

NÁDIA ALINE CORROQUÉ

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO BODIESEL E
DE MISTURAS DE BODIESEL/DIESEL, POR MEIO DO TESTE
DO MICRONÚCLEO EM SANGUE PERIFÉRICO E DE
HISTOLOGIA DE BRÂNKUIAS DE *Oreochromis niloticus***

NÁDIA ALINE CORROQUÉ

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO BIODIESEL E DE
MISTURAS DE BIODIESEL/DIESEL, POR MEIO DO TESTE DO
MICRONÚCLEO EM SANGUE PERIFÉRICO E DE HISTOLOGIA DE
BRÂNQUIAS DE *OREOCHROMIS NILOTICUS***

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Marin Morales

Co-orientador: Dr^a. Daniela Morais Leme

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2011

574.88 Corroqué, Nádia Aline
C825a Avaliação do potencial mutagênico do biodiesel e de misturas de biodiesel/diesel, por meio do teste do micronúcleo em sangue periférico e de histologia de brânquias de *Oreochromis niloticus* / Nádia Aline Corroqué. - Rio Claro : [s.n.], 2011
31 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Aparecida Marin Morales
Co-Orientador: Daniela Morais Leme

1. Biologia molecular. 2. Biocombustível. 3. Mutagenicidade. 4. Genotoxicidade. 5. Citotoxicidade. 6. Petróleo. I. Título.

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

Dedico este trabalho aos meus pais, Daniel e Angela e também ao meu irmão Marcelo, por tudo que me representam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao apoio financeiro da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor Petróleo e Gás (PRH-ANP/MCT) e do Programa de Formação de Recursos Humanos da Petrobras.

Ao Programa PRH-05, da Unesp de Rio Claro, pelo apoio financeiro, pelo incentivo na realização deste trabalho e também pela realização dos cursos de verão, que foram essenciais à minha formação acadêmica e profissional.

Ao Prof. Dr. Dimas Dias Brito, coordenador do Programa PRH-05, pelo incentivo e apoio na realização deste trabalho.

À Bioverde, pelo fornecimento do biodiesel e do diesel utilizados na execução deste trabalho.

Ao Departamento de Biologia, por ceder a infra-estrutura e todo o suporte necessário para a realização do trabalho.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Marin Morales, por todos esses anos de trabalho, pela dedicação, paciência, compreensão e por todo o auxílio nas horas mais difíceis. Enfim, não tenho palavras para agradecer por tudo que me fez.

À minha co-orientadora Dr^a. Daniela Moraes Leme, que foi fundamental para o início e realização deste projeto como um todo. Agradeço-lhe não só pela ajuda no andamento das etapas do trabalho, mas também pela amizade e toda a atenção dispensada.

Agradeço também às Prof^{as} Dr^a. Maria Isabel Souza Camargo e Dr^a. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, por todo o auxílio prestado, orientando nos trabalhos da histologia.

Aos técnicos, Sandra e Gérson, que mantiveram tudo em funcionamento para o bom andamento deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer aos meus pais, Daniel e Angela. Se hoje estou concluindo esta etapa da minha vida, o mérito também é de vocês. Agradeço pelo apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos. Agradeço também ao meu irmão, Marcelo, meu grande inspirador e incentivador nas escolhas da minha vida. Sou muito grata a vocês todos, inclusive minha cunhadinha Mi, por todo o apoio e por terem segurado a barra comigo nas horas mais difíceis.

Ao meu namorado, Rafa, que não há palavras para agradecer tudo que fez por mim. Podemos dizer que com uma ligeira interrupção, você esteve presente tanto no início deste trabalho, quanto no fim. Obrigada por toda a paciência, dedicação, amor e carinho, não só estando ao meu lado, mas também ajudando de várias formas possíveis.

À todos os mutagênicos (Matheus, Léo, Pulga, Raquel, Maria Tereza, Dânia, Thaís, Marcinha, Jaque, Lívia, Jana, Cí, Yali, Paulinha, Laís) pela convivência desses anos todos, por tudo que me ensinaram, pelos problemas enfrentados e também por todas as risadas compartilhadas. Especialmente, Marcinha, Pulga, Matheus, Maria Tereza, Raquel, Dânia e Cí, que me auxiliaram de alguma forma, ou de muitas formas, principalmente nesta última etapa do trabalho. Aos demais, se não ajudaram na execução em si, entraram na torcida e apoio para que este trabalho fosse finalizado. Mais do que companheiros de laboratório, tenho em vocês, grandes amigos.

Aos amigos do curso de verão (Xuxa, Gigolô, Banana, Vassoura, Patrick, Smurf, Hina, Sacra, Demorô, Noemi, Ceará, Raquel e Pulga) pela companhia durante este período de estudos, pelos nossos cafezinhos comunitários e também por todas as cervejadas e risadas.

Aos meus colegas de classe e também de disciplinas cursadas, dos quais não irei citar os nomes, porque são vários. Mas obrigada pela amizade e companheirismo em todos esses anos.

Van e Artur (meus botânicos do coração) e Pulga muito obrigada pela amizade, pelos desesperos que passamos juntos, as esperas, os alívios e as muitas risadas compartilhadas também.

Espero não ter esquecido ninguém. Agradeço a todos, pois cada um de vocês aqui citados, fazem parte da minha vida e deste trabalho.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

1. Introdução.....	7
1.1. Contexto geral: biodiesel e questões ambientais	7
1.2. Avaliação de agentes genotóxicos e mutagênicos	8
1.3. Avaliações histopatológicas no âmbito da poluição aquática.....	10
2. Objetivo	11
3. Material e Métodos.....	12
3.1. Material.....	12
3.2. Simulação de vazamento das misturas de biodiesel e diesel em água.....	12
3.3. Análise química de HPAs	13
3.4. Bioensaio com organismo aquático (<i>O. niloticus</i>).....	14
3.4.1. Teste do MN em sangue periférico.....	15
3.4.2. Análise histológica e histoquímica em brânquias	16
4. Resultados.....	17
4.1. Análise química de HPAs	17
4.2. Análise de mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade em sangue periférico de <i>O. niloticus</i>	17
4.3. Análise histológica e histoquímica em brânquias	20
5. Discussão.....	23
5.1. Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em sangue periférico em <i>O. niloticus</i>	23
5.2. Histologia e histoquímica em brânquia de <i>O. niloticus</i>	24
6. Conclusão.....	26
7. Referências Bibliográficas	26

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contexto geral: biodiesel e questões ambientais

O crescimento populacional e industrial está diretamente relacionado com o aumento do consumo de energia. Atualmente, sabe-se que esta demanda energética é suprida praticamente por fontes não renováveis, principalmente, provenientes do setor petrolífero (SCHUDART et al., 1998). No entanto, a possibilidade de escassez do petróleo tem contribuído para o desenvolvimento de um novo setor energético, baseado em fontes de energia renováveis, como, por exemplo, o biodiesel.

O biodiesel é um biocombustível que pode ser obtido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais, sendo a transesterificação o processo mais aplicado na sua produção. Este processo consiste na reação do óleo ou gordura com etanol ou metanol, através de um catalisador (ENCINAR et al., 1999; NOUREDDINI et al., 1998).

A utilização do biodiesel puro em motores do ciclo diesel é ainda problemática, o que tem incentivado o seu uso associado ao óleo diesel. Atualmente ele é comercializado no Brasil, conforme previsto pela Lei nº 11097/2005, na proporção 5% de biodiesel e 95% de diesel, conhecida como mistura B5, mas, em alguns locais, a mistura B20 (20% de biodiesel e 80% de diesel) já vem sendo também comercializada.

Em comparação ao óleo diesel, o biodiesel tem sido considerado um combustível menos poluente por apresentar uma menor taxa de emissão de poluentes atmosféricos, como material particulado, óxidos de nitrogênio, óxidos de enxofre, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) entre outros (COSTA NETO et al., 2000; NABI et al., 2006; CORRÊA; ARBILLA, 2006; BASHA et al., 2009). Entretanto, quando as misturas de biodiesel são utilizadas em motores do ciclo diesel, podem gerar emissões de gases tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, tais como compostos carbonílicos (LEITE et al., 2011). Em relação aos impactos do biodiesel em outros meios físicos e aos efeitos adversos deste biocombustível a organismos expostos, poucos são os estudos encontrados na literatura. Poon et al. (2007), estudando a toxicidade oral de três tipos de biodiesel provenientes de diferentes matérias-primas e diesel de baixo teor de enxofre em ratos machos, mostraram que o biodiesel induziu efeitos lipídicos e stress oxidativo matéria-prima-dependente. Khan et al. (2007), em estudo de comparação da toxicidade aguda do biodiesel e suas misturas com o óleo diesel em organismos aquáticos, mostraram que o biodiesel e suas misturas são menos tóxicas do que o diesel convencional, porém, os riscos conferidos pelo biodiesel em organismos aquáticos são ainda bastante substanciais. Leite et al. (2011), estudando a toxicidade de frações hidrossolúveis de biodiesel produzidos a partir de óleo de rícino, óleo de palma e óleo de

cozinha, mostraram que este biocombustível pode gerar impactos negativos em ambientes aquáticos com toxicidade matéria-prima-dependente, sendo o metanol, proveniente da reação inversa da transesterificação em água, o contaminante mais proeminente. Nogueira et al. (2011), também estudando os efeitos do biodiesel em casos de poluição aquática, mostraram que biodiesel de gorduras animais e suas misturas com óleo diesel podem induzir stress oxidativo e alterações enzimáticas em espécimes de *Oreochromis niloticus*. Ainda não há trabalhos disponíveis na literatura em relação aos efeitos genotóxicos e mutagênicos deste biocombustível em situações de contaminações de ambientes aquáticos e solos.

Além de sua utilização como combustível, o biodiesel tem sido utilizado como um agente de biorremediação de áreas contaminadas por substâncias como óleos crus (MUDGE; PEREIRA, 1999; FERNANDEZ-ALVAREZ et al., 2005), alcatrão de hulha (TAYLOR; JONES, 2001) e solos contaminados com HPAs (Gong et al., 2010). De acordo com estes autores, este biocombustível possui uma ação detergente de baixa eficiência, em relação aos agentes surfactantes, mas pode biodisponibilizar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes nos derivados do petróleo para os microrganismos degradadores, aumentando, assim, a velocidade de degradação destes compostos. No entanto, apesar do favorecimento da biorremediação da área contaminada, esta ação pode ser prejudicial à saúde de organismos expostos, uma vez que muitos poluentes, como os HPAs, são reconhecidamente perigosos, pelos efeitos deletérios que promovem aos organismos, como, por exemplo, os danos nas suas moléculas de DNA (AINA et al., 2006). Assim, levando em consideração que os microrganismos podem levar de dias até anos para recuperarem totalmente o ambiente e que outros organismos ali presentes podem também sofrer com a ação dos contaminantes, poderemos ter um comprometimento generalizado de toda biota da área afetada, inclusive com severos danos no material genético dos organismos expostos.

1.2. Avaliação de agentes genotóxicos e mutagênicos

Segundo Houk (1992), para uma eficiente investigação ambiental, é necessária uma escolha adequada do ensaio a ser utilizado, levando em consideração não apenas as características da amostra a ser avaliada, mas também fatores como a validade do sistema-teste, o custo relativo do ensaio e a simplicidade do mesmo. Dentre os sistemas-teste, os peixes têm sido indicados como bons avaliadores da toxicidade de ambientes aquáticos (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Estes organismos-teste, por desempenharem diferentes funções na cadeia trófica, são capazes de acumular substâncias tóxicas ou pela exposição direta à água contaminada ou, de maneira indireta, através da cadeia alimentar (ATEEQ et al., 2002).

A espécie *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), popularmente conhecida como tilápia do Nilo, é comercialmente importante para a região sudeste do Brasil, especialmente para o estado de São Paulo. A tilápia tem ampla e significativa distribuição, é sensível e possui respostas rápidas às alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996).

As mutações são eventos biológicos que ocorrem naturalmente, fazendo parte, inclusive, do processo evolutivo dos organismos. Porém, esses eventos também podem ser induzidos por agentes químicos ou físicos. Os agentes mutagênicos são capazes de promover alteração na sequência das bases no DNA, acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações. Como as moléculas de DNA são alvos constantes da ação de poluentes (KOVALCHUCK et al., 1998), estes contaminantes podem induzir a danos que, se não forem reparados ou se forem reparados erradamente, podem resultar em mutações (KIRSCH-VOLDERS, et al., 1998). Segundo Obe et al. (1982), a maior parte dos agentes mutagênicos altera o material genético em todas as fases do ciclo celular. Porém, para que as alterações se fixem, é necessário que haja um evento de replicação do DNA logo após a ocorrência da alteração. Segundo Kirsch-Volders et al. (2002), as mutações podem ser classificadas em duas categorias: 1) Mutações gênicas, que são alterações pontuais, causadas por substituição ou por inserção ou deleção de bases (Frameshift) (DEVORET, 2004); 2) Mutações cromossômicas, que são mudanças na estrutura cromossômica ou no número total do conjunto cromossômico do organismo (RUSSEL, 2002).

Os micronúcleos (MN) são massas de cromatina citoplasmática com aparência de pequenos núcleos, que surgem de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros atrasados durante a anáfase da divisão celular (FENECH et al., 1999). Para que uma estrutura seja considerada um MN clássico, ela tem que ser morfológicamente semelhante ao núcleo principal, inclusive com a mesma refração, não estar ligada ao núcleo e ter um tamanho correspondente de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula. No caso específico dos peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos seus cromossomos, a proporção de tamanho passa para a faixa de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo (Al-SABTI; METCALFE, 1995; FENECH, 2000).

O teste do MN é largamente utilizado para avaliar danos genéticos causados por agentes químicos ou físicos (UDROIU, 2006), tendo grande sucesso para avaliar o potencial mutagênico de diversos poluentes (KLOBUCAR et al., 2003). Esta técnica é vantajosa pela sua simplicidade e aplicabilidade em diversas populações celulares em proliferação, sem necessitar de conhecimento prévio do cariótipo celular do organismo-teste (HAYASHI et al., 1998), podendo ser utilizada em diferentes órgãos e tecidos, como o epitélio branquial

(ÇAVAS; ERGENE-GOKUZARA, 2005), o fígado (RAO et al., 1997), o rim (PALHARES; GRISOLIA, 2002; RODRIGUEZ-CEA et al., 2003; BARSIENTE et al., 2006) e o sangue periférico (AL-SABTI, 1986; AL-SABTI et al., 1994; BAHARI et al., 1994; PALHARES; GRISOLIA, 2002; GRAVATO; SANTOS, 2003; BARSIENTE et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006; VENTURA et al., 2007; HOSHINA et al., 2008). Apesar de sua alta aplicabilidade, o teste do MN é dependente do ciclo celular, uma vez que, danos induzidos no primeiro ciclo serão visualizados como MN no segundo ciclo celular ou posteriormente (TATES et al., 1980). Nos peixes teleósteos, ainda há poucos dados referentes à duração do ciclo celular, principalmente, porque a duração do ciclo é dependente da temperatura. Em geral, a indução máxima de MN em peixes ocorre entre 1 a 5 dias, após o organismo ser exposto ao agente indutor (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Vários estudos têm mostrado que eritrócitos de peixes apresentam uma alta frequência de MN, quando expostos a poluentes, tanto em campo quanto em condições laboratoriais (AL-SABTI, 1986; HOSE et al., 1987; MATSUMOTO et al., 2006). A aplicação deste ensaio em eritrócitos, principalmente em amostras de sangue, é simples (UDROIU, 2006) e fácil de analisar (AL-SABTI; METCALFE, 1995) e, por este motivo, tem sido comumente utilizado.

O teste do MN tem sido muito utilizado para avaliar o potencial mutagênico de águas impactadas por refinarias (ÇAVAS; ERGENE-GOKUZARA, 2005b; SOUZA; FONTANETTI, 2006; HOSHINA et al., 2008), demonstrando o efeito mutagênico causado pelas atividades do setor petrolífero.

Vanzella et al. (2007) demonstraram, por meio do teste do MN e do ensaio do cometa, aplicados em eritrócitos de *Prochilodus lineatus*, os efeitos genotóxicos e mutagênicos do óleo diesel. No entanto, avaliações da genotoxicidade/mutagenicidade de águas contaminadas com biodiesel e suas misturas com diesel ainda não foram divulgadas na literatura, o que mostra a necessidade de avaliações deste tipo de ação.

1.3. Avaliações histopatológicas no âmbito da poluição aquática

As brânquias são estruturas que apresentam bons parâmetros para serem utilizados em avaliação do comprometimento ambiental aquático, por estarem em contato direto com o meio (EVANS, 1987). Segundo Arellano et al. (1999), as alterações histológicas das brânquias caracterizam um método rápido e válido para determinar os danos causados pela exposição do organismo a diferentes poluentes.

As brânquias são constituídas, basicamente, por dois tipos de epitélio: o respiratório e o branquial. O epitélio respiratório é constituído de uma única camada de células

pavimentosas, que revestem as lamelas respiratórias e são responsáveis pelas trocas gasosas entre o sangue e o meio externo. Já o epitélio branquial é estratificado e reveste o arco branquial, os rastros, os filamentos branquiais e as regiões interlamelares (EVANS, 1987). Este epitélio é constituído por diferentes tipos celulares, como células pavimentosas, mucosas e clorídricas, sendo as células clorídricas importantes para a troca iônica de peixes de água doce (LAURENT et al., 1985; LAURENT; PERRY, 1990).

Para avaliar as alterações histológicas, Bernet et al. (1999) propuseram um protocolo capaz de verificar 5 tipos diferentes de alterações dos tecidos, como: distúrbios circulatórios, alterações regressivas, alterações progressivas, inflamação e neoplasia.

As alterações morfológicas das brânquias, segundo Mallat (1985), podem ser focadas principalmente nas regiões lamelares e interlamelares, sendo que as mais observadas são: desprendimento epitelial, fusão lamelar, necrose, hiperplasia das células epiteliais, hipertrofia das células epiteliais, hipersecreção de muco, proliferação das células que secretam muco e cloreto, redução da superfície respiratória, ruptura das células epiteliais, aneurisma lamelar, congestão vascular, infiltração dos leucócitos no epitélio e alterações no espaço sanguíneo. Já as técnicas histoquímicas podem ser utilizadas para identificar tipos específicos de alterações celulares relacionadas às sínteses, como, por exemplo, preservação de proteínas, presença de polissacarídeos, de cálcio e de lipídio.

As células mucosas, presentes no epitélio branquial, são células de grande importância, pois secretam muco que, por sua vez, atua na proteção contra bactérias, parasitas, partículas e poluentes presentes na água, além de auxiliar na regulação iônica (McCahon et al., 1987; Handy et al., 1989; Deszfuli et al., 2003; Ledy et al., 2003; Moron et al., 2009). O muco produzido auxilia na retenção destes agentes tóxicos e, com isso, previnem a penetração destes agentes através das brânquias (PERRY; LAURENT, 1993). Segundo Takashima e Hibiya (1995), estas células podem hipersecretar muco em decorrência de infecções ou irritações por agentes químicos, indicando uma resposta defensiva do organismo. Contudo, o aumento do muco pode prejudicar a eficiência respiratória, uma vez que funcionam como barreira também para as trocas gasosas.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de águas contaminadas com diesel e biodiesel (puros) e suas misturas B5 (5% biodiesel + 95% diesel), B20 (20% biodiesel + 80% diesel) e B50 (50% biodiesel + 50 % diesel), por meio do teste de anormalidades nucleares (AN) e do MN em sangue periférico de

Oreochromis niloticus e de análises histológicas das brânquias desses organismos. Como fatores ambientais podem influenciar os efeitos adversos promovidos pelos contaminantes em casos de contaminações aquáticas, este trabalho também teve como objetivo comparar os efeitos destes combustíveis, na forma pura ou em misturas, em duas distintas estações do ano – verão e inverno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Os combustíveis dos tipos diesel (diesel A S500 - diesel com teor de enxofre máximo de 500 mg/kg) e biodiesel (biodiesel de soja produzido por transesterificação com metanol), utilizados neste trabalho, foram fornecidos pela empresa BioVerde, localizada na cidade de Taubaté-SP. O intuito de adquirir os combustíveis por meio de uma empresa produtora e não por meio de uma empresa fornecedora, como os postos de combustíveis, foi eliminar a possibilidade de adulteração dos combustíveis, o que poderia gerar resultados não confiáveis.

Como material biológico foi utilizada a espécie *O. niloticus* (Perciformes, Cichlidae), peixe popularmente conhecido como tilápia do Nilo.

3.2. Simulação de vazamento das misturas de biodiesel e diesel em água

As simulações de vazamento das misturas B5, B20 e B50, bem como dos combustíveis puros diesel (D100) e biodiesel (B100) foram realizadas de acordo com Nicodem et al. (1998) e Vanzella et al. (2007), em escala laboratorial, com algumas modificações. As simulações de vazamento em água foram realizadas em duas distintas estações do ano, estação quente/chuvosa (verão - março de 2009) e estação fria/seca (inverno - julho de 2009). A realização das simulações em diferentes épocas do ano foi proposta com o objetivo de verificar se as misturas de diesel e biodiesel testadas apresentam o mesmo comportamento em condições climáticas distintas.

O fato da obtenção do material de estudo ter se dado antes do início do projeto de iniciação científica aqui referido (2009), deve-se ao vínculo deste trabalho com o projeto de doutorado já finalizado da Dra. Daniela Morais Leme. O presente trabalho mostra análises complementares às avaliações da genotoxicidade do biodiesel realizada pela Dra. Daniela M. Leme, conferindo dados adicionais para a estimativa dos impactos do biodiesel e suas misturas em ambientes aquáticos. Desta forma, o material utilizado nos ensaios fazia parte da coleção de material biológico do Laboratório de Mutagênese do Departamento de Biologia,

Instituto de Biociências – UNESP Rio Claro, SP, que estava armazenado sob condições de congelamento (-20°C).

Foram adicionados, separadamente, em cada aquário de vidro (capacidade de 50 L) 625 mL de uma das misturas B5, B20 e B50 ou dos combustíveis puros B100 e D100 a 40 L de água de poço artesiano. Os aquários foram submetidos à agitação constante com auxílio de uma bomba submersa (Sarlo Better 650) e expostos a ambiente aberto por 22 horas. O início da exposição das simulações ao ambiente ocorreu às 18 horas, a fim de evitar perdas significativas por volatilidade, já no início das simulações. Desta forma, as simulações ficaram expostas por 13 horas na ausência de luz e 9 horas na presença de luz solar de baixa-média intensidade. Decorridas as 22 horas, a fração superior insolúvel foi descartada e a água contaminada coletada e usada para a realização dos bioensaios com *O. niloticus*.

3.3. Análise química de HPAs

A análise química para detecção e quantificação dos HPAs presentes nos tratamentos foi realizada pelo aluno Marcos Canto Machado, no Instituto de Química (IQ) da UNESP de Araraquara-SP, pela parceria estabelecida com a Profa. Dra. Maria Rosa Rodrigues de Marchi.

A extração das amostras de água para a análise química de HPAs foi realizada de acordo com os procedimentos de tratamento das amostras fortificadas, estabelecido pelo método USEPA 550.1 (EPA, 1990). Primeiramente, foi realizado o condicionamento dos cartuchos de SPE (*solid phase extraction*), como segue: cartuchos de C-18 (capacidade de 200 mg; 3 mL, Agilent technologies; utilizados para a extração de compostos não polares a compostos moderadamente polares) foram acoplados ao sistema de vácuo Manifold para o ajuste do gotejamento do cartucho em 8 mL min^{-1} (vazão otimizada). Após esta etapa, os cartuchos foram lavados com quatro porções de 10 mL de diclorometano, seguidos de quatro porções de 10 mL de metanol, sendo que entre cada lavagem realizada não se deixou secar a fase estacionária. Em seguida, os cartuchos foram lavados com duas porções de 10 mL de água deionizada, sendo que, após a primeira lavagem, deixou-se secar o cartucho e na segunda deixou-se a fase estacionária coberta com água (camada de cerca de 1 mm).

Para a etapa de extração dos HPAs, foi adaptado o sistema de extração, utilizando um funil de 100 mL, o qual foi acoplado ao cartucho de SPE, como reservatório para as amostras, facilitando, assim, o procedimento de extração. Para a extração, foi utilizado um volume de 250 mL da amostra. A vazão, controlada por bomba de vácuo, foi fixada em 8 mL min^{-1} . Os funis e aparatos contendo as amostras foram envoltos em papel alumínio, para evitar o contato

com a luz ambiente, já que os HPAs são fotossensíveis. O eluato (água sem a presença dos HPAs) foi descartado, o cartucho foi lavado com 10 mL de água milli-Q e, em seguida, colocado para secar por 10 minutos. Posteriormente, eluiu-se o cartucho com duas porções de 5 mL de diclorometano. As vidrarias que estiveram em contato com a amostra fortificada também foram lavadas com 2 mL excedentes de diclorometano. Este volume foi adicionado ao volume do extrato.

A secagem do extrato foi realizada em uma coluna de secagem de 2,5 cm com Na₂SO₄ anidro, previamente seco em estufa por 8 h a 180°C. Por esta coluna, passaram-se 10 mL de diclorometano e o extrato obtido. Em seguida, a coluna foi lavada com 2 mL adicionais de diclorometano e misturados os volumes obtidos. O extrato foi concentrado em corrente de N₂, até secagem completa, para depois ser armazenado a -20°C, até a sua utilização nas análises químicas dos HPAs.

A quantificação de HPAs foi efetuada de acordo com o protocolo USEPA-550.1 (EPA, 1990), que consiste na técnica de cromatografia líquida em associação a um detector de fluorescência (HPLC-Flu), que consegue captar 16 HPAs prioritários: naftaleno, acenaftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pyreno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(e)pireno, benzo(e)acefenantrileno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, indene(123-cd)pireno.

3.4. Bioensaio com organismo aquático (*O. niloticus*)

Espécimes do peixe *O. niloticus* foram transferidos do tanque de criação, localizado no Jardim Experimental do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, SP, para aquários com capacidade de 50 L cada, mantidos no Laboratório de Mutagênese do mesmo Instituto, onde foram realizados os ensaios. Os peixes foram organizados em sete grupos experimentais distintos, sendo dois grupos controles (negativo e positivo) e cinco grupos de tratamentos (B5, B20, B50, B100 e D100).

Nos aquários referentes aos controles negativo e positivo foram adicionados 50 L de água de poço artesiano, enquanto que nos demais, foram adicionadas as frações solúveis resultantes da respectiva simulação de vazamento de cada tratamento.

O conteúdo dos aquários foi aerado por 24 horas, antes dos peixes serem dispostos nos mesmos. Para cada aquário, foram dispostos, com aclimação de 30 minutos, cinco indivíduos com cerca de 10 cm de comprimento, aleatoriamente escolhidos. Os aquários foram mantidos em temperatura e aeração constante.

Para os ensaios do controle positivo (CP), os peixes foram submetidos a injeções intraperitoneais de ciclofosfamida (20 mg/mL, Lab. Sigma, CAS 50-18-0), aplicadas na proporção de 30 mL de ciclofosfamida/50 g de peixe. Para o controle negativo (CN) e demais tratamentos foram realizadas injeções de soro fisiológico, na proporção de 30 mL de soro/50 g de peixe, a fim de que todos passassem pelo mesmo estresse do manuseio.

Após completar 96 horas de exposição, todos os espécimes de *O. niloticus* foram anestesiados com solução de benzocaína (Lab. Merck, CAS 94-09-7) - 6 g de benzocaína/500 mL de etanol (proporção de 80 mg desta solução para cada litro de água), por aproximadamente 10 minutos (DE MIRANDA CABRAL GONTIJO et al., 2003), para, então, ser realizada a coleta das amostras de sangue e brânquia a serem utilizadas, posteriormente, no teste do MN e na análise histológica, respectivamente.

3.4.1. Teste do MN em sangue periférico

Decorridas 96 horas de exposição, foram coletadas com seringas previamente heparinizadas, por meio de punção cardíaca, as amostras de sangue de cada indivíduo.

As lâminas foram confeccionadas pela técnica de esfregaço (extensões sanguíneas), como segue: a primeira gota de sangue extraída da seringa foi descartada, para evitar contaminações e as gotas seguintes utilizadas para confecção das lâminas. Para cada indivíduo, foram realizados três esfregaços sanguíneos. As lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos, secas em temperatura ambiente e armazenadas em caixas apropriadas para posterior análise. Cabe informar que células sanguíneas não podem ser estocadas, *in natura*, por períodos superiores a três dias, nem mesmo a baixas temperaturas, por induzir morte das células, havendo assim, a necessidade de armazenamento do material já disposto em lâminas devidamente fixadas em metanol.

Para a coloração do material, as lâminas de esfregaço previamente preparadas, foram submetidas à hidrólise em HCl 1 N, por 11 minutos, em banho-maria a 60°C, e posteriormente colocadas em cubetas de vidro com Reativo de Schiff, por 2 horas. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas em água destilada para a retirada do excesso do reagente e secas novamente em temperatura ambiente.

Para a análise do teste do MN em sangue periférico de *O. niloticus*, eritrócitos nucleados foram avaliados quanto à frequência de células micronucleadas e portadoras de anormalidades nucleares, segundo a descrição de Carrasco et al. (1990). Foram avaliados em microscopia de luz comum, aumento de 1000x, 1000 eritrócitos por indivíduo, totalizando 5000 células para cada tratamento realizado.

Todos os dados obtidos com as análises dos esfregaços sanguíneos foram avaliados estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney, que tem por objetivo comparar cada tratamento com o controle negativo, a um nível de significância de 0,05.

3.4.2. Análise histológica e histoquímica em brânquias

O material histológico foi previamente processado, antes do início do projeto de iniciação científica aqui referido, devido ao vínculo com o projeto de doutorado acima mencionado. O material foi coletado e fixado em Bouin aquoso por 24 horas a 4°C. Após a fixação, o material foi transferido para um tampão fosfato de sódio (pH = 7,4), sendo, posteriormente, desidratado de forma gradual em soluções de etanol (70%, 80%, 90% e 95%), de 30 minutos cada banho. Em seguida à desidratação, o material foi colocado em uma solução de resina de embebição (Historesina Leica), permanecendo nesta solução por 24 horas a 4°C. A seguir, o material foi transferido para moldes que foram preenchidos com resina de inclusão. Após endurecimento desta resina, o material ficou armazenado em estufa a 37°C, para depois ser desenformado e armazenado em dissecador a temperatura ambiente, até o momento de sua utilização na microtomia.

A partir deste momento, deu-se prosseguimento às técnicas histológicas, sendo feitas micro-seções, com auxílio de micrótomo, dos blocos de resina previamente obtidos. Os cortes obtidos foram então hidratados em banho de água destilada e recolhidos em lâminas. As lâminas foram colocadas em estufa a 37°C, para secagem e posterior coloração.

As lâminas foram coradas pela técnica de Hematoxilina/Eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Hematoxilina: foi utilizada a Hematoxilina de Harris por 6 minutos. Posteriormente, as lâminas foram transferidas para água por 4 minutos. A coloração em eosina foi feita com Eosina aquosa, por mais 5 minutos, seguida de lavagem em água corrente e secagem.

Para análise histoquímica, as lâminas foram submetidas à técnica de PAS (Periodic Acid Schiff)/Alcian Blue, visando a detecção de polissacarídeos neutros e ácidos. Depois de umedecidas em água destilada, as lâminas foram coradas em Alcian Blue (pH = 2,5) por 20 minutos. Posteriormente, foram imersas em ácido periódico 1% por 5 minutos, lavadas em água destilada e, em seguida, colocadas em Reativo de Schiff, por 30 minutos no escuro. Decorrido este período, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos. Após a lavagem, as lâminas foram colocadas para secar.

Para ambas as técnicas de coloração apresentadas, as lâminas foram montadas em resina Entellan, para posterior análise em microscopia de luz.

4. RESULTADOS

4.1. Análise química de HPAs

As análises químicas realizadas para a detecção e quantificação de HPAs presentes nas amostras testes de água estão demonstradas abaixo na Tabela 1.

Tabela 1. Quantificação dos HPAs presentes nas amostras de água contaminadas pelos combustíveis diesel, biodiesel e suas misturas. (Ano de 2009).

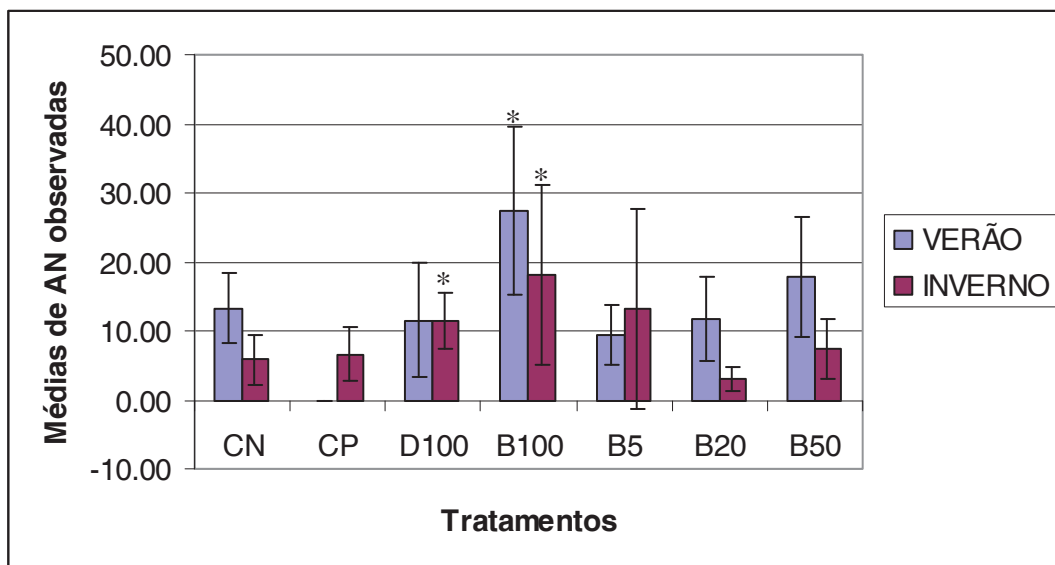
HPAs (µg/L)	CN	D100	B100	B5	B20	B50
Naftaleno	0.7	365.7	2.2	344.6	313.9	287.6
Acenafteno	0.2	23.3	1.4	22.6	20.7	16.9
Fluoreno	0.3	193.2	2.6	160.7	155.7	117.3
Fenantreno	1.3	232.5	9.9	221.2	217.5	168.3
Antraceno	0.3	3.4	2.1	2.4	2.2	2.2
Fluoranteno	0.3	3.7	1.3	3.7	3.3	3.4
Pireno	1.1	16.2	2.8	13.3	11.8	11.8
Benzo(a)antraceno	0.2	1.9	0.4	0.9	1.7	1.7
Criseno	nd	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
Benzo(e)pireno	nd	0.2	nd	nd	nd	nd
Benzo(e)acefenantrileno	nd	0.9	nd	0.6	0.5	0.2
Benzo(k)fluoranteno	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(a)pireno	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dibenzo(a,h)antraceno	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(g,h,i)perileno	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Indeno(123-cd)pireno	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Σ HPAs	4.4	841.14	22.81	770.1	706.7	609.5

CN = controle negativo; B5 = 5% biodiesel + 95% diesel; B20 = 20% biodiesel + 80% diesel; B50 = 50% biodiesel + 50% diesel; B100 = biodiesel puro; D100 = diesel puro; nd = não detectado (abaixo do limite de detecção)

4.2. Análise de mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade em sangue periférico de *O. niloticus*

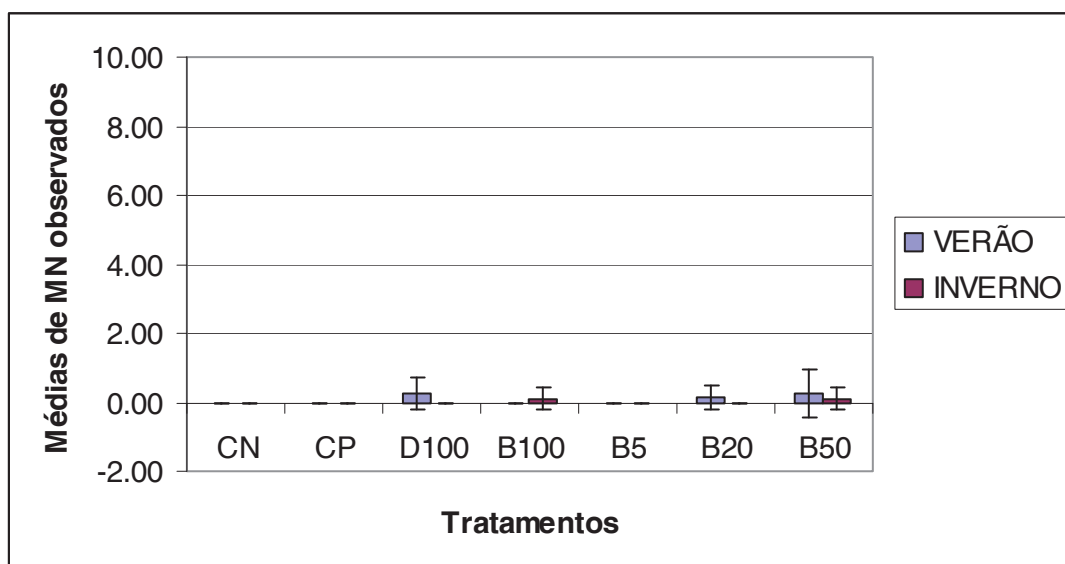
Os resultados obtidos pelo teste de AN e do MN em amostras de sangue de *O. niloticus*, expostos por 96 horas em águas contaminadas com biodiesel, diesel e suas misturas, estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3. No ensaio do CP, realizado na simulação de verão, houve a mortalidade total dos espécimes experimentados, representados nas figuras 1,2,3 como dados nulos. Os resultados encontrados para AN e células micronucleadas foram fotodocumentados e estão dispostos na Figura 4.

Figura 1. Valores de média de AN observadas em eritrócitos de *O. niloticus* expostos por 96 horas às águas contaminadas com diesel, biodiesel e suas misturas (Ano de 2009).



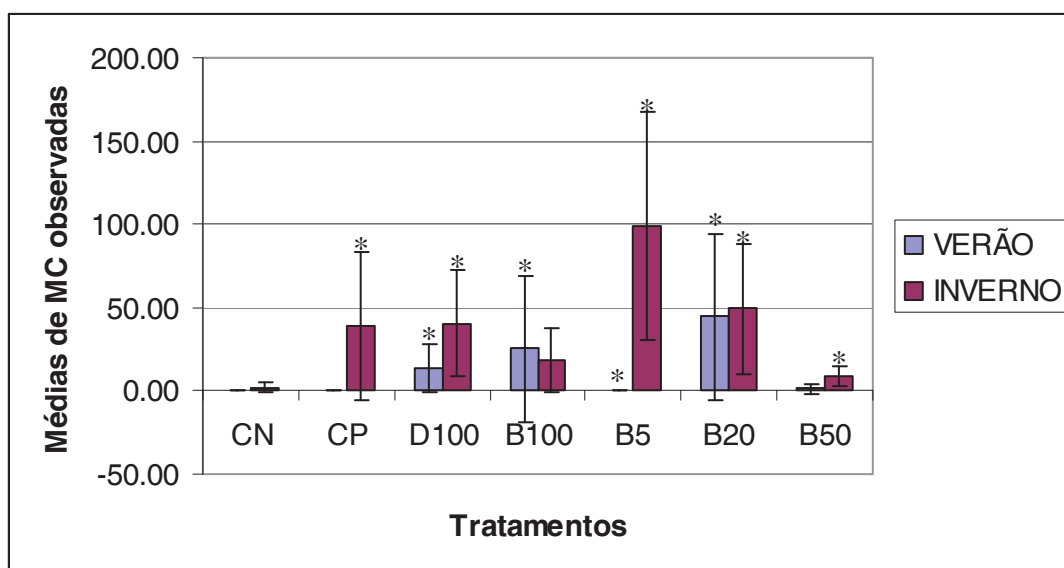
CN = controle negativo (água de poço artesiano); CP = controle positivo (injeção intraperitoneal de ciclofosfamida); B5 = 5% biodiesel + 95% diesel; B20 = 20% biodiesel + 80% diesel; B50 = 50% biodiesel + 50% diesel; B100 = biodiesel puro; D100 = diesel puro. *Valor significativo para $p < 0.05$ (Mann-Whitney).

Figura 2. Valores de média de MN observados em eritrócitos de *O. niloticus* expostos por 96 horas às águas contaminadas com diesel, biodiesel e suas misturas. (Ano de 2009).



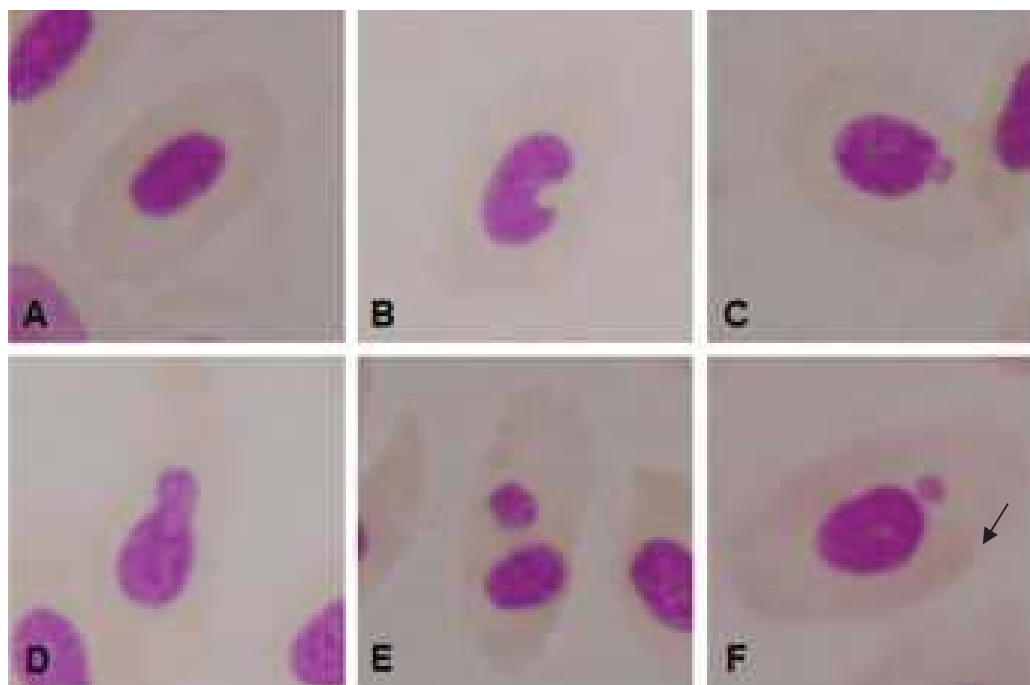
CN = controle negativo (água de poço artesiano); CP = controle positivo (injeção intraperitoneal de ciclofosfamida); B5 = 5% biodiesel + 95% diesel; B20 = 20% biodiesel + 80% diesel; B50 = 50% biodiesel + 50% diesel; B100 = biodiesel puro; D100 = diesel puro. *Valor significativo para $p < 0.05$ (Mann-Whitney).

Figura 3. Valores de média de Morte Celular (MC) observada em eritrócitos de *O. niloticus* expostos por 96 horas às águas contaminadas com diesel, biodiesel e suas misturas.



CN = controle negativo (água de poço artesiano); CP = controle positivo (injeção intra-peritoneal de ciclofosfamida); B5 = 5% biodiesel + 95% diesel; B20 = 20% biodiesel + 80% diesel; B50 = 50% biodiesel + 50% diesel; B100 = biodiesel puro; D100 = diesel puro.*Valor significativo para $p < 0.05$ (Mann-Whitney).

Figura 4. Eritrócitos de *O. niloticus* expostos por 96 horas em águas contaminadas com diesel, biodiesel e suas misturas.



A. Eritrócito normal; B. Núcleo do tipo Notched; C. Núcleo do tipo Blebbed; D. Núcleo do tipo Lobed; E. Eritrócito Binucleado; F. Micronúcleo (seta)

4.3. Análise histológica e histoquímica em brânquias

Os resultados da análise histológica obtidos pela coloração de HE estão apresentados na Tabela 2, enquanto que os dados da análise histoquímica, para avaliação dos polissacarídeos realizada pela técnica de PAS/Alcian Blue, podem ser visualizados na Tabela 3. As imagens referentes às alterações morfológicas podem ser visualizadas na Figura 5 e as de análise histoquímica de polissacarídeos podem ser visualizadas nas Figuras 6 e 7.

Tabela 2. Alterações morfológicas observadas em epitélio branquial de *O. niloticus* expostos por 96 horas às águas contaminadas com diesel, biodiesel e suas misturas. (Ano de 2009).

	<i>Alterações</i>			
	<i>Tratamentos</i>	<i>Fusão Lamelar</i>	<i>Hiperplasia</i>	<i>Desprendimento Epitelial</i>
VERÃO	CN	-	-	-
	D100	-	+	-
	B100	+	-	+
	B5	-	+	+
	B20	-	+	+
	B50	+	+	+
INVERNO	CN	-	+	-
	D100	+	+	+
	B100	-	+	+
	B5	-	-	-
	B20	+	+	+
	B50	-	-	+

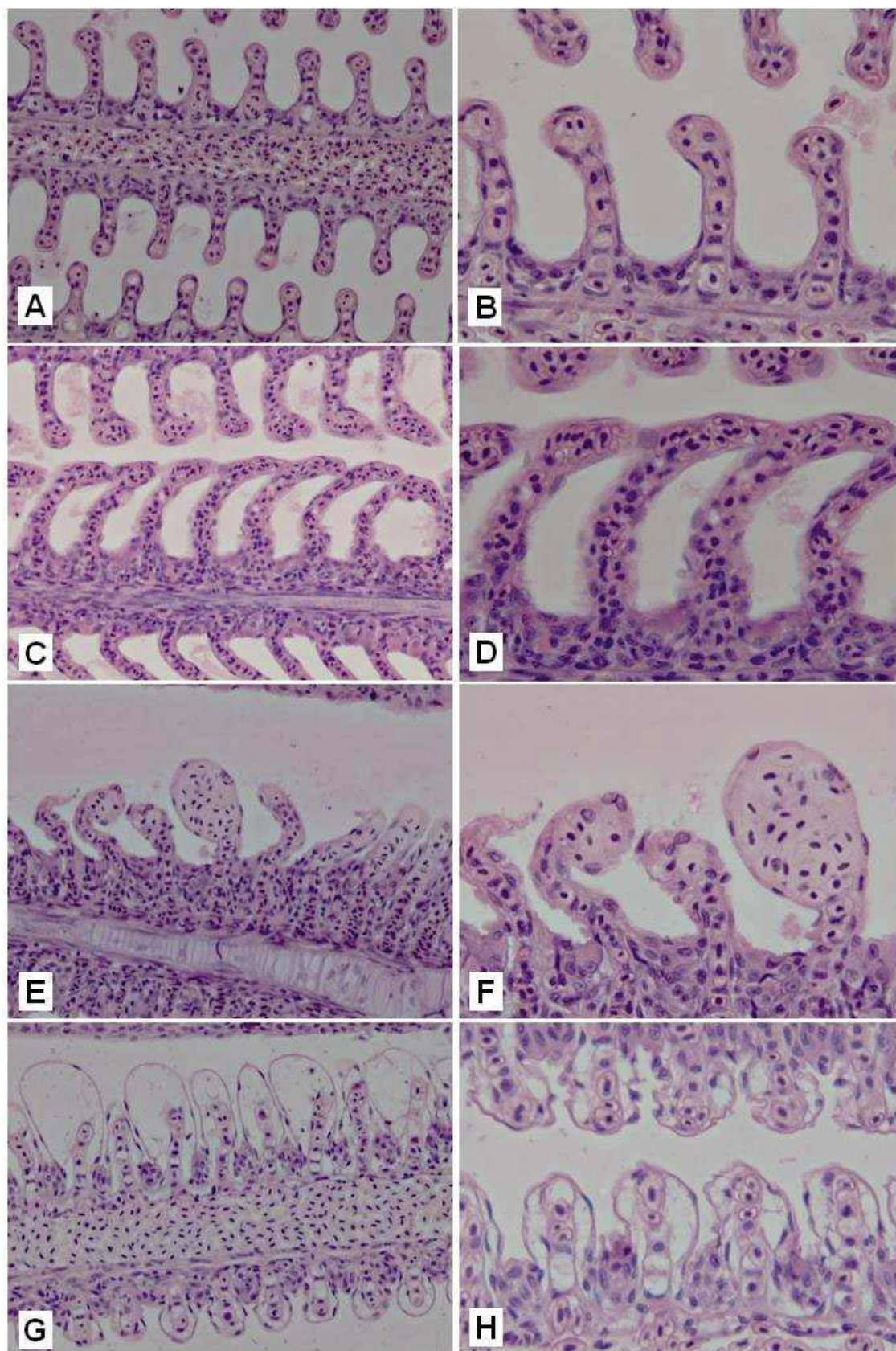
CN = controle negativo (água de poço artesiano); B5 = 5% biodiesel + 95% diesel; B20 = 20% biodiesel + 80% diesel; B50 = 50% biodiesel + 50% diesel; B100 = biodiesel puro; D100 = diesel puro. (-) ausência; (+) presença

Tabela 3. Intensidade de polissacarídeos observados em epitélio branquial de *O. niloticus* expostos por 96 horas às águas contaminadas com biodiesel, diesel e suas misturas. (Ano de 2009).

			<i>Tratamentos</i>					
			CN	D100	B100	B5	B20	B50
Verão	Lamela	núcleo	+	+	+	+	+	+
		citoplasma	-	+	+	+	+	-
	Células mucosas		++	++	++	++	++	++
Inverno	Lamela	núcleo	+	+	++	++	+	++
		citoplasma	-	-	+	+	+	+
	Células mucosas		++	++	+++	+++	+++	++

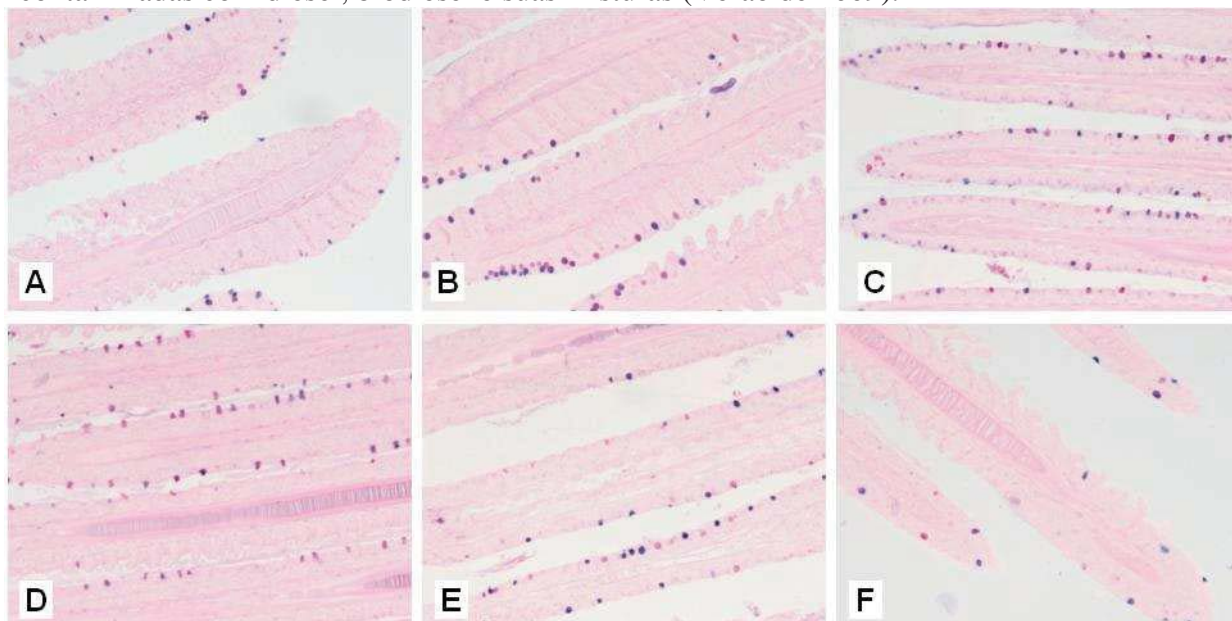
CN = controle negativo (água de poço artesiano); B5 = 5% biodiesel + 95% diesel; B20 = 20% biodiesel + 80% diesel; B50 = 50% biodiesel + 50% diesel; B100 = biodiesel puro; D100 = diesel puro. (-) ausência; (+) presença/intensidade (fracamente positivo); (++) presença/intensidade (positivo); (+++) presença/intensidade (fortemente positivo).

Figura 5. Lamelas branquiais de *O. niloticus* expostos por 96 horas em águas contaminadas com diesel, biodiesel e suas misturas (Ano de 2009).



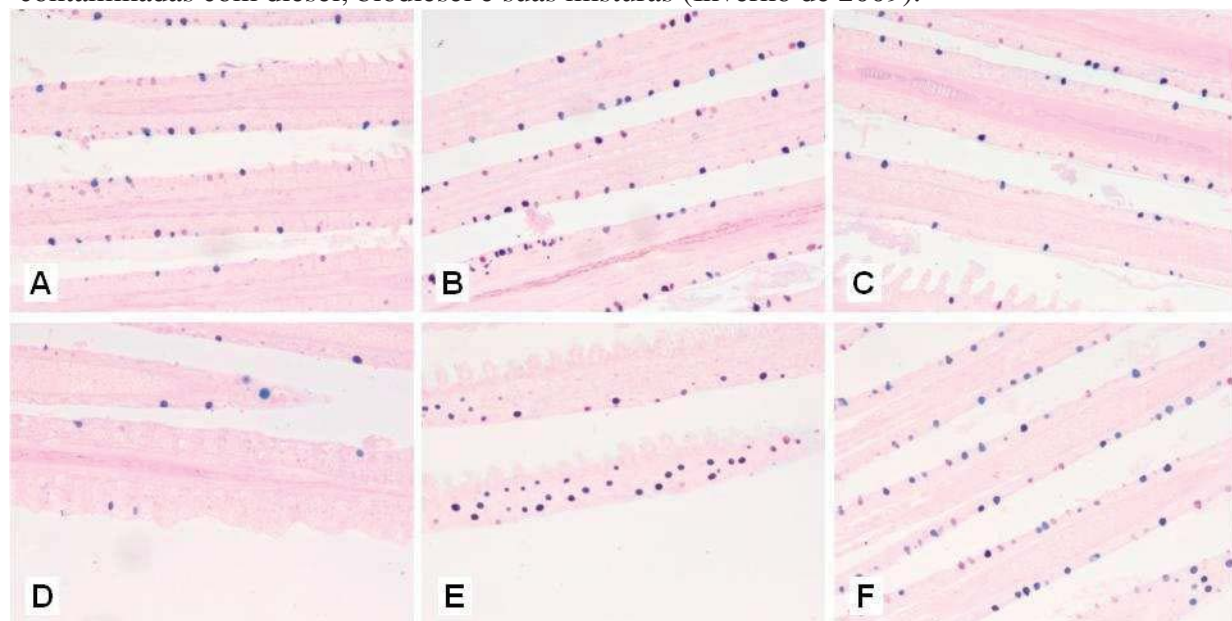
A-B. Morfologia Normal; C-D. Fusão Lamelar; E-F. Hiperplasia; G-H. Desprendimento Epitelial. Aumento: A, C, E e G = 200X; B, D, F e H = 400X (Coradas em HE).

Figura 6. Cortes histológicos de brânquias de *O. niloticus* expostos por 96 horas em águas contaminadas com diesel, biodiesel e suas misturas (Verão de 2009).



A. CN; B. B5; C.B20; D.B50; E. B100; F. D100. Os pontos corados (azul e magenta) correspondem às concentrações diferentes de polissacarídeos. A cor azul indica a presença de polissacarídeos ácidos e a cor magenta indica a presença de polissacarídeos neutros. As variações de tonalidade são diretamente proporcionais às diferenças nas concentrações dos polissacarídeos. Aumento: 100x (Técnica de PAS/Alcian Blue).

Figura 7. Cortes histológicos de brânquias de *O. niloticus* expostos por 96 horas em águas contaminadas com diesel, biodiesel e suas misturas (Inverno de 2009).



A. CN; B. B5; C.B20; D.B50; E. B100; F. D100. Os pontos corados (azul e magenta) correspondem às concentrações diferentes de polissacarídeos. A cor azul indica a presença de polissacarídeos ácidos e a cor magenta indica a presença de polissacarídeos neutros. As variações de tonalidade são diretamente proporcionais às diferenças nas concentrações dos polissacarídeos. Aumento: 100x (Técnica de PAS/Alcian Blue).

5. DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em sangue periférico em *O. niloticus*

Para análise dos bioensaios realizados, as células portadoras de alterações foram contabilizadas em três *endpoints*: portadoras de micronúcleo, para avaliação do potencial mutagênico; portadoras de anormalidades nucleares, para avaliação do potencial genotóxico e índice de morte celular, para avaliação do potencial citotóxico.

O CP, referente à simulação de verão, induziram à morte dos indivíduos expostos, representados como dados nulos nas figuras 1, 2 e 3, apesar de ter sido utilizada a mesma dosagem para ambos os bioensaios (verão e inverno). A temperatura, por ser um fator que altera o metabolismo do organismo em questão, pode ter influenciado no padrão de absorção, já que em altas temperaturas, o metabolismo se torna mais alto também. Contudo, este controle não inviabilizou os testes, pois, como os tratamentos são diretamente comparados ao CN, e este se mostrou adequado para as comparações, os resultados apresentaram-se consistentes.

Pelos resultados obtidos, não foram observados valores significativos de MN, em relação ao CN, para nenhum dos tratamentos realizados. Estes resultados indicam a ausência de mutagenicidade para as amostras de água contaminadas com diesel, biodiesel e suas misturas, em ambas as simulações de vazamento realizadas (verão e inverno).

Já a análise da genotoxicidade evidenciou valores significativos de AN para o tratamento B100, nas simulações de verão e inverno e para o tratamento D100 (apenas na simulação de inverno). Estes resultados mostram que os combustíveis diesel e biodiesel, quando puros, são mais genotóxicos do que quando utilizados em misturas.

Adicionalmente, embora tenham sido observados valores significativos de AN somente para B100 (simulação de verão), podemos sugerir que possa haver uma relação diretamente proporcional entre indução de AN e aumento proporção de biodiesel nas misturas, pois foi observado um aumento crescente de AN conforme se aumentou a proporção de biodiesel na mistura (B5<B20<B50). Tal resultado pode ser mais um indicativo de que o biodiesel seja o principal responsável pela genotoxicidade aqui observada.

Na simulação de inverno não foi possível observar a mesma correlação das concentrações de biodiesel com o aumento da indução de AN. Este resultado pode estar relacionado a uma possível ação mais moderada do biodiesel, quando exposto a temperaturas mais baixas. A possível explicação seria então que temperaturas mais elevadas podem levar ao processo de inversão da transesterificação, produzindo mais metanol, que, por sua vez teria

um efeito mais tóxico. No entanto, o composto B100 continuou sendo estatisticamente significativo, porém com valores mais baixos do que os observados na simulação de verão. Para o tratamento D100, foram observados valores semelhantes nas duas simulações realizadas (verão e inverno), embora para as análises de verão, os valores não tenham se mostrado significativos em relação ao CN. Isso pode ser explicado pelo fato do CN já ter exibido valores basais mais elevados que os de inverno. Como a comparação é sempre feita com os valores basais, a diferença entre os dois testes foi, realmente, diferente entre si, mesmo com as análises exibindo médias absolutas semelhantes.

Os índices de morte celular, que são indicativos de citotoxicidade, foram vistos como significativos na simulação de verão para os tratamentos B5, B20, B100 e D100 e para a simulação de inverno nos tratamentos B5, B20, B50 E D100.

Na simulação de verão, foi observada certa inconsistência dos resultados, como o do tratamento B5, que se mostrou significativo, porém com uma média muito baixa, quando comparada aos demais tratamentos e ao do CN. Assim, entendemos que novos experimentos devam ser realizados, para que se possa interpretar, com clareza, a ação destes químicos na indução de morte celular.

Para a simulação de inverno, foi observada a ocorrência de um aumento na indução de MC, diretamente proporcional ao aumento da concentração de diesel na amostra, constatado com os resultados obtidos para o tratamento D100. Com estes resultados, podemos inferir que tal resposta seja resultante da presença de HPAs nas amostras testadas (tabela 1). Nesta tabela, podemos observar que os conforme a concentração de diesel aumenta, ocorre um acréscimo nos valores dos HPAs encontrados. Tal resultado foi também observado por Moraes Leme et al. (2011), em testes realizados com células humanas mantidas em culturas.

5.2. Histologia e histoquímica em brânquia de *O. niloticus*

Para a análise histológica das brânquias dos organismos expostos aos tratamentos, foram avaliadas as alterações nas estruturas morfológicas do epitélio branquial, como: hiperplasia lamelar, desprendimento do epitélio lamelar e fusão lamelar.

De acordo com os resultados obtidos, todos os tratamentos, em ambas as simulações (verão e inverno), com exceção do B5 na simulação de inverno, apresentaram evidentes alterações na morfologia das brânquias. As análises que mais mostraram alterações foram as realizadas com os tratamentos B50 na simulação de verão e B20 e D100 na simulação de inverno, que apresentaram três tipos de alterações simultaneamente. Porém, de forma geral, todos os tratamentos apresentaram alguma resposta quanto à exposição realizada.

Estas alterações morfológicas, segundo Perry e Laurent (1993), consistem em respostas adaptativas na busca da conservação das funções fisiológicas, quando em condições ambientais adversas. Entretanto, em decorrência destas alterações, ocorre também uma redução na eficiência respiratória, comprometendo as trocas gasosas, o que pode, inclusive, levar o indivíduo à morte.

Segundo Bernet (1999), as alterações branquiais são classificadas como progressivas ou regressivas. A fusão lamelar e o desprendimento epitelial são considerados alterações progressivas, que são aquelas que levam à redução funcional ou até mesmo à perda do órgão. Já a hiperplasia e aumento na produção de muco são considerados alterações progressivas, ou seja, aquelas que promovem o aumento da atividade celular ou do tecido.

A fusão lamelar, segundo Mallat (1985), tem função protetora, diminuindo a superfície de contato das brânquias e, com isso, reduzindo o contato também com o poluente. Já a hiperplasia e o desprendimento epitelial possuem uma função defensiva, que é a de aumentar a distância entre o poluente presente na água e a corrente sanguínea, dificultando sua chegada ao sangue e, conseqüentemente, para o resto do organismo (KARLSSON-NORRGREN et al., 1985; ERKEN; KOLANKAIA, 2000).

Na análise histoquímica realizada neste trabalho, foi verificada a intensidade dos polissacarídeos presentes nas células mucosas do epitélio branquial de todos os tratamentos realizados.

Segundo McCahon et al. (1987), o muco tem função protetora, atuando como uma barreira, além de também atuar como facilitador na regulação iônica (HANDY et al., 1989). Assim, as células mucosas podem ser consideradas boas indicadoras da ação de substâncias tóxicas dissolvidas no meio. Pode ocorrer uma hipersecreção dessas células mucosas, de forma defensiva, em situações crônicas, como infecções parasitárias, bacterianas ou agentes químicos (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Mas o acúmulo desse muco também pode acarretar na redução da eficiência respiratória, gerando problemas para as trocas gasosas.

Pelos resultados observados, não foi verificada diferença na intensidade dos polissacarídeos para os tratamentos da simulação de verão, quando comparados ao controle. Entretanto, na simulação de inverno, os tratamentos B5, B20 e B100 mostraram maior intensidade destes compostos celulares, com relação ao controle, o que justifica a maior produção de muco para estes tratamentos.

6. CONCLUSÃO

A partir deste trabalho realizado com o organismo-teste *O. niloticus*, são apresentadas as seguintes conclusões:

- ✓ Apesar dos resultados não terem mostrado um potencial mutagênico para o biodiesel, foram observadas evidências significativas de citotoxicidade e genotoxicidade para este biocombustível, requerendo certa cautela em caracterizá-lo como um combustível ambientalmente mais seguro;
- ✓ O diesel também apresentou genotoxicidade;
- ✓ Fatores ambientais podem interferir na eliminação dos poluentes, pois houve diferença nos resultados entre as simulações realizadas no verão e no inverno;
- ✓ As alterações morfológicas nas brânquias podem afetar a eficiência das trocas gasosas e isso pode levar a danos significativos nesta estrutura, motivo este para as altas frequências de MC registradas na análise sanguínea;
- ✓ O biodiesel requer maiores investigações, quanto a sua toxicidade ao meio ambiente e organismos expostos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINA, R.; PALIN, L.; CITTERIO, S. Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L. **Chemosphere**, v.65, p. 666-673, 2006.

AL-SABTI, K. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. **Cytobios**, v.47, p.147-154, 1986.

AL-SABTI, K.; FRANKO, M.; ANDRIJANI, B.; KNEZ, S.; STEGNAR, P. Chromium induced micronuclei in fish. **Journal of Applied Toxicology**, v.14, p.333-336, 1994.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p. 121-135, 1995.

ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.44, p.62-72, 1999.

ATEEQ, B.; ADUL FARRAH, M.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2-4-D and butachlor evaluated by Allium rot tip test. **Mutation Research**, v.514, p.05-113, 2002.

[BRASIL] PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL – CASA CIVIL. Lei Federal nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Disponível em:

<www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>. Acesso em: 05 de agosto de 2009. Brasília, 2005.

BAHARI, I.B.; NOOR, F.M.; DAUD, N.M. Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*. **Mutation Research**, v.313, p.1-5, 1994.

BARSINIÈ, J.; DEDONYTÈ, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKÈNAITÈ, L.; ANDERSEN, O.K. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquatic Toxicology**, v.78S, p.S99-S104, 2006.

BASHA, S.A; GOPAL, K.R.; JEBARAJ, S. A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.13, p. 1628-1634, 2009.

BERNET, D.; SCHMIDT,H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v.22, p.25-34, 1999.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MAYERS, M. S. Assessment of the piscine micronuclei test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v.47, p.2123 -2136, 1990.

CORRÊA, S.M.; ARBILLA, G. Aromatic hydrocarbons emissions in diesel and biodiesel exhaust. **Atmospheric Environment**, v.40, p.6821-6826, 2006.

COSTA NETO, P.R.; ROSSI, L.F.S.; ZAGONEL, G.F.; RAMOS, L.P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v.23, p.531-537, 2000.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOKUZARA, S. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxicity pollution in the marine environment. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.46, p.64-70, 2005.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOKUZARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v.74, p.264-271, 2005b.

DE MIRANDA CABRAL GONTIJO, A.M.; BARRETO, R.E.; SPEIT, G.; VALENZUELA REYES, V.A.; VOLPATO, G.L.; FAVERO SALVADORI, D.M. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research**, v.534, p.165-172, 2003.

DEVORET, R. Mutation. **Encyclopedia of Life Sciences**. (2004). doi: 10.1038/npg.els.0001882.

DEZFULI, B.S.; GIARI, L.; KONECNY, R.; JAEGER, P.; MANERA, M. Immunohistochemistry, ultrastructure and pathology of gills of *Abramis brama* from Lake Mondsee, Austria, infected with *Ergasilus sieboldi* (Copepoda). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.53, p.257-262, 2003.

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; SABIO, E.; RAMIRO, M. J. Preparation and Properties of Biodiesel from *Cynara cardunculus* L. Oil. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.38, p. 2927-2931, 1999.

[EPA] Environmental Protect Agency. In: **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons ins drinking water by liquid-solid extraction and hplc with coupled ultraviolet and fluorescence detection**. Method 550.1, July, 1990.

ERKEN, B.; KOLANKAIA, D. Effects of water quality on ephitelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmark River, Turkey. Bull. **Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v.64, p.418-425, 2000.

EVANS, D.H. The fish gill : Site of actions and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environmental Heath Perspectives**, Research Triangle Park, v.71, p.47-58, 1987.

FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytotasis and DNA damage in human lymphocytes measured assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v.14, p.605-612, 1999.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.

FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, P.; VILA, J.; GARRIDO, J.M.; GRIFOL, M.; LEMA, J.M. Use of biodiesel as cleaning and bioremediation agent in oiled shores. In: **Symposium on Marine Accidental Oil Spills**, 2005.

GONG, Z.; WANG, X.; TU, Y.; WU, J.; SUN, Y.; LI, P. Polycyclic aromatic hydrocarbon removal from contaminated soils using fatty acid methyl esters. **Chemosphere**, v.79, p.138-143, 2010.

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

HANDY, R.D.; EDDY, F.B.; ROMAIN, G. In vitro evidence for the ionoregulatory role of rainbow trout mucus in acid, acid/aluminum and zinc toxicity. **Journal of Fish Biology**, v.35, p.737-747, 1989.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, v.399, p.125-133, 1998.

HOSE, J.R; CROSS, J.N.; SMITH, S.G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of Southern California. **Marine Environmental Research**, v.22, p.167-176, 1987.

HOSHINA, M.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutation Research**, v.656, p.44-48, 2008.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. **Mutation Research**, v.277, p.91-138, 1992.

JUNQUEIRA, L.C.U; JUNQUEIRA, M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo. Livraria Editora Santos, 123f, 1983.

KARLSSON-NORRGREN, L.; RUNN, P.; HAUX, C.; FÖRLIN, L. Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton–Buchanan), and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, v.27, p.81–95, 1985.

KHAN, N.; WARITH, M.A.; LUK, G.. A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v.57, p.286-296, 2007.

KIRSCH-VOLDERS, M.; CUNDARI, F.; VERDOODT, B. Towards a unifying model for the metaphase/anaphase transition. **Mutagenesis**, v.13, p.321-335, 1998.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v.504, p.137-148, 2002.

KLOBUCAR, G.; 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.

KOVALCHUCK, O.; KOVALCHUCK, I.; ARKIPOV, A.; TELYUK, P.; HOHN, B.; KOVALCHUCK, L. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, v.415, p.47-57, 1998

LAURENT, P.; HOBE,H.; DUNEL-ERB, S. The role of environmental sodium chloride relative to calcium in gill morphology of freshwater salmonid fish. **Cell and Tissue Research**, New York, v.240, p.675-693, 1985.

LAURENT, P.; PERY, S.F. Effect of cortisol in gill chlorid cell morphology and ionic uptake in freshwater trout, *Salmo gairdneri*. **Cell and Tissue Research**, New York, v.259, p.429-442, 1990.

LEDY, K.; GIAMBERINI, L.; PIHAN, J. C. Mucous cell responses in gill and skin of brown trout *Salmo trutta fario* in acidic, aluminium-containing stream water. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.56, p.235-240, 2003.

LEITE, M.B.N.L; ARAÚJO, M.M.S.; NASCIMENTO, I.A.; CRUZ, A.C.S.; PEREIRA, S.A.; NASCIMENTO, N.C. Toxicity of water-soluble fractions of biodiesel fuels derived from castor oil, palm oil, and waste cooking oil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, p.893-897, 2011.

LEME, D.M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; SKERSWETAT, M., de MARCHI, M.R.; MACHADO, M.C.; de OLIVEIRA, D.P.; MARIN-MORALES, M.A. Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2011. Doi:10.1016/j.ecoenv.2011.08.012.

MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and others irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.42, p.630-648, 1985.

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. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.148-158, 2006.

McCAHON, C.P.; PASCOE, D.; KAVANAGH, M. Histochemical observations on the salmonids *Salmo salar* L. and *Salmo trutta* L. and the ephemeropterans *Baetis rhodani* (Pict.) and *Ecdyonurus venosus* (Fabr.) following a simulated episode of acidity in an upland stream. **Hydrobiology**, v.153, p.3-12, 1987.

MORON, S.E.; ANDRADE, C.A.; FERNANDES, M.N. Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerthrinus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, p. 491-498, 2009.

MUDGE, S.M.; PEREIRA, G. Stimulating the biodegradation of crude oil with biodiesel preliminary results. **Spill Science & Technology Bulletin**, v.5, p.353-355, 1999.

NABI, Md.N.; AKHTER, Md.S.; SHAHADAT, M.Md.Z. Improvement of engine emissions with conventional diesel fuel and diesel-biodiesel blends. **Bioresource Technology**, v.97, p.372-378, 2006.

NICODEM, D.E.; GUEDES, C.L.B.; CORREA, R.J. Photochemistry of petroleum. I. systematic study of brazilian intermediate crude oil. **Marine Chemistry**, v.63, p.93-104, 1998.

NOGUEIRA, L.; SANCHES, A.L.; da SILVA, D.G.; FERRIZI, V.C.; MOREIRA, A.B.; de 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.

NOUREDDINI, H.; HARKEY, D.; MEDIKONDURU, V.A. Continuous process for the conversion of vegetable oil into methyl esters of fatty acids. **Journal of the AOCS**, v.75, p.1775-1783, 1998.

OBE, G.; NATARAJAN, A. T.; PALITTI, F. Role of DNA double strand breaks in the formation of radiation induced chromosomal aberrations. **Progress in Mutation Research**, v. 4, p.1-9, 1982.

PALHARES, D.; GRISOLIA, C.K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in Tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.281-284, 2002.

PERRY, S. F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: Rakin, J.C.; Jensen, F.B. **Fish Ecophysiology**. London, p. 231-264, 1993.

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

RAO, S.S.; NEHELI, T.; CAREY, J.H.; CAIRNS, V.W. Fish hepatic micronuclei as an indication of exposure to genotoxic environmental contaminants. **Environmental Ecotoxicology and Water Quality**, v.12, p.217-222, 1997.

RODRIGUEZ-CEA, A.; AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.56, p.442-448, 2003.

RUSSEL, P.J. Chromosomal mutation. In: B. Cummings (Ed.), **Genetics**, Pearson Education Inc, San Francisco, p.595-621, 2002.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R.M. Transesterification of vegetable oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.9, n.1, p.199-210, 1998.

SOUZA, T.S; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, v. 605, p.87-93, 2006.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. (Ed.) **An Atlas of Fish Histology**; Normal and Pathological Features. 2.ed. Tokio: Kodanska, 1995.

TATES, A.D.; NEUTEBOOM, I.; HOFKER, M.; DEN ENGELSE, L. A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN/DMN) in hepatocytes of rat liver *in vivo*. **Mutation Research**, v.74, p.11, 1980.

TAYLOR, L.T.; JONES, D.M. Bioremediation of coal tar PAH in soil using biodiesel. **Chemosphere**, v.44, p.1131-1136, 2001.

UDROIU, I. Review: The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v.79, p.201-204, 2006.

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

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.90, p.42-51, 2007.

VIJAYAN, M.M.; MORGAN, J.D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E.G.; IWAMA, G.K. Food privation effects seawater acclimation in Tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal Experimental Biology**, v.199, p. 2467-2475, 1996.