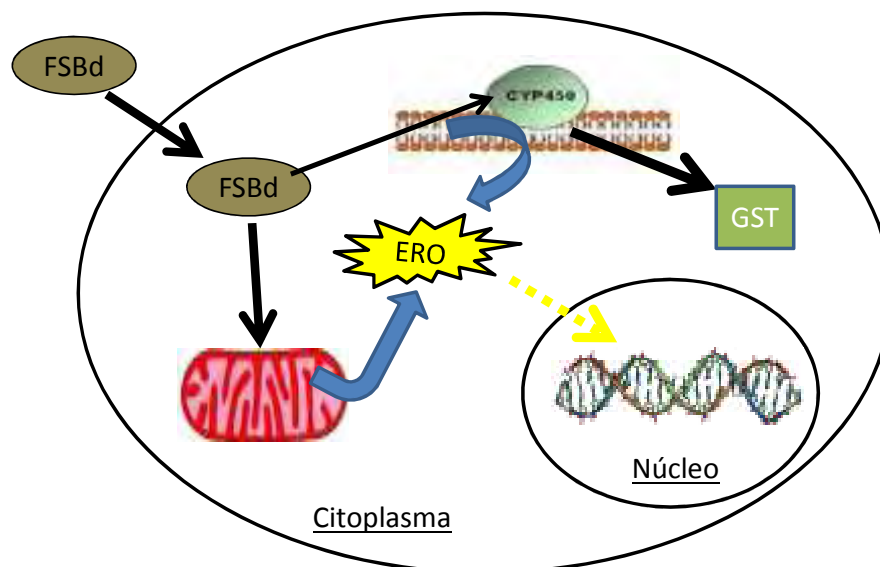


Figura 46 – Esquema sugerindo possível mecanismo de ação do biodiesel dentro da célula animal.

Para finalizar, baseado nos resultados encontrados, a afirmação de que o biodiesel é um biocombustível ecologicamente correto precisa ser feita com cautela. Mais estudos são necessários para a compreensão dos reais benefícios e malefícios que esse biocombustível pode trazer para o meio ambiente, em especial o ecossistema aquático. Este estudo se torna importante porque colabora na compreensão dos efeitos biológicos causados pelos compostos solúveis presentes no biodiesel, podendo ser utilizado como fonte de consulta para possíveis medidas que precisam ser tomadas no caso de um derramamento de biodiesel e sugerindo biomarcadores para o biomonitoramento dos recursos hídricos associados a possíveis impactos ambientais causados pelo biodiesel.

7. REFERÊNCIAS GERAIS

ABRAHAMSON, A.; ANDERSON, C.; JÖNSSON, M.E.; FOGELBERG, O.; ÖRBERG, J.; BRUNSTRÖM, B.; BRANDT, I. Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish-A study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala Waters. **Aquat. Toxicol.** 85:1-8, 2007.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutat. Res** 34:121-135, 1995.

ANP, **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis** (<http://www.anp.gov.br>)

ANTOLÍN, G. Optimization of Biodiesel Production by Sunflower Oil Transesterification. **Bioresource Technol.** 83:111-114, 2002.

ATLAS do BIODIESEL - Potencialidade Brasileira para Produção e Consumo de Combustíveis Vegetais. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/brasil/regioes.htm>>. Acessado em: 12/02/2007.

AYLLON F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and Other Nuclear Lesions as Genotoxicity Indicators in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicol. Environ. Safety** 49: 221-225, 2001.

ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M. MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde** 12:61-72, 2007.

BENNEMANN, S.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; ROCHA, G.R.A. Composición ictiofaunística em cinco localidades de la cuenca Del rio Tibagi, PR - Brasil. **Interciencia** 20:7-13, 1995.

BERRIDGE, M.V.; HERST, P. M. TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnol. Annual: Review** 11: 127–152, 2005.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism. **A manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, 1975.

BEUTLER, E; DUROM, O; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.** 61:882-890, 1963.

BICKHAM, J.W.; SANDHU, S.; HEBER, P.D.N; CHIKHI, L; ANTHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mut.Res.** 463:33-51, 2000.

BRADFORD, M A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254, 1976.

BOLS, N.C.; DAYEH, V.R.; LEE, L.E.J.; SCHIRMER, K. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. **Biochem. Molec. Biol. of Fishes** 6: 43-84, 2005.

BOPP, S.K.; LETTIERI, T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. **BMC Pharmacol.** 30: 8:8, 2008.

BORSATO, D.; DALL'ANTONIA, H.L.; GUEDES, L. C .; MAIA, E.C.; FREITAS, R.H.; MOREIRA, I.; SPACINO, R.K. Aplicação do delineamento simplex-centroide no estudo da cinética da oxidação de biodiesel B100 em mistura com antioxidantes sintéticos. **Quím. Nova** 33:1726- 1731, 2010.

BUNGER, J.; KRAHL, J.; BAUM, K.; SCHROEDER, O.; MULLER, M.; WESTPHAL, G.; RUHNAU, P.; SCHULZT, G.; HALLIER, E. Cytotoxic and mutagenic effects, particle size and concentration analysis of diesel engine emissions using biodiesel and petrol diesel as fuel. **Arch. Toxicol.** 74:490–498, 2000a.

BUNGER, J.; MULLER, M.M.; KRAHL, J.; BAUM, K.; WEIGEL, A.; HALLIER, E.; SCHULZ, T.G. Mutagenicity of diesel exhaust particles from two fossil and two plant oil fuels. **Mutagenesis.** 15:391–397, 2000b.

BUNGER, J.; KRAHL, J.; MUNACK, A.; RUSCHEL, Y.; SCHRODER, O.; EMMERT, B.; WESTPHAL, G.; MULLER, M.; HALLIER, E.; BRUNING, T. Strong mutagenic effects of diesel engine emissions using vegetable oil as fuel. **Arch. Toxicol.** 81: 599- 603, 2007.

CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J-L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. **Mut. Res.** 531:5-23, 2003.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; YERS, M.S. Assessment of the piscine micronuclei test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish Aquat. Sci.** 47:2123 – 2136, 1990.

CASTAÑO, A.; BOLS, N.; BRAUNBECK, T. The use of fish cells in ecotoxicology. The report and recommendations of ECVAM workshop no. 47. **Altern. Lab. Anim.** 31:317-351, 2003.

CAVALCANTE, D.G.S.M.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mut. Res** 655: 41-46, 2008.

ÇAVAS, T.; KONEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis** 22:263-268, 2007.

CHAN, K.M.; KU, L.L.; CHAN, P.C.; CHEUK, W.K. Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. **Marine Environ Res.** 62: 83–87, 2006.

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

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

CHEUNG, K.L.; NTZIACHRISTOS, L.; TZAMKIOZIS, T.; SCHAUER, J.J.; SAMARAS, Z.; MOORE, K.F.; SIOUTAS, C. Emissions of Particulate Trace Elements, Metals and Organic Species from Gasoline, Diesel, and Biodiesel Passenger Vehicles and Their Relation to Oxidative Potential. **Aerosol Sci. and Technol.** 44, 2010

COLLINS, A.R.; DUSINSKA, M.; GEDIK, C.M.; STETINA, R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? **Environ. Health Perspect.** 104:465–469, 1996.

CONOLLY, R.B.; LUTZ, W.K. Nonmonotonic dose-response relationships: Mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. **Toxicol. Sci.** 77:151–157, 2004.

COOKE, M.S.; EVANS, M.D.; DIZDAROGLU, M.; JOSEPH, L. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB J.** 17:1195-1214, 2003.

COSTA, C.L.A.; CHAVESA, I.S.; VENTURA-LIMA, J.; FERREIRA, J.L.R.; FERRAZ, L.; CARVALHO, L.M.; MONSERRAT, J.M. In vitro evaluation of co-exposure of arsenium and an organic nanomaterial (fullerene, C60) in zebrafish hepatocytes. **Part C: Toxicol. & Pharmacol.** 155: 206–212, 2012.

DAVOREN, M.; FOGARTY, M. In vitro cytotoxicity assessment of the biocidal agents sodium o-phenylphenol, sodium o-benzyl-p-chlorophenol, and sodium ptertiary amyphenol using established fish cell lines. **Toxicol. in Vitro** 20: 1190–1201, 2006.

DE QUADROS, D.P.C.; CHAVES, E.S.; SILVA, J.S.A.; TEIXEIRA, L.S.G.; CURTIUS, A.J.; PEREIRA, P.A.P. Contaminantes em Biodiesel e Controle de Qualidade. **Revista Virtual de Química** 3, 2011.

DOMINGUES, W.M.; HAYASHI, C. Estudo experimental sobre anéis diários em escamas nas fases iniciais do desenvolvimento do curimba, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae). **Revista Brasileira de Biologia** 58:609-617, 1998.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** 82:47-95, 2002.

EGGENS, M.L, GALGANI, F. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: Fast determination within a fluorescence plate-reader. **Mar. Environ. Res.** 33: 213-221, 1992.

FATORELLI, L.; CORSEUIL, H.X. Avaliação de risco ecológico para a estação intermediária de Guaratuba In: **Anais do XIII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas**, Cuiabá, 2004.

FENT, K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. **Toxicol. in Vitro** 15:477–488, 2001.

FERREIRA-CRAVO, M.; PIEDRAS, F.R.; MORAES, T.B.; FERREIRA, J.L.R.; FREITAS, D.P.S.; MACHADO, M.D.; GERACITANO, L.A.; MONSERRAT, J.M. Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). **Chemosphere**. 66:1367-1374, 2007.

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. **Quím. Nova** 28:19-23, 2005.

FINCH, G.; HOBBS, C.H.; BLAIR, L.; BARR, E.B.; HAHN, F.F.; JARAMILLO, R.J.; KUBATKO, J.E.; MARCH, T. H.; WHITE, R.K.; KRONE, J. R.; MÉNACHE, M.G.; NIKULA, K.J.; MAUDERLY, J.L.; VAN GERPEN J.; MERCEICA, M.D.; ZIELINSKA, B.; STANKOWSKI, L.; BURLING, K., HOWELL, S. Effects of subchronic inhalation exposure of rats to emissions from a diesel engine burning soybean oil-derived biodiesel fuel. **Inhal. Toxicol.** 14:1017–1048, 2002.

FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I.; NIGRO, M.; FÖRLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbor. **Mut. Res.** 552:187–195, 2004.

GERPEN, J.V. Biodiesel processing and production. **Fuel Process Technol.** 86:1097 - 1107, 2005.

DI GIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand, G.M. (Ed.), **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. 2nd ed. Washington: Taylor & Francis, pp. 523-561. 1995.

GHOSH, C.; ZHOU, Y.L.; COLLODI, P. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. **Cell Biol. Toxicol.** 10: 167–176, 1994.

HE, S. Cancer and inflammation studies using zebrafish cell lines. Doctoral thesis, Institute of Biology (IBL). **Faculty of Science, Leiden University**, 2010.

HAGGER, J.A.; JONES, M.B.; LEONARD, P.; OWEN, R.; GALLOWAY, T.S. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? **Integrat. Environ. Assessm. Managem.** 2:312–329, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press. 2005.

HEMMINGSSEN, J.G.; MØLLER, P.; NØJGAARD, J.K.; ROURSGAARD, M.; LOFT, S. Oxidative Stress, Genotoxicity, And Vascular Cell Adhesion Molecule Expression in Cells Exposed to Particulate Matter from Combustion of Conventional Diesel and Methyl Ester Biodiesel Blends. **Environ. Sci. Technol.** 45: 8545–8551, 2011.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K B (ed.) **Functional metabolism: regulation and adaptation**. New York, John Wiley & Sons, Inc. pp 319-368. 2004.

HILL J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **PNAS** 103: 11206-11210, 2006.

HOFTMAN, R.N.; DE RAAT, W.K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulfonate. **Mut. Res.** 104:147-152, 1982.

HOLLEBONE, B.P.B.; FIELDHOUSE, T.C.; LUMLEY, M.; LANDIRAULT, K.D.; JACKMAN, P. Aqueous solubility, dispersibility and toxicity of biofuels. **Environment Canada Arctic and Marine Oil Spill Program Technical Seminar (AMOP) Proceedings** 227-244, 2007.

HOPKINS, J.; TUDHOPE, G.R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **J. Haematol.** 25: 563-575, 1973.

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

JHA, A.N. Genotoxic studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research*, v.552, p.1-17, 2004
JIMENEZ, B.D.; STEGEMAN, J.J. Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. In: Adams, S.M. (Ed.). *Biological Indicators of Stress in Fish*. Bethesda: **Amer Fisheries Symp.** 8: 67-79, 1990.

JONSSON, C.M.; CASTRO, V.L. Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde-ambiente. **EMBRAPA**, 2005. in: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Jonsson_Castro_biomarcadoresID-U4Vhi5C93K.pdf

JUNG, D.; MATSON, C.; COLLINS, L.; LABAN, G.; STAPLETON, H.; BICKHAM, J.; SWENBERG, J.; DI GIULIO, R. Genotoxicity in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) from a PAH-contaminated Superfund site on the Elizabeth River, Virginia. **Ecotoxicology** 20: 1881-1889, 2011.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBI, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. **Biol. Chem.** 251: 6183-6188, 1976.

KEYER, K.; GORT, A.S.; IMLAY, A. Superoxide J and the production of oxidative DNA damage. **J. Bacteriol** 177: 6782-6790, 1995.

KESTON, A.S.; BRANDT, R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. **Anal. Biochem.** 11: 1-5, 1965.

KHAN, N.; WARITH, M.A.; LUK, G. A Comparison of Acute Toxicity of Biodiesel, Biodiesel Blends, and Diesel on Aquatic Organisms. **J Air Waste Manag Assoc.** 57:286-96, 2007.

KIENZLER, A. Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. **Toxicol in Vitro.** 2012

KILEMADE, M.F.; HARTL, M.G.J.; SHEEHAN, D.; MOTHERSILL, CAVAN PELT, F.N.A.M.; O'HALLORAN, J.; O'BRIEN, N.M. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*) as measured by the comet assay. **Environ and Mol Mutagenesis**, 44: 56-64, 2004.

KNOTHE, Gerhard, et al, **Manual do Biodiesel**, São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KOBAYASHI, H.; SUGUYAMA, 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** 3:103–115, 1995.

KRAHL, J.; KNOTHE, G.; MUNACK, A.; RUSCHEL, Y.; SCHRÖDER, O.; HALLIER, E.; WESTPHAL, G.; BÜNGER, J. Comparison of exhaust emissions and their mutagenicity from the combustion of biodiesel, vegetable oil, gas-to-liquid and petrodiesel fuels. **Fuel** 88:1064–1069, 2009.

LACKNER, R. Oxidative stress in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck T, Hinton D E, Streit B (eds). **Fish Ecotoxicol**. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland. 203 – 224, 1998.

LEE, L.E.J.; DAYEH, V.R.; SCHIRMER, K.; AND BOLS, N.C. Applications and potential uses of fish gill cell lines: examples with RTgill-W1. **In vitro cellular & Developm. Biolog. Animal**. 45: 127–134, 2009.

LEITE, M.B.N.L.; ARAÚJO, M M.S.; NASCIMENTO, I.A.; CRUZ, .A.C.S.; PEREIRA, S.A.; NASCIMENTO, N.C. Toxicity of water-soluble fractions of biodiesel fuels derived from castor oil, palm oil, and waste cooking oil. **Environ. Toxicol. Chemi**. 30:893–897, 2011.

LEME, D.M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; RENZ, S.; REINEL, S.; OLIVEIRA, D.P.; FERRAZ, E.R.A.; MARCHI, M.R.R.; MACHADO, M.C.; ZOCCOLO, G.J.; MARIN-MORALES, M.A. An overview of biodiesel soil pollution: data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. **J. Hazard Mater**, doi:10.1016/j.jhazmat.2011.11.026, 2011a.

LEME, D.M.; GRUMMT, T.; OLIVEIRA, D.P.; SEHR, A.; RENZ, S.; REINEL, S.; FERRAZ, E.R.A.; MARCHI, M.R.R.; MACHADO, M.C.; ZOCCOLO, G.J.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity assessment of water soluble fractions of biodiesel and its diesel blends using the Salmonella assay and the in vitro MicroFlow kit (Litron) assay. **Chemosphere**, doi:10.1016/j.chemosphere.2011.10.017, 2011b.

LIMA, P.C.R. O biodiesel e a inclusão social. **Consultoria Legislativa**. Available at <http://www2.camara.gov.br/internet/publicacoes/>. 2004.

LIVINGSTONE, D.R Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Mar. Pollut. Bull**. 42: 656–666, 2001.

LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquat. Toxicol**. 101:13–30, 2011

LYONS, B.P.; HARVEY, J.S.; PARRY, J.M. An initial assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in the intertidal teleost *Lipophrys pholis*. **Mut. Res.** 390: 263-268, 1997.

MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technol.** 70: 1 – 15, 1999.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E et al. (eds). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: Edição dos editores, p. 551-577. 2002.

MARTINEZ, C.B.R.; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.V.; ZAIA, D.A.M. Acute morphological and physiological affects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian J. Biol.** 64: 797-807, 2004.

MARTINEZ, C.B.R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Ângela Teresa Silva-Souza. (org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Maringá: **ABRAPOA**, p. 43-62, 2006.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin. **Biol.Chem.** 244: 6049 – 6055, 1969.

MCCORMICK, R.L. The Impact of Biodiesel on Pollutant Emissions and Public Health. **Inhal. Toxicol.** 19:1033-1039, 2007.

MEHER, L.C.; VIDYA, S.D.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-A review. **Renewable Sustainable Energy Rev.** 10:248-268, 2006.

MIRANDA, C.L.; COLLODI, P.; ZHAO, X.; BARNES, D.W.; BUHLER, D.R. Regulation of cytochrome P450 expression in a novel liver cell line from zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 305:320–327, 1993.

MONSERRAT, J.M.; GERACITANO, L.A.; BIANCHINI, A. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. **Comments Toxicol.** 9:55–269, 2003.

MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M. G.; PINHO, G.L.L.; CHAVES, I.S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.** 146C: 221–234, 2007.

MONTEIRO, V.; CAVALCANTE, D.G.S.M.; VILÉLA, M.B.F.A.; SOFIA, S.H.; MARTINEZ, C.B.R. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical fresh water fish *Prochilodus lineatus*. **Aquat. Toxicol.** 104: 291-298, 2011.

MOORE, M.N.; DEPLEDGE, M.H, READMAN, J.W.; LEONARD, P. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mut. Res.** 552:247–268, 2004.

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

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L.; CRUZ, A. C. S.; Santos, J. M; Veras, T.F.; BARROS, D.A.; ALVAREZ, H. M. ; NASCIMENTO, M. A. Is Biodiesel an Eco-Compatible Fuel? Toxicity Estimation Organisms of Diferent Trophic Levels. In: Harry Newbury; William de Lome.. (Org.). **Industrial Pollution Including Oil**. Nova York: Nova Science Publishers, 01:01-30, 2009.

NOGUEIRA, L.; SANCHES, A.L.M.; SILVA, D.G.H.; FERRIZI, V.C.; MOREIRA, A.B.; ALMEIDA, E. A. Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. **Chemosphere**. 85: 97 – 105, 2011.

PAIVA, M.; ANDRADE-TUBINO, M.; GODOY, M. As represas e os peixes nativos do rio Grande: bacia do Paraná, Brasil. Rio de Janeiro: **Interciência** Ltda, 2002.

PARKINSON, A.; OGILVIE, B.W. Biotransformation of Xenobiotics in: **Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons** (Klaassen CD ed), McGraw-Hill, Inc., New York City, NY, 2008.

PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M., CORSEUIL, H.X.; SCHNEIDER, M.R. LINHARES, M.M. Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo. Salvador: **Centro de Recursos Ambientais, Série Cadernos de Referência Ambiental**, v. 12. 246 p, 2002.

PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N; REZENDE, M.J.C.; RIBEIRO, N.M.; TORRES, E.A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P.A.; ANDRADE, J.B. Biodiesel: an overview. **J. Braz. Chem. Soc.** 16, 2005.

POON, R.; CHU, I; VALLI, V.E.; GRAHAM, L.; YAGMINAS, A.; HOLLEBONE, B.; RIDEOUT, G.; FINGAS, M. Effects of three biodiesels and a low sulfur diesel in male rats – A pilot 4-week oral study. **Food Chem. Toxicol.** 45:1830- 1837, 2007.

PORTARIA ANP Nº 255 DE 15/09/2003. Estabelece a especificação do biodiesel puro a ser adicionado ao óleo diesel automotivo para testes em frotas cativas ou para uso em processo industrial específico nos termos da Portaria ANP nº 240, de 25 de agosto de 2003 .

PRATES, C. P; PIEROBON, E. C; COSTA, R. C. Formação do mercado de biodiesel no Brasil. **BNDES Setorial** 25:39-64, 2007.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Editora Ulbra. Canoas: 1ª edição, 2003.

ROTA, C.; CHIGNELL, C.F.; MASON, R.P. Evidence for free radical formation during theoxidation of 2'-7'-dichlorofluorescin to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: Possible implications for oxidative stress measurements. **Free Radic. Biol. Med.** 27:873– 81, 1999.

RYAN, J.A.; HIGHTOWER, L.E. Evaluation of heavy metal ion toxicity in fish cells using a combined stress and cytotoxicity assay. **Environ. Toxicology and Chemistry** 13:1231–1240, 1994.

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

SANDRINI, J.Z.; TRINDADE, G.S.; NERY, L.E.M.; MARINS, L.F. Time-course expression of DNA repair-related genes in hepatocytes of zebrafish (*Danio rerio*) after UV-B exposure. **Photochem. Photobiol.** 85:220–226, 2009.

SARASQUETE, C.; SEGNER, H. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. **Sci. of the Total Envir.** 247:313–332, 2000.

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

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experim. Physiol.** 82:291–295, 1997.

SHÚILLEABHÁIN, N.Í.; MOTHERSILL, C.; SHEEHAN, D.; O'BRIEN, N.M.; O'HALLORAN, J.; VAN PELT, F.N.A.M.; DAVOREN, M. In vitro cytotoxicity testing of three metal salts using established fish cell lines. **Toxicol. in Vitro**, 18:365–376, 2004.

SINGH, N. P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.** 175:184 – 191, 1988.

STEGEMAN, J.J.; BROWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: **Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress.** Eds. Lewis Publishers. Chelsea, MI, USA, pp. 235–335. 1992.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29:1715–1733. 1996.

STURVE, J.; HASSELBERG, L.; FALTH, H.; CELANDER, M.; FÖRLIN, L. Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquat. Toxicol.** 78, 73–78. 2006.

TAN, F.; WANG, M.; WANG, W.; LU, Y. Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals in vitro. **Toxicol. in Vitro** 22: 164–170 2008.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology Testing. **Environ. and Mol. Mutagenesis** 35: 206–221, 2000.

- UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat Toxicol.* 79:201-204, 2006.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. ***Environ. Toxicol. Phar.*** 13:57-149, 2003
- VAN GESTEL, C.A.M.; VAN BRUMMELEN, T.C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. ***Ecotoxicol.*** 5:217-225, 1996.
- VAN NGAN, P.; GOMES, V.; PASSOS, M.J.A.C.R.; USSAM, K.A.; CAMPOS, D.Y.F.; ROCHA, A.J.O.S.; PEREIRA, B.A. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station “Comandante Ferraz,” King George Island. ***Polar Biol.*** 30:209–217, 2007.
- VARSHO, B.J. Acute oral toxicity study of 100% REE in albino rats. **WIL Research Laboratories**, Inc. Ashland, OH, USA. Final Report (WIL-275003), 1996a.
- VARSHO, B.J. Acute dermal toxicity study of 100% REE in albino rabbits. **WIL Research Laboratories**, Inc. Ashland, OH, USA. Final Report (WIL-275004), 1996b.
- VASUDEVAN, P.T.; BRIGGS, M. Biodiesel production: Current state of the art and challenges. ***J Ind Microbiol Biot*** 35: 421-430, 2008.
- VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. ***Comparat. Biochem. and Physiol. Part C***, 146:281–300, 2007.
- ZELDIN, D.C.; SEUBERT, J.M. Structure, Mechanism, and Regulation of Cytochromes P450. In: ***Molec. Biochem. Toxicol.***, Fourth Edition, 2008.
- ZHANG, Q.; PI, J.; WOODS, C.G.; JARABEK, A.M.; CLEWELL, H.J.; ANDERSEN, M.E. Hormesis and Adaptive Cellular Control Systems. ***Dose-Response J.*** 6:196 – 208, 2008.
- ZHU, L.; HUANG, Y.; LIU, G. Using DNA damage to monitor water environment. ***Chinese J. of Oceanol. and Limnol.*** 23:340-348, 2005.
- WAN, G.; CHEUK, W.K.; CHAN, K.M. Differential regulation of zebrafish metallothionein-II (zMT-II) gene transcription in ZFL and SJD cell lines by metal ions. ***Aquat. Toxicol.*** 91:33–43, 2009.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. ***Phy. Rev.*** 77:591- 620, 1997.