



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Andréia Arantes Felício

Avaliação de biomarcadores bioquímicos em cascudos
(*Pterygoplichthys anisitsi*) expostos a óleo diesel e biodiesel.

São José do Rio Preto
2012

Andréia Arantes Felício

Avaliação de biomarcadores bioquímicos em cascudos (*Pterygoplichthys anisitsi*) expostos a óleo diesel e biodiesel.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Biologia Estrutural, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

Andréia Arantes Felício

Avaliação de biomarcadores bioquímicos em cascudos (*Pterygoplichthys anisitsi*) expostos a óleo diesel e biodiesel.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Biologia Estrutural, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Igor Dias Medeiros
UNIFESP – Santos

Prof^ª. Dr^ª. Danielle Palma de Oliveira
USP – Ribeirão Preto

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais, Maria Helena e Sérgio, às minhas irmãs, Máisa e Raquel, ao meu sobrinho e afilhado, Miguel e aos meus cunhados Péricles e Wanderson.

Que sempre me apoiaram e incentivaram em cada passo. Só cheguei até aqui foi pelo apoio e carinho de vocês.

A todos os meus amigos pelo incentivo constante e paciência, pois nos momentos difíceis longe da família vocês sempre me deram força como se fossem eles.

Obrigada, amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço imensamente:

- ao Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida pela paciência, incentivo, “puxões de orelha” e orientação.
- a Mestre Lilian Nogueira, pelo apoio, correções de trabalhos, pois sem ela meu trabalho não teria sido realizado.
- à Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho e por ter concedido a bolsa de auxílio acadêmico.
- a indústria Fertibom Indústrias Ltda, por nos permitir a utilização do produto Biodiesel Biomax em nossas análises.
- ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática por toda a ajuda, horas de descontração e vários incentivos, pois sem eles com certeza não seria possível à realização deste trabalho e com certeza não seria tão divertido o seu desenvolvimento.
- à Profª. Dra. Sônia Maria Oleani por permitir a utilização de seu laboratório e equipamento para as análises do ensaio do cometa.
 - ao Prof., Dr. Classius de Oliveira por liberar a utilização de seu microscópio para a realização das análises do teste de micronúcleo.
- a Profª. Dra. Lidia Maria de Almeida Plicas por ceder o espaço de seu laboratório para a realização dos experimentos.
- a Dra. Lucilene Regina Maschio pela compra do microscópio para que eu possa terminar minhas análises de micronúcleo e cometa no nosso laboratório e ainda pelo incentivo e ajuda sempre.
 - ao membro da banca pela análise e correções.
- a minha família e amigos pela paciência e ajuda em todos os momentos em que passei trabalhando, estudando, analisando dados e escrevendo.

Resumo

Cada vez mais os níveis de contaminantes que são lançados no ambiente aumentam. Dentre os principais poluentes estão o petróleo e seus derivados, como o óleo diesel. Eles são motivo de muitas preocupações, já que apresentam grande persistência ambiental e são potencialmente mutagênicos e carcinogênicos. Além disso, o petróleo é uma forma de energia não renovável e assim, outras formas de energia renováveis vêm sendo pesquisadas, como é o caso do Biodiesel, que vem substituindo gradualmente o petróleo. Desde 2010 passou a ser obrigatória a venda em postos de combustíveis no Brasil, o óleo diesel B5, que apresenta 5% de biodiesel em sua composição. Porém, pouco se sabe sobre os efeitos deste biocombustível no ambiente. Assim, este trabalho visou verificar quais os efeitos das diferentes misturas do óleo diesel e biodiesel e o biodiesel puro (B5, B20 e B100) nos peixes *Pterygoplichthys anisitsi* às concentrações de 0,01 e 0,001 mL.L⁻¹ de cada contaminante, pelos períodos de 15 e 30 dias. Após as exposições, amostras de fígado, brânquias, cérebro e sangue dos peixes foram retirados para as seguintes análises: 7-etoxi-resorufina-*O*-deetilase (EROD), glutathione *S*-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), níveis de malondialdeído (MDA), acetilcolinesterase (AChE), carboxilesterase (CbE), teste de micronúcleo (MN) e ensaio do cometa. Desta forma pudemos observar que o contaminante B100 0,001 mL.L⁻¹ foi o que menos causou alterações nas atividades enzimáticas, sendo alteradas apenas a SOD e a CbE. Já o B5 0,001 mL.L⁻¹ foi o que causou mais alterações nas atividades enzimáticas dos peixes, alterando a GST, SOD, CAT, GPx, os níveis de MDA e as quantidades de MN e AN (anormalidades nucleares), principalmente após 30 dias de exposição, sendo seguido pelo B5 0,01 mL.L⁻¹ e B20 0,001 mL.L⁻¹. O período de exposição que mais levou às alterações foi o de 15 dias. Estes resultados nos possibilitam concluir que mesmo em misturas, o biodiesel e o óleo diesel, até mesmo em baixas concentrações apresentam riscos à biota aquática.

Palavras-chave: óleo diesel, biodiesel, estresse oxidativo, biomarcadores bioquímicos, biomarcadores genotóxicos e *Pterygoplichthys anisitsi*.

Abstract

Increasing levels of contaminants that are released into the environment have been increasing. Among the main pollutants, including petroleum and its derivatives, such as diesel oil is a major concern, since they are environmental persistent and potentially carcinogenic and mutagenic. Furthermore, oil is a non-renewable form of energy, so other forms of renewable energy have been investigated, such as Biodiesel, which is gradually replacing the oil. Since 2010, it is required to sell diesel B5, with 5% biodiesel in this composition at gas stations in Brazil. However, just a little is known about the effects of biofuel in the environment. This work aimed to verify that the effects of different blends of diesel and biodiesel and only biodiesel (B5, B20 and B100) in fish *Pterygoplichthys anisitsi*, in that concentrations, 0,01 and 0,001 mL.L⁻¹ for each contaminant for 15 and 30 days. After exposure, samples of liver, gills, brain and blood were collected for the following analyzes: 7-ethoxy-resorufin-0-deetilase (EROD), glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), levels of malondialdehyde (MDA), acetylcholinesterase (AChE), carboxylesterase (CBE), micronucleus test (MN) and comet assay. Thus we found that that the contaminant B100 0,001 mL.L⁻¹ was the one that has caused less changes in enzyme activity, changing only SOD and CbE. On the other hand, the B5 0,001 mL.L⁻¹ caused more changes in enzyme activity of the fish, changing the GST, SOD, CAT, GPx, MDA levels and quantities of MN and AN (nuclear abnormalities), especially after 30 days of exposure, followed by B5 0,01 mL.L⁻¹ and B20 0,001 mL.L⁻¹. The period of exposure that led to more changes was 15 days. These results allow us to conclude that even in mixtures, biodiesel and diesel fuel, even at low concentrations, can cause risks to aquatic biota.

Key-words: diesel oil, biodiesel, oxidative stress, biochemical biomarkers, genotoxic biomarkers and *Pterygoplichthys anisitsi*

Lista de Ilustrações

Figura 1. Simplificação dos sistemas oxidativo e antioxidantes dentro de uma célula. Ânion superóxido é produzido em quantidades significativas no citosol por monooxigenases, Fe ²⁺ ou Cu ⁺ e na mitocôndria pelo escape de elétrons provenientes da cadeia respiratória. Duas moléculas de superóxido reagem espontaneamente ou via SOD, produzindo peróxido de hidrogênio, o que irá permitir o fluxo de ERO entre compartimentos celulares. O peróxido de hidrogênio pode ser metabolizado à água e ao oxigênio molecular por diversos sistemas enzimáticos ou convertido a radical hidroxil, o qual é muito reativo, através de reações catalisadas por metais. Nordberg e Arner (2001) adaptado por Nogueira (2010).....	21
Figura 2. Esquema mostrando a atividade antioxidante da GPx sobre o peróxido de hidrogênio. Sendo o Peróxido de hidrogênio reduzido pela GPx a partir de duas moléculas de GSH, formando GSSG. A GSSG pode voltar a GSH, pela ação da GR, utilizando NADPH. Adaptado de Nordberg e Arner (2001).	24
Figura 3. Fases I e II do metabolismo dos compostos.	24
Figura 4. Reação detalhando a ação do citocromo P450, em que há a formação de resorufina (7-hidroxi-resorufina), que é fluorescente, a partir da 7-etoxi-resorufina, catalisada pela isoforma 1A do citocromo P450. Adaptado de Whyte et al. (2000).	26
Figura 5. Reação de substituição, no substrato CDNB, catalisada pela GST.	26
Figura 6. Superfamília das glutationa-S-transferase. Adaptado de Strange et al. (2001).	27
Figura 7. Hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético pela AChE. Adaptado de Miao et al., 2010.	28
Figura 8. Espécie de peixe utilizada nos experimentos e tecidos utilizados para as análises bioquímicas. A) <i>Pterygoplichthys anisitsi</i> , cascudo marrom. I) Fígado. II) Brânquias. III) Encéfalo.....	31
Figura 9. Fazenda onde foram coletados os cascudos, na cidade de Guapiaçu/SP, município próximo a São José do Rio Preto.	32
Figura 10. Delineamento experimental da exposição dos peixes aos contaminantes, em duas concentrações diferentes, durante 15 e 30 dias.....	33
Figura 11. Micronúcleos e anormalidades nucleares observadas em eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> . A-C: Células micronucleadas; D: Núcleo notched (seta); E: Núcleo lobed (seta); F: Broken eggs (seta); G: Núcleo blebbed (seta); H: Célula binucleada (seta); I. Cariólise (seta) (MASCHIO, 2009).	39

Figura 12. Atividade da EROD em brânquias (A e C) e em fígado (B e D) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 e 30 dias respectivamente.	43
Figura 13. Atividade da GST em brânquias (A e C) e em fígado (B e D) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 e 30 dias respectivamente.	45
Figura 14. Atividade da SOD em brânquias (A e C) e em fígado (B e D) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 e 30 dias respectivamente.	46
Figura 15. Atividade da CAT em brânquias (A e C) e em fígado (B e D) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 e 30 dias respectivamente.	47
Figura 16. Atividade da GPx em brânquias (A e C) e em fígado (B e D) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 e 30 dias respectivamente.	48
Figura 17. Concentração de MDA em brânquias (A e C) e em fígado (B e D) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 e 30 dias respectivamente.	50
Figura 18. Média e desvio padrão de MN e AN analisado em sangue de cascudos expostos por 15 (A) e 30 dias (B) aos contaminantes.	51
Figura 19. Média e desvio padrão de MN e AN analisado em sangue de cascudos expostos por 15 (A) e 30 dias (B) aos contaminantes.	53
Figura 20. Atividade da AChE em cérebro de cascudos expostos aos contaminantes por 15 (A) e 30 (B) dias.	55
Figura 21. Atividade da CbE em brânquias (A) e fígado (B) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 dias.	56

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Valores diários de pH medidos durante o experimento de 15 dias..... p.70
- Tabela 2.** Valores diários de pH medidos durante o experimento de 30 dias.....p.72
- Tabela 3.** Concentração de amônia presente na água de cada aquário, medidas no início da exposição e a cada troca de água no decorrer do experimento de 15 diasp.76
- Tabela 4.** Concentração de amônia presente na água de cada aquário, medidas no início da exposição e a cada troca de água no decorrer do experimento de 30 diasp.78
- Tabela 5.** Tabela contendo os dados obtidos para cada análise bioquímica e de peroxidação lipídica em fígado de *Pterygoplichthys anisitsi* em ambos os períodos de exposição.....p.80
- Tabela 6.** Tabela contendo os dados obtidos para cada análise bioquímica e de peroxidação lipídica em brânquias de *Pterygoplichthys anisitsi* em ambos os períodos de exposição.....p.81

Lista de Abreviaturas e Siglas

AChE	Acetilcolinesterase
AN	Anormalidades nucleares
ANP	Agência Nacional do Petróleo e Biocombustíveis
B100	Combustível 100% de biodiesel
B20	Combustível 80% de óleo diesel e 20% de biodiesel
B5	Combustível 95% de óleo diesel e 5% de biodiesel
B2	Combustível 98% de óleo diesel e 2% de biodiesel
CAT	Catalase
CbE	Carboxilesterase
Cd	Cádmio
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CM	Carbamatos
cit P450	Citocromo P450
Cu	Cobre
CYP1A	Isoforma 1A do citocromo P450
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROD	7-etóxi-resorufina- <i>O</i> -deetilase
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S-transferase
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC	High performance liquid chromatography
HPLC-UV	High performance liquid chromatography, com detecção de ultra-violeta
MDA	malondialdeído

MN	Micronúcleo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OP	Organofosforados
P	Valor de probabilidade do teste de hipótese
Pb	Chumbo
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoreto
<i>P. anisitsi</i>	<i>Pterygoplichthys anisitsi</i>
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
tBOOH	Ter-butil hidroperóxido
Tris	Hidroximetil aminometano hidrocloreto

Sumário

<i>Dedicatória</i>	3
<i>Agradecimentos</i>	4
<i>Lista de Ilustrações</i>	7
1. Introdução	14
1.1. <i>Combustíveis fósseis, biodiesel e a poluição aquática causada por ambos.</i>	14
1.2. <i>Biomarcadores de contaminação aquática</i>	16
1.2.1. <i>Biomarcadores de genotoxicidade</i>	18
1.2.2. <i>Parâmetros de estresse oxidativo</i>	20
1.2.3. <i>Fases da biotransformação de compostos</i>	24
1.2.4. <i>Esterases</i>	27
1.3. <i>Organismo teste</i>	28
2. Objetivos	30
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	30
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	30
3. Materiais e Métodos	31
3.1. <i>Animais</i>	31
3.2. <i>Exposição dos peixes ao biodiesel e suas misturas com o óleo diesel</i>	32
3.3. <i>Preparo das misturas de Biodiesel</i>	34
3.4. <i>Descarte de resíduos tóxicos e de água contaminada</i>	35
3.5. <i>Análises Bioquímicas</i>	35
3.5.1. <i>Preparo das amostras para análises das enzimas EROD, GST, SOD, CAT e GPx.</i>	35
3.5.2. <i>7-etoxirresorufina-0-deetilase (EROD)</i>	35
3.5.3. <i>Glutathione S-transferase (GST)</i>	36
3.5.4. <i>Superóxido dismutase (SOD)</i>	36
3.5.5. <i>Catalase (CAT)</i>	36
3.5.6. <i>Glutathione peroxidase (GPx)</i>	37
3.5.7. <i>Peroxidação lipídica</i>	37
3.5.8. <i>Preparo das amostras para análises das enzimas AChE e CbE</i>	37
3.5.9. <i>Acetilcolinesterase (AChE) e a carboxilesterase (CbE)</i>	38

3.5.10. Quantificação de proteína	38
3.6. Teste do micronúcleo.....	38
3.7. Ensaio do cometa	40
3.8. Análise estatística.....	40
4. Resultados e Discussão.....	42
4.1. Efeitos observados do óleo diesel e biodiesel após 15 e 30 dias de exposição	42
4.1.1. EROD.....	42
4.1.2. GST.....	44
4.1.3. Enzimas antioxidantes	46
4.1.4. Peroxidação lipídica.....	49
4.1.5. Teste do Micronúcleo	50
4.1.6. Ensaio do Cometa.....	52
4.1.7. Esterases	54
4.1.8. Mortalidade dos animais	Erro! Indicador não definido.
6. Conclusões.....	58
Referências Bibliográficas	60
Apêndice 1: Tabela com o valor do pH medido no experimento de exposição durante 15 dias.	71
Apêndice 2: Tabela com o valor do pH medido no experimento de exposição durante 30 dias	73
Apêndice 3: Tabela com os valores da concentração de amônia medias no experimento de exposição durante 15 dias	77
Apêndice 4: Tabela com os valores da concentração de amônia medias no experimento de exposição durante 30 dias	79
Apêndice 5: Tabela com a atividade enzimática e concentração de MDA em fígado de cascudos expostos por 15 e 30 dias aos contaminantes.	81

Apêndice 6: Tabela com a atividade enzimática e concentração de MDA em brânquia de cascudos expostos por 15 e 30 dias aos contaminantes. 82

1. Introdução

1.1. Combustíveis fósseis, biodiesel e a poluição aquática causada por ambos.

Os níveis de contaminantes lançados no ambiente vêm aumentando de forma alarmante com o decorrer dos anos. Este aumento é resultado da atividade antropogênica que pode comprometer a saúde dos seres vivos que o habitam (CAJARAVILLE et al., 2000). Diante desta problemática, temos sido alertados sobre os potenciais riscos e efeitos adversos à longo prazo que essas substâncias podem causar a todo o nosso ecossistema (VAN DER OOST et al., 2003). Já que estes produtos antropogênicos, tanto advindos de atividades industriais quanto da própria população humana, chegam ao seu destino final, o ambiente, em taxas crescentes de contaminação, sendo que a grande maioria destes compostos são potencialmente genotóxicos e carcinogênicos (JHA, 2004).

Existem muitos poluentes chegando ao ambiente constantemente, sendo que dentre eles, o petróleo e seus derivados, são um dos mais toxicologicamente relevantes, já que são encontrados em muitos produtos de uso comum. Um de seus componentes são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e o estudo destes compostos já é realizado há muitos anos, desde 1775 por Sir Percivall Pott, mostrando colocar em risco a saúde de humanos, podendo causar vários tipos de câncer. A maioria das contaminações por petróleo e seus produtos, são resultados de acidentes envolvendo tanques de óleo, grandes vazamentos e despejos industriais e municipais. O óleo diesel, um dos derivados do petróleo, é composto por uma complexa mistura contendo centenas de substâncias químicas, que podem ser divididos em duas classes, os alifáticos e os hidrocarbonetos aromáticos, dentre esta última classe, estão os HPA (PACHECO; SANTOS, 2001; IARC, 2010). Assim, a poluição causada por estes vazamentos nos ecossistemas pode resultar na deposição de grande quantidade de HPA (HAMOUTEN et al., 2002), que causam muitas preocupações, por apresentarem alta persistência no ambiente e serem potencialmente mutagênicos e carcinogênicos. Alguns HPA como benzo(a)fluoranteno, dibenzopireno e 5-metilcriseno, foram classificados pela International Agency for Research on Cancer (IARC), como um possível carcinógeno para humanos (2B) (IARC, 2010; GALGANI et al., 2011). Os HPA são contaminantes ambientais amplamente difundidos, pois são formados durante a combustão incompleta de materiais orgânicos e estão presentes em ambientes aquáticos, no solo e ar atmosférico em quantidades

vestigiais, exceto em locais próximos de sua fonte. Podemos encontrar este composto também em alguns alimentos e produtos farmacêuticos que são aplicados sobre a pele (IARC, 2010).

Vários estudos têm mostrado o quanto o óleo diesel é tóxico aos animais aquáticos (KHAN; WARITH; LUK, 2007). Este combustível é formado por uma mistura complexa que consiste basicamente em hidrocarbonetos olefínicos, parafínicos e aromáticos. Ele apresenta duas frações principais, a insolúvel e a lipossolúvel. Sua fração insolúvel é muito tóxica para os peixes, por exemplo, já que fazem contato direto com as suas brânquias, causando danos diretos ao tecido respiratório (PACHECO; SANTOS, 2001). Já sua fração lipossolúvel, que é composta por muitos HPA, está relacionada ao estresse oxidativo, efeitos genotóxicos, formação de neoplasias em fígado de peixes bentônicos e alterações nos níveis de cortisol (BAUMANN, 1998; PACHECO; SANTOS, 2001).

Cada vez mais, os níveis dos combustíveis fósseis disponíveis diminuí como é o caso do petróleo, sendo que são utilizados em uma vasta gama de produtos e também, cada vez mais a contaminação causada por seus produtos aumenta (IPCC, 2007), assim, energias renováveis alternativas como o biodiesel vêm sendo buscadas (HAAS, 2006), sendo o Brasil um dos pioneiros no seu desenvolvimento (World Bank Group, 2004).

O biodiesel é considerado uma alternativa viável para o óleo diesel de petróleo, podendo ser gerado a partir de fontes domésticas, como o óleo de cozinha usado, e fontes naturais, como muitas oleaginosas (soja, semente de girassol e gordura animal), contribuindo para a diminuição da dependência dos combustíveis fósseis (BALAT; BALAT, 2010). Ele é constituído por mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos derivados das fontes citadas anteriormente, sendo que são geralmente obtidos através da transesterificação com metanol (AGARWAL et al., 2006; CARDONE, et al., 2002). Este biocombustível pode ser misturado ao óleo diesel em diferentes proporções, sendo de B2 (2% de biodiesel misturado em 98% de óleo diesel) até B100 (100% biodiesel, sem a adição de combustível fóssil), sendo que quase todos os motores movidos a óleo diesel podem ter seu funcionamento normal com utilização de misturas B2 até B20, com características de desempenho compatíveis ao óleo diesel puro (RAKOPOULOS, 2012).

Há pesquisas demonstrando que o biodiesel é mais biodegradável (MARTINS et al., 2011; PEREIRA et al., 2012) e produz menos gases de efeito estufa do que o óleo derivado do petróleo (LEE; HERAGE; YOUNG, 2004; BALAT; BALAT, 2010; MARTINS et al., 2011), outros relatam a atuação do biodiesel como dispersante do óleo diesel, atrapalhando a sua

degradação por microorganismos e potencialmente tóxico no ambiente aquático (LEME et al., 2012).

No Brasil, desde o início de 2010, o uso do combustível contendo 5% de biodiesel em 95% de óleo diesel (B5) passou a ser de uso obrigatório em todos os postos de combustível do país (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIAS, 2012). A utilização do biodiesel puro (B100) e de outras misturas maiores do que a B5, de acordo com a Resolução ANP nº2, de 29 de janeiro de 2008, fica de uso restrito a experimentação em equipamentos industriais e frotas cativas de empresas (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2008). Existem dois fatores que nos indicam a crescente utilização do biodiesel e misturas com o óleo diesel, o primeiro é o comprovado por Rakopoulos (2012), mostrando que a utilização do biodiesel em mistura com o óleo diesel não causa grandes perdas no desempenho dos motores de veículos movidos a óleo diesel somente. O segundo fator é o comprovado por Leite et al. (2011) e Martins et al. (2011), que o biodiesel em diferentes misturas com o óleo diesel, é menos tóxico à biota do que o óleo diesel puro. Assim, mais estudos são necessários para que conheçamos quais os reais danos que podem ser causados por estes combustíveis.

Uma boa ferramenta para verificarmos quais efeitos o biodiesel puro ou em misturas com o óleo diesel podem causar e sua dimensão, são os biomarcadores de contaminação aquática, já que eles nos fornecem informações sobre os efeitos biológicos dos poluentes de maneira rápida e eficiente (WALKER et al., 1996; MARTINEZ, 2006).

1.2. Biomarcadores de contaminação aquática

Há diferentes meios de estudar o nível de contaminação aquática, como por exemplo, os testes de toxicidade, a identificação e a quantificação dos poluentes presentes na água, no sedimento e nos organismos (GESTEL; BRUMMELEN, 1996). Desde 1970, pesquisadores argumentam que as metodologias tradicionais de classificação de águas, baseadas em características físico-químicas e análises quantitativas dos poluentes, não são suficientes para a avaliação da qualidade da mesma, sendo necessárias também, análises biológicas (CAIRNS; PRATT, 1993).

Um método utilizado para o estudo dos efeitos tóxicos sobre os organismos é a análise de biomarcadores de contaminação (GESTEL; BRUMMELEN, 1996), que podem ser definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas nas células, fluidos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativos da

exposição ou efeito de xenobióticos (LAM; GRAY, 2003). Biomarcadores são ferramentas que sofrem mudanças através de respostas celulares e fisiológicas após exposição a agentes químicos. Através da avaliação dos biomarcadores há a detecção das primeiras mudanças nas respostas biológicas na fase inicial da contaminação ambiental. Esta ferramenta é aplicada tanto em experimentos laboratoriais quanto em pesquisas de campo, permitindo uma importante ligação entre ambos (VAN DER OOST et. al., 2003), assim podemos, com as análises laboratoriais extrapolar os resultados para o ambiente.

De acordo com NRC (1987) e WHO (1993), os biomarcadores podem ser subdivididos em três classes, os de exposição, os de efeito e os de susceptibilidade. Os biomarcadores de exposição são aqueles que detectam e mensuram uma substância exógena ou seu metabolismo, ou ainda o produto de uma interação entre um agente xenobiótico e algumas moléculas ou células alvo, sendo medidas no organismo. Os biomarcadores de efeito incluem as alterações bioquímicas, fisiológicas ou outras alterações nos tecidos ou fluidos corpóreos de um organismo que podem ser reconhecidas e associadas com algumas perturbações para a saúde ou surgimento de doenças. Já os biomarcadores de susceptibilidade indicam a capacidade inerente ou adquirida de um organismo para responder à exposição a algum xenobiótico, incluindo fatores genéticos e alterações nos receptores alterando a susceptibilidade de um organismo que foi exposto.

Dentre os biomarcadores de efeito estão os biomarcadores enzimáticos, que nos ajudam a mensurar a atividade de várias enzimas, e os biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade, que são aqueles que detectam os efeitos mutagênicos no organismo (AMORIM, 2003).

Como exemplo de biomarcador de contaminação podemos citar o citocromo P450 isoforma 1A (CYP1A), que após estudos realizados em células musculares e endoteliais, mostrando que sua atividade é alterada quando há a exposição do animal aos HPA, podendo ter efeitos tóxicos e genotóxicos (KLAASSEN, 2001; NOGUEIRA et al., 2011), as glutathione *S*-transferase (GST) que tem sua atividade aumentada após exposição às concentrações subletais de nitrogênio amoniacal (HEGAZI et al., 2010).

Assim, muitos testes de toxicidade, incluindo genotoxicidade, como o Teste do Micronúcleo e o Ensaio do Cometa, têm sido realizados ultimamente, para que os dados das análises físicas e químicas sejam complementados (GRANT, 1999; EGITO et al., 2007; KUSHWAHA et al., 2011; MICHEL, VINCENT-HUBERT, 2012).

1.2.1. Biomarcadores de genotoxicidade

O estudo dos biomarcadores genotóxicos pode ser definido como a análise das alterações no material genético da biota, causadas pelos agentes químicos, verificando qual o potencial mutagênico desses agentes nas células, sendo que estas alterações poderão ser transmitidas para as próximas gerações (VAN DER OOST et al., 2003). Estes agentes, ao entrarem em contato com o organismo e interagirem quimicamente com o material genético, serão formado adutos de DNA, alterações oxidativas e quebras na molécula de DNA. Em sua grande maioria, as lesões provocadas são reparadas pelos próprios mecanismos de reparo das células, porém, pode ser que haja alguma falha e estes não ocorram, fixando as alterações e provocando mutações (UMBUZEIRO, ROUBICEK, 2003). Pode ser que estas mutações sejam passadas para as células filhas, durante a replicação, assim, o agente causador destes danos será considerado mutagênico (UMBUZEIRO, ROUBICEK, 2003).

Sabe-se que as mutações são necessárias para garantir a variabilidade genética das populações, mantendo uma espécie na comunidade, porém, dependendo do local em que ela ocorreu e da sua quantidade, pode causar danos aos descendentes (UMBUZEIRO, ROUBICEK, 2003).

1.2.1.1. Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo (MN) em eritrócitos de peixes se tornou muito vantajoso, se comparado a outros biomarcadores de mutagenicidade, já que são pequenos, em grande quantidade e nucleados, e por apresentarem baixa taxa mitótica, é difícil a aplicação de outros testes (KLIGERMAN, 1982; AL-SABTI; METCALFE, 1995; AYLLÓN, GARCIA-VASQUEZ, 2000). O teste do MN vem sendo utilizado com grande sucesso para a avaliação de potenciais contaminantes ambientais que possam ser mutagênicos (KLOBUCAR et al., 2003).

Os MN são expressos em células em divisão que contenham quebras cromossômicas, que são causadas por agentes clastogênicos, ou perda de centrômeros e/ou do cromossomo inteiro, que são causados por agentes aneugênicos. Estes se tornam incapazes de se deslocarem para os fusos durante a mitose e na telófase, um envoltório nuclear será formado ao redor do cromossomo, assumindo gradualmente a morfologia de um núcleo, porém em menor tamanho do que o principal, por isso o termo micronúcleo (FENECH, 2000). Assim, é importante ressaltar que os MN são formados durante a mitose, independentemente do tipo de

dano ocorrido durante o ciclo, sendo até mesmo um evento de ocorrência natural, variando em frequência nas células. Por isso, os danos no DNA causados pela exposição a algum agente mutagênico somente serão expressos após um ciclo de divisão celular completo (SALVADORI et al., 2003). Os MN são caracterizados por apresentarem formato redondo ou oval, serem não birrefringentes (facilitando a distinção de artefatos da coloração), não apresentam ligação com núcleo principal, apresentam clara distinção de limite nuclear, mesmo quando em contato com o núcleo principal e por fim, apresentam, normalmente, a mesma intensidade da coloração que o núcleo principal, porém, algumas vezes ele pode apresentar maior intensidade de cor (FENECH, 2003).

Os danos cromossômicos, que levaram à maior frequência de MN, podem ser causados por radiação ionizante e por vários tipos de substâncias mutagênicas como, por exemplo, metais (cromo e arsênio) (EVANS, 1977; MASCHIO, 2009). Esta frequência em uma população de células é altamente dependente da cinética da proliferação celular, o que pode variar de acordo com a espécie em estudo, o tecido analisado, as alterações ambientais e outros fatores (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Segundo Carrasco (1990), além de analisarmos a frequência de micronúcleos presentes em uma célula, podemos também classificar as alterações morfológicas e no envoltório nuclear, causados pelos efeitos exercidos pelos contaminantes, presentes na água, sobre o material genético. As alterações podem estar relacionadas com falhas nas divisões celulares, processos de morte celular e reações decorrentes de mutagenicidade, causadas por agentes químicos (NAKANO; OKA, 1991; CORMAK, 1991; FENECH, 2000).

Essas alterações foram classificadas como: *blebbed* (evaginações sutis do envoltório nuclear); *lobed* (evaginações proeminentes do envoltório nuclear), *notched* (invaginação do envoltório nuclear ou núcleo em forma de rim), *broken eggs* (pequena porção nuclear ligada ao núcleo principal por um pequeno filamento nucleoplasmático) (Figura 11) (CARRASCO et al., 1990).

1.2.1.2. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa é um teste que pode fornecer importantes informações sobre o quanto uma substância é genotóxica. Ele foi primeiramente proposto por Ostling e Johanson (1984), modificado por Singh et al. (1988) e também modificado após certo tempo, por Macnamee et al. (2000), tornando o ensaio mais eficiente, alterando o seu pH de 10,0 para 13,0 e também de mais fácil aplicação. Este ensaio é amplamente utilizado para medir as quebras na molécula de DNA, podendo ser aplicado em células de plantas, vermes, moluscos,

peixes, anfíbios e mamíferos em estudos de biomonitoramento (MICHEL; VINCENT-HUBERT, 2012).

O ensaio, realizado com eritrócitos de peixes, vem sendo amplamente utilizado para a avaliação da poluição ambiental (NACCI et al., 1996; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2007; VENTURA et al., 2008).

Binelli et al. (2008) detectaram aumento na quantidade de quebras do DNA através da aplicação do ensaio do cometa em *Dreissena polymorpha*, após exposição ao Benzo[a]pireno, mostrando a eficiência do teste para a detecção de danos causados por HPA.

Outros estudos realizados comprovam ainda mais a eficiência do ensaio do cometa para a avaliação de efeitos genotóxicos, como o estudo realizado por Frenzilli et al. (2000), que avaliaram os efeitos de 18 compostos químicos nas células e ainda que as quebras ocorridas no DNA possam estar relacionadas com as propriedades carcinogênicas e mutagênicas dos poluentes.

O ensaio do cometa não é utilizado para verificar mutações, mas sim lesões genômicas, que se não forem reparadas podem levar às mutações (CONTIJO; TICE, 2003).

1.2.2. Parâmetros de estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\bullet OH$), são formadas e degradadas por organismos aeróbios e são encontradas em concentrações fisiológicas no interior das células. A Figura 1 nos mostra duas moléculas de superóxido reagindo espontaneamente ou via SOD produzindo peróxido de hidrogênio, o que permitirá o fluxo de ERO entre os compartimentos celulares. O peróxido de hidrogênio pode ser metabolizado à água e ao oxigênio molecular por diversos sistemas enzimáticos ou convertidos a radical hidroxil, o qual é muito reativo, através de reações catalisadas por metais (NORDBERG; ARNER, 2001). Quando a taxa de produção das ERO excede a taxa de sua decomposição por sistemas antioxidantes, dizemos que então ocorre o estresse oxidativo, podendo levar a um aumento do dano oxidativo em diferentes alvos celulares (ALMEIDA et al., 2005). As ERO podem reagir rapidamente com a maioria das biomoléculas, levando às lesões oxidativas em biomoléculas e, por vezes, iniciando uma cadeia de formação de novos radicais livres. Para que essa reação em cadeia seja finalizada, o radical livre deve reagir com outro radical livre, eliminando os elétrons desemparelhados, ou ainda, reagir com um composto antioxidante (NORDBERG; ARNER, 2001).

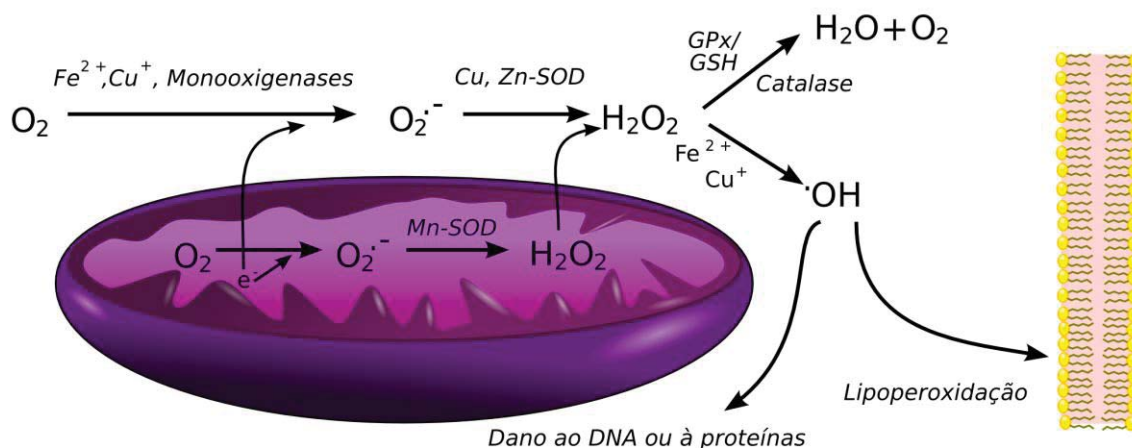


Figura 1. Simplificação dos sistemas oxidativo e antioxidantes dentro de uma célula. Ânion superóxido é produzido em quantidades significativas no citosol por monooxigenases, Fe^{2+} ou Cu^+ e na mitocôndria pelo escape de elétrons provenientes da cadeia respiratória. Nordberg e Arner (2001) adaptado por Nogueira (2010).

As ERO apresentam uma elevada reatividade, o que as tornam ainda mais propensas a causar danos às biomoléculas, o que as classifica como potencialmente tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas (NORDBERG; ARNER, 2001). Elas podem reagir com diferentes alvos celulares originando lesões oxidativas às macromoléculas (ALMEIDA et al., 2003), como o DNA, lipídeos e proteínas. No DNA, as ERO podem causar fragmentações, oxidação de purinas, tendo efeitos mutagênicos (MARNETT, 2000).

A oxidação de ácidos graxos poli-insaturados levando à inserção de grupamentos peroxila na molécula recebe o nome de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que é uma importante consequência do estresse oxidativo (VAN DER OOST et. al., 2003). O metabolismo microsossomal de hidrocarbonetos aromáticos pode dar origem a radicais capazes de oxidar membranas biológicas, como foi observado em peixes expostos a sedimento contaminado por tais compostos (COSSU et al., 1997). A presença de radicais livres desencadeará um ciclo de reações bioquímicas que originarão alguns produtos da peroxidação lipídica como cetonas e aldeídos, dentre os quais o malondialdeído (MDA) tem sido usado como indicador de estresse oxidativo (VAN DER OOST et. al., 2003). Portanto, para a análise de parâmetros que evidenciem uma situação de estresse oxidativo, a peroxidação lipídica, pode ser usada como biomarcador de contaminação, sendo detectada a presença de lipoperoxidação.

1.2.2.1. *Enzimas antioxidantes*

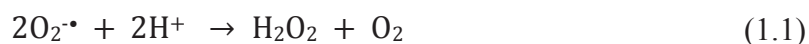
As enzimas antioxidantes são importantes para a proteção das células contra o estresse oxidativo causado pelos xenobióticos (PRIETO et.al., 2007; AMADO; MONSERRAT, 2010), defendendo os organismos das ERO (VAN DER OOST et. al., 2003).

Dentre as enzimas antioxidantes há três principais que foram analisadas neste trabalho, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx). Estas três enzimas formam um sistema de combate à formação de oxirradicais (VAN DER OOST et. al., 2003).

- *Superóxido dismutase (SOD)*

As SODs são um grupo de metaloenzimas que catalisam a transformação de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (Equação 1.1). Segundo Stegeman et al. (1992) elas desempenham um papel antioxidante muito importante no metabolismo, estando presentes em todos os organismos aeróbicos até agora examinados. Na reação catalisada pela SOD há a formação de peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular a partir de duas moléculas de superóxido (NORDBERG; ARNER, 2001).

Em um primeiro momento, estudos das atividades enzimáticas e a produção e eliminação de O_2 , cientistas argumentaram que esta molécula não era muito reativa, sendo assim, afirmou-se ser desnecessários estudos sobre essas enzimas (LIOCHEV; FRIDOVICH, 2007).



Há diferentes isoformas de SOD, sendo encontradas em diferentes espaços celulares. Em um primeiro momento foi encontrado Cu,Zn-SOD somente no citosol, e Mn-SOD na matriz mitocondrial. Posteriormente, Okado-Matsumoto e Fridovich (2001) comprovaram a presença de ambas em peroxissomos e no espaço intermembranas de mitocôndrias, somente de Mn-SOD na matriz mitocondrial e a presença de somente Cu,Zn-SOD no citosol e lisossomos. Assim, consideram-se as mitocôndrias o principal local de presença de SOD em células eucarióticas, já que nesta organela há grande consume de oxigênio para a respiração celular (OKADO-MATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001).

O estudo de Gomes et al. (2012), por exemplo, mostra que a SOD é um bom biomarcador, já que após a exposição de *Mytilus galloprovincialis* a nanopartículas de óxido de cobre por 3 e 7 dias, esta enzima apresentou aumento significativo de sua atividade, sugerindo a produção de ânions superóxido.

- *Catalase (CAT)*

As CATs são heme-enzimas (VAN DER OOST et al., 2003) encontradas em locais como peroxissomos e eritrócitos, promovendo a redução de H₂O₂ em H₂O mais O₂ (Equação 1.2) (ZHANG et al., 2004). A proliferação dos peroxissomos após a exposição aos contaminantes é a principal causa para a elevação da atividade catalásica nos tecidos. A catalase está presente em todos os tecidos de vertebrados, com atividade particularmente alta nos eritrócitos do fígado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2005).



Algumas peroxidases tem a capacidade de reduzir vários peróxidos, já a CAT tem a capacidade de reduzir somente o H₂O₂. Esta enzima tem uma importante função antioxidante, sendo capaz de eliminar o H₂O₂, não permitindo a formação de radicais hidroxil a partir do peróxido de hidrogênio, uma grande vantagem desta enzima (VAN DER OOST et al., 2003).

Alguns estudos comprovam a eficácia desta enzima como biomarcador de contaminação, aumentando ou diminuindo sua atividade enzimática, como exemplo sua indução enzimática que pode ser observada em algumas análises realizadas após exposição de peixes a efluentes de celulose e produção de papel, bifenil policlorado (PCB), HPA e óxido de cobre (DI GIULIO et al., 1989a,b; MARTHER-MIHAICH; DI GIULIO, 1991; RUDNEVA-TITOVA; ZHERKO, 1994; GOMES et al., 2012).

- *Glutathione Peroxidase (GPx)*

As GPxs catalisam a redução de peróxido lipídico e de hidrogênio (ZHANG et al., 2004). Todas as suas isoformas utilizam a glutathione reduzida como co-substrato, transformando os peróxidos orgânicos em alcoóis (Equação 1.3) (NORDBERG; ARNER, 2001).



O que acontece nesta reação é basicamente a redução de peróxidos utilizando elétrons da glutathione reduzida (GSH), gerando glutathione dissulfeto (GSSG), que pode ser reduzida mais uma vez a GSH, pela ação da glutathione redutase (GR), que utiliza elétrons do NADPH para tal processo (Figura 2) (NORDBERG; ARNER, 2001; VAN DER OOST et al., 2003).

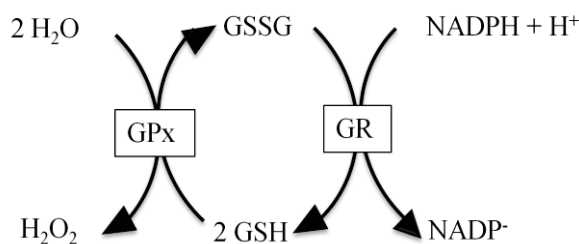


Figura 2. Esquema mostrando a atividade antioxidante da GPx sobre o peróxido de hidrogênio. Sendo o Peróxido de hidrogênio reduzido pela GPx a partir de duas moléculas de GSH, formando GSSG. A GSSG pode voltar a GSH, pela ação da GR, utilizando NADPH. Adaptado de Nordberg e Arner (2001).

A GPx apresenta uma função muito importante como antioxidante, prevenindo danos às biomembranas, que estão relacionadas à peroxidação lipídica (VAN DER OOST et al., 2003), além do que segundo Almeida et al. (2005), muitas isoformas da GST podem apresentar atividade de GPx.

1.2.3. Fases da biotransformação de compostos

A biotransformação de um composto pode ser definida como a conversão de um xenobiótico em compostos mais solúveis em água, para que seja excretado do corpo mais facilmente. O processo de biotransformação de um composto químico é subdividido em três fases, a fase I a II e a III. A Fase I é responsável por reações de oxidação, redução e hidrólise das substâncias, para que haja alteração da molécula original para a posterior conjugação que ocorrerá na fase II e catabolizada na fase III (Figura 3) (VAN DER OOST et al., 2003).

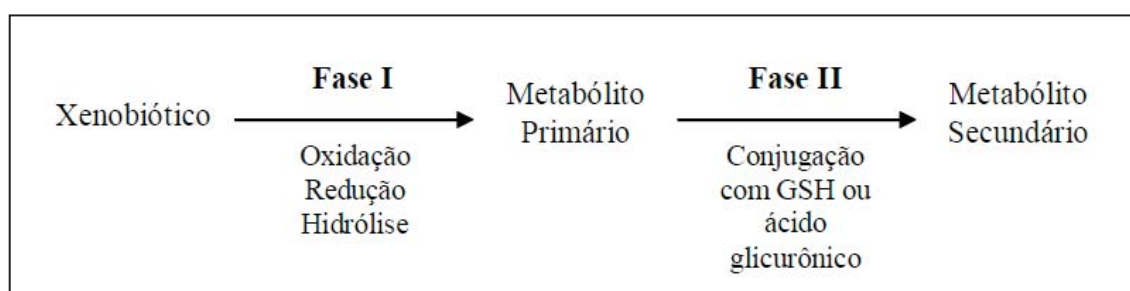


Figura 3. Fases I e II do metabolismo dos compostos.

1.2.3.1. Fase I

Na primeira fase do metabolismo de compostos tóxicos há a exposição ou adição de grupos funcionais reativos através de reações de oxidação, redução ou hidrólise. Assim, a

característica mais importante dessa fase é a modificação química dos compostos, geralmente lipofílicos, em produtos mais solúveis em água, o que facilita a sua excreção. Para a maioria dos xenobióticos, as reações que ocorrem nesta fase da biotransformação são catalisadas por enzimas monooxigenases microssomais, como citocromo P450, citocromo b₅ e NADPH citocromo P450 redutase (VAN DER OOST et al., 2003).

Os citocromo P450 compreende uma vasta família de heme-proteínas ligadas às membranas localizadas, predominantemente, no retículo endoplasmático liso das células hepáticas. Em menor quantidade, elas são encontradas também em vários outras organelas e tecidos dos organismos. As reações que envolvem o cyt P450 podem ser agrupadas de acordo com o tipo de substrato e também podem ser amplamente divididos de acordo com a síntese e degradação de substratos endógenos e o metabolismo dos xenobióticos. Nesta família podemos encontrar a subfamília P450 1A (CYP1A), que é um dos biomarcadores mais empregados em estudos ambientais, havendo fortes evidências de que este biomarcador, em peixes, está fortemente relacionado à exposição à HPA (VAN DER OOST et al., 2003), como pode ser comprovado através de alguns estudos como o de Pacheco e Santos (2001) e Nogueira et al. (2011), em que ambos, após exposição de enguias (*Anguilla anguilla*) e tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), respectivamente, apresentaram indução da atividade da EROD, já que os contaminantes aos quais os animais foram expostos, apresentam HPA em sua composição (gasolina e óleo diesel respectivamente).

Para verificar a atividade catalítica da CYP1A utiliza-se a análise da 7-etoxirresorufina-*O*-deetilase (EROD). A subfamília CYP1A tem a função de biotransformar as substâncias ambientalmente persistentes, como é o caso dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e a desregulação de sua atividade é resultante da exposição aos compostos desta natureza. A expressão do gene da CYP1A é induzida por diversos hidrocarbonetos aromáticos, já que sua indução inicial requer a ligação com o receptor aril hidrocarboneto. O trabalho de Nogueira et al. (2011) mostra claramente a indução da atividade da EROD após a exposição de tilápias do Nilo à óleo diesel puro, B5 e B20, comprovando a ação do HPA.

A atividade é medida cineticamente, através da análise do aumento da fluorescência decorrente do produto da reação, que é a resorufina (VAN DER OOST et al., 2003), portanto medirá a passagem de um substrato não fluorescente 7-etóxi-resorufina em um produto fluorescente, a resorufina (Figura 4) (SARASQUETE; SEGNER, 2000).

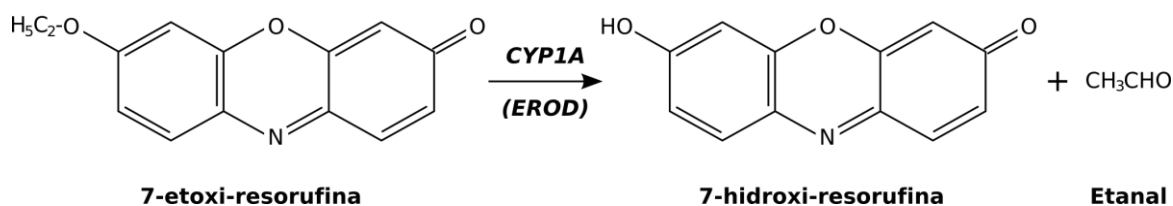


Figura 4. Reação detalhando a ação do citocromo P450, em que há a formação de resorufina (7-hidroxi-resorufina), que é fluorescente, a partir da 7-etoxi-resorufina, catalisada pela isoforma 1A do citocromo P450. Adaptado de Whyte et al. (2000).

1.2.3.2. Fase II

Na segunda fase do metabolismo ocorre a conjugação do composto original, não transformado, ou dos metabólitos vindos da fase I, com substratos endógenos, geralmente polares, como sulfatos inorgânicos, aminoácidos, glutionas, entre outros, isto ocorre para que posteriormente haja excreção do xenobiótico na fase III (VAN DER OOST et al., 2003).

Dentre as enzimas que realizam a conjugação na fase II estão as glutiona *S*-transferases (GSTs), que utilizam como molécula endógena para a conjugação o tripeptídeo glutiona (VAN DER OOST et al., 2003).

Em comparação com o sistema da fase I, as respostas de indução das enzimas de fase II são, geralmente, menos pronunciadas (VAN DER OOST et al., 2003).

1.2.3.3. Glutiona *S*-transferase (GST)

As GST são um grupo de enzimas que catalisam a reação de conjugação da glutiona (GSH) com uma variedade de compostos eletrofílicos. Muitos estudos sobre a GST total utilizam o substrato artificial 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por ser um substrato para a maioria das isoformas de GST (VAN DER OOST et al., 2003) (Figura 5).

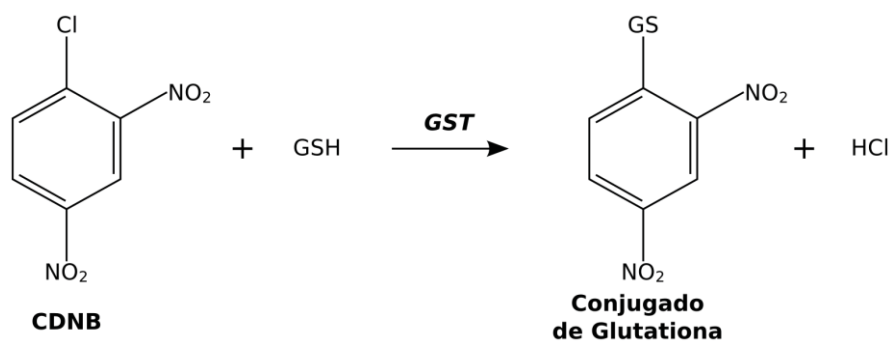


Figura 5. Reação de substituição, no substrato CDNB, catalisada pela GST.

Existem algumas isoformas da GST, a Mu, Alpha, Pi, Theta Zeta, Sigma, Kappa e Chi, que diferem na de acordo com seu gene (Figura 6). Todas essas isoformas apresentam a mesma função, de proteção celular, diferindo no substrato utilizado para as reações (MEYER et al., 1991; STRANGER et al., 2001).

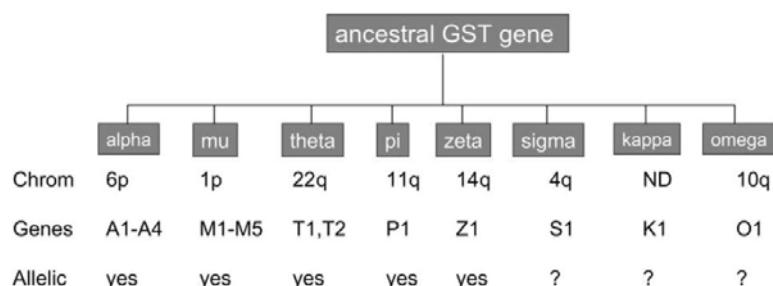


Figura 6. Superfamília das glutationa-S-transferase. Adaptado de Strange et al. (2001).

Algumas análises realizadas por Zhang et al. (2004), Simonato et al. (2006) e Simonato et al. (2008) em peixes expostos ao óleo diesel mostram que este contaminante aumenta significativamente a atividade da GST hepática. Assim, há mais um indício da importância da GST como um indicador de contaminação por derivados do petróleo (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008).

1.2.4. Esterases

Outro grupo de biomarcadores de contaminação aquática muito importante é o das esterases.

As esterases representam um grupo de hidrolases que catalisam a clivagem e a formação de ligações do tipo éster (LIU et al., 2004). É sabido que esta classe de enzimas é altamente inibida quando há exposição dos animais aos praguicidas organofosforados (OP) e carbamatos (CM) e que também são afetadas por metais. Por este motivo, o uso destas enzimas como indicadores de contaminação ambiental por estes compostos tem sido amplamente utilizado (BAINY et al., 2006).

As esterases apresentam alta sensibilidade a vários contaminantes ambientais, apresentam baixo custo para sua análise e por isso podem ser facilmente analisadas e quantificadas, o que faz com que cada vez mais seja comum a sua utilização como um biomarcador na ecotoxicologia (NUNES, 2011).

Duas enzimas esterases que são muito avaliadas como biomarcadores, são a acetilcolinesterase (AChE) e a carboxilesterase (ChE).

1.2.4.1. Acetilcolinesterase (AChE)

A AChE é responsável pela hidrólise da acetilcolina, éster liberado nas fendas sinápticas quando há a liberação de um impulso nervoso de uma célula nervosa a outra, em colina e ácido acético (Figura 7). Esta enzima pode ser encontrada em eritrócitos, sistema nervoso central e placa motora de músculos esqueléticos. Quando há a inibição da AChE, ocorre um acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, causando hiperestimulação dos receptores de acetilcolina, impedindo a contração muscular normal (VIOQUE-FERNÁNDEZ; ALMEIDA; LÓPEZ-BAREA, 2007; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

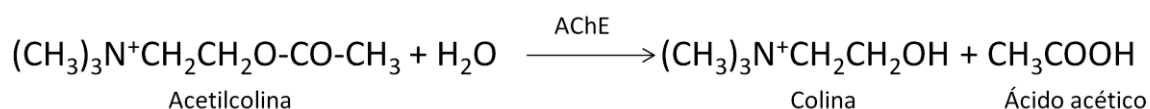


Figura 7. Hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético pela AChE. Adaptado de Miao et al., 2010.

1.2.4.2. Carboxilesterase (CbE)

As carboxilesterases são hidrolases de cadeia curta, responsáveis pela hidrólise de ácidos graxos endógenos ou exógenos, inclusive xenobióticos. Diversos estudos mostram que esta enzima tem um papel importante na metabolização de diversos praguicidas (BONACCI, 2004; VIOQUE-FERNÁNDEZ; ALMEIDA; LÓPEZ-BAREA, 2007). Elas são encontradas em diversos tecidos como fígado, pulmão, intestino, coração, rim, músculos, cérebro, tecido adiposo, leucócitos e sangue (WHEELLOCK, 2008).

1.3. Organismo teste

No momento em que selecionamos um organismo para estudar os efeitos biológicos dos poluentes, muitos fatores têm que ser levados em consideração, como as características e hábitos da população, o seu histórico de pré-exposição, sua importância ecológica, sua fisiologia e sua sensibilidade aos contaminantes (ROMÉO; GNASSIA-BERELLI, 1995).

O cascudo marrom (*Pterygoplichthys anisitsi*, Loricariidae) é um peixe de hábitos bentônicos, encontrado em águas doces da América do Sul, como nas Bacias do Uruguai, do Paraguai e do Paraná, onde habitam corpos d'água caracterizados por baixas concentrações de oxigênio (CRUZ et al., 2009).

A maioria das espécies da família dos Loricariidae, incluindo os *P. anisitsi*, utilizam o estômago ou o intestino como órgãos acessórios para as trocas gasosas (respiração aérea acessória). Isto acontece principalmente quando as condições da água não estão favoráveis, apresentando baixa concentração de oxigênio dissolvido, assim, os animais se deslocam até a superfície da coluna de água e capturam, com a boca, o ar contendo maior concentração do gás, que é necessário para as funções metabólicas do organismo (CRUZ et al., 2009). Esta espécie, endêmica sul-americana, é pouco utilizada em estudos ecotoxicológicos e os dados gerados por este tipo de estudo serão de grande importância para o biomonitoramento em ambientes de água doce na América do Sul, principalmente pelo possível contato do peixe com a fração insolúvel do contaminante no momento em que ele se desloca até a superfície para a captura de ar atmosférico. Assim, ele pode ter contato com as frações solúveis e insolúveis dos contaminantes, sofrendo os efeitos de ambas e não só do sedimento como foi relatado por Zizek et al. (2007). Assim, mais estudos em animais de hábitos bentônicos são necessários, já que podem fornecer dados importantes sobre as respostas dos organismos aos poluentes em diferentes matrizes aquáticas, onde as diferentes frações dos contaminantes se encontram.

Por meio de todas essas informações, esperamos que o biodiesel, por conter menos elementos tóxicos em sua composição do que o óleo diesel incorrerá em menos efeitos tóxicos aos peixes. Assim, quanto maior for a proporção de biodiesel presente na mistura com o óleo diesel, menores serão os efeitos deletérios aos peixes, sendo menores os prejuízos sofridos pelo metabolismo e material genético.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho visou comparar os efeitos do óleo diesel em mistura com o biodiesel e o biodiesel puro, em diferentes concentrações após exposição crônica (15 e 30 dias), em biomarcadores bioquímicos de uma espécie de peixe de hábito bentônico, o cascudo marrom, *Pterygoplichthys anisitsi*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos em *P. anisitsi* expostos por 15 e 30 dias às concentrações 0,01 e 0,001 mL.L⁻¹ de biodiesel puro B100 e das misturas B20 e B5 por meio dos seguintes parâmetros:

- Atividade da isoforma 1A do citocromo P450 (EROD), GST, enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx), níveis de peroxidação lipídica (MDA) em brânquias e fígado.
- Atividade de esterases (AChE e CbE) em fígado, brânquias e encéfalo.
- Análise genotóxica (teste do micronúcleo e ensaio do cometa) no sangue.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Os peixes usados no trabalho, *Pterygoplichthys anisitsi*, (Figura 8) foram obtidos em uma fazenda de criação de peixes, no município de Guapiaçu/SP (Figura 9). Os animais expostos aos contaminantes por 15 dias apresentaram peso de $144,83 \text{ g} \pm 57,98 \text{ g}$ e tamanho $18,30 \text{ cm} \pm 2,71 \text{ cm}$, enquanto que os peixes expostos aos contaminantes por 30 dias apresentaram peso $50,99 \text{ g} \pm 11,57 \text{ g}$ e tamanho de $14,50 \text{ cm} \pm 1,02 \text{ cm}$. Os animais utilizados foram de ambos os sexos e de aproximadamente a mesma idade em cada um dos experimentos.

O trabalho teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – IBILCE/UNESP - CSJRP (Anexo I).



Figura 8. Espécie de peixe utilizada nos experimentos e tecidos utilizados para as análises bioquímicas. A) *Pterygoplichthys anisitsi*, cascudo marrom. I) Fígado. II) Brânquias. III) Encéfalo.



Figura 9. Fazenda onde foram coletados os cascudos, na cidade de Guapiaçu/SP, município próximo a São José do Rio Preto.

3.2. Exposição dos peixes ao biodiesel e suas misturas com o óleo diesel

Em estudos realizados anteriormente por Nogueira (2011), os cascudos foram expostos pelos períodos de dois e sete dias às concentrações de 0,1 e 0,01 mL.L⁻¹ de diesel e biodiesel em diferentes misturas (B0, B5, B20 e B100) e nele observou-se que estes peixes apresentam uma rapidez e eficiência no sistema antioxidante, o que ajuda a prevenir as lesões e os torna mais resistentes, assim, procuramos realizar as exposições com 15 e 30 dias, com menores concentrações para verificarmos quais os efeitos.

Portanto, foram realizadas duas exposições, uma durante 15 dias e a outra por 30 dias, sendo que antes de cada uma delas os peixes passaram por um período de aclimação de cinco dias nos respectivos aquários.

Foram utilizados aquários de 50 cm x 80 cm x 60 cm (aproximadamente 100 L de água), com divisórias de vidro separando em seis compartimentos de aproximadamente 17 litros, contendo um peixe por compartimento, permitindo assim que cada grupo experimental, aqui representado por um aquário, contenha seis réplicas verdadeiras de seu respectivo grupo. Os aquários foram mantidos sob aeração, pH (8.32 ± 0.26) e temperatura ($23.17 \pm 1,38$) (Apêndices 1 e 2) constantes em um ciclo de claro-escuro de 12h. Os peixes eram alimentados a cada dois dias.

Para cada período de exposição foram utilizados 42 peixes, sendo seis deles para cada grupo, como segue: Controle, 0,01 mL.L⁻¹ de B100, 0,001 mL.L⁻¹ de B100, 0,01 mL.L⁻¹ de B20, 0,001 mL.L⁻¹ de B20, 0,01 mL.L⁻¹ de B5 e 0,001 mL.L⁻¹ de B5 (Figura 10).

Durante as exposições, o pH e a temperatura da água foram medidos diariamente e a cada cinco dias a água de todos os aquários foi trocada, contendo seus respectivos tratamentos, e a quantidade de amônia dissolvida em água medida antes da troca, caracterizando uma exposição semi-estática. Para a troca de água dos aquários foram tomadas precauções para que não fosse provocado estresse nos animais, manipulando-os com muito cuidado e o menor número de vezes possível, revezando os aquários para que não houvesse contaminação entre eles e também não ficassem fora da água por muito tempo. Logo que um aquário era desocupado, este era lavado para que na próxima troca estivesse limpo para a sua utilização.

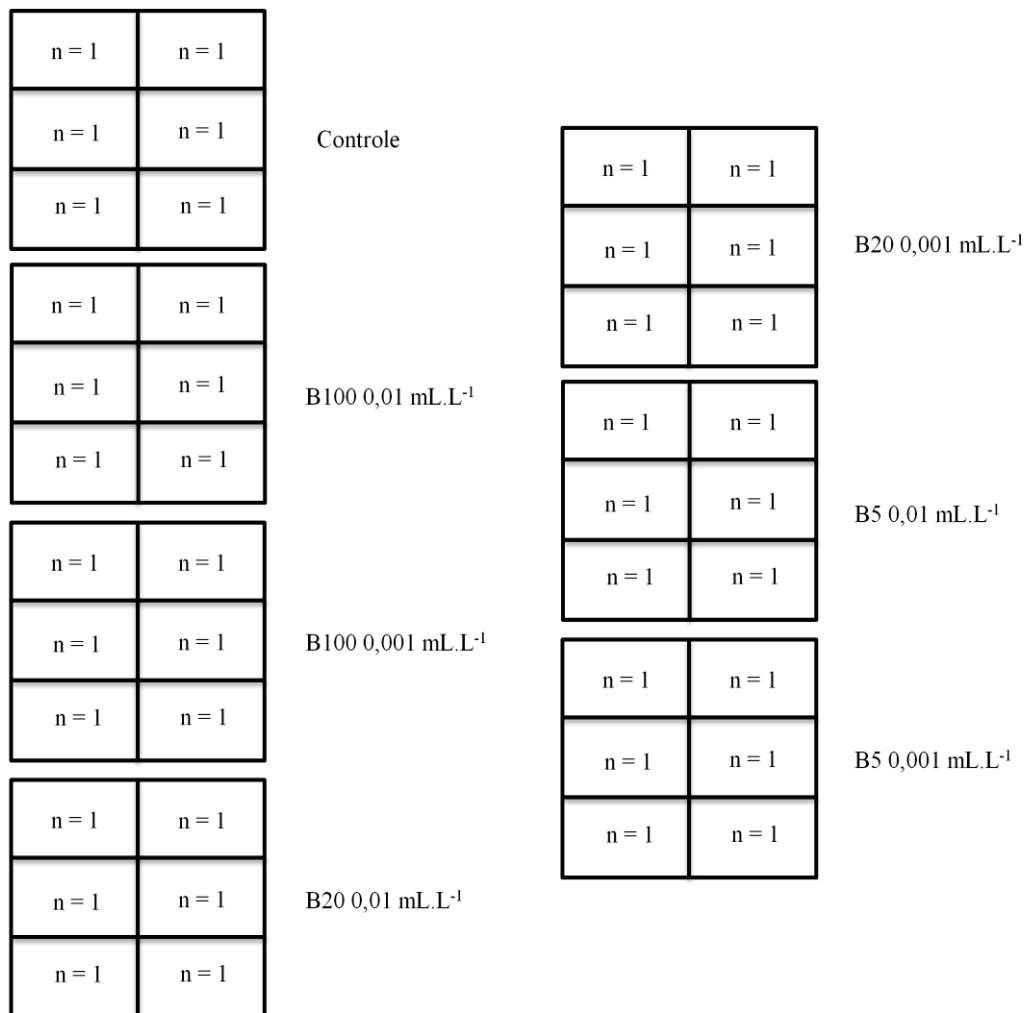


Figura 10. Delineamento experimental da exposição dos peixes aos contaminantes, em duas concentrações diferentes, durante 15 e 30 dias.

Ao final dos 15 dias e 30 dias de exposição, os animais tiveram seu sangue coletado para análise de cometa e micronúcleo, e em seguida foram anestesiados com fenoxietanol (2 mL.L⁻¹) e mortos para a dissecação do fígado, brânquias e encéfalo.

3.3. Teste de Toxicidade

O teste de toxicidade seguiu o protocolo do EPA, EPA-821-R-02-012 (Métodos para Medir a Toxicidade Aguda de Efluentes e Águas Receptores de Água Doce e Organismos Marinhos). A exposição dos peixes foi realizada também em aquários de 50cm x 80cm x 60cm (aproximadamente 100L de água), dividido com divisórias de vidro em seis compartimentos de aproximadamente 17 litros, contendo um peixe por compartimento, permitindo assim que cada grupo experimental, aqui representado por 1 aquário, contenha seis réplicas verdadeiras de seu respectivo grupo. Os aquários foram mantidos sob aeração, pH e temperatura constantes em um ciclo de claro-escuro de 12h.

Os testes de toxicidade foram realizados separadamente para cada fração do diesel (B5, B20 e B100). Para cada teste, foram necessários cinco aquários com seis peixes, sendo que em cada aquário, o composto foi adicionado em concentrações crescentes. A princípio foi considerado o maior valor de concentração no teste, a concentração de 1,5 mL.L⁻¹, e a partir dessa concentração, foram calculadas as demais concentrações considerando esta como 100%. As demais concentrações utilizadas no teste foram 75%, 50%, 25% e 12,5% da dose maior (respectivamente 1,125, 0,75, 0,375 e 0,188 mL.L⁻¹). Porém estas concentrações utilizadas não nos deram resultados, assim, outros teste foram realizados até chegarmos a dose de 6,0 mL.L⁻¹ (100%), o que achamos ser um valor muito alto.

Após as 96h de exposição a mortalidade dos peixes foi registrada e calculadas as LC100 (96h) e LC50 (96h), através de um gráfico em que estarão as doses versus as mortalidades (%).

3.4. Preparo das misturas de Biodiesel

O biodiesel puro (B100), produzido a partir de oleaginosas, foi obtido junto a Fertibom Indústrias Ltda., localizada na cidade de Catanduva/SP, sendo o seu produto o Biodiesel Biomax.

Como o óleo diesel puro não pode ser comercializado em postos de combustíveis foi obtido apenas o biodiesel B5 em postos da rede Petrobrás, localizado na cidade de São José do Rio Preto/SP. Posteriormente, no laboratório, com o auxílio de uma proveta fizemos uma solução de 20% de biodiesel no óleo diesel já a 5%, tornando-o uma solução de B20 (20% de biodiesel em 80% de óleo diesel).

3.5. Descarte de resíduos tóxicos e de água contaminada

O descarte de água foi realizado com a utilização de uma bomba de UV com filtro de carvão ativado para que os resíduos tóxicos ficassem retidos e os microorganismos presentes fossem mortos, evitando assim, o descarte inadequado no ambiente.

Todos os resíduos tóxicos produzidos durante as análises bioquímicas foram devidamente armazenados em recipientes apropriados para o descarte, que é realizado pela própria instituição, que atualmente possui um posto de coleta de resíduos tóxicos e dão a estes o devido tratamento.

3.6. Análises Bioquímicas

3.5.1. Preparo das amostras para análises das enzimas EROD, GST, SOD, CAT e GPx.

Para as análises enzimáticas da SOD, CAT, GPx e GST, os tecidos foram homogeneizados (1:4 massa:volume) em tampão Tris HCl 20 mM, pH 7,4 contendo sacarose 0,5M, KCl 0,15 mM e 1 mM de inibidor de protease (PMSF), e centrifugados a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C e a fração sobrenadante foi coletada e re-centrifugada a 50.000 x g por 60 minutos a 4°C. A porção sobrenadante foi novamente coletada para as análises das atividades da GST, SOD, CAT e GPx. Para a análise da EROD, os *pelets* resultantes tanto das amostras de fígado quanto as de brânquias foram re-suspendidos em 100 µL de tampão Tris 100 mM, pH 7,5, contendo EDTA 1mM, ditiotreitól 1 mM, KCl 100 mM e 20% de glicerol. O sobrenadante foi separado em alíquotas e armazenado em freezer -80°C, assim como o homogeneizado para EROD.

3.5.2. 7-etoxirresorufina-0-deetilase (EROD)

A EROD foi medida por método fluorimétrico, adaptado de Burke e Mayer (1974). O método consiste na formação da resorufina, que é fluorescente ($\lambda_{\text{excit}} = 537 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emiss}} = 583 \text{ nm}$), catalisada pela isoforma 1A do citocromo P450. Foram adicionadas às cubetas 1940 μL de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,4, além de 20 μL de solução de 7-etoxirresorufina 335 μM , 20 μL de NADPH 10 mM e 20 μL de amostra de fígado ou brônquias previamente preparadas. A reação foi observada durante 3 minutos a 30°C e os dados foram expressos em $\text{pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

3.5.3. Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi analisada por método espectrofotométrico adaptado de Keen, Habig e Jakoby (1976). Nas cubetas foram adicionados o tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 6,5, o CDNB (100 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) e a GSH (100 mM de glutathione reduzida), sendo por fim, adicionada a amostra e assim, a atividade enzimática foi avaliada a 30°C, sendo o aumento da absorvância acompanhado durante um minuto a 340 nm e os dados expressos em U mg^{-1} de proteína.

3.5.4. Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida pelo método espectrofotométrico adaptado de McCord e Fridovich (1969). Este método é baseado em um sistema de geração de superóxido (xantina/xantina oxidase) acoplado à redução do citocromo c pelo radical ânion superóxido, provocando aumento de absorvância em 550 nm a 25°C, sendo acompanhado durante um minuto. A adição da amostra contendo a SOD promove uma inibição na velocidade de redução do citocromo c, uma vez que a SOD compete com o citocromo pelo superóxido. Nas cubetas são adicionados o meio de reação (contendo o tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, citocromo C e a xantina), a amostra e por fim a xantina oxidase diluída em EDTA 0,001 M pH 7,0. Os dados foram expressos em U mg^{-1} de proteína.

3.5.5. Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida pelo método espectrofotométrico adaptado de Beutler (1975), método este que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, através do decréscimo de absorvância em 240 nm a 30°C durante um minuto. As cubetas utilizadas para as análises foram as de quartzo e nelas foram acrescentados o meio de

reação (contendo H_2O_2 a 30%, tampão Tris-HCl 1 M pH 8,0 e água ultrapura) e a amostra. Os dados foram expressos em U mg^{-1} de proteína.

3.5.6. *Glutathione peroxidase (GPx)*

A análise da GPx foi medida por método espectrofotométrico adaptado de Sies et al. (1979). Esse método baseia-se na medida do decréscimo da absorbância a 340 nm, em função do consumo de NADPH pela catalisada pela glutathione redutase (GR) reduzindo a GSSG, gerada pelo uso da GSH pela GPx na redução do peróxido de *t*-butila, a temperatura ambiente. Nas cubetas para as análises foram adicionados o meio de reação contendo: tampão fosfato de potássio (0,1 M pH 7,0, EDTA 0,005 M pH 7,0, glutathione redutase, glutathione reduzida – GSH, nicotinamida adenina dinucleotídeo – NADPH e água ultrapura), o peróxido de *t*-butila (tBOOH) (0,5 mM) e a amostra. Os dados foram expressos em U mg^{-1} de proteína.

3.5.7. *Peroxidação lipídica*

Para que os níveis de peroxidação lipídica nos tecidos fossem avaliados, foi analisada a presença do produto formado entre o malondialdeído (MDA) e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), via cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) acoplada ao detector de UV/Vis (ALMEIDA, et al., 2003, 2004).

Para esta análise, 100 mg de tecido foi homogeneizado em 0,3 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Após a homogeneização, 300 μL de TBA diluído em HCl 0,2 M (solução a 0,4%) foi adicionado à amostra. A mistura foi aquecida a 90°C por 40 minutos. O produto da reação foi então extraído com 1 mL de *n*-butanol e quantificado no HPLC-UV/Vis em 532 nm. Para a curva de calibração foi utilizado como padrão o MDA obtido pela hidrólise do tetrametoxipropano. Os dados foram expressos em nmol mg^{-1} de tecido.

3.5.8. *Preparo das amostras para análises das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE)*

Para as análises enzimáticas da AChE e CbE os tecidos foram homogeneizados (1:4 massa:volume) em tampão Tris HCl 0,1 mol.L^{-1} pH 8,0 e centrifugados por 30 minutos a 10.000 x g, a 4°C. A fração sobrenadante foi coletada e armazenada em freezer -80°C para as posteriores análises.

3.5.9. AChE e a CbE

Para a análise de acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE) foi utilizado o espectrofotômetro de feixe duplo, seguindo a metodologia descrita por Ellman et al. (1961), medindo-se a formação do produto tiólico produzido pela ação da enzima sobre o substrato, que reage com o ditionitrobenzeno (DTNB), formando um composto amarelado que é monitorado em 412 nm, a 25°C, durante um minuto. Para a AChE foi utilizado como substrato para a reação a acetiltiocolina e para a CbE foi utilizado o feniltioacetato.

3.5.10. Quantificação de proteína

A quantificação de proteína foi realizada utilizando-se o método de Bradford (1976). O reagente de Bradford contém Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução ácida, este ao se ligar às proteínas tem sua absorvância alterada de 465 nm para 595 nm, isto devido à mudança na coloração de castanho para diferentes tons de azul, de acordo com a concentração de proteína presente, consequência da interação entre a proteína e o corante que estabiliza a forma iônica do corante. A absorvância é determinada por espectrofotometria em 595 nm. Esta quantificação foi utilizada apenas para os cálculos das atividades específicas de cada enzima.

3.7. Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo foi realizado com sangue de *P. anisitsi*, coletados utilizando uma seringa heparinizada para cada peixe.

Para preparar a lâmina, a primeira gota de sangue foi descartada da seringa, para evitar contaminação do sangue com o líquido que estava presente na superfície corpórea do indivíduo. Foram confeccionadas duas lâminas, de esfregaço, para cada indivíduo, foram pingadas duas gotas de sangue no início da lâmina e estas foram distribuídas por toda a extensão da lâmina. Após a secagem do sangue presente na lâmina, esta foi colocada em fixador (metanol absoluto) por 10 minutos.

Após a secagem *overnight* das lâminas, elas foram submetidas à reação de Feulgen, que possui duas etapas: a primeira é a hidrólise ácida em HCl 1 M a 60 °C por 11 minutos e a segunda é a imersão em reativo de *Schiff*, por duas horas, em local escuro.

Em cada lâmina foram analisados 1.000 eritrócitos, totalizando 3.000 eritrócitos por peixe, sob objetiva de 40x em um microscópio Leica acoplado a uma câmera para captura de imagem e ainda a imagem foi aumentada no computador para que uma melhor análise fosse obtida. Durante as análises as alterações celulares foram classificadas em: *blebbed* (uma evaginação sutil no envoltório nuclear); *lobed* (evaginação proeminente do envoltório nuclear); *notched* (invaginação do envoltório nuclear ou núcleo em forma de rim) e *broken eggs* (pequena porção nuclear ligada ao núcleo principal por um pequeno filamento nucleoplasmático) (CARRASCO et al., 1990) (Figura 11).

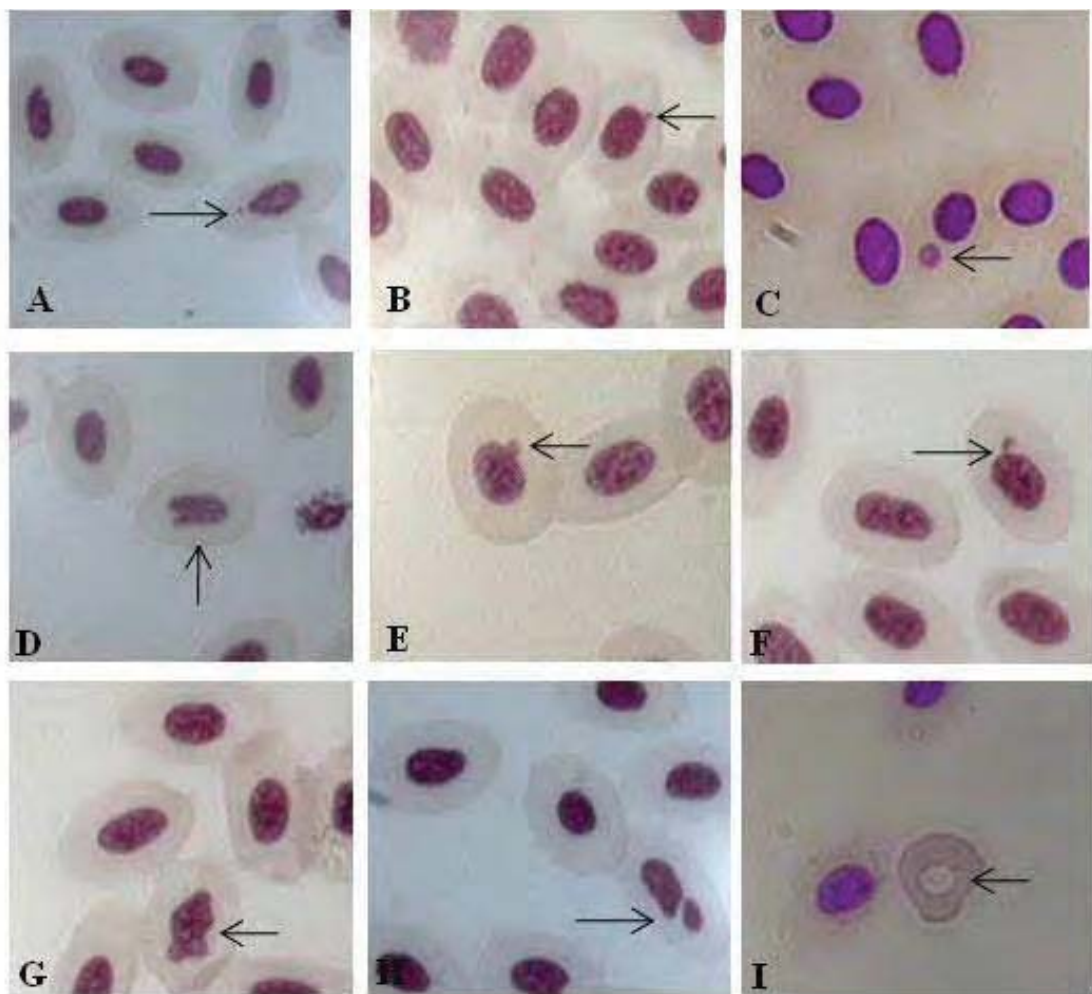


Figura 11. Micronúcleos e anormalidades nucleares observadas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. A-C: Células micronucleadas; D: Núcleo notched (seta); E: Núcleo lobed (seta); F: Broken eggs (seta); G: Núcleo blebbed (seta); H: Célula binucleada (seta); I. Cariólise (seta) (MASCHIO, 2009).

3.8. Ensaio do cometa

O mesmo sangue que foi coletado para a confecção das lâminas de esfregaço sanguíneo para o teste do micronúcleo, também foi utilizado para a confecção das lâminas para o ensaio do cometa.

Uma amostra de 10 μL de sangue foi diluída em 1.000 μL de solução fisiológica. Desta suspensão celular foram retirados 10 μL e acrescentado 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C. Estas lâminas permaneceram em solução de lise (1 mL de triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, para 1 L) na geladeira por uma hora. Após o processo de lise celular, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal. Para que a corrida fosse realizada, acrescentou-se tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM – pH~13), por 20 minutos, na ausência de luz. Após o período de descanso, as lâminas foram submetidas à eletroforese, por 20 minutos à 25 V e 300 mA. Após a corrida as lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4M, por 15 minutos e fixadas em etanol por mais 10 minutos.

No momento da análise das lâminas a coloração foi realizada com brometo de etídio (0,02 mg.mL⁻¹).

Para cada peixe foram analisados 100 nucleóides, com a utilização de microscopia de fluorescência Leica, filtro B – 3⁴ (excitação: $\lambda = 420 - 490$ nM, barreira: $\lambda = 520$ nM), em objetiva de 40x. Os nucleóides foram classificados visualmente, de acordo com a migração de seus fragmentos, sendo classificados em: classe 0 (sem danos); classe 1 (poucos danos); classe 2 (danos médios) e classe 3 (grandes danos), de acordo com a classificação sugerida por Kobayashi (1995).

3.9. Análise estatística

A análise foi realizada através da utilização do programa Statistica 7.1 (Statsoft).

Foram feitas comparações entre os diferentes tratamentos para os mesmos períodos (15 ou 30 dias), não comparando os resultados entre os períodos de exposição, visto que houve grande diferença de peso entre os animais expostos durante 15 e 30 dias.

Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk's, seguido do teste de homogeneidade das variâncias (Levene) e quando os dados eram paramétricos, foi aplicado

ANOVA One-Way, seguido do teste de Tukey HSD, caso os dados eram não-paramétricos, foi aplicado Kruskal-Wallis. As diferenças estatisticamente significantes foram aceitas somente para $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Efeitos observados do óleo diesel e biodiesel após 15 e 30 dias de exposição

4.1.1. Teste de toxicidade

O teste de toxicidade foi realizado a princípio utilizando-se $1,5 \text{ mL.L}^{-1}$ de contaminante (B100, B20 e B5), sendo esta a concentração de 100%, as demais concentrações seriam de 75%, 50%, 25% e 12,5%, sendo respectivamente $1,125 \text{ mL.L}^{-1}$, $0,75 \text{ mL.L}^{-1}$, $0,375 \text{ mL.L}^{-1}$ e $0,188 \text{ mL.L}^{-1}$. Neste primeiro teste realizado, foi observada a morte de apenas quatro peixes nas concentrações $1,5 \text{ mL.L}^{-1}$ e $1,125 \text{ mL.L}^{-1}$ do contaminante B20, sendo dois em cada uma. Nos demais contaminantes nenhuma morte foi observada ao final de 96 horas de exposição, assim, as concentrações foram dobradas para um novo teste, sendo as novas de $3,0 \text{ mL.L}^{-1}$, $2,625 \text{ mL.L}^{-1}$, $1,5 \text{ mL.L}^{-1}$, $0,75 \text{ mL.L}^{-1}$ e $0,375 \text{ mL.L}^{-1}$, sendo o mesmo padrão de porcentagem seguido. Neste segundo teste, houve morte de apenas dois peixes na concentração $1,5 \text{ mL.L}^{-1}$ do contaminante B20 e novamente nos demais nenhum peixe morreu após as 96 horas de exposição, mesmo na maior concentração de B5. Assim, um terceiro teste foi realizado, também com dobro da maior concentração utilizada no anterior, seguindo o mesmo padrão de porcentagem, sendo as concentrações de $6,0 \text{ mL.L}^{-1}$, $4,5 \text{ mL.L}^{-1}$, $3,0 \text{ mL.L}^{-1}$, $1,5 \text{ mL.L}^{-1}$ e $0,75 \text{ mL.L}^{-1}$. Neste último teste maior mortalidade foi observada, porém não o necessário para que a LC50 fosse estabelecida. Obtivemos a morte de cinco peixes no total, sendo um da concentração $1,5 \text{ mL.L}^{-1}$ de B20, dois na concentração $4,5 \text{ mL.L}^{-1}$ e dois na $6,0 \text{ mL.L}^{-1}$ de B5. Após fazermos esses três testes, decidimos não realizar outros aumentando as concentrações novamente, já que as concentrações utilizadas já estavam muito altas e seria difícil de encontra-las no ambiente.

4.1.2. Mortalidade dos animais

Durante a exposição de 30 dias, o total de seis peixes morreram antes de completar o período de exposição. Destes seis peixes que morreram, quatro pertenciam ao grupo exposto ao tratamento de B20 $0,01 \text{ mL.L}^{-1}$, um pertencia ao grupo exposto ao tratamento B20 $0,001 \text{ mL.L}^{-1}$ e o outro ao grupo exposto ao tratamento de B5 $0,001 \text{ mL.L}^{-1}$.

4.1.3. EROD

Foi observado aumento estatisticamente significativo na atividade enzimática da EROD nas brânquias, de peixes expostos por 15 dias ao B20 0,01 mL.L⁻¹ quando comparado aos peixes expostos ao controle (Figura 12A), o mesmo ocorreu no fígado, sendo que além do B20 0,01 mL.L⁻¹, o B5 0,01 mL.L⁻¹, também apresentou diferença quando comparado ao controle (Figura 12B).

Em brânquias de peixes expostos por 30 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Figura 12C). Já em fígado, houve aumento da atividade enzimática de peixes expostos ao B20 0,001 mL.L⁻¹ e B5 0,01 mL.L⁻¹, quando comparados ao controle (Figura 12D).

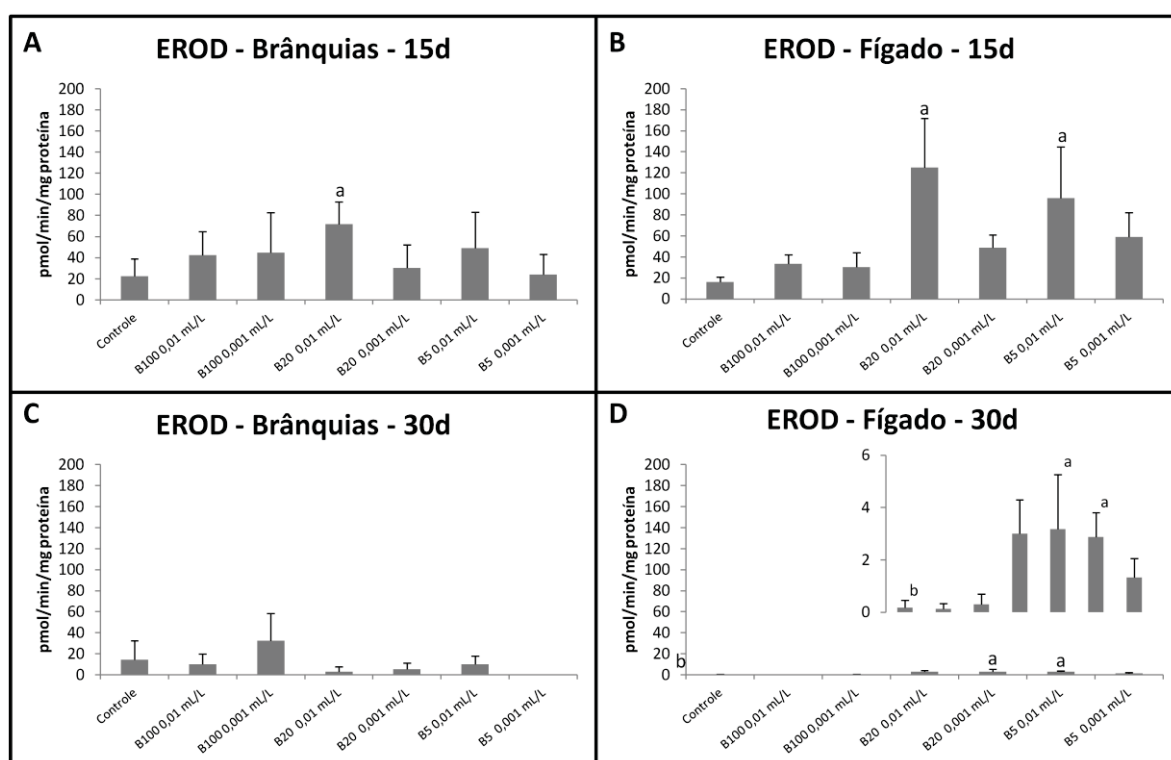


Figura 12. Atividade da EROD em brânquias (A e C) e em fígado (B e D) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 e 30 dias respectivamente.

a – diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

b – diferença estatisticamente significativa em relação ao controle de brânquias expostas por 30 dias.

Estes resultados nos mostram que houve indução da atividade da EROD em duas das misturas utilizadas, nas diferentes concentrações. No B20 0,01 mL.L⁻¹ houve indução da EROD após 15 dias de exposição e no B20 0,001 mL.L⁻¹ houve indução após 30 dias de exposição, em fígado. Já no tratamento B5 houve indução da atividade da enzima somente em sua maior concentração após 15 e 30 dias de exposição. A indução da atividade enzimática

observada em B5 pode ser explicada pelo fato de os derivados do petróleo apresentarem uma alta quantidade de HPA, que são ambientalmente persistentes e agonistas de receptores aril hidrocarboneto, em muitos organismos, inclusive em peixes. A ativação destes receptores promove uma cadeia de reações que levará a síntese da isoforma 1A do citocromo P450 (CYP1A), levando ao aumento da atividade enzimática (WHYTE et al., 2000). Vários trabalhos de exposição de peixes a derivados de petróleo (GOLD-BOUCHOT et al., 2006; PATHIRATNE; CHANDRASEKERA; PATHIRATNE, 2009) e HPA (KOPECKA-PILARCZYK; CORREIA, 2009; TRÍDICO et al., 2010) mostram a indução desta enzima.

A indução enzimática observada no B20 nos dois períodos de exposição pode ser explicada pela possibilidade de o biodiesel aumentar a disponibilidade do diesel para os organismos, já que o biodiesel atua como “detergente”, levando à dispersão e solubilização das substâncias do óleo diesel, deixando-as mais disponíveis (MUDGE, PEREIRA, 1999; TAYLOR, JONES, 2001). Assim, a indução enzimática neste tratamento é tão pronunciada quanto no tratamento B5, já que desta forma, os componentes destas misturas podem interagir mais facilmente com as biomoléculas.

Muitos trabalhos relatam que o fígado é o principal tecido para a análise desta enzima, pela sua maior concentração (VAN DER OOST et al., 2003; MARTINEZ, 2006; FREIRE, 2008). Entretanto, também podemos verificar sua atividade em rins, trato gastro intestinal e tecido branquial (VARANASI, 1989). Neste trabalho, pudemos detectar uma maior sensibilidade enzimática no fígado do que em brânquias, demonstrando que nas condições testadas, o fígado foi o mais afetado.

Nos dados apresentados, vale ressaltar a grande diferença de peso entre os peixes utilizados em cada período, o que explica a grande diferença na atividade enzimática entre eles.

4.1.2. GST

Foi observado na GST diminuição estatisticamente significativa na atividade hepática da enzima, de peixes expostos por 30 dias ao B5 nas duas concentrações, em relação ao controle (Figura 13D).

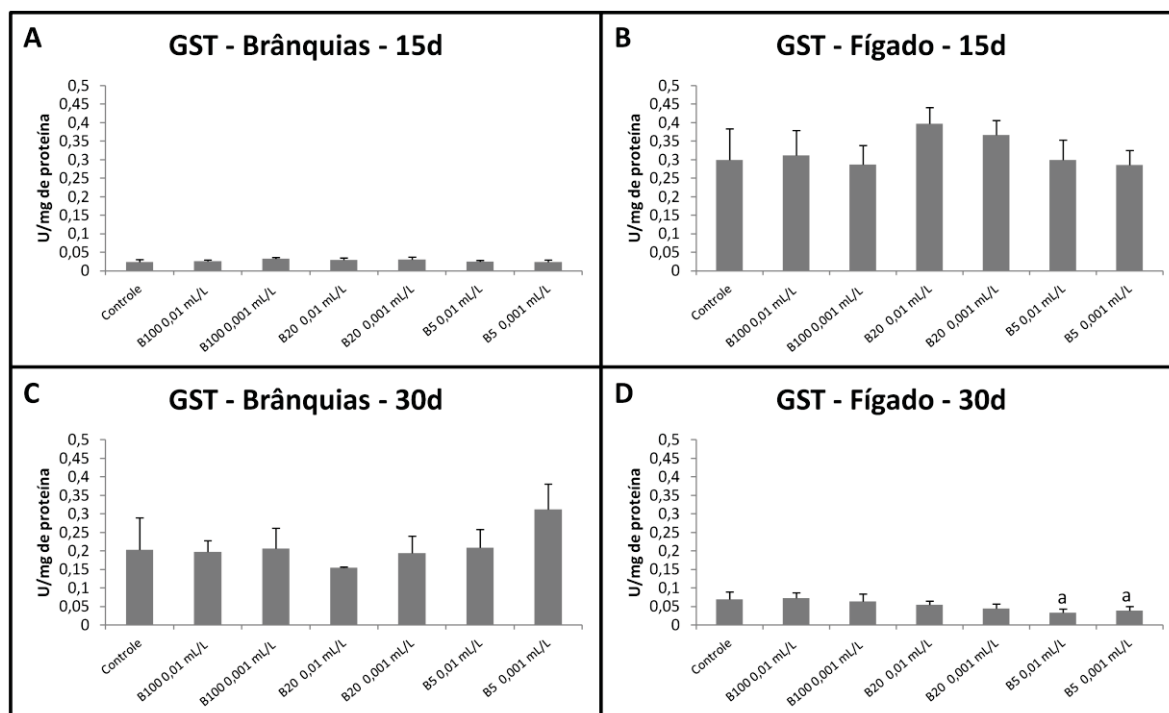


Figura 13. Atividade da GST em brânquias (A e C) e em fígado (B e D) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 e 30 dias respectivamente.
a – diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

A glutiona S-transferase, que é uma enzima de fase II, catalisa a reação da glutiona (GSH) com vários compostos eletrofílicos, detoxificando compostos intermediários reativos e de radical oxigênio. Após 30 dias de exposição houve diminuição da atividade da GST hepática para o tratamento B5 nas duas concentrações. Estas alterações observadas somente no contaminante B5, nos leva a concluir que esta mistura pode causar maiores danos aos peixes do que aqueles com maiores quantidades de biodiesel.

Há trabalhos como os já citados de Zhang et al. (2004), Simonato et al. (2006) e Simonato et al. (2008) que relatam a significativa indução da atividade desta enzima após a exposição à óleo diesel porém, neste trabalho resultados semelhantes aos encontrados por Jifa et al. (2006), Banni et al. (2009) e Thompson et al. (2010) foram encontrados, estes trabalhos mostram que após exposição ao benzo[a]pireno, outro HPA, não houve alteração na atividade enzimática, o que não era o esperado, assim, como neste trabalho, em que o esperado era a indução enzimática após a exposição e não a sua inibição.

A indução da GST na presença de óleo diesel é casada pela presença de HPA na mistura. Pois a GST, assim como a EROD (CYP1A), é ativada quando o HPA se liga ao receptor aril-hidrocarboneto (VAN DER OOST et al., 2003). O que pode explicar a inibição

desta enzima no fígado dos peixes é que provavelmente há algum outro composto, dentre os muitos que existem no óleo diesel, que causa a inibição da GST, prevalecendo a inibição e não a indução que poderia ter sido causada pela presença do HPA.

4.1.3. Enzimas antioxidantes

4.1.3.1. SOD

A SOD apresentou diferenças estatisticamente significativas em brânquias de peixes expostos por 15 dias aos contaminantes, sendo que, os peixes de todos os tratamentos em todas as concentrações tiveram a diminuição da atividade enzimática em relação ao controle (Figura 14A).

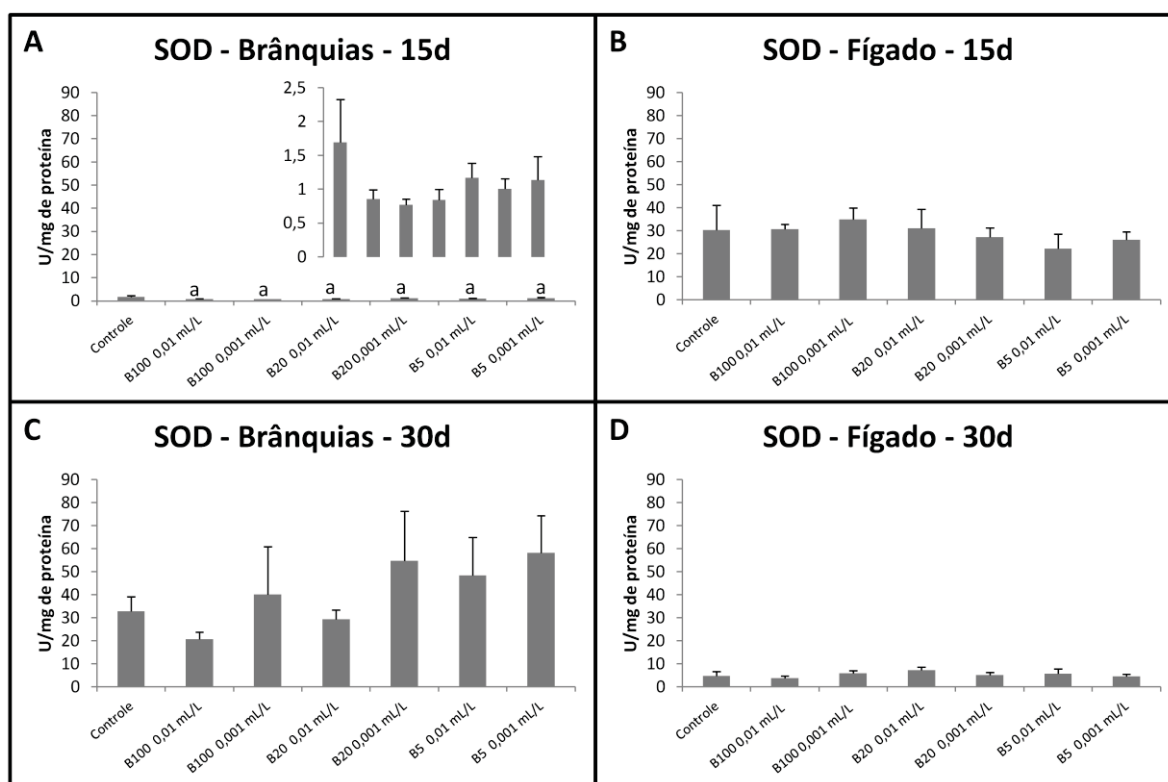


Figura 14. Atividade da SOD em brânquias (A e C) e em fígado (B e D) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 e 30 dias respectivamente. a – diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

No trabalho de Nogueira (2011) foi observado o aumento das atividades das enzimas GST, SOD, CAT e GPx ao longo de dois e sete dias de exposição aos mesmos contaminantes. Neste trabalho, como utilizamos períodos de exposição mais prolongados e com as análises observamos a redução na atividade enzimática, sugerimos que esteja acontecendo um

fenômeno chamado por Campbell (2000) de “cooperatividade negativa”, onde os metabólitos gerados pelas enzimas antioxidantes nos primeiros dias de exposição serão possíveis inibidores desta própria enzima, conseqüentemente a ligação dessas enzimas aos inibidores acarretará sua modificação conformacional, apresentando maior afinidade pelo seu inibidor do que pelo seu substrato, causando inibição enzimática, neste caso o excesso de peróxido de hidrogênio que causará a inibição da SOD. Maria e Bebiano (2011) também propuseram que pudesse haver um *feed-back* negativo para justificar a diminuição da atividade da SOD após sete dias de exposição de mexilhões *Mytilus galloprovincialis* a misturas de benzo[a]pireno e cobre.

4.1.3.2. CAT

Foi observado, na CAT, aumento estatisticamente significativo somente em Brânquias expostas aos contaminantes por 30 dias ao tratamento B5 0,001 mL.L⁻¹ se comparado ao controle (Figura 15C).

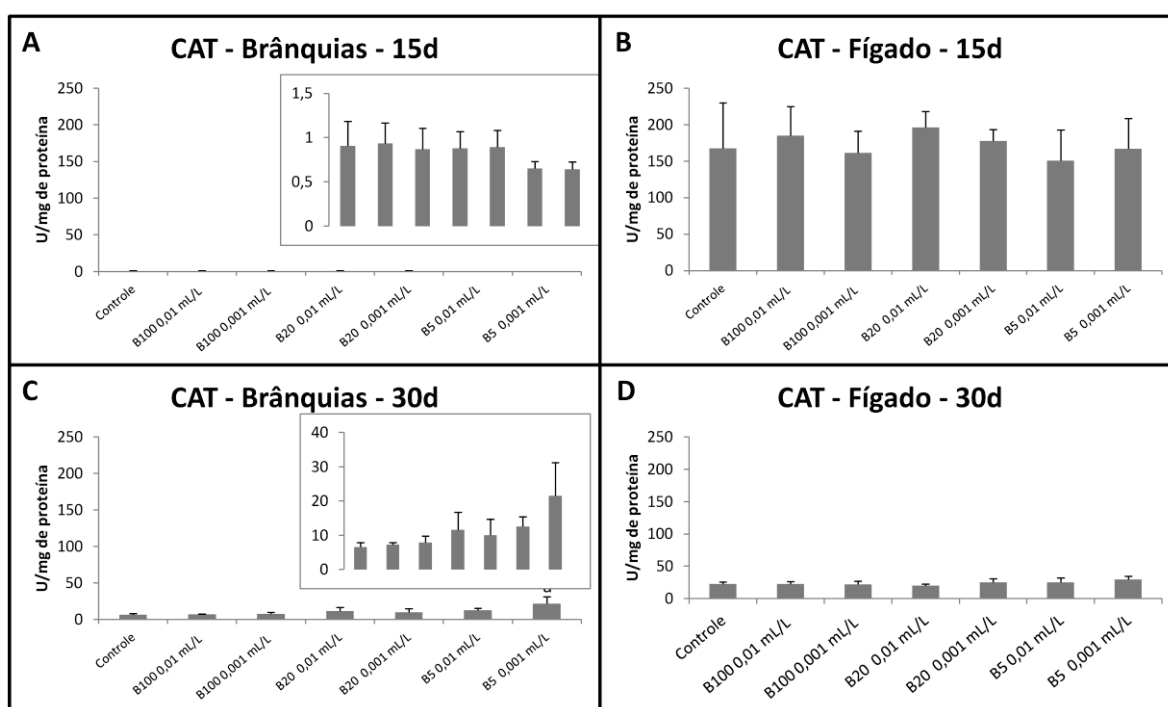


Figura 15. Atividade da CAT em brânquias (A e C) e em fígado (B e D) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 e 30 dias respectivamente.
a – diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

4.1.3.3. GPx

Na GPx, foi observado aumento estatisticamente significativo apenas nos dados obtidos da análise de brânquias de peixes expostos por 30 dias ao tratamento B5 0,001 mL.L⁻¹ em comparação ao controle (Figura 16C).

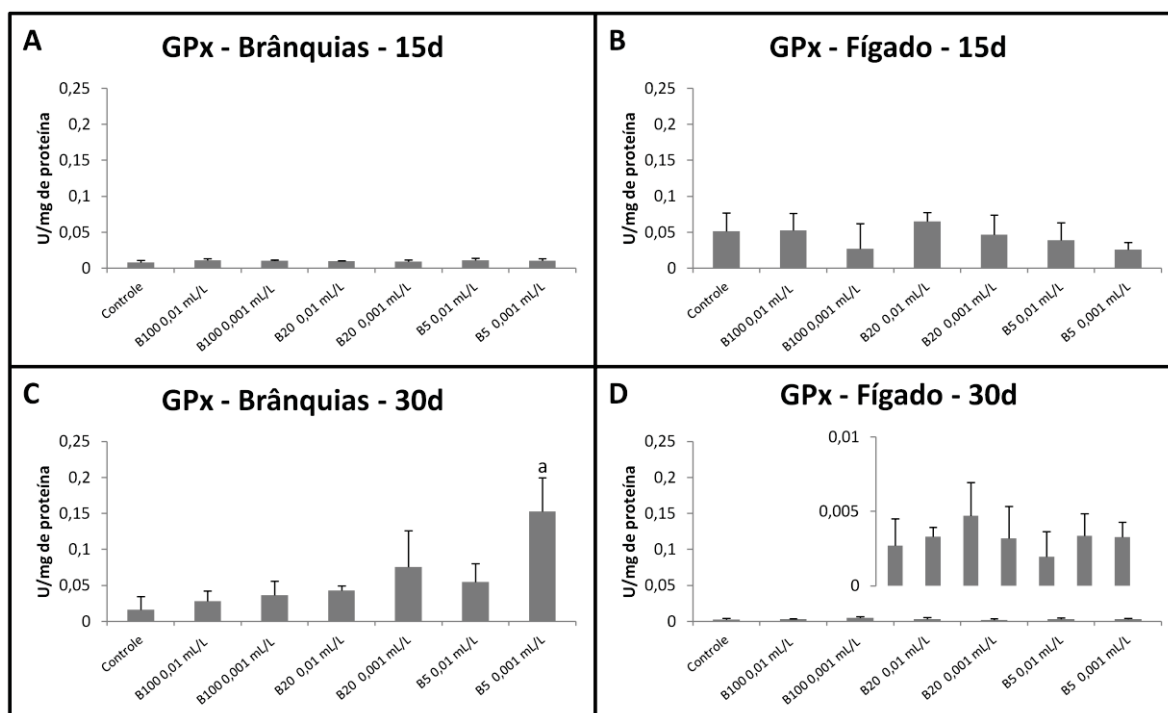


Figura 16. Atividade da GPx em brânquias (A e C) e em fígado (B e D) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 e 30 dias respectivamente.
a – diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

A SOD, CAT e GPx formam juntas, o sistema antioxidante, de defesa dos organismos, combatendo os oxirradicais (VAN DER OOST et al., 2003). A SOD, como já visto anteriormente, foi inibida nos tratamentos. As enzimas CAT e GPx foram induzidas no mesmo tratamento após o mesmo período de exposição (B5 0,001 mL.L⁻¹ após 30 dias de exposição) em brânquias, mostrando que ambas estão atuando nestes organismos para combater os oxirradicais, evitando os danos às biomoléculas.

Nogueira (2011) observou, após a exposição aos mesmos contaminantes pelos períodos de dois e sete dias, que a SOD, CAT e a GPx sofreram um aumento estatisticamente significativo, assim, concluímos que no início da exposição há um grande aumento da atividade das enzimas antioxidantes, combatendo os possíveis danos que seriam causados às

biomoléculas (DNA, proteínas, lipoperoxidação), após este período houve a diminuição da atividade enzimática da SOD e somente no contaminante B5 0,001 mL.L⁻¹ houve indução da atividade enzimática da CAT e GPx, mostrando que após um longo período de exposição (30 dias), não há mais as alterações enzimáticas que antes eram observadas. Isto pode ser pela adaptação do organismo à exposição ao contaminante, fazendo com que não haja mais as alterações enzimáticas que antes foram observadas (dois e sete dias de exposição).

Os resultados aqui apresentados sobre as enzimas antioxidantes corroboram com a hipótese do trabalho, de que quanto maior a quantidade de biodiesel misturado ao óleo diesel, menores serão as alterações causadas aos peixes, sugerindo, mais uma vez que, o biodiesel em maiores concentrações nas misturas com o óleo diesel pode ser menos prejudicial à biota aquática.

4.1.4. Peroxidação lipídica

Ao analisarmos a concentração de MDA nas brânquias de peixes expostos por 15 dias, observamos que houve diminuição estatísticas significantes do grupo B100 0,001 mL.L⁻¹ quando comparado aos grupos controle (Figura 18A). Em fígado, neste mesmo período, foi observada diminuição nos tratamentos B20 0,001 mL.L⁻¹ e B5 nas duas concentrações em relação ao controle (Figura 18B).

Nas brânquias, peixes expostos por 30 dias aos tratamentos B20 0,001 mL.L⁻¹ e as duas concentrações de B5, foi observada diminuição estatisticamente significativa da concentração de MDA em relação ao controle (Figura 18C) e no fígado deste mesmo período, foi observada diminuição de B20 0,001 mL.L⁻¹ e B5 0,01 mL.L⁻¹, em relação ao controle (Figura 18D).

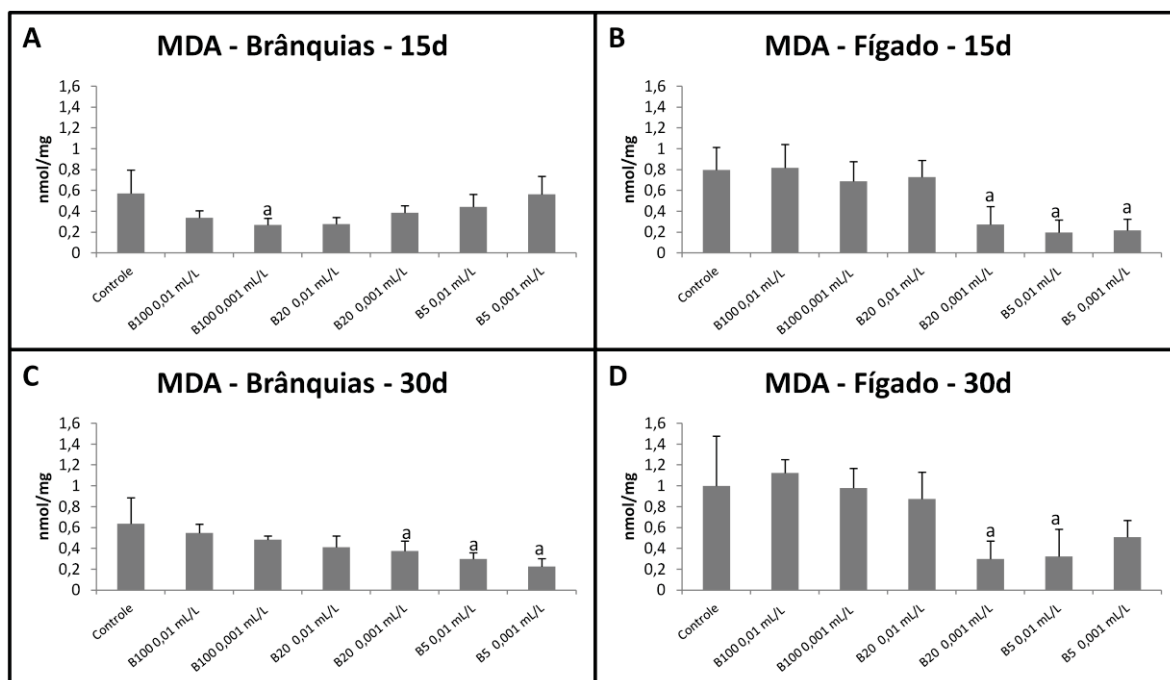


Figura 17. Concentração de MDA em brânquias (A e C) e em fígado (B e D) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 e 30 dias respectivamente. a – diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

A análise da peroxidação lipídica nos forneceu resultados inesperados, pois quando organismos são expostos à agentes químicos que causarão algum estresse oxidativo o que se espera é o aumento na quantidade de danos nas biomembranas, lipoperoxidação. Porém neste trabalho o que observamos é a diminuição na quantidade de danos dos peixes expostos aos contaminantes quando comparados aos controles. Assim, sugerimos que alguma enzima antioxidante, não analisada neste trabalho esteja atuando no combate aos oxirradicais, impedindo-os de causar a lipoperoxidação.

Aqui também podemos dizer que há a corroboração de nossa hipótese, já que comparando com o controle, quanto maior a quantidade de óleo diesel junto ao biodiesel, maiores são os danos causados.

4.1.5. Teste do Micronúcleo

Nas análises de MN e AN em eritrócito de cascudos expostos por 15 dias aos contaminantes, podemos observar aumento estatisticamente significativo na quantidade de MN em peixes expostos ao grupo B20 0,001 mL.L⁻¹ em relação aos grupos controle (Figura 19A).

Nas análises de MN e AN em eritrócito de cascudos, após 30 dias de exposição aos contaminantes, podemos observar um aumento estatisticamente significativo na quantidade de

anormalidades nucleares (AN) ao observarmos o grupo exposto ao B5 0,01 mL.L⁻¹ em relação ao controle (Figura 19B).

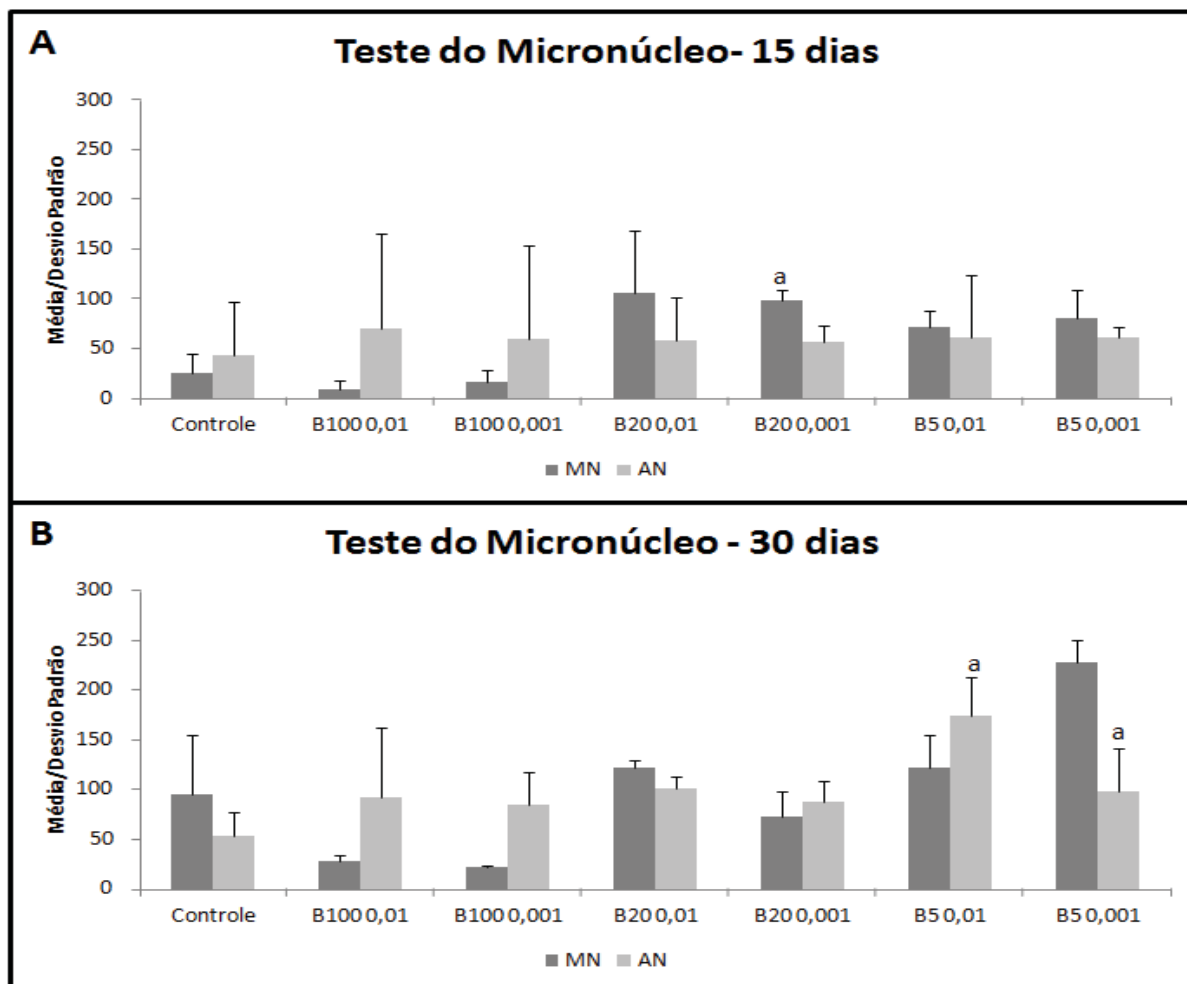


Figura 18. Média e desvio padrão de MN e AN analisado em sangue de cascudos expostos por 15 (A) e 30 dias (B) aos contaminantes.
a – diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Os danos causados às moléculas de DNA por quebra ou até mesmo perdas não reparadas, pode ser causado pelas ERO (FENECH, 2000), bem como por alquilação do material genético por componentes presentes nos tratamentos. O teste de MN tem sido utilizado para estimar efeitos resultantes de danos cromossômicos causados por produtos químicos (LEME; MARIN-MORDES, 2009). Em adição ao teste do MN está o ensaio do cometa que também tem sido amplamente utilizado para a avaliação de possíveis danos mediados por ERO ou outros agentes (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

Podemos observar que há um aumento na quantidade de MN em peixes expostos por 15 dias ao B20 0,001 mL.L⁻¹ e de AN em peixes expostos por 30 dias ao B5 nas duas

concentrações utilizadas (0,01 e 0,001 mL.L⁻¹). Como nos animais expostos ao B20 0,001 mL.L⁻¹ por 15 dias ao B5 0,01 mL.L⁻¹ por 30 dias houve um aumento na atividade da ERO, supõe-se que um excesso de espécies reativas de oxigênio esteja sendo gerado, podendo ser uma das causas responsáveis pela presença de micronúcleos nestes mesmos grupos.

Os resultados apresentados por esta análise corroboram com a hipótese lançada por Nogueira (2010) de que a presença de biodiesel no contaminante B20 aumente a disponibilidade dos elementos presentes no óleo diesel, sendo assim, maiores danos são causados após a exposição à este contaminante, sendo que o contaminante B100 não apresentou aumento na quantidade de MN e AN, o que mais uma vez, corrobora com a hipótese do trabalho, de que quanto maior for a quantidade de biodiesel na mistura dos combustíveis, menores serão os danos causados à biota aquática.

4.1.6. Ensaio do Cometa

Na análise do ensaio do cometa realizado com eritrócito de cascudos, após 15 dias de exposição aos contaminantes, observamos aumento estatisticamente significativo no *Score* de danos causados as molecular de DNA nos tratamentos B100 0,01 e 0,001 mL.L⁻¹ e B5 0,01 mL.L⁻¹ em relação ao controle (Figura 19A).

Ao analisarmos o Ensaio do Cometa realizado com eritrócitos de cascudos expostos aos contaminantes pelo período de 30 dias, observamos aumento estatisticamente significativo no *Score* de danos causados as molecular de DNA no tratamento B100 0,001 mL.L⁻¹ em relação ao controle (Figura 19B)

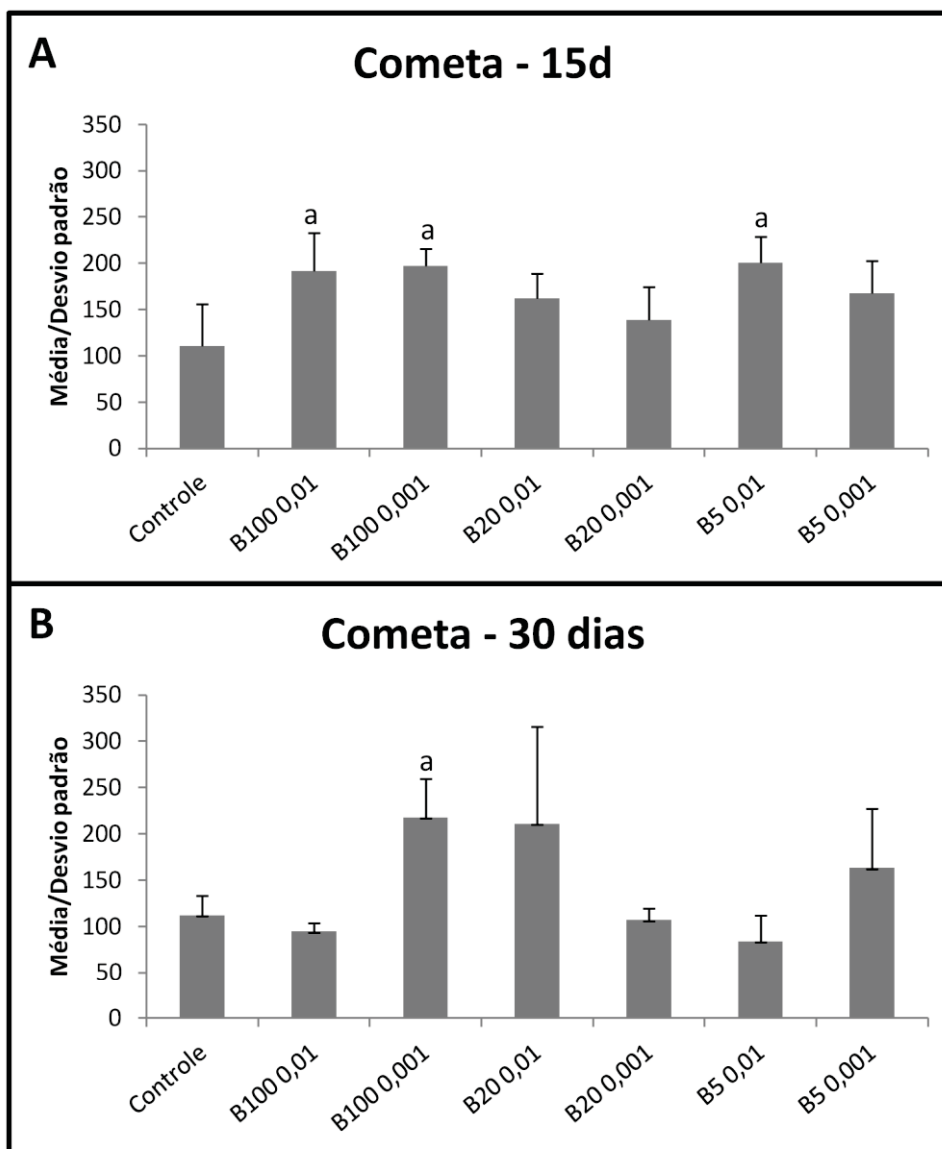


Figura 19. Média e desvio padrão de MN e AN analisado em sangue de cascudos expostos por 15 (A) e 30 dias (B) aos contaminantes. a – diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

O aumento de cometas no contaminante B5 0,001 mL.L⁻¹ para 15 dias de exposição, e para o B20 0,001 mL.L⁻¹ e B5 0,001 mL.L⁻¹ para 30 dias, também são explicados pela presença de HPA, já que estes, como dito anteriormente, também apresentam indução da EROD, possivelmente pelo aumento na de ERO e ainda aumento na quantidade de produtos da biodegradação do diesel como, alcenos, antraceno, benzo[a]pireno e naftaleno (BENTO, 2005), outros produtos são gerados e estes podem ser reativos e se ligarem a molécula de DNA, causando os danos oxidativos, gerando maiores quantidades de cometas de Classe 3.

O contaminante B100 0,001 mL.L⁻¹ também apresentou aumento na quantidade de cometas, o que nos possibilita afirmar que este contaminante também produz ERO, que são capazes de levar à modificações no DNA, pela formação de adutos com seus metabólitos ou

com o próprio xenobiótico. Este dado se opõe à hipótese lançada, já que aqui, o contaminante B100 também aparece como prejudicial à biota aquática, levando a formação de cometas de Classe 3 e corrobora com o trabalho de Leme et al. (2012), afirmando que o biodiesel pode promover toxicidade no ambiente aquático, já que ele é potencialmente genotóxico e mutagênico.

4.1.7. Esterases

4.1.7.1. AChE

Ao analisarmos AChE em cérebro de cascudos expostos aos contaminantes pelo período de 15 dias, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa para este período (Figura 20A).

A AChE analisada em cérebro de cascudos expostos por 30 dias aos contaminantes apresentou diminuição estatisticamente significativa de sua atividade em B20 0,001 mL.L⁻¹ em relação ao controle (Figura 20B).

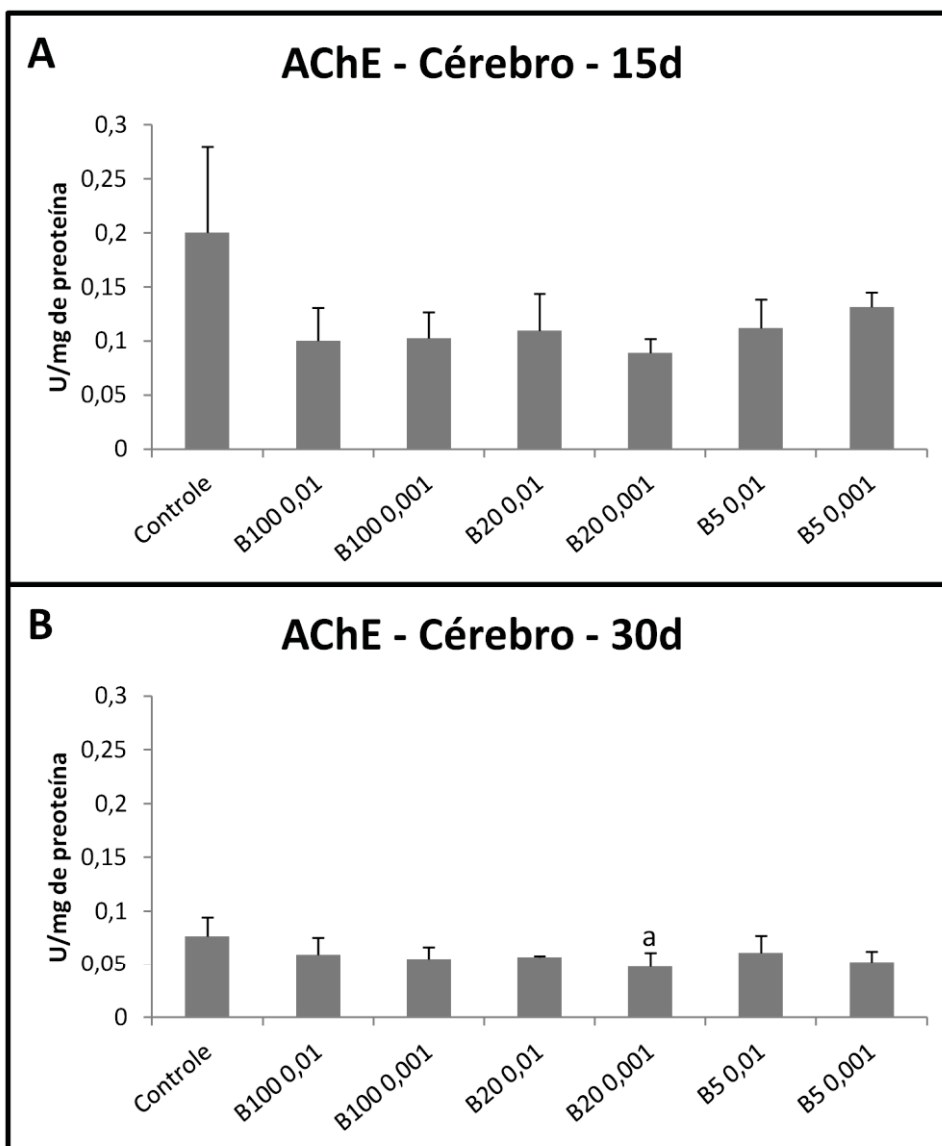


Figura 20. Atividade da AChE em cérebro de cascos expostos aos contaminantes por 15 (**A**) e 30 (**B**) dias.

a – diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

4.1.7.2. CbE

Analisando as brânquias de cascos expostos por 15 dias aos contaminantes, observamos diminuição estatisticamente significativa nos grupos expostos ao B20 0,01 mL.L⁻¹, B5 0,01 mL.L⁻¹ e B5 0,001 mL.L⁻¹ em relação ao controle (Figura 21A).

Analisando o fígado de cascos expostos por 15 dias aos contaminantes, observamos diminuição estatisticamente significativa nos grupos expostos ao B100 0,01 mL.L⁻¹, B5 0,01 mL.L⁻¹ e B5 0,001 mL.L⁻¹ (Figura 21B).

A análise de CbE em brânquias e fígado dos cascudos expostos à 30 dias aos contaminantes não foi possível, já que a quantidade de tecido foi insuficiente.

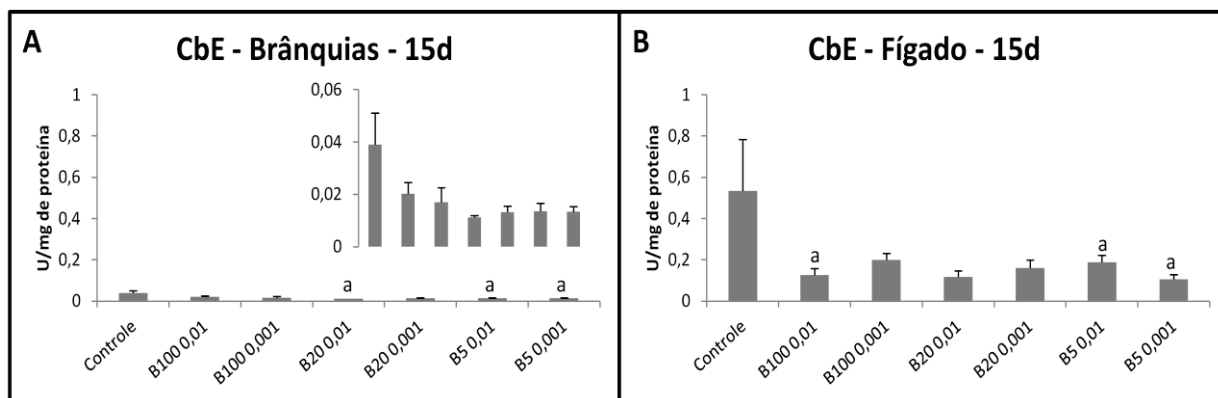


Figura 21. Atividade da CbE em brânquias (A) e fígado (B) de cascudos expostos aos contaminantes por 15 dias.

a – diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Ao avaliarmos a AChE em cérebro de cascudos expostos aos contaminantes, observamos a sua diminuição após 30 dias de exposição ao B20 0,001 mL.L⁻¹. Para a análise da enzima CbE em brânquias e fígado, observamos sua diminuição hepática aos contaminantes B100 0,01 mL.L⁻¹, B5 0,01 mL.L⁻¹ e B5 0,001 mL.L⁻¹ e a diminuição branquial aos contaminantes B20 0,01 mL.L⁻¹, B5 0,01 mL.L⁻¹ e B5 0,001 mL.L⁻¹. Estas duas enzimas são conhecidas pela forte inibição que sofrem após exposição à praguicidas organofosforados e (OP) e carbamatos (CM) (BAINY et al., 2006). Lima (2011) realizou exposição de zebrafish a metais e analisou AChE e CbE, foi observada a inibição dessas duas enzimas após a exposição, sendo a AChE inibida por todos os metais testados (cobre, ferro, chumbo e cádmio) e a CbE foi inibida apenas pela exposição ao cobre, portanto, este foi o motivo pelo qual estas enzimas foram analisadas.

Em nosso estudo, como houve a diminuição de ambas as enzimas após a exposição às diferentes misturas de óleo diesel e biodiesel, podemos afirmar que algum composto, como os metais, por exemplo, esteja causando esta inibição. Segundo a Petrobras (2012), após o refino do petróleo para a obtenção das diferentes frações e entre elas, do óleo diesel, muitos compostos tóxicos são eliminados, como por exemplo, o enxofre. Assim, tem-se que avaliar quais os compostos presentes no óleo diesel e suas misturas, que podem causar esta alteração.

Avaliando os dados de uma forma geral, podemos concluir que tanto o biodiesel B5 quanto o B20 foram capazes de gerar alterações enzimáticas e danos no material genético.

Além disso, o B20 promoveu mortalidade durante o experimento. Isso pode estar de acordo com a hipótese levantada por Nogueira et al. (2011), que observaram que o B5 e o B20 promoveram mais alterações enzimáticas que o biodiesel puro em tilápias. A hipótese levantada neste trabalho seria que a presença do biodiesel na mistura com o óleo diesel (B20) aumenta a disponibilidade de elementos presentes no óleo diesel, que normalmente seriam absorvidos em menores taxas, provavelmente causando menores danos. Porém, mais estudos são necessários para comprovarmos que esta ocorrência de fato acontece.

6. Conclusões

- De maneira geral, o tratamento B5 0,001 mL.L⁻¹, após os dois períodos de exposição (15 e 30 dias), foi o que mais causou alterações nos biomarcadores bioquímicos em ambos os tecidos analisados.
- O tratamento B20 0,01 mL.L⁻¹ foi o mais letal para os cascudos, causando a morte de muitos deles após 30 dias de exposição, supondo que este contaminante realmente aumente os danos causados pelo óleo diesel, promovendo maior absorção de seus compostos que causam estresse oxidativo.
- Comparando os efeitos individuais para cada tecido, os tratamentos B100 0,001 mL.L⁻¹, B20 0,01 mL.L⁻¹ e B5 0,001 mL.L⁻¹, após os dois períodos de exposição, foram os que causaram maiores alterações nos biomarcadores bioquímicos em brânquias, enquanto que o tratamento B5 0,01 mL.L⁻¹, após os dois períodos de exposição, foi o que causou maiores alterações nos biomarcadores bioquímicos no fígado. Assim, podemos afirmar que mesmo o B100 pode causar danos aos organismos, sendo potencialmente tóxico.
- A exposição dos cascudos aos tratamentos pelo período de 15 dias foi o que causou mais alterações nos biomarcadores bioquímicos. Mostrando-nos que a exposição crônica é prejudicial, porém após um período muito grande o organismo começa a voltar a ter seu sistema de defesa normalizado.
- Os resultados nos mostram que o B100 apresenta uma baixa toxicidade, sendo que o mesmo foi observado por Nascimento (2009) e Leite (2011). Entretanto, apresenta-se potencialmente tóxico quando analisado em brânquias e nos parâmetros genotóxicos necessitando de mais estudos para essa comprovação e maior cautela ao dizer que ele é a alternativa mais segura para o ambiente, como também é afirmado por Leme et al. (2012).
- A hipótese do trabalho foi corroborada em partes já que, a maioria das análises como a EROD, GST, CAT, GPx, MDA, Teste do Micronúcleo, CbE e AChE comprovam que quanto maior a quantidade de biodiesel adicionado à mistura do óleo diesel, menores são

as alterações decorrentes de estresse oxidativo. Porém, algumas análises como SOD, Ensaio do Cometa e CbE nos mostram que o B100 é potencialmente tóxico.

- Assim, mais estudos são necessários para comprovar o aumento da disponibilidade dos compostos do óleo diesel pelo B20 e a real toxicidade do B100.

Referências Bibliográficas

- ACHUBA, F. I.; OSAKWE, S. A. Petroleum - induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 29, n. 7, p. 97–103, 2003.
- AGARWAL, D.; SINHA, S.; AGARWAL, A.K. Experimental investigation of control of NO_x emissions in biodiesel-fueled compression ignition engine. *Renewable Energy* v. 31, p. 2356–2369, 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS. *Resolução ANP n. 2 de 29.1.2008*. [S.l.], 2008. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/janeiro/ranp%20%20-%202008.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$g=\\$x=\\$nc=8806](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/janeiro/ranp%20%20-%202008.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$g=$x=$nc=8806)>. Acesso em: 10 jan. 2012.
- ALMEIDA, E. A. et al. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, v. 135, n. 3, p. 295–303, 2003.
- ALMEIDA, E. A. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel *Perna perna* exposed to air and re-submersed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 318, p. 21–30, 2005.
- ALMEIDA, E. A. et al. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Marine Pollution Bulletin*, v. 49, n. 5-6, p. 386–92, 2004.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 343, p.121-135, 1995.
- AMADO, L.L.; MONSERRAT, J.M. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: why and how. *Environment International*, v.36, p. 226–235, 2010.
- AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epideiologia*, v.6, supl.1, 2003.
- AYLLÓN, F.; GARCIA-VASQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and *Poecilia latipinna*: an assessment of fish micronucleus test, *Mutation Research*, v. 467, p. 177-186, 2000.
- BAINY, A.C.D. et al. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. *Biotemas*, v. 19, p. 35-39, 2006.
- BALAT, M.; BALAT, H. Progress in biodiesel processing. *Applied Energy*, v. 87, n. 6, p. 1815–1835, 2010.
- BANNI, M.; BOURAOU, Z.; GHEDIRA, J.; CLERANDEAU, C.; GUERBEJ, H.; NARBONNE, J.F.; BOUSSETTA, H. Acute effects of benzo[a]pyrene damage on sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, p. 293–299, 2009.

- BAUMANN, P. C. Epizootics of cancer in fish associated with genotoxins in sediment and water. *Mutation Research*, v. 411, n. 3, p. 227–33, 1998.
- BENTO, D.M. *Análise Química da degradação de hidrocarbonetos de óleo diesel no Estuário da Lagoa dos Patos-Rio Grande do Sul*. Dissertação (Mestrado Oceanografia Física, Química e Geológica) - Departamento de Geociência – Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, Rio Grande do Sul, 112p, Março 2005.
- BEUTLER, E. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. New York: Grune & Stratton, 1975.
- BINELLI, A.; RIVA, C.; COGNI, D.; PROVINI, A. Assessment of the genotoxic potential of benzo(a)pyrene and pp-dichlorodiphenyl dichloroethylene in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), *Mutation Research: Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis*, v.649, p. 135–145, 2008.
- BONACCI, S. et al. Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colberki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, v. 49, p. 445- 455, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–54, 1976.
- BURKE, M.; MAYER, R. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal Odealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 2, n. 6, p. 583, 1974.
- CAIRNS, J.J.R.; PRATT, J.R. A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D. M.; RESH, V.H. *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. Chapman & Hall, 1993.
- CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, v. 247, p. 295-311, 2000.
- CARDONE, M.; PRATI, M.V.; ROCCO, V.; SEGGIANI, M.; SENATORE, A.; VITOLO, S. *Brassica carinata* as an alternative oil crop for the production of biodiesel in Italy: engine performance and regulated and unregulated exhaust emissions. *Environmental Science and Technology*, v.36, p.4656–4662. 2002.
- CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MAYERS, M.S. Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects, *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, v. 47, p. 2123-2136, 1990.
- CONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra. p. 173-200, 2003.

- CORMAK, D.H. (Ed.), *Hams Histologia*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. pp. 5-35, 1991.
- COSSU, C. et al. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 38, n. 2, p. 122–31, 1997.
- CRUZ, A. L.; PEDRETTI, A. C. E.; FERNANDES, M. N. Stereological estimation of the surface area and oxygen diffusing capacity of the respiratory stomach of the air-breathing armored catfish *Pterygoplichthys anisitsi* (teleostei: Loricariidae). *Journal of Morphology*, v. 270, n. 5, p. 601–614, 2009.
- DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental, In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, p. 167-178, 2003.
- DERELANKO, M.J.; HOLLINGER, M.A. *Handbook of Toxicology*. 2ªed. EUA: Updated and expanded ed. p. 1380, 2001.
- DI GIULIO, R.T.; WASHBURN, P.C.; WENNING, R.J.; WINSTON, G.W.; JEWELL, C.S. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 8, p. 1103-1123, 1989.
- EGITO, L.C.M.; MEDEIROS, M.G.; MEDEIROS, S.R.B.; AGNEZ-LIMA, L.F. Cytotoxic and genotoxic potencial os surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 30, p. 425-441, 2007.
- ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology*, v. 7, p. 88-95, 1961.
- EVANS, .J. Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations, in: D. Scott, B.A. Bridges, F.H. Sobels (Eds.), *Progress in Genetic Toxicology*, Elsevier North Holland Biomedical Press, p. 57–74, 1977.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique, *Mutation Research* v. 455, p. 81- 95, 2000.
- FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, v.534, p. 65-75, 2003.
- FREIRE, M.M.; SANTOS, V.G.; GINUINO, I.S.F.; ARIAS, A.R.L. Biomarcadores na Avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, v.12 p.347-354, 2008.
- FRENZILLI, G.; BOSCO, E.; BARALE, R. Validation of single gell assay in human leukocytes with 18 reference compounds. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 35, p. 206-221, 2000.

- GALANI, F.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, C.; GIOVANARDI, F.; ROMANELLI, G.; CAIXACH, J.; CENTO, A.; SCARPATO, A.; BENBRAHIM, S.; MESSAOUDI, J.; DEUDERO, S.; BOULAHID, M.; BENEDICTO, J.; ANDRAL, B. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Western basin of the Mediterranean Sea. *Environmental Monitoring Assessment*, v. 172, p. 301-317, 2011.
- GESTEL, C. A. M.; BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, v. 5, n. 4, p. 217-225, 1996.
- GOLD-BOUCHOT, G. et al. Biomarkers and pollutants in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, in four lakes from San Miguel, Chiapas, Mexico. *International Journal of Environmental and Pollution*, v. 26, n. 1, p. 129-141, 2006.
- GOMES, T.; PEREIRA, C.G.; CARDOSO, C.; PINHEIRO, J.P.; CANCIO, I; BEBIANO, M.J. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, v. 118-119, p. 72-79, 2012.
- GRANT, W.F.. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutation – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation Research*, v. 426, p. 107-112, 1999.
- HAAS, M.J., MCALOON, A.J., YEE, W.C., FOGLIA, T.A. A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresour Technol*, v. 97, p. 671-678, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press, 936 p. 2005.
- HAMOUTEN, D. et al. Use of the Comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, v. 54, n. 3-5, p. 471-4, 2002.
- HEGAZI, M.M.; ATTIA, Z.I.; ASHOUR, O.A. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. *Aquatic Toxicology*, v. 99, p. 118-125, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. V. 92 Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. Lyon, France, 2010.
- IPIntergovernmental Panel of Climate Change. WMO/UNEP/ IPCC. 4th Assessment Report. AR4 Synthesis Report. World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland, p 52, 2007.
- JHA, A. N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research*, v. 552, n. 1-2, p. 1-17, 2004.

- JIFA, W.; ZHIMING, Y.; XIUXIAN, S.; YOU, W. Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicas*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 65, p. 230–236, 2006.
- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 251, n. 20, p. 6183–8, 1976.
- KHAN, N.; WARITH, M. A.; LUK, G. A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel lends, and diesel on aquatic organisms. *Journal of the Air & Waste Management Association*, v.57, n. 3, p. 286-96, 2007.
- KLAASSEN, C.D. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 6th. McGraw-Hill Professional. 2001.
- KLIGERMAN, A.D. Fishes as biological detectors of the effects genotoxic agents. In: J.A. Heddle (ed). *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*, Academic Press, p. 435-456, 1982.
- KLOBUCAR, G.I.V.; PAVLICA, M.; ERBEN, R.; PAPES, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments, *Aquatic Toxicology*, v.64, p. 15-23, 2003.
- KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAMA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T.. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gel electrophoresis. *MMS Comm.* v. 3 p. 103-115, 1995.
- KOPECKA-PILARCZYK, J.; CORREIA, A. D. Biochemical response in gilthead seabream *Sparus aurata* to in vivo exposure to a mix of selected PAHs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 4, p. 1296–302, 2009.
- KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, K. The “comet” assay for detection of potential genotoxicity of polluted water, *Folia biologica*, v. 45, p. 153-156, 1997.
- KUSHWAHA, S.; VIKRAM, A.; TRIVEDI, P.P.; JENA, G.B. Alkaline, Endo III and FPG modified comet assay as biomarkers for the detection of oxidative DNA damage in rats with experimentally induced diabetes. *Mutation Research*, v. 726, p. 242-250, 2011.
- LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*, v. 46, p.182-186, 2003.
- LEE, S. W.; HERAGE, T.; YOUNG, B. Emission reduction potential from the combustion of soy methyl ester fuel blended with petroleum distillate fuel. *Fuel*, v. 83, p. 1607–1613, 2004.
- 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 carter oil, palm oil, and waste cooking oil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 30, n. 4, p. 893-897, 2011.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation Research*, v. 682, p.71–81, 2009.

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 fraction of biodiesel and its diesel blends using the *Salmonella* assay and the *in vitro* MicroFlow[®] kit (Litron) assay. *Chemosphere*, v.86, p. 512-520, 2012.

LEMOS, N.G.; DIAS, A.L.; SILVA-SOUZA, A.T.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.19, p.197-201, 2005.

LIMA, D. *Estudo do efeito de metais em esterases de zebrafish (Danio rerio)*. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química Ambiental – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 50p, 2011.

LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radical Biology & Medicine*, v.42, p. 1465-1469, 2007.

LIU, S.Q. et al. Characterisation of esterases of *Streptococcus thermophilus* ST1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B1079 as alcohol acyltransferases. *International Dairy Journal*, v.14, p.865–870, 2004.

MAcNAMEE, J.P.; MCLEAN, J.R.N.; FERRAROTTO, C.L.; BELLIER, P.V. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 466, p. 63-69, 2000.

MARIA, V.L.; BEBIANO, M.J. Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo(a)pyrene and copper. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v.154 p. 56-63, 2011.

MARNETT, L. J. Oxyl radicals and dna damage. *Carcinogenesis*, v. 21, n. 3, p. 361–70, 2000.

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.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: A bacia do rio Tibagi, cap. 29, p. 551-557, 2002.

MARTINS, L.D.; JÚNIOR, C.R.S.; SOLCI, M.C.; PINTO, J.P.; SOUZA, D.Z.; VASCONCELLOS, P.; GUARUEURO, A.L.N.; GUARIEIRO, L.L.N.; SOUSA, E.T.; ANDRADE, J.B. Particle emission from heavy-duty engine fuelled with blended diesel and biodiesel. *Environmental Monitorin Assessment*, 2011.

- MASCHIO, L.R. *Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do Rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto/SP*. 2009. 208p. Tese (Doutorado em Genética) – Departamento de Biologia – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.
- MATHER-MIHAICH, E.; DI GIULIO, R.T. Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached kraft mill effluent. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 20, p. 391-397, 1991.
- MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips, *Genetic and Molecular Biology*, v. 29, p.148-158, 2006.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 244, n. 22, p. 6049–55, 1969.
- MEYER, D.J.; COLES, B.; PEMBLE, S.E.; GILMORE, K.S.; FRASER, G.M.; KETTERER, B. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochemical Journal*, v. 274, p. 409-414, 1991.
- MIAO, Y.; HE, N.; ZHU, J.J. History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition. *Chemical Reviews*, v. 110, p. 5216–5234, 2010.
- MICHEL, C.; VINCENT-HUBERT, F. Detection of 8-oxodG in *Dreissena polymorpha* gill cells exposed to model contaminants. *Mutation Research*, v. 741, p. 1-6, 2012.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. B5 passa a ser obrigatório a partir de primeiro de janeiro. 2010. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/mme/noticias/destaque3/destaque_-0081.html>. Acesso em: 10 jan. 2012.
- MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, *Mutation Research*, v. 399, p. 135-147, 1998.
- MUDGE, S.M.; PEREIRA, G. Stimulating the biodegradation of crude oil with biodiesel preliminary results. *Spill Science e Technology Bulletin*, v. 5, p. 353-355, 1999.
- NACCI, D.E.; CAYULA, S.; JACKMIN, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay, *Aquatic Toxicology*, v. 35, p. 197-210, 1996.
- NAKANO, T.M.D.; OKA, K.M.D. Transition of Ki-67 index of uterine cervical tumors during radiation therapy, *Cancer*, v. 68, p. 517-523, 1991.
- NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L.; DA CRUZ, A.C.; SANTOS, J.M.; BARROS, D.A.; VERAS, T.F.; ALVAREZ, H.M.; NASCIMENTO, M.A. Is biodiesel

an eco-compatible fuel? Toxicity estimation to organisms of different trophic levels. In Newbury H, De Lorne W, eds, *Industrial Pollution Including Oil*. Nova Science, New York, NY, USA, p 61–90. 2009.

NOGUEIRA, L. *Estudo comparativo do estresse oxidativo entre tilápias (Oreochromis niloticus) e cascudo (Pterygoplichthys anisitsi) expostos a óleo diesel e biodiesel*. 2010, 54p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Departamento de Química Ambiental – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 2010.

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*, v.85, p. 97-105, 2011.

NORDBERG, J.; ARNER, E. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, v. 74, p.39, 1987.

NUNES, B. The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 212, p. 29-59, 2011.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular Distribution of Superoxide Dismutase (SOD) in Rat Liver. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 42, p. 38388-38393, 2001.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando, v. 123, p. 291-298, 1984.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla L.* to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 49, n. 1, p. 64–75, 2001.

PATHIRATNE, A.; CHANDRASEKERA, L.W. H. U.; PATHIRATNE, K. A. S. Use of biomarkers in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to assess the impacts of pollution in Bolgoda Lake, an urban water body in Sri Lanka. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 156, n. 1-4, p. 361–75, 2009.

PEREIRA, S.A.; ARAÚJO, V.Q.; REBOUCAS, M.V.; VIEIRA, F.S.V.; ALMEIDA, M.V.A.; CHINALIA, F.A.; NASCIMENTO, I.A. Toxicity of biodiesel, diesel and biodiesel/diesel blends: comparative sub-lethal effects of water-soluble fractions to microalgae species. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, v.88, p. 234-238, 2012.

PETROBRAS. **Óleo Combustível – Petrobrás Distribuidora.**
<http://www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/produtos/paraindustriasetermetricas/>

oleocombustivel/!ut/p/c5/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hLf0N_P293QwP3YE9nAyNTD5egIEcnQwt3I6B8JE55AydjknT7-3u6AuUNXF09jM2Bygnp9vPIz03Vj9SPMkdSFRAANMPHz8fXwtsQaKSxfmROanpicqV-QW5oRHm-oyIAReXI8A!!/dl3/d3/L0lJSklna2shL0lCakFBRXIBQkVSQ0IBISEvWUZOQzFOS18yN3chLzdfOU8xT05LRzEwR1BQRTAyTE5MTThLMTEwTzM!/?PC_7_9O1ONKG10GPPE02LNLM8K110O3000000_WCM_CONTEXT=/wps/wcm/connect/portal+de+conteudo/produtos/automotivos/oleo+diesel/caracteristica+do+oleo. Acessado em 28 julho de 2012.

- PRIETO, A.L.; PICHARDO, S.; JOS, Á.; MORENO, I.; CAMEÁN, A.M. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions *Aquat. Toxicology*, 84, p. 337–345, 2007.
- RAKOPOULOS, D.C. Heat release analysis of combustion in heavy-duty turbocharged diesel engine operating on blends of diesel fuel with cottonseed or sunflower oils and their bio-diesel. *Fuel*, v. 96, p.524-534, 2012.
- ROMÉO, M.; GNASSIA-BARELLI, M. Metal distribution in different tissues and in subcellular fractions of the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, copper, or zinc. *Comparative Biochemistry Physiology-Part C: Toxicology and Pharmacology*, v. 111, p. 457–463, 1995.
- RUDNEVA-TITOVA, I.I.; ZHERKO, N.V. Effects of polychlorinated biphenyls on the activity of anti-oxidant enzymes and lipid peroxidation in muscle and liver of two Black Sea fish species. *Biochemistry (Moscow)*, v. 59, p. 25-31, 1994.
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste de micronúcleo em células humanas *in vitro*. . In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, p. 201-220, 2003.
- SARASQUETE, C.; SEGNER, H. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of studies. *Science of the Total Environmental*, v. 247, n. 2-3, p. 313–32, 2000.
- SASAKI, Y.F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted seawater using shellfish and alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study, *Mutation Research*, v. 393, p. 133-139, 1997.
- SIES, H. et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Letters*, v. 103, n. 2, p. 287–90, 1979.
- SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, v. 76, n. 3, p. 505–11, 2006.

- SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 69, n. 1, p. 112–20, 2008.
- SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHEIDER, E. L. A. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.
- SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. 4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás-PDPETRO, Campinas, p. 1-10, 2007.
- STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; RICHARD, T.D.G.; 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: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, p. 235-335, 1992.
- STRANGE, R.C.; SPITERI, M.A.; RAMACHANDRAN, S.; FRYER, A.A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research*, v. 482, p. 21-26, 2001.
- TAYLOR, L.T.; JONES, D.M. Bioremediation of coal tar PHA in soil using biodiesel. *Chemosphere*, v. 44, p. 1131-1136, 2001.
- THOMPSON, E.D.; BURWINKEL, K.E.; CHAVA, A.K.; NOTCH, E.G.; MAYER, G.D. Activity of Phase I and Phase II enzymes of the benzo[a]pyrene transformation pathway in zebrafish (*Danio rerio*) following waterborne exposure to arsenite. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 152, p. 371-378, 2010.
- TRÍDICO, C. P. et al. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo [a] pyrene and diazinon. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 73, n. 5, p. 858–863, 2010.
- UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima, p. 327-344, 2003.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.
- VARANASI, U. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, p. 341, 1989.
- VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichilidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 90, p. 42-51, 2008.

- VIOQUE-FERNÁNDEZ, A.; ALMEIDA, E.A.; LÓPEZ-BAREA, J. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 145, p. 404-412, 2007.
- WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. Principles of ecotoxicology. *London, Taylor & Francis*, p. 321, 1996.
- WHEELOCK, C.E. et al. Applications of Carboxylesterase Activity in Environmental Monitoring and Toxicity Identification Evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria 155*, World Health Organization, Geneva, 1993.
- WHYTE, J. J. et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 30, n. 4, p. 347–570, 2000.
- World Bank Group. Annual Review of Development Effectiveness. Washington, DC. 2004.
- ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.) *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima, 2006.
- ZHANG, J. F. et al. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 58, n. 1, p. 110–6, 2004.
- ZIZEK, S. et al. Bioaccumulation of mercury in benthic communities of a river ecosystem affected by mercury mining. *Science of the Total Environment*, v. 377, n. 2-3, p. 407–415, 2007.

Apêndice 1: Tabela com o valor do pH medido no experimento de exposição durante 15 dias.

Tabela 1. Valor do pH medido todos os dias durante o experimento de 15 dias

Tratamento	Peixe	DIAS														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CONTROLE	1	7,41	7,66	7,74	7,63	7,83	7,63	7,83	8,01	7,95	7,92	7,84	7,93	8,02	8,16	8,07
	2	7,21	8,02	8,01	8,1	8,09	7,92	8,1	8,18	8,13	8,09	8,04	8,14	8,18	8,26	8,16
	3	7,21	8,32	8,36	8,26	8,3	8,23	8,33	8,39	8,25	8,29	8,22	8,37	8,45	8,52	8,46
	4	7,13	8,31	8,35	8,24	8,43	8,12	8,3	8,31	8,21	8,2	8,14	8,22	8,26	8,37	8,31
	5	7,22	8,37	8,41	8,28	8,38	8,49	8,59	8,6	8,42	8,51	8,28	8,42	8,47	8,53	8,5
	6	7,1	7,98	8,1	8,03	8,06	7,95	8,15	8,23	8,11	8,13	8,11	8,17	8,25	8,32	8,3
	7	6,95	7,87	8,02	8,05	7,87	8,84	7,8	7,7	7,48	7,52	8,09	8,18	8,26	8,3	8,3
	8	7,6	7,71	7,63	7,53	7,47	8,37	8,38	8,41	8,34	8,41	7,27	7,17	7,89	8,29	8,31
	9	6,95	8,06	8,19	8,12	7,93	8,14	8,23	8,24	8,1	8,19	8,2	8,27	8,29	8,31	8,28
	10	6,95	7,94	7,94	7,7	7,43	7,5	7,66	7,73	7,67	7,65	7,83	8,03	7,92	7,85	7,98
B100a	11	6,99	8,22	8,42	8,38	8,29	8,14	8,19	8,23	8,19	8,23	8,27	8,38	8,25	8,32	8,37
	12	7	8,1	8,31	8,28	8,04	8,3	8,21	8,27	8,16	8,25	8,02	8,05	7,95	7,83	7,89
	13	6,91	7,5	7,82	7,66	7,44	8,35	8,4	8,4	8,3	8,37	8,24	8,17	8,15	8,16	8,18
	14	6,92	7,14	7,57	8,44	8,37	8,57	8,58	8,59	8,48	8,51	8,54	8,5	8,51	8,49	8,53
	15	6,93	7	7,82	7,83	7,78	8,45	8,41	8,48	8,38	8,45	8,51	8,47	8,46	8,47	8,51
	16	6,99	8,24	8,1	8,09	7,9	8,12	8,16	8,15	8,06	8,13	7,89	7,87	8,14	8,27	8,34
B100b	17	6,85	7,94	8	8,09	7,93	7,59	7,81	7,83	7,76	7,74	8,12	7,99	8	8,03	8
	18	6,82	8,12	8,28	8,25	8,21	8,17	8,2	8,19	8,12	8,19	8,58	8,29	8,29	8,28	8,3
	19	7,01	7,99	7,98	8,1	8,34	8,38	8,32	8,28	8,15	8,17	8,4	8,41	8,42	8,44	8,49
	20	7,05	8,38	8,53	8,44	8,33	8,37	8,48	8,52	8,45	8,5	8,48	8,42	8,41	8,42	8,49
B20a	21	7,07	8,19	8,26	8,1	7,58	8,49	8,48	8,46	8,36	8,31	8,57	8,53	8,5	8,51	8,59
	22	6,92	8,3	8,25	8,36	8,32	8,51	8,45	8,44	8,32	8,32	8,5	8,46	8,44	8,42	8,48

23	6,96	8,27	8,54	8,34	8,25	8,51	8,44	8,47	8,28	8,18	8,52	8,48	8,5	8,45	8,51
24	6,93	8,34	8,5	8,38	8,16	7,57	7,6	8,1	7,92	7,82	8,4	8,33	8,35	8,34	8,35
25	7,07	8,07	8,17	8,21	8,09	8,44	8,11	8,07	7,96	8,06	8,45	8,39	8,41	8,42	8,48
26	7,06	7,49	7,75	8,12	8,03	7,8	8,28	8,26	8,16	8,28	8,38	8,28	8,26	8,27	8,31
27	7,05	8,25	8,3	8,27	8,17	7,58	7,97	7,96	7,88	7,97	8,18	8,13	8,15	8,12	8,17
28	7,21	8,06	8,17	8,16	8,11	8,5	8,48	8,49	8,41	8,5	8,29	8,2	8,23	8,22	8,29
29	7,13	8,1	8,12	8,08	7,82	7,9	8,23	8,19	8,07	8,18	8,41	8,31	8,3	8,31	8,36
30	6,97	7,1	7,3	8,39	8,32	8,03	7,73	7,6	7,42	7,62	8,47	8,4	8,3	8,25	8,37
31	6,96	8,12	8,2	8,21	7,78	8,21	8,36	8,34	8,19	8,3	8,22	8,09	8,1	7,94	8,04
32	7,05	7,97	7,36	7,99	7,75	7,87	8,04	8,04	7,97	8,04	8,08	7,84	7,88	8	8,05
33	6,93	7,34	7,33	7,39	7,83	8,14	8,22	8,2	8,06	8,13	8,17	8,04	8,11	8,21	8,31
34	6,85	8,1	8,17	8,11	8	7,94	7,99	8,03	7,96	8,02	7,91	7,74	7,64	7,58	7,63
35	6,96	8	7,95	7,98	7,87	7,83	8,01	8,02	7,94	8,02	8,5	8,43	8,39	8,32	8,39
36	7,07	8,13	8,25	8,22	8,17	8,37	8,42	8,41	8,32	8,33	8,2	8,08	8	8,05	8,1
37	6,84	8,12	8,2	8,17	8,22	8,19	8,4	8,43	8,38	8,5	8,28	8,13	8,14	8,15	8,2
38	7,01	8,14	8,25	8,28	8,3	8,31	8,45	8,49	8,46	8,52	8,46	8,42	8,5	8,44	8,46
39	7,05	8,38	8,49	8,44	8,4	8,59	8,56	8,58	8,47	8,51	8,57	8,51	8,49	8,52	8,55
40	6,93	8,39	8,46	8,4	8,35	8,57	8,55	8,56	8,51	8,56	8,52	8,41	8,5	8,43	8,5
41	7,03	8,37	8,37	8,32	8,26	8,57	8,56	8,56	8,51	8,54	8,57	8,51	8,48	8,47	8,48
42	7,06	7,21	8,49	8,41	8,37	8,41	8,44	8,46	8,41	8,43	8,59	8,5	8,47	8,41	8,42

Apêndice 2: Tabela com o valor do pH medido no experimento de exposição durante 30 dias

Tabela 2. Valor do pH medido todos os dias durante o experimento de 30 dias

Tratamento	Peixes	Dias														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	1	8,41	8,40	8,47	8,50	8,60	8,87	8,88	8,83	8,85	8,22	8,62	8,63	8,90	8,67	8,60
	2	8,22	8,30	8,32	8,33	8,45	8,65	8,65	8,61	8,66	8,42	8,31	8,41	8,65	8,50	8,60
	3	8,60	8,70	8,71	8,75	8,80	8,74	8,75	8,73	8,70	8,60	8,57	8,62	8,81	8,69	8,80
	4	8,50	8,55	8,57	8,60	8,70	8,56	8,55	8,62	8,60	8,50	8,41	8,45	8,65	8,58	8,80
	5	7,96	8,10	8,13	8,20	8,22	8,37	8,37	8,36	8,36	8,01	8,11	8,40	8,33	8,33	8,70
	6	8,57	8,62	8,63	8,65	8,68	8,59	8,60	8,61	8,60	8,52	8,61	8,63	8,64	8,60	8,48
	7	7,51	7,68	8,01	8,10	8,20	8,30	8,32	8,22	8,30	7,51	7,69	8,72	8,65	8,23	8,56
	8	8,31	8,45	8,52	8,58	8,60	8,49	8,50	8,52	8,50	8,31	8,32	8,41	8,58	8,51	8,65
	9	8,43	8,52	8,53	8,55	8,56	8,25	8,26	8,46	8,47	8,43	8,45	8,47	8,52	8,49	8,52
	10	8,46	8,47	8,47	8,49	8,50	8,60	8,63	8,64	8,65	8,57	8,61	8,63	8,67	8,59	8,56
	11	8,42	8,43	8,45	8,50	8,55	8,55	8,55	8,56	8,50	8,42	8,45	8,51	8,60	8,51	8,42
	12	8,55	8,57	8,62	8,66	8,69	8,60	8,60	8,60	8,62	8,55	8,56	8,57	8,66	8,61	8,52
	13	8,30	8,42	8,44	8,47	8,50	8,33	8,34	8,50	8,50	8,55	8,56	8,62	8,35	8,48	8,48
	14	8,45	8,46	8,51	8,58	8,60	8,38	8,39	8,62	8,60	8,45	8,48	8,54	8,59	8,54	8,42
	15	8,57	8,62	8,61	8,62	8,66	8,55	8,60	8,69	8,70	8,62	8,63	8,64	8,65	8,63	8,65
	16	8,32	8,41	8,42	8,42	8,48	8,30	8,32	8,33	8,35	8,31	8,42	8,51	8,66	8,43	8,24
	17	7,50	7,58	7,61	8,62	8,63	8,24	8,26	7,43	8,44	7,92	8,01	8,09	8,65	8,21	8,54
	18	8,06	8,11	8,12	8,20	8,22	8,40	8,44	8,48	8,39	8,06	8,12	8,14	8,62	8,35	8,42
	19	8,55	8,57	8,59	8,60	8,65	8,45	8,46	8,68	8,70	8,55	8,66	8,71	8,71	8,62	8,48
	20	7,62	7,68	7,69	7,70	7,77	8,54	8,54	8,70	8,65	7,62	8,02	8,12	8,73	8,22	8,57
	21	8,12	8,15	8,21	8,22	8,25	8,34	8,34	8,50	8,55	8,12	8,14	8,21	8,45	8,37	8,57
	22	8,57	8,61	8,62	8,65	8,66	8,58	8,60	8,69	8,70	8,57	8,62	8,65	8,63	8,61	8,48
	23	8,44	8,45	8,47	8,50	8,52	8,57	8,60	8,65	8,66	8,54	8,61	8,69	8,60	8,55	8,42
	24	8,03	8,05	8,10	8,14	8,18	8,46	8,50	8,49	8,50	8,43	8,47	8,58	8,68	8,40	8,57

25	8,34	8,36	8,38	8,40	8,45	8,35	8,36	8,51	8,55	8,67	8,71	8,84	8,57	8,51	8,72
26	8,67	8,68	8,69	8,70	8,72	8,72	8,73	8,42	8,30	8,34	8,32	8,44	8,73	8,58	8,65
27	8,62	8,63	8,62	8,64	8,68	8,50	8,52	8,61	8,65	8,62	8,63	8,72	8,64	8,62	8,43
28	8,53	8,54	8,55	8,58	8,68	8,50	8,52	8,59	8,60	8,56	8,57	8,61	8,59	8,56	8,52
29	8,54	8,55	8,56	8,58	8,60	8,44	8,55	8,61	8,65	8,54	8,55	8,59	8,64	8,58	8,52
30	8,34	8,36	8,33	8,38	8,48	7,91	8,15	8,59	8,60	8,31	8,32	8,33	8,57	8,42	8,43
31	8,51	8,54	8,57	8,60	8,65	8,19	8,22	8,53	8,58	8,51	8,55	8,58	8,40	8,51	8,06
32	8,56	8,62	8,66	8,68	8,70	8,05	8,15	8,48	8,57	8,56	8,58	8,63	8,60	8,52	7,77
33	8,57	8,58	8,59	8,60	8,65	8,53	8,54	8,57	8,62	8,54	8,55	8,57	8,59	8,60	8,57
34	8,61	8,64	8,65	8,66	8,69	8,57	8,58	8,60	8,63	8,61	8,61	8,47	8,35	8,58	8,24
35	8,54	8,52	8,57	8,60	8,65	8,44	8,45	8,46	8,50	8,54	8,53	8,55	8,65	8,53	7,77
36	8,58	8,59	8,62	8,65	8,66	8,64	8,63	8,61	8,62	8,58	8,58	8,58	8,58	8,62	8,72
37	8,30	8,42	8,48	8,50	8,52	8,30	8,30	8,31	8,36	8,24	8,28	8,45	8,68	8,42	8,58
38	8,43	8,44	8,51	8,54	8,55	8,41	8,40	8,41	8,48	8,43	8,43	8,46	8,62	8,48	8,43
39	8,63	8,62	8,64	8,66	8,68	8,67	8,67	8,65	8,70	8,63	8,65	8,66	8,67	8,47	8,43
40	8,58	8,61	8,63	8,65	8,66	8,70	8,69	8,67	8,72	8,59	8,62	8,62	8,68	8,62	8,56
41	8,55	8,57	8,60	8,62	8,63	8,44	8,48	8,63	8,65	8,56	8,58	8,62	8,64	8,58	8,56
42	8,56	8,57	8,60	8,63	8,63	8,58	8,60	8,62	8,65	8,55	8,59	8,60	8,62	8,58	8,06

Tabela 2. Valor do pH medido todos os dias durante o experimento de 30 dias

Tratamento	Peixes	Dias																												
		16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30														
1		8,82	8,71	8,62	8,66	8,66	8,85	8,80	8,82	8,79	8,67	8,72	8,82	8,69	8,68	8,63														
2		8,62	8,63	8,65	8,52	8,51	8,63	8,62	8,72	8,65	8,53	8,63	8,72	8,52	8,53	8,55														
3		8,69	8,68	8,66	8,70	8,70	8,72	8,70	8,69	8,68	8,70	8,70	8,69	8,71	8,70	8,60														
4		8,61	8,60	8,62	8,59	8,59	8,65	8,63	8,65	8,63	8,59	8,39	8,65	8,60	8,60	8,62														
5		8,67	8,41	8,45	8,35	8,35	8,72	8,73	8,65	8,64	8,38	8,42	8,65	8,36	8,39	8,58														
6		8,56	8,57	8,58	8,59	8,60	8,74	8,75	8,72	8,70	8,60	8,61	8,72	8,60	8,61	8,25														
7		8,58	8,31	8,36	8,25	8,24	8,65	8,65	8,73	8,70	8,28	8,32	8,73	8,27	8,30	8,62														
8		8,59	8,55	8,58	8,52	8,52	8,64	8,63	8,72	8,70	8,53	8,55	8,72	8,54	8,54	8,57														

9	8,55	8,53	8,54	8,50	8,50	8,60	8,61	8,68	8,69	8,51	8,54	8,68	8,51	8,52	8,66
10	8,58	8,58	8,60	8,58	8,58	8,66	8,66	8,69	8,67	8,59	8,63	8,69	8,58	8,59	8,64
11	8,54	8,52	8,55	8,51	8,51	8,59	8,64	8,56	8,55	8,52	8,56	8,56	8,53	8,52	8,56
12	8,55	8,57	8,57	8,60	8,60	8,63	8,64	8,65	8,63	8,60	8,61	8,65	8,61	8,60	8,61
13	8,58	8,54	8,55	8,49	8,48	8,67	8,68	8,50	8,51	8,49	8,57	8,50	8,46	8,50	8,57
14	8,56	8,51	8,53	8,53	8,53	8,69	8,69	8,66	8,67	8,54	8,55	8,66	8,54	8,54	8,53
15	8,64	8,62	8,61	8,63	8,63	8,67	8,62	8,62	8,63	8,63	8,63	8,62	8,62	8,63	8,61
16	8,55	8,53	8,54	8,43	8,43	8,58	8,69	8,44	8,47	8,44	8,50	8,44	8,45	8,45	8,56
17	8,58	8,34	8,38	8,23	8,22	8,65	8,66	8,62	8,60	8,27	8,32	8,62	8,23	8,28	8,63
18	8,54	8,42	8,45	8,36	8,35	8,59	8,60	8,66	8,65	8,38	8,38	8,66	8,40	8,39	8,70
19	8,67	8,63	8,67	8,61	8,61	8,74	8,72	8,62	8,63	8,62	8,62	8,62	8,60	8,62	8,56
20	8,66	8,57	8,60	8,27	8,24	8,73	8,74	8,71	8,70	8,31	8,32	8,71	8,26		
21	8,63	8,62	8,63	8,40	8,38	8,65	8,66	8,66	8,64	8,42	8,44	8,66	8,40	8,43	8,64
22	8,62	8,58	8,60	8,60	8,60	8,62	8,63	8,36	8,37	8,59	8,44	8,36	8,60		
23	8,51	8,42	8,44	8,53	8,54	8,67	8,68	8,35	8,34	8,53	8,35	8,35	8,53		
24	8,63	8,66	8,68	8,44	8,41	8,62	8,63	8,63	8,63	8,45	8,53	8,63	8,38		
25	8,60	8,63	8,67	8,53	8,52	8,74	8,74	8,50	8,51	8,54	8,52	8,50	8,45	8,54	8,35
26	8,64	8,65	8,66	8,59	8,58	8,76	8,76								
27	8,56	8,58	8,60	8,61	8,61	8,66	8,66	8,67	8,66	8,62	8,64	8,67	8,61	8,62	8,63
28	8,52	8,55	8,60	8,56	8,56	8,47	8,50	8,48	8,50	8,55	8,51	8,48	8,55	8,55	8,59
29	8,59	8,61	8,59	8,58	8,58	8,62	8,63	8,59	8,60	8,58	8,58	8,59	8,58	8,58	8,71
30	8,39	8,42	8,44	8,42	8,42	8,70	8,71	8,67	8,63	8,44	8,53	8,67	8,43	8,45	8,68
31	8,37	8,37	8,40	8,48	8,48	8,61	8,62	8,64	8,62	8,49	8,57	8,64	8,49	8,49	8,58
32	8,10	8,12	8,22	8,45	8,48	8,68	8,68	8,64	8,65	8,47	8,55	8,64	8,50	8,48	8,57
33	8,61	8,62	8,65	8,60	8,59	8,69	8,71	8,66	8,67	8,60	8,62	8,66	8,60	8,61	8,66
34	8,47	8,48	8,50	8,56	8,57	8,49	8,52	8,57	8,58	8,56	8,56	8,57	8,58	8,56	8,70
35	8,12	8,11	8,13	8,46	8,49	8,59	8,60	8,55	8,52	8,47	8,51	8,55	8,53	8,47	8,71
36	8,59	8,58	8,59	8,62	8,62	8,67	8,63	8,66	8,65	8,62	8,63	8,66	8,63	8,62	8,66
37	8,55	8,57	8,58	8,44	8,42	8,48	8,50	8,29	8,32	8,43	8,40	8,29	8,44	8,43	8,58
38	8,50	8,52	8,53	8,48	8,47	8,42	8,43	8,46	8,47	8,47	8,47	8,46	8,48	8,47	8,58
39	8,58	8,57	8,60	8,61	8,62	8,67	8,67	8,62	8,59	8,62	8,61	8,62	8,41	8,62	8,63

40	8,63	8,64	8,63	8,62	8,62	8,36	8,38	8,55	8,57	8,61	8,58	8,55	8,61	8,60	8,57
41	8,57	8,57	8,58	8,58	8,62	8,60	8,55	8,52	8,58	8,58	8,55	8,55	8,57	8,58	8,53
42	8,51	8,51	8,53	8,55	8,58	8,60	8,37	8,48	8,54	8,54	8,51	8,37	8,57	8,54	

Apêndice 3: Tabela com os valores da concentração de amônia medias no experimento de exposição durante 15 dias

Tabela 3. Concentração de amônia presente na água de cada aquário, medidas no início da exposição e a cada troca de água no decorrer do experimento de 15 dias.

Tratamento	Peixes	Início	1ª troca	2ª troca	3ª troca
		Concent.	Concent.	Concent.	Concent.
CONTROLE	1	1,402885	3,016132	11,88672	1,453098
	2	1,509722	2,86656	11,21297	1,169979
	3	1,338782	2,364423	5,65449	1,395406
	4	1,338782	2,513996	7,759975	1,611218
	5	1,328098	2,075962	4,391199	1,470192
	6	1,488355	1,915705	3,885883	0,829167
B100a	7	1,296047	1,937073	7,675755	1,199893
	8	1,456303	2,118697	9,191704	1,710577
	9	1,499038	2,246902	10,455	1,971261
	10	1,296047	2,407158	9,78124	1,896474
	11	1,306731	1,70203	5,401832	0,971261
	12	1,424252	2,311004	7,507317	1,74797
B100b	13	1,402885	2,097329	5,570271	0,856944
	14	1,53109	1,947756	4,054322	0,932799
	15	1,413568	2,172115	14,32909	2,058868
	16	1,434936	1,915705	4,559638	1,767201
	17	1,296047	2,236218	9,949679	2,401816
	18	1,231944	2,385791	11,80251	2,007585
B20a	19	1,413568	1,979808	4,643857	1,71485
	20	1,349466	1,894338	5,907148	2,484081
	21	1,36015	1,862286	4,896515	1,675321
	22	1,36015	2,225534	5,991368	2,07062
	23	1,381517	1,755449	7,254658	2,008654
	24	1,317415	1,61656	5,317612	1,660363
B20b	25	1,317415	2,802457	7,254658	1,300321
	26	1,317415	2,353739	6,580903	1,472329
	27	1,392201	2,385791	7,002	2,789637
	28	1,296047	1,274679	7,591536	1,222329
	29	1,317415	2,033226	6,159806	1,378312
	30	1,328098	2,513996	8,181072	1,925321
B5a	31	1,36015	2,546047	4,643857	2,488355
	32	1,338782	2,823825	8,602169	3,363355
	33	1,392201	2,278953	4,728077	1,7875
	34	1,456303	2,802457	8,939046	3,71485
	35	1,338782	2,033226	4,643857	1,989423

	36	1,413568	1,70203	3,970102	1,520406
B5b	37	1,456303	2,449893	10,37078	2,50438
	38	1,306731	2,513996	8,012633	2,130449
	39	1,402885	1,883654	4,391199	1,988355
	40	1,413568	1,830235	5,149174	1,57062
	41	1,349466	1,862286	4,22276	1,681731
	42	1,306731	1,584509	3,801663	1,153953

Apêndice 4: Tabela com os valores da concentração de amônia medias no experimento de exposição durante 30 dias

Tabela 4. Concentração de amônia presente na água de cada aquário, medidas no início da exposição e a cada troca de água no decorrer do experimento de 30 dias.

		Início	1ª troca	2ª troca	3ª troca	4ª troca	5ª troca	Fim
		Concent.	Concent.	Concent.	Concent.	Concent.	Concent.	Concent.
CONTROLE	1	1,402885	1,988355	2,21485	1,677457	1,199893	1,206303	1,135791
	2	1,509722	2,2875	2,533226	0,883654	1,057799	1,167842	1,23515
	3	1,338782	1,739423	2,744765	1,57703	1,221261	1,213782	1,401816
	4	1,338782	2,066346	2,757585	1,822756	1,296047	1,102671	1,417842
	5	1,328098	1,941346	2,653953	1,699893	1,191346	1,308868	1,398611
	6	1,488355	2,152885	2,091987	1,393269	1,348397	0,896474	0,947756
B100a	7	1,296047	1,70844	1,758654	1,259722	1,111218	1,071688	1,397543
	8	1,456303	1,829167	1,71485	1,36015	1,226603	1,365491	1,36015
	9	1,499038	1,384722	1,856944	1,819551	1,075962	1,130449	1,317415
	10	1,296047	1,486218	1,902885	1,174252	1,136859	1,33344	1,114423
	11	1,306731	1,61015	1,777885	1,087714	1,302457	0,996902	1,125107
	12	1,424252	1,518269	1,643269	1,143269	1,013996	1,028953	1,347329
B100b	13	1,402885	1,684936	2,315278	1,691346	0,955235	1,018269	0,87938
	14	1,53109	1,319551	1,953098	1,536432	0,940278	1,173184	1,33985
	15	1,413568	1,742628	1,853739	1,303526	1,152885	1,242628	1,07703
	16	1,434936	1,966987	2,271474	1,659295	1,384722	0,897543	1,035363
	17	1,296047	1,9125	2,066346	1,851603	1,282158	0,884722	1,311004
	18	1,231944	2,447756	2,341987	1,364423	1,237286	0,891132	1,171047
B20a	19	1,413568	1,447756	2,074893	1,134722	1,71485	0,927457	1,660363
	20	1,349466	1,294979	2,062073	1,4125	0,992628	1,388996	
	21	1,36015	2,36015	2,905021	0,925321	1,369765	1,198825	1,988355
	22	1,36015	1,903953	2,368697	0,591987	0,995833	0,989423	
	23	1,381517	1,542842	2,427457	0,71485	1,24156	1,192415	
	24	1,317415	1,917842	2,634722	0,910363	1,390064	1,219124	
B20b	25	1,317415	2,180662	1,766132	0,375107	1,095192	0,82703	1,236218
	26	1,317415	1,624038	1,888996	0,392201	1,085577		
	27	1,392201	1,283226	2,380449	0,526816	0,917842	1,035363	1,432799
	28	1,296047	2,433868	2,934936	0,895406	0,968056	1,733013	1,186004
	29	1,317415	1,323825	2,658226	1,133654	1,383654	1,134722	1,250107
	30	1,328098	1,149679	1,533226	0,273611	1,271474	0,761859	1,566346
B5a	31	1,36015	1,223397	2,137927	0,835577	1,710577	1,020406	1,767201
	32	1,338782	1,25438	2,562073	0,671047	1,240491	1,039637	1,863355
	33	1,392201	1,78109	2,334509	0,638996	1,052457	1,415705	1,829167
	34	1,456303	1,706303	2,304594	0,83344	1,29391	1,024679	1,559936
	35	1,338782	1,58985	1,809936	0,808868	1,256517	1,411432	1,606944
	36	1,413568	1,980876	2,355876	0,791774	1,41891	1,341987	0,867628
B5b	37	1,456303	1,854808	2,510791	1,224466	1,148611	1,151816	1,026816
	38	1,306731	1,892201	1,861218	0,250107	1,612286	1,517201	1,036432

39	1,402885	1,768269	2,368697	0,921047	0,942415	1,476603	1,265064
40	1,413568	1,892201	1,805662	0,637927	0,947756	0,78109	1,096261
41	1,349466	1,400748	1,711645	0,692415	0,94562	1,477671	1,088782
42	1,306731	2,317415	2,561004	0,688141	0,94562	1,238355	

Apêndice 5: Tabela com a atividade enzimática e concentração de MDA em fígado de cascudos expostos por 15 e 30 dias aos contaminantes.

Tabela 5. Atividade enzimática e concentração de MDA em fígado de *Pterygoplichthys anisitsi*.

Período	Tratamento	Concentração (mL L ⁻¹)	Biomarcadores					
			EROD ^A	GST ^B	SOD ^B	CAT ^B	GPx ^B	MDA ^C
15 dias	Controle	-	15.96 ± 4.99 ^{a,c}	0.29 ± 0.08	30.37 ± 10.77	167.31 ± 62.46	0,05 ± 0.02	0.79 ± 0.21 ^{b,c,d}
	B100	0.01	33.55 ± 8.55	0.31 ± 0.06	30.68 ± 2.09	185.16 ± 39.61	0,05 ± 0.02	0.81 ± 0.22 ^{b,c,d}
	B100	0.001	30.27 ± 13.77 ^a	0.28 ± 0.05 ^a	34.95 ± 4.99 ^c	161.53 ± 29.54	0,03 ± 0.04	0.68 ± 0.18 ^{b,c,b}
	B20	0.01	124.99 ± 46.76	0.39 ± 0.04	31.08 ± 8.16	196.25 ± 21.75	0,06 ± 0.01	0.72 ± 0.16 ^{b,c,b}
	B20	0.001	48.75 ± 12.04	0.36 ± 0.03	27.16 ± 4.07	177.74 ± 15.76	0,04 ± 0.02	0.27 ± 0.17
	B5	0.01	95.84 ± 48.99	0.29 ± 0.05	22.27 ± 0.35	150.81 ± 41.80	0,03 ± 0.02	0.19 ± 0.11 ^a
30 dias	Controle	-	0.18 ± 0.27 ^{b,c}	0.06 ± 0.02 ^{c,d}	4.69 ± 2.09	22.90 ± 3.05	0.002 ± 0.001	0.99 ± 0.48 ^{b,c,d}
	B100	0.01	0.13 ± 0.20 ^{b,c}	0.07 ± 0.01 ^{c,d}	3.91 ± 0.83	22.55 ± 3.76	0.003 ± 0.000	1.12 ± 0.13 ^{b,c}
	B100	0.001	0.30 ± 0.39	0.06 ± 0.02 ^c	5.90 ± 1.13 ^d	22.19 ± 4.77	0.004 ± 0.002	0.98 ± 0.18 ^{b,c}
	B20	0.01	1.00 ± 1.65	0.05 ± 0.01	7.31 ± 1.22	20.08 ± 2.57	0.003 ± 0.002	0.87 ± 0.25
	B20	0.001	4.30 ± 4.78	0.04 ± 0.01	5.69 ± 1.13	25.05 ± 6.05	0.001 ± 0.001	0.29 ± 0.17
	B5	0.01	2.87 ± 0.92	0.03 ± 0.01	5.69 ± 2.14	25.47 ± 6.44	0.003 ± 0.001	0.32 ± 0.26
B5	0.001	1.33 ± 0.72	0.03 ± 0.01	4.64 ± 0.93	29.85 ± 4.95	0.003 ± 0.001	0.50 ± 0.16	

Nota: Dados expressos como média ± desvio padrão.

^A Atividade expressa em pmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

^B Atividade expressa em U mg⁻¹ proteína.

^C Concentração expressa em nmol g⁻¹ tecido.

^a Diferença estatisticamente significativa em relação ao B20 0.01 mL/L.

^b Diferença estatisticamente significativa em relação ao B20 0.001 mL/L.

^c Diferença estatisticamente significativa em relação ao B5 0.01 mL/L.

^d Diferença estatisticamente significativa em relação ao B5 0.001 mL/L.

Apêndice 6: Tabela com a atividade enzimática e concentração de MDA em brânquia de cascudos expostos por 15 e 30 dias aos contaminantes.

Tabela 6. Atividade enzimática e concentração de MDA em brânquia de *Pterygoplichthys anistisi*.

Período	Tratamento	Concentração (mL L ⁻¹)	Biomarcadores					
			EROD ^A	GST ^B	SOD ^B	CAT ^B	GPx ^B	MDA ^C
15 dias	Controle	-	22.55 ± 16.39	0.02 ± 0.00	1.69 ± 0.63	0.90 ± 0.27	0.008 ± 0.002	0.56 ± 0.22
	B100	0.01	42.48 ± 22.16	0.02 ± 0.00	0.85 ± 0.13	0.93 ± 0.23	0.010 ± 0.002	0.33 ± 0.06
	B100	0.001	44.90 ± 37.78	0.03 ± 0.00	0.76 ± 0.08 ^{a,c}	0.86 ± 0.23	0.010 ± 0.001	0.26 ± 0.06 ^{a,d}
	B20	0.01	71.58 ± 21.42 ^{a,d}	0.02 ± 0.00	0.84 ± 0.15	0.87 ± 0.18	0.009 ± 0.000	0.27 ± 0.06 ^d
	B20	0.001	30.44 ± 21.58	0.03 ± 0.00	1.16 ± 0.21	0.89 ± 0.19	0.009 ± 0.002	0.38 ± 0.06
	B5	0.01	48.94 ± 33.99	0.02 ± 0.00	1.00 ± 0.14	0.65 ± 0.07	0.010 ± 0.002	0.44 ± 0.12
30 dias	Controle	-	14.43 ± 17.96	0.20 ± 0.08	32.77 ± 6.37	6.55 ± 1.37	0.03 ± 0.05	0.63 ± 0.25
	B100	0.01	10.12 ± 9.80	0.19 ± 0.02 ^d	20.81 ± 3.01	7.27 ± 0.58	0.02 ± 0.01	0.54 ± 0.08
	B100	0.001	32.48 ± 26.07 ^d	0.20 ± 0.05	40.22 ± 20.58	7.90 ± 7.89	0.03 ± 0.01	0.48 ± 0.03 ^d
	B20	0.01	3.11 ± 4.40	0.15 ± 0.00 ^d	29.28 ± 4.05	11.56 ± 5.18	0.04 ± 0.00	0.41 ± 0.10
	B20	0.001	5.35 ± 5.69	0.19 ± 0.04 ^d	54.67 ± 21.52	10.05 ± 4.61	0.07 ± 0.05	0.37 ± 0.09 ^a
	B5	0.01	9.87 ± 7.86	0.20 ± 0.04	48.37 ± 16.56 ^b	12.55 ± 2.91	0.05 ± 0.02	0.29 ± 0.05 ^{a,b}
	B5	0.001	0.00 ± 0.00	0.31 ± 0.06 ^b	58.26 ± 15.99 ^b	21.49 ± 9.73 ^{a,b}	0.24 ± 0.20 ^{a,b}	0.22 ± 0.07 ^{a,b}

Nota: Dados expressos como média ± desvio padrão.

^A Atividade expressa em pmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

^B Atividade expressa em U mg⁻¹ proteína.

^C Concentração expressa em nmol g⁻¹ tecido.

^a Diferença estatisticamente significante em relação ao Controle.

^b Diferença estatisticamente significante em relação ao B100 0.01mL/L.

^c Diferença estatisticamente significante em relação ao B20 0.001mL/L.

^d Diferença estatisticamente significante em relação ao B5 0.001mL/L.

Anexo I: Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – IBILCE/UNESP-CSJRP



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação de Biomarcadores bioquímicos em cascudos (*Pterygoplichthys anisitsi*) expostos à óleo diesel e biodiesel**" (protocolo n°. 027/2010 CEUA), sob responsabilidade do Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, em reunião de 28/09/2010.

CERTIFICATE

UNESP/IBILCE Ethical Committee for Animal Research (CEUA) hereby certify that the scientific investigation entitled "**Estimate of biochemical biomarkers in catfishes (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil and biodiesel**" (protocol n°. 027/2010 CEUA), on Eduardo Alves de Almeida responsibility, is in accordance with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and it was approved by the Committee of this Institute, on march 28th, september, 2010.

São José do Rio Preto, 28 de setembro de 2010.


 Profa. Dra. Rejane Maira Góes
 Presidente da CEUA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – SAEPE
 Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Lardim Nazareth
 CEP 15054-000 São José do Rio Preto – SP - Brasil
 Tel 17 221 2425 fax 17 221 2390 / 3221 2500
 E-mail: bitont@ibilce.unesp.br e ceua@ibilce.unesp.br