



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Biomarcadores como instrumentos preventivos de
poluição em corpos de água: toxicidade do
Biodiesel comparada ao diesel fóssil e blenda B5**

Maria Bernadete Neiva Lemos Leite

SALVADOR – BAHIA

2013



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Biomarcadores como instrumentos preventivos de
poluição em corpos de água: toxicidade do
Biodiesel comparada ao diesel fóssil e blenda B5**

Maria Bernadete Neiva Lemos Leite

Fortaleza – CE

2013



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Federal da Bahia

**Biomarcadores como instrumentos preventivos de
poluição em corpos de água: toxicidade do
Biodiesel comparada ao diesel fóssil e blenda B5**

Maria Bernadete Neiva Lemos Leite

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da
Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO como
parte dos requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.**

**Orientadora: Prof^a. Dra. Iracema Andrade Nascimento
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Erlon Araújo Rodrigues**

SALVADOR - BAHIA

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

L533 Leite, Maria Bernadete Neiva Lemos

Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição em corpos de água: toxicidade do biodiesel comparada ao diesel fóssil e blenda B5 / Maria Bernadete Neiva Lemos Leite. – Salvador, 2013.

106 f.

Orientadora: Prof^a Dr^a Iracema Andrade Nascimento.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. Biodiesel. 2. Biomarcadores. 3. *Oreochromis niloticus* I. Nascimento, Iracema Andrade. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 662.753

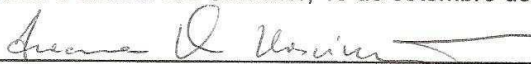
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia
Av. Miguel Calmon, s/n – Vale do Canela
40110-100, Salvador-BA - Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail: renorbio@ufba.br

ATA – DEFESA DE TESE

Ata de Defesa de Tese de Doutorado da aluna **Maria Bernadete Neiva Lemos Leite**. Aos dezesseis dias do mês de setembro do ano de dois mil e treze, às oito horas no Auditório Ophélia Gaudenz no terceiro andar no Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA) se reúne em sessão pública, a Banca Examinadora de Defesa de Tese composta pelos Professores: Profa. Dra. **Iracema Andrade Nascimento**, orientadora, Prof. Dr. **Luiz Erlon Araujo Rodrigues**, co-orientador, Prof. Dr. **Giovanni Sansone**, Prof. Dr. **Milton Ricardo de Abreu Roque**, Prof. Dr. **André Luis da Cruz**, Profa. Dra. **Solange Andrade Pereira** perante o qual a Doutoranda **Maria Bernadete Neiva Lemos Leite**, aluno regularmente matriculado no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Bahia, defendeu para preenchimento do requisito de Doutor, sua Tese intitulada “**Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição em corpos de água: uso na avaliação da toxicidade do biodiesel comparada ao diesel fóssil e blenda B5**”. A defesa da referida tese ocorreu, das oito horas às **10:30**, tendo a Doutoranda sido submetido à sabatina, dispondo cada membro da Banca do tempo para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a Doutoranda aprovada por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito satisfatório.

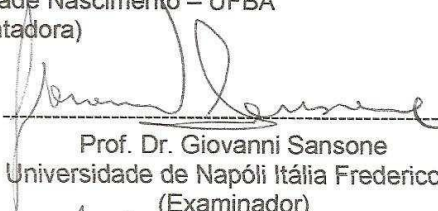
Eu, Iracema Andrade Nascimento, que presidi a Banca de Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Salvador, 16 de setembro de 2013..



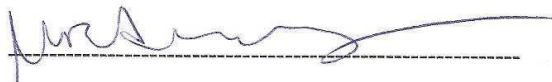
Prof. Dra. Iracema Andrade Nascimento – UFBA
(Orientadora)



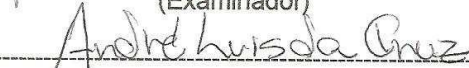
Prof. Dr. Luiz Erlon Araujo Rodrigues – UFBA
(Co-orientador)



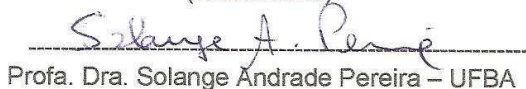
Prof. Dr. Giovanni Sansone
Universidade de Nápoli Itália Frederico II
(Examinador)



Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque – UFBA
(Examinador)



Prof. Dr. André Luis da Cruz – UFBA
(Examinador)



Prof. Dra. Solange Andrade Pereira – UFBA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Federal da Bahia-UFBA
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia
Av. Miguel Calmon, s/n – Vale do Canela
40110-100, Salvador-BA - Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail: ano@ufba.br

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: Maria Bernadete Neiva Lemos Leite

TÍTULO DO PROJETO: “Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição em corpos de água: uso na avaliação da toxicidade do biodiesel comparada ao diesel fóssil e blenda B5”

PROFESSORA ORIENTADORA: Profa. Dra. Iracema Andrade Nascimento

BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Iracema Andrade Nascimento – UFBA (Orientadora)	Satisfatório	
Prof. Dr. Luiz Erlon Araujo Rodrigues - UFBA (Co-orientador)	Satisfatório	
Prof. Dr. Giovanni Sansone Universidade de Nápoli Itália Frederico II (Examinador)	Satisfatório	
Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque – UFBA (Examinador)	Satisfatório	
Prof. Dr. André Luis da Cruz - UFBA (Examinador)	Satisfatório	
Profa. Dra. Solange Andrade Pereira - UFBA (Examinador)	Satisfatório	

DATA DA DEFESA DE TESE: 16 de setembro de 2013

HORÁRIO: 08hs

LOCAL: Auditório Ophélia Gaudenzi no 3º andar

ICS/UFBA

DEDICATÓRIA

À minha família,

Por vocês cheguei até aqui;

Por vocês chegarei onde for preciso.

Em especial, à meus filhos Ricardo e Renata,

Meus melhores amigos, meu porto seguro.

A vocês dedico esta tese e todo o meu amor!

Um amor maior que eu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, que possibilitou mais esta conquista em minha vida.

À Dagoberto, Ricardo e Renata por terem sempre acreditado e me apoiado em tudo o que faço, amo demais vocês.

Aos meus pais, Alcino e Joventina (in memoriam), pelo exemplo de vida.

Agradeço imensamente a minha orientadora Profa. Dra. Iracema Nascimento, exemplo de profissional, pela atenção, eficiência, incentivo, apoio, dedicação e confiança depositada durante estes anos de orientações às minhas atividades e que, com certeza, alimentaram minha perseverança e que jamais irei esquecer.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Erlon Rodrigues por suas idéias e imensa disponibilidade em me ajudar e ensinar. Muito obrigada por sua amizade e compreensão sempre.

A Profa Dra. Lilia Moreira por sua disposição e atenção com que sempre me recebeu para troca de idéias e valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Moises pelo auxílio na leitura das lâminas de fígado.

À Profa. Dra. Solange Pereira pela amizade construída durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. André Cruz pela colaboração nos estudos histológicos.

Ao Prof. Dr. José Marcos, pela disponibilidade do LAMAR para a realização das fotomicrografias e a Cristina Mendes pelo auxílio no manuseio do equipamento.

Às minhas colegas Roseli e Andréa pelo companherismo e amizade durante curso.

Aos colegas do LABIOMAR, Instituto de Biologia – UFBA, em especial Ana Mariani, Felipe Lima, Jutilândia e Leandro pela colaboração.

À Sayuri Yamashita, pela amizade e colaboração na realização dos testes.

À José Inácio e Samuel pela amizade e valiosa ajuda dispensada.

À BRASKEM pela realização das análises cromatográficas.

Ao DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra a Seca) pela doação dos peixes.

Aos componentes da banca examinadora, pelas valiosas contribuições.

Ao Programa de Pós-graduação da RENORBIO, pela oportunidade.

Ao CNPq (processo nº 574712/2008-9 e nº 551134/2010-9) pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, auxiliaram para que este trabalho fosse concretizado, e que, por minhas limitações humanas, acabei não mencionando.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT/TGP - Alanina aminotransferase

AST/TGO - Aspartato aminotransferase

AN – Anormalidades nucleares

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

BTEX – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno

BTX – Benzeno, Tolueno e Xileno

B5 – Mistura binária de diesel/biodiesel contendo 5% de biodiesel

B100 – Biodiesel puro

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CG – Cromatografia Gasosa

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO₂ – Dióxido de Carbono (Gás Carbônico)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNOCS - Departamento Nacional de Obras Contra a Seca

FSA – Fração solúvel em água

HPA - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

LOEC – Lowest observed effect concentration

MN – Micronúcleo

NOEC – No observed effect concentration

NO_x – Óxidos Nitrosos

OD – Oxigênio Dissolvido

pH – Potencial Hidrogeniônico

.

RESUMO

Combustíveis fósseis a exemplo do diesel estão sendo gradualmente substituídos por biodiesel, uma fonte de energia renovável, considerada menos poluente, uma vez que a maioria dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos carcinogênicos (HAP) são ausentes nas emissões, que contêm menos monóxido e dióxido de carbono, assim como particulados. Entretanto, sabe-se que o contato com a água pode reverter o processo de transesterificação do biodiesel, liberando o metanol que é hepatotóxico. O aumento estimado da produção e uso do biodiesel pode envolver riscos de acidentes e de contaminação de corpos de água. Avaliar a toxicidade dessa fonte de energia sobre os organismos aquáticos é a finalidade deste trabalho que estima e compara efeitos tóxicos em tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas às frações solúveis em água (FSA) do biodiesel (B100) produzido por via metílica, da mistura petrodiesel/biodiesel (B5 comercial), e do diesel, usando biomarcadores bioquímicos, mutagênicos e histopatológicos. Os organismos-teste foram expostos às concentrações de 0 (controle) a 100% das FSA, por 24h. As atividades das enzimas β - Glucuronidase (EC 3.2.1.31), Aspartato aminotransferase/TGO (AST: EC 2.6.1.1) e da Alanina aminotransferase TGP (ALT: EC 2.6.1.2) foram utilizadas como biomarcadores bioquímicos; o teste de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares (AN), como biomarcadores de genotoxicidade e o estudo histológico de brânquias e fígado, como biomarcadores histopatológicos. Amostras de fígado foram homogeneizadas em solução de sacarose 0,25M, centrifugadas a 1500xg e as avaliações enzimáticas foram realizadas no sobrenadante obtido. Amostras de fígado e brânquias foram fixadas em Bouin, processadas histologicamente, coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas em microscópio de óptico. As mesmas amostras das FSA de B5 comercial e diesel foram analisadas por cromatografia gasosa para quantificação de hidrocarbonetos e do B100, para o teor de metanol. No sangue, corado com Giemsa, foram analisados MN e AN. As análises cromatográficas indicaram valores de BTX bem acima dos limites permitidos por lei nas FSA dos petrocombustíveis e elevado teor de metanol, na FSA do B100. Houve um aumento dose/resposta da atividade da enzima lisossômica β -glucuronidase nos organismos expostos, em relação ao controle (valores médios significativos nas concentrações de 46 e 100 % da FSA do B5 comercial e diesel, e de 100%, para o B100) sugestivo de alteração na integridade da membrana lisossômica, induzida pelas substâncias tóxicas presentes nas FSA dos combustíveis testados. A análise estatística mostrou que houve também um aumento de dose/dependência na atividade da enzima ALT entre as

concentrações dos três produtos testados; em todas as concentrações os valores médios foram menores em B100, indicando este combustível com menos tóxico em comparação aos demais testados. A atividade AST mostrou-se menos eficiente para o diagnóstico da hepatotoxicidade. O teste MN mostrou que nas concentrações de 10 e 22% das FSA de B5 comercial e diesel, os valores médios foram mais elevados e significativamente diferentes do controle e das demais concentrações testadas ($p < 0,05$). Contudo, para o B100, esta diferença significativa foi observada apenas em 22%, indicando que nestas concentrações as células começaram a atingir o seu limite máximo de resposta em relação a formação de micronúcleos (MN), seguido de um declínio nas concentrações mais elevadas (46 e 100%). No entanto, as anormalidades nucleares (AN) aumentaram progressivamente, obedecendo a uma resposta de dose/dependência, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações de 46 e 100% de B5 comercial e diesel, e 100% de B100, quando comparadas ao controle e com as demais concentrações. Entretanto, danos citogenotóxicos foram observados nos eritrócitos dos peixes expostos às FSA dos três combustíveis testados. Os animais expostos apresentaram alterações histológicas nas brânquias (aneurisma, edema, descolamento epitelial e fusão lamelar) e danos no fígado (vacuolização, núcleos na periferia da célula, degeneração celular, focos de necrose), refletindo assim a ação dos produtos na integridade desses tecidos e o possível prejuízo de processos fundamentais para a manutenção da homeostase nesses peixes. Apesar de apresentar efeitos menos severos que o diesel e B5 comercial, o B100 pode ativar respostas bioquímicas, mutagênicas e histopatológicas, indicando que este combustível também pode representar um risco para a biota aquática. Exceto a atividade da AST, todas as técnicas utilizadas, mostraram-se como biomarcadores adequados ao monitoramento, prevenção e controle de poluição por biocombustíveis.

Palavras-chave: Biodiesel/Petrodiesel . Biomarcadores. *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

Fossil diesel is gradually being replaced by biodiesel, a renewable biofuel, considered as less pollutant. Most carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are absent in biodiesel, which emissions are also lower in carbon monoxide, carbon dioxide and particulates. However, the estimated increase in production and use of biodiesel may involve risks of accidents and water bodies contamination; hidrolysis can reverse the biodiesel transesterification process, and releases into water free methanol, which is toxic and carcinogenic. The present work aims to estimate and compare the toxic effects of fuels on the aquatic environment by exposing tilapia (*Oreochromis niloticus*) to the water soluble fraction (WSF) of biodiesel (B100, resultant from methanol transesterification), the blend B5 petrodiesel / biodiesel (commercial), and diesel, by using biochemical, mutagenic and histopathological biomarkers. The test-organisms were exposed to concentrations of 0 (control) to 100% of the water-soluble-fraction (WSF) of those fuels, for 24h. The activities of the enzymes β -Glucuronidase (EC 3.2.1.31), Aspartate aminotransferase (AST: EC 2.6.1.1) and Alanine aminotransferase SGPT (ALT: EC 2.6.1.2) were used as biochemical biomarkers; the micronucleus test (MN) and the nuclear abnormalities (NA), as biomarkers of genotoxicity and the histological alterations of gills and liver as histopathological biomarkers. Liver samples were homogenized in 0.25 M sucrose solution, and centrifuged at 1500xg. The resultant supernatants were used to assess the enzymatic activities. Liver and gills samples were fixed in Bouin, histologically processed, stained by hematoxylin and eosin (H & E) and examined under light microscope. The same WSF-samples of B5 and commercial diesel fuel were analyzed by gas chromatography for quantification of hydrocarbons, and of B100, for methanol content. Blood cells, stained with Giemsa were analyzed MN and AN. GC analysis indicated BTX values well above the standard-limits in the petrodiesel-WSF and B5, and high methanol content in the B100-WSF. There was an increased dose/response activity of the lysosomal enzyme β -glucuronidase in exposed organisms, compared to control (significant mean values at concentrations of 46 and 100% of the FSA's commercial B5 and diesel- WSF and 100% for the B100-WSF), suggesting a possible change in the integrity of the lysosomal membrane, induced by toxic substances present in the WSF. Statistical analysis showed that there was also a dose/dependence increase in the ALT activity between the three products tested; at all concentrations, the values were lower in B100, indicating this fuel as less toxic compared to the others tested. AST activity was less efficient for the diagnosis of hepato-

toxicity. The MN test showed that at the concentrations of WSF-10 and 22%, B5 commercial and diesel average values were higher and significantly different from control and from other concentrations tested ($p < 0.05$). However, for B100, the significant difference was observed only in 22%, indicating that at this concentration the cells began to reach its maximum response regarding the formation of micronuclei (MN), followed by a decline at higher concentrations (46 and 100%). The nuclear changes (AN), however, increased progressively, by following a dose/dependent response, presenting significant difference ($p < 0.05$) at concentrations of 46 and 100% of B5 and commercial diesel, and 100% of B100, when compared to control and other concentrations. However, citogenotóxic damages were observed in erythrocytes of fish exposed to the FSA of the three fuels tested. The animals exhibited histological changes in the gills (aneurysm, edema, lamellar fusion and epithelial detachment) and liver damage (vacuolization, nuclei at the periphery of the cell, cell degeneration, necrosis foci), reflecting the action of the WSF- contaminants on the integrity of these tissues and the possible loss of key processes for homeostasis maintenance. Despite showing effects less severe than diesel and B5, B100 showed to be able to activate abnormal biochemical, mutagenic and histopathological responses, indicating that this fuel can also pose a risk to aquatic biota. Except for AST activity, all the used techniques proved to be efficient as biomarkers for monitoring and pollution prevention and control.

Keywords: Biodiesel/ Petrodiesel. Biomarkers. *Oreochromis niloticus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Combustíveis líquidos: biodiesel versus petrodiesel.....	13
1.2 Poluição hídrica por combustíveis	15
1.3 Biomarcadores como instrumentos da ecotoxicologia	17
1.4 Biomarcadores bioquímicos	19
1.5 Biomarcadores de genotoxicidade	23
1.6 Biomarcadores histológicos	24

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais	27
2.2 Objetivos específicos	27

3. RESULTADOS E PRODUTOS GERADOS

28

3.1 Artigo 01

28

Avaliação ecotoxicológica em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), expostos à frações solúveis de biodiesel e petrodiesel: efeitos bioquímicos e mutagênicos

3.2. Artigo 02

57

Toxicidade do biodiesel comparada ao diesel fóssil e blends: uso de biomarcador histológico aplicado à tilápia, como ferramenta preventiva de poluição em corpos de água.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

91

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

94

1. INTRODUÇÃO

1.1 Combustíveis líquidos: biodiesel versus petrodiesel

A utilização de fontes renováveis de energia, visando contrabalançar os efeitos danosos resultantes do uso de energias fósseis é umas das grandes prioridades mundiais. A preocupação atual com a redução da poluição e com o atendimento da crescente demanda energética tem estimulado o mercado mundial de biocombustíveis. Com a economia global em crescimento, a busca por energia limpa, proveniente de recursos renováveis, encontra-se em contínuo aumento (BILGEN *et al.*, 2006)

O uso de óleos vegetais como combustíveis teve início em 1900, quando Rudolf Diesel apresentou um motor funcionando à base de óleo de amendoim. Porém, já no início do século XX, ficou comprovada que a utilização de óleos vegetais sem qualquer modificação, causava problemas ao funcionamento dos motores (RANESES *et al.*, 1999), devido à alta viscosidade, a baixa volatilidade e ao caráter poli-insaturado destes óleos, que ocasionam combustão incompleta (ENCINAR *et al.*, 1999). Visando contornar esses problemas, diferentes alternativas de modificação dos óleos têm sido consideradas, tais como diluição, microemulsão com álcool, craqueamento catalítico e reação de transesterificação com álcool, atualmente, o método mais utilizado para a geração de biodiesel (KNOTHE, 2006).

O biodiesel é um combustível renovável, produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais. Esses substratos são transformados em ésteres de cadeia longa (biodiesel) por diferentes processos de esterificação ou por transesterificação, na presença de um catalisador e um álcool (FUKUDA *et al.*, 2001; RAMANDHAS *et al.*, 2005). Em geral, a produção de biodiesel no Brasil é feita utilizando o metanol, resultando os ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel) e a glicerina (MULLER, 2011). A Figura 01 apresenta um esquema ilustrando a reação de transesterificação, onde R1, R2 e R3 são cadeias de hidrocarbonetos saturados ou insaturados e R4 são grupos alquilas.

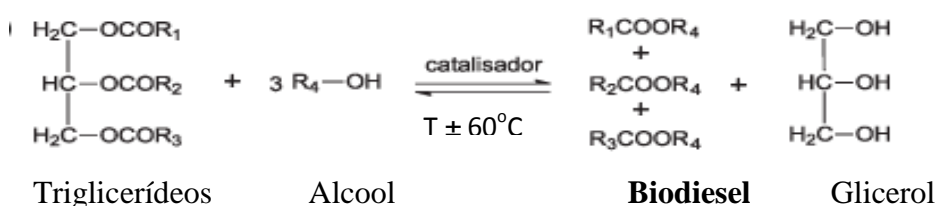


Figura 01. Equação geral de transesterificação de um triglicerídeo para a formação do biodiesel (GERIS *et al.*, 2007)

As vantagens do biodiesel são relacionadas à diminuição de emissões tóxicas (derivados de enxofre e material particulado, além de hidrocarbonetos aromáticos, considerados cancerígenos) ao ser queimado em motores diesel, sem exigir modificação e com eficiência semelhante àquela do diesel fóssil (TURRIO-BALDASSARRI *et al.*, 2004). Ainda, diferentemente do diesel, o biodiesel é considerado como biodegradável (WANG *et al.*, 2000; ATADASHI *et al.*, 2010). Essas vantagens ambientais, aliadas às econômicas referentes à substituição do diesel importado pelo País, possibilitaram, a partir de 2005, o avanço na produção e uso do biodiesel. No cenário brasileiro, observa-se que a substituição dos combustíveis derivados do petróleo, vem sendo intensificada pelo aumento progressivo da fração de biodiesel adicionada ao diesel convencional (KRAUSE, 2008). Neste sentido, o governo brasileiro estabeleceu a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao combustível de petróleo, mediante a Lei 11.097/2005. Essa lei promoveu a introdução progressiva do biodiesel na matriz energética do país, começando com 2%, como o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao diesel. Atualmente, este percentual está fixado em 5% (CNPE, 2009).

Em função das vantagens ambientais do biodiesel sobre o diesel, sua produção e uso têm aumentado continuamente em nível mundial. Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial de biodiesel (tendo ultrapassado a Alemanha em 2011), só perdendo para os Estados Unidos. A produção atual brasileira é de 2,7 bilhões de litros (ANP, 2012), enquanto a mundial gira em torno de 19 bilhões de L (IEA, 2012). Os avanços tecnológicos na produção de biodiesel são grandes e as perspectivas de aumento global de produção são estimadas em 166 bilhões de litros até 2016, envolvendo um mercado que deverá movimentar US\$ 139.6 bilhões (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2011). Entretanto, o consumo mundial de diesel fica em torno de 1 trilhão de litros por ano (IEA, 2012). Estudos recentes (ALTIERI, 2010) indicam como impossível a total substituição do diesel pelo biodiesel de oleaginosas terrestres, desde que as tecnologias de primeira geração são pouco eficientes em termos de conversão de energia, de modo que requerem grande quantidade de matéria-prima, de terras agrícolas e de fertilizantes. Isto traz problemas ambientais que podem negar os benefícios do biodiesel. A solução para o problema é a busca de outras matérias-primas como, por exemplo, as microalgas.

O óleo diesel é um combustível formado na primeira destilação do petróleo e pode ser definido como uma complexa mistura de hidrocarbonetos, contendo compostos aromáticos, n-

alcanos, iso e cicloalcanos, enxofre, nitrogênio e compostos oxigenados. É impossível determinar uma definição exata da composição dos combustíveis derivados do petróleo devido às diferentes fontes de óleo cru e diferentes processos de otimização dos produtos (MULLER, 2011). A FSA do petróleo e dos seus combustíveis derivados é composta por uma mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno), fenóis, hidrocarbonetos alifáticos e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre (ANDERSON *et. al.*, 1974). Dentre essas substâncias as principais responsáveis pela toxicidade aos organismos aquáticos são os HPAs e os hidrocarbonetos monoaromáticos compostos pelos BTEX – (ANDERSON *et. al.*, 1974; SIMONATO *et. al.*, 2008; RODRIGUES *et. al.*, 2010).

1.2 Poluição hídrica por combustíveis

Diante das perspectivas de aumento da produção e uso do biodiesel, a avaliação dos riscos de derrames de biodiesel e de possíveis danos aos organismos aquáticos devem ser avaliados para proverem meios mais eficientes de controle e prevenção. Observa-se que no processo de produção e na distribuição dos combustíveis existem riscos de acidentes ambientais, podendo ocorrer contaminação de ecossistemas. Em caso de derramamento de combustível no meio ambiente, estes compostos sofrem inúmeros processos de partição ambiental que determinam o destino do poluente e seus possíveis impactos. No caso do biodiesel, quando em presença de água, a reação de transesterificação pode ser parcialmente revertida, gerando novamente o metanol que é reconhecidamente tóxico (NASCIMENTO *et al.*, 2009). LAPINSKIENÉ *et al.*, 2006, demonstraram que a fração solúvel do biodiesel (óleo de canola e metanol), é menos tóxica que o diesel, uma vez que só provoca efeitos tóxicos em microorganismos do solo em concentrações (w/w) maiores que 12%, enquanto o diesel fóssil já apresenta esta característica negativa em concentrações acima de 3%. Embora seja atribuída ao biodiesel uma mais baixa toxicidade em relação ao diesel (LAPINSKIENÉ *et al.*, 2006), a toxicidade de suas frações solúveis podem se constituir em risco ambiental considerável, em virtude da possibilidade de derrames em corpos de água (PEREIRA *et al.*, 2011).

De todos os problemas causados por poluição ambiental, um dos mais importantes é a contaminação das águas e a conseqüente escassez dos recursos hídricos de boa qualidade. Dentre os diferentes tipos de poluentes, os derivados de petróleo são um dos mais relevantes

para a ecotoxicologia aquática (PACHECO; SANTOS., 2001) e têm causado bastante preocupação, tanto pela frequência dos eventos de contaminação, como pelo elevado potencial poluidor dos seus compostos. A contaminação de águas subterrâneas por esses compostos orgânicos também representa sérios riscos à saúde pública e aos ecossistemas (TIBURTIUS *et al.*, 2009). A entrada de petróleo e derivados no ambiente aquático é atribuída principalmente a acidentes com tanques de armazenamento, a grandes derramamentos e descargas de resíduos municipais e industriais. Consequentemente, os componentes do petróleo e de seus derivados podem atingir os rios e outros ecossistemas aquáticos; em vista disso a investigação dos efeitos tóxicos desses contaminantes em organismos aquáticos é de extrema importância (PACHECO; SANTOS., 2001), principalmente em função da frequência com que episódios de contaminação são verificados e da gravidade com que o meio ambiente é afetado. Embora grandes vazamentos de petróleo sejam preocupantes e ocupem grande espaço na mídia, estima-se que a principal fonte de contaminação por petróleo e seus derivados deva-se a pequenos e contínuos vazamentos de combustíveis em postos de distribuição, favorecidos pelo envelhecimento dos tanques (TIBURTIUS *et al.*, 2009).

Acidentes ambientais, como derrames de combustíveis fósseis, constituem a principal fonte de contaminação aguda (KENNISH, 1992) de corpos de água. Em escala mundial, destaca-se o rompimento do navio tanque Prestige na costa da Espanha em 2002 derramando mais de 60.000 toneladas de óleo, cujos efeitos mais dramáticos foram observados na região da Galicia, afetando também a costa inglesa (SORIANO *et al.*, 2006). No Brasil, destacam-se o derrame de 1,3 milhões de litros de óleo na Baía da Guanabara, Rio de Janeiro, em janeiro de 2000; o vazamento de 4 milhões de litros de óleo nos rios Barigui e Iguazú, no estado do Paraná em julho do mesmo ano; e em novembro de 2004, o vazamento de mais de 6 milhões de litros de diferentes tipos de óleo em Paranaguá (PR). Em todos estes eventos foram observados impactos em diversos ecossistemas (FILHO, 2006).

Apesar dos efeitos tóxicos na biota serem aparentes nesse tipo de derrame, alguns ecossistemas aquáticos são submetidos a uma contaminação crônica. Esses ecossistemas recebem um aporte contínuo de efluentes do petróleo como resultado do consumo de combustíveis ou por lixiviação do solo em áreas urbanas. (KENNISH, 1992; FILHO, 2006). De acordo com Filho (2006), a contaminação crônica provocada pelo consumo de petróleo e seus derivados, seja por carros, barcos, navios, lixiviação de solo em áreas urbanas,

vazamentos em postos de combustível corresponde a maior parcela de petróleo introduzida nos corpos hídricos. No Brasil, de acordo com a Resolução nº. 273 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2000), toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e outros configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais.

No caso dos combustíveis renováveis, riscos de armazenamento e transporte podem ocorrer nas mesmas circunstâncias que combustíveis fósseis, promovendo sérios distúrbios nos ecossistemas aquáticos, uma vez que suas frações solúveis em água (FSA) podem alcançar águas naturais, tornando-se biodisponíveis aos organismos aquáticos. Componentes presentes nas FSA das blendas diesel/biodiesel, por exemplo, os hidrocarbonetos aromáticos monocíclicos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) e os hidrocarbonetos poliaromáticos ou policíclicos (PAH), são tóxicos e potencialmente mutagênicos e/ou carcinogênicos (KHAN, 1998; TELES *et al.*, 2003). Vale salientar que os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de origem petrolífera são uma das classes de poluentes mais frequentemente encontradas nos ambientes aquáticos (KETTRUP; MARTH, 1998). Benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos (BTEX) e os hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH) são frequentemente associados com poluição por combustíveis fósseis, gerando altos níveis de efeitos tóxicos (KHAN, 1998; PAIXÃO *et al.*, 2007). Quando combustíveis fósseis entram em contacto com uma matriz à base de água, vários hidrocarbonetos aromáticos e não aromáticos tornam-se bio-disponíveis. (AL-YAKOOB *et al.*, 1996; VIEIRA, 2004; VANZELLA *et al.*, 2007; HOLLEBONE, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2010; MULLER, 2011). Além disso, a possibilidade da reversão do processo de transesterificação, por hidrólise, biodisponibiliza o metanol, comprovadamente tóxico. Sendo assim, são necessários estudos para a avaliação dos efeitos da poluição por esses combustíveis (ZHANG *et al.*, 2003) e, sobretudo, para o desenvolvimento de técnicas rápidas e de baixo custo, que possam estimar efeitos tóxicos e preveni-los, assegurando a sustentabilidade dos ecossistemas.

1.3 Biomarcadores como instrumentos da ecotoxicologia.

A consciência da necessidade de preservação da biodiversidade é hoje universal entre cientistas e, desde 1992 (Conferência das Nações Unidas em Ambiente e Desenvolvimento, Rio de Janeiro), se tornou um princípio político. A chave deste conceito está no uso de

instrumentos preventivos de poluição. Pesquisas empregando técnicas rápidas e de baixo custo que possam indicar a ação interativa no ambiente de efluentes complexos ou produtos químicos é de fundamental importância para o controle da qualidade ambiental e preservação da biodiversidade. Entretanto, são técnicas utilizadas para indicação da presença de substâncias nos corpos de água. Análises químicas indicam concentrações de substâncias, mas não os possíveis sinergismos, adições entre contaminantes ou sua disponibilidade. Apenas organismos vivos respondem de forma interativa à toxicidade do meio, e por isso devem ser os instrumentos da avaliação de qualidade ambiental (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Nesse contexto, a Ecotoxicologia exerce o papel fundamental de avaliar o efeito das substâncias tóxicas sobre os organismos. Dentre as técnicas utilizadas para avaliação destes efeitos, os biomarcadores podem se mostrar mais adequados e eficientes na determinação da toxicidade, desde que envolvem respostas de organismos vivos a agentes estressores mensuráveis nos níveis bioquímico-celular, fisiológico ou comportamental e constituem respostas adaptativas de avisos. Assim, estas técnicas tornam possível a tomada de decisões corretivas antes que ocorram danos irreversíveis ao organismo. (WALKER *et al.*, 1996; DEPLEDGE, 1994; MARTINS *et al.*, 2005).

Os efeitos adversos dos contaminantes nos organismos incluem os efeitos letais e subletais, como alterações no comportamento, crescimento, desenvolvimento, reprodução e na estrutura dos tecidos. Efeitos adversos em nível celular incluem indução ou inibição de enzimas e ou sistemas de enzimas e suas funções associadas (RAND *et al.*, 1995). Alterações morfo-funcionais têm sido muito utilizadas como biomarcadores para indicar tanto a exposição, quanto os efeitos de poluentes ambientais (ALMEIDA *et al.*, 2005). Os biomarcadores são comumente usados como indicadores bioquímicos, fisiológicos, e histológicos de exposição à xenobióticos ou de efeitos de contaminantes químicos (HUGGETT *et al.*, 1992). A importância destas técnicas é que elas representam medidas de alterações biológicas que podem indicar a presença de contaminantes e fornecer um meio de interpretar níveis ambientais de poluentes em termos biológicos (WALKER *et al.*, 1996).

Apesar das vantagens ambientais, a introdução de biocombustíveis na matriz energética também envolve riscos, sobretudo pela necessidade de produção em grande escala (LEITE *et al.*, 2011). Poluentes orgânicos como hidrocarbonetos entre outros, presentes nas blendas (biodiesel/diesel), vêm sendo liberados no ambiente (VAN DER OOST, *et al.*, 2003). Estudos toxicológicos das distintas misturas biodiesel/diesel, usando microalgas como

organismos testes, indicam menor toxicidade do biodiesel em relação ao diesel e uma correlação positiva entre o aumento da toxicidade com o aumento de hidrocarbonetos presentes na FSA (PEREIRA *et al.*, 2011). No que tange às blendas biodiesel/diesel, pesquisadores afirmam que a dissolução, representada pela Fração Solúvel em Água (FSA) do combustível fóssil é responsável por grande parte da contaminação ambiental causada por acidentes (GRIFFIN; CALDER, 1997; SAEED; AL-MUTAIRI, 1999; ALMEIDA-VAL *et al.*, 2002; NAVAS *et al.*, 2006). Além disso, os ecossistemas aquáticos representam os receptáculos finais de qualquer poluição aquática, atmosférica ou do solo (FLEEGER *et al.*, 2003).

Para avaliar os efeitos adversos desses compostos químicos e o risco potencial que eles representam para os ecossistemas aquáticos, o uso de biomarcadores em peixes tem sido bastante eficiente (VENZELLA, *et al.*, 2007; SIMONATO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010; CRUZ, *et al.*, 2012). Os contaminantes podem manifestar seus efeitos nos peixes em vários níveis de organização, como alterações estruturais em órgãos e tecidos, disfunções fisiológicas e modificações que podem prejudicar o crescimento e a reprodução. Um grande número de biomarcadores relacionados à exposição a poluentes tem sido proposto para avaliar a saúde dos peixes (ADAMS 1990; VAN DER OOST *et al.*, 2003). Entretanto técnicas rápidas, de baixo custo são necessárias para viabilizar correção e prevenção, por exemplo, biomarcadores bioquímicos, genotóxicos e histopatológicos que serão descritos a seguir.

1.4 Biomarcadores bioquímicos

Eventos moleculares e bioquímicos decorrentes da exposição aos agentes tóxicos tendem a ser mais sensíveis, menos variáveis e mais altamente conservados do que parâmetros determinados em nível fisiológico (ADAMS 1990). Assim, vários parâmetros bioquímicos de peixes têm sido utilizados como biomarcadores devido às suas respostas às substâncias tóxicas. Dentre os biomarcadores bioquímicos, os mais extensivamente investigados são as enzimas envolvidas nos processos de desintoxicação de xenobióticos e de seus metabólitos, ou seja, as enzimas de biotransformação (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Como principal órgão metabólico, o fígado desempenha funções importantes na tomada, acúmulo, biotransformação e excreção de xenobióticos nos peixes (JIMENEZ;

STEGEMAN, 1990). As reações envolvidas no metabolismo ou biotransformação destas substâncias incluem duas fases. A fase inicial ou fase I (oxidação, redução, hidrólise), freqüentemente oxidativa, ocorre quando um grupamento funcional polar (ex: OH) é introduzido no contaminante lipofílico, tornando-o mais hidrofílico. Na fase II (conjugação) os metabólitos produzidos na fase I são conjugados com compostos endógenos de ocorrência comum nas células, formando um metabólito secundário. Um importante aspecto desta reação é a conversão de compostos lipofílicos em compostos hidrofílicos, que assim se tornam metabólitos excretáveis. No entanto, os metabólitos produzidos na fase I, podem gerar compostos extremamente tóxicos (DI GIULIO *et al.*, 1995; LANDIS ; YU, 1995; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

O uso de biomarcadores bioquímicos em programas de monitoramento oferece algumas vantagens, por serem, normalmente, os primeiros a serem alterados, por apresentarem boa sensibilidade e relativa especificidade. Por detectarem alterações enzimáticas, os biomarcadores bioquímicos são considerados como sistemas de aviso precoce, indicando a contaminação do ambiente antes que ocorram danos mais severos aos organismos e, possivelmente, ao ecossistema (MCCARTHY; SHUGART, 1990; VAN DER OOST *et al.*, 2003). Dentre os marcadores bioquímicos utilizados destacam-se a atividade da enzima lisossômica β -Glucuronidase (beta-D-glicuronosídeo glicuronohidrolase, EC 3.2.1.31), a atividade da alanina aminotransferase (ALT: EC 2.6.1.1) e aspartato aminotransferase (AST: EC 2.6.1.2) que são objeto do presente estudo.

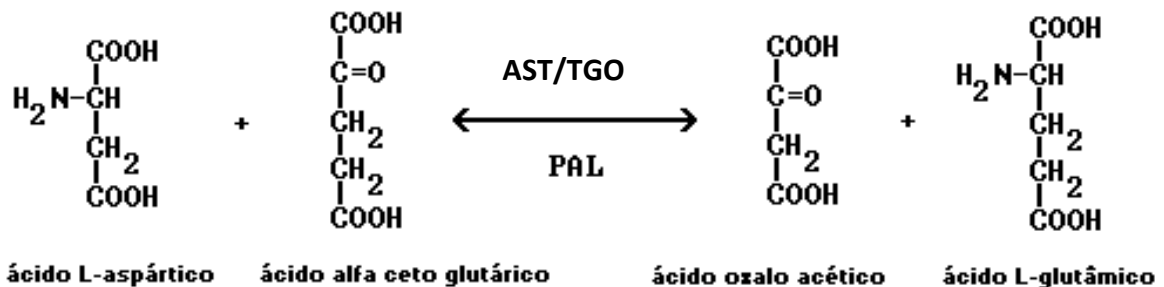
A avaliação da estabilidade da membrana lisossômica vem sendo utilizada como um biomarcador celular generalizado de estresse à poluição (NICHOLSON; LAM 2005). Lisossomas são orgânulos subcelulares circundadas por uma membrana semipermeável que contém muitas enzimas hidrolíticas envolvidas numa série de processos celulares, incluindo digestão e defesa (PIPE, 1993), além de serem os orgânulos responsáveis pela remoção de compostos tóxicos do citosol (STEFANONI; ABESSA 2008). Muitas substâncias tóxicas como hidrocarbonetos, se acumulam nos lisossomos podendo causar danos à membrana lisossômica. Sua integridade e estabilidade costumam ser afetadas por substâncias estressoras sendo, a estabilidade destas membranas considerada um indicador de “bem estar” celular (MOORE *et al.*, 2006). Embora a capacidade de sequestrar contaminantes de locais intracelulares sensíveis seja um mecanismo protetor essencial, torna a membrana lisossômica particularmente suscetível às elevadas concentrações de compostos tóxicos. Com excesso de

substâncias exógenas, a armazenagem intralisossômica pode aumentar a permeabilidade da membrana, levando ao efluxo de enzimas hidrolíticas e aumento da atividade autolítica da célula (NICHOLSON, 2001). A fragilidade das membranas lisossômicas é quantitativamente relacionada ao nível de estresse induzido por xenobióticos (MOORE 1985). Muitos estudos têm demonstrado que a avaliação da permeabilidade da membrana lisossômica é um biomarcador útil, robusto, generalizado e prático, uma vez que os lisossomos são alvo de uma vasta gama de poluentes e estão presentes em todas as células nucleadas (FREIRE *et al.*, 2008). Mas, estudos relacionados a biocombustíveis são raros, utilizando estas organelas, embora o valor deste método como biomarcador geral de poluição tenha sido demonstrado em vários estudos (RANK *et al* 2007, CRUZ *et al.*, 2012) sendo considerado um ensaio de alta sensibilidade e robustez. Segundo FREIRE *et al.*, (2008) a avaliação da estabilidade da membrana lisossômica pode ser considerada um eficiente indicador inespecífico do estresse celular.

Neste sentido, várias hidrolases têm aplicações relevantes no metabolismo de animais e plantas. Entre elas destaca-se a β -glucuronidase (EC.3.2.1.31) que hidrolisa os éteres semi-acetálicos entre o ácido glicurônico e alcoóis ou fenóis (RODRIGUES, 2001). É uma enzima também conhecida por exercer um papel na regulação de glucuronidação de xenobióticos e compostos endógenos (CHILKE, 2010). Quase todos os tecidos possuem atividade β -glucuronidase, sendo o fígado um dos mais ricos. Por sua localização, principalmente no compartimento lisossômico, esta enzima tem sido durante muito tempo, utilizada como marcador enzimático deste compartimento celular (RODRIGUES, 2001). Estudos em relação ao nível de β -glucuronidase no fígado de peixe ainda são pouco disponíveis (CHILKE, 2006). Recentemente, Chilke (2010) estudou as propriedades cinéticas da β -glucuronidase em fígado e rim do peixe *Labeo rohita*. Contudo, a atividade da β -glucuronidase no fígado tem sido notado em ratos com cirrose induzida por tetracloreto de carbono (MELEN, *et al* 1985), e organofosforados (WILLIAMS (1970); INAYAT-HUSSAIN *et al.*, 2007).

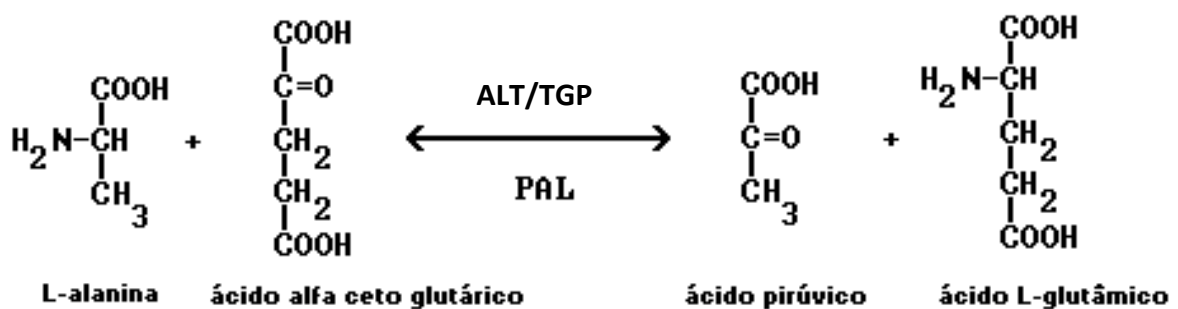
A presença de agentes químicos poluentes no meio pode levar a alterações hepáticas drásticas, tanto de ordem bioquímica, como histológica. Como consequência os níveis plasmáticos de várias enzimas indicativas da integridade deste órgão podem apresentar-se alteradas, proporcionalmente ao dano celular (HEATH, 1995). Assim sendo, a avaliação dos níveis enzimáticos de aspartato aminotransferase (AST/TGO) e alanina aminotransferase (ALT/TGP), normalmente baixos, pode contribuir de maneira significativa para o

entendimento das alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas provocadas pela exposição de peixes aos xenobióticos (KAVITA *et al.*, 2010; THOMAS, 1990). As aminotransferases são enzimas encontradas em vários órgãos e tecidos, incluindo o fígado. A ALT é uma enzima de origem predominantemente hepática, sendo encontrada em pequenas quantidades no coração e musculatura esquelética enquanto a AST é encontrada em concentração muito alta no músculo cardíaco, no fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas. A AST/TGO atua catalisando a transferência reversível do grupo amínico dos aminoácidos L-glutâmico ou L-aspártico para cetoácidos específicos como o α -cetoglutárico ou oxaloacético respectivamente:



Fonte: Rodrigues, 2001

A ALT/TGP catalisa a reação de transferência do grupo amínico da L-alanina para o ácido α -cetoglutárico. Este é o sentido fisiológico da reação:



Fonte: Rodrigues, 2001.

O piruvato, depois de descarboxilado, é geralmente utilizado energeticamente, via ciclo de Krebs, na maioria dos tecidos. As alterações na atividade destas enzimas, nos organismos aquáticos, podem servir como indicadores de toxicidade. El-Shehawi (2007), determinou a atividade das transaminases (AST e ALT) em *O. niloticus* para monitoramento da poluição aquática. Estas enzimas foram também eficientes para estimar o efeito de resíduos

acumulados de agrotóxicos (SAQIB *et al.*, 2005, VIJAYAVEL ; BALASUBRAMANIAN., 2007) e metais (KAVITHA *et al.*, 2010, KUMARI *et al.*, 2011). Modificações bioquímicas ou fisiológicas, geralmente precedem alterações genotóxicas ou ocorrem concomitantemente como consequência das mesmas.

1.5 Biomarcadores de genotoxicidade

Nos últimos anos tem aumentado o interesse na área da toxicidade/genotoxicidade causada pela poluição ambiental. Os peixes se constituem em um dos modelos para monitoramento genotóxico aquático pela habilidade de metabolizar xenobióticos e, em alguns casos, apresentarem acúmulo de poluentes. O teste de micronúcleo tem sido utilizado para análise de toxicidade genética em várias espécies de peixes (DE FLORA *et al.*, 1993; ALSABTI; METCALFE 1995; GRISOLIA; CORDEIRO, 2000). O teste de micronúcleo (MN) em tilápia tem sido largamente utilizado como biomarcador na avaliação de respostas à xenobióticos (ÇAVAS; ERGENE-GOZUKA, 2003; MATSUMOTO, *et al.*, 2005; SOUZA; FONTANETTI, 2006), embora não tenha sido aplicado à estimativa de danos ecotoxicológicos causados por combustíveis em corpos aquáticos.

Por não ser uma molécula estática, o DNA de um organismo frequentemente apresenta suas bases expostas a agentes naturais e artificiais, que provocam modificações químicas e estruturais. Tais alterações do material genético são consideradas mutações quando não resultam de segregação ou recombinação (CABRIOTI, 2005). Micronúcleos são cromossomos ou fragmentos destes, formados durante a divisão celular (anáfase) em consequência de um evento clastogênico (quebra cromossômica) ou aneugênico (segregação cromossômica anormal).

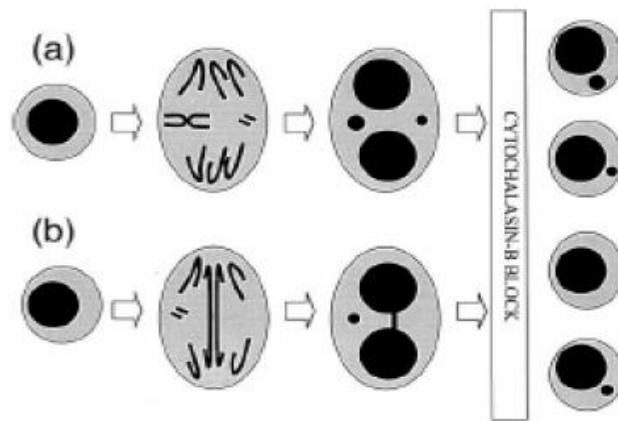


Figura 02 Formação de micronúcleo em eritroblasto. (a) ação do agente clastogênico com quebra cromossômica. (b) ação do agente no fuso mitótico. Fonte: Fenech, 2000.

Micronúcleos são biomarcas expressas nas células filhas em decorrência de danos induzidos às células mães (RIBEIRO, 2003). De acordo com ÇAVAS; ERGENE-GOZUKARA (2003), alterações morfológicas nucleares (AN) são consideradas biomarcas de estresse ambiental; tais alterações morfológicas nucleares são indicadores de citotoxicidade, enquanto que micronúcleos indicam genotoxicidade (BENINCÁ, 2006).

1.6 Biomarcadores histológicos

Dentre os biomarcadores mais utilizados, destacam-se os histopatológicos aplicados em peixes, que têm sido propostos como ferramentas sensíveis para diagnosticar efeitos tóxicos diretos e indiretos que afetem tecidos destes animais. A histopatologia se constitui em um dos métodos rápidos e sensíveis na detecção dos níveis tóxicos de exposição, refletindo o nível de poluição do ambiente aquático (CAZENAVE *et al.*, 2005). Consequentemente são também instrumentos importantes para biomonitoramento da qualidade da água (HEATH, 1995; SCHWAIGER *et al.*, 1997; ALBINATI, *et al.*, 2009). Entretanto, a escolha dos órgãos que serão alvos de estudo é crucial para a relevância dos dados obtidos. Diferentes órgãos de peixes reagem de maneira diversa, ou com intensidade diferente à presença de uma substância tóxica (CAZENAVE *et al.*, 2005). Órgãos de contato direto com o agente tóxico, como as brânquias e os órgãos de metabolismo e excreção de xenobióticos – como o fígado, podem indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica desses agentes em tecidos animais (LINS, *et al.*, 2010). Danos às brânquias e ao fígado de peixes expostos a contaminantes derivados de petróleo têm sido amplamente utilizados nos últimos anos como parâmetros para avaliação da

qualidade de diferentes ambientes (SIMPSON *et al.* 2000; STENTIFORD *et al.*, 2003; AKAISHI *et al.*, 2004; NERO *et al.*, 2006; SIMONATO *et al.*, 2008; RODRIGUES, *et al.*, 2010; PAL, *et al.*, 2011). Nero *et al.*, (2006) afirmam que as análises histopatológicas usadas para a avaliação das alterações no fígado e brânquias são ferramentas eficientes na detecção dos efeitos do óleo sobre o organismo dos peixes, assim como no biomonitoramento de áreas supostamente impactadas (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005). Entretanto, são escassos os estudos relacionados aos biocombustíveis visando comparar seus efeitos tóxicos aos causados pelos combustíveis fósseis.

Em razão de importantes características como grande superfície de absorção, pequenas distâncias de difusão e grande fluxo contracorrente, as brânquias são consideradas órgãos dominantes na captação e absorção de substâncias dissolvidas na água, relacionadas a alterações fisiológicas no organismo (GARCIA-SANTOS, *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2008). A maioria dos peixes respira através de brânquias que estão localizadas na cavidade opercular e são divididas em arcos. Dos arcos divergem filamentos branquiais nos quais se inserem duas fileiras de lamelas secundárias, como ocorre na maioria dos teleósteos (FERGUSSON, 1989). As lamelas são ricamente vascularizadas, revestidas por um epitélio pavimentoso simples, sustentado por células pilares, as quais formam lacunas por onde se inserem os capilares sanguíneos (HIBIYA, 1982). Essa estrutura é responsável pelas trocas gasosas (hematose), além de ser o primeiro local de excreção, exercendo um importante papel no balanceamento iônico (BALDISSEROTTO, 2002). Segundo GARCIA-SANTOS *et al.*, (2007) e CRUZ, *et al.*, (2013) as brânquias são importantes também nas trocas gasosas (O₂/CO₂), na regulação osmótica, no balanço ácido-básico e no transporte e excreção de compostos nitrogenados. Essa multifuncionalidade faz das brânquias um órgão chave no monitoramento dos poluentes presentes no meio aquático. Nesse sentido, as alterações histológicas são reconhecidas como método rápido e válido na caracterização dos danos causados pela exposição dos peixes a diferentes poluentes (GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007).

Em estudos de impacto ambiental, as brânquias apresentam diversas alterações patológicas indicativas de poluição. A exposição de peixes a pesticidas organofosforados resulta em alterações morfológicas de brânquias, as quais têm sido relatadas por diversos autores. O estudo de *Lepomis macrochirus*, exposto à concentração aguda do malation, levou a necrose, edema, descolamento do epitélio e fusão de lamelas secundárias, acrescidos de deslocamento de epitélio e destruição da integridade lamelar secundária, quando o estudo foi

realizado com *Oreochromis niloticus* (RUDNICKI, 2004). Simonato (2006), em avaliação do efeito de óleo diesel sobre curimbatás, observou alterações vasculares como congestão, aneurisma e hemorragia, além de lesões estruturais como descolamento do epitélio, fusão lamelar, hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar, além de rompimento e descamação epitelial. Peixoto *et al.*, (2008), em experimento com herbicida em *Oreochromis niloticus*, observaram hiperplasia das células de revestimento, desenvolvimento do epitélio interlamelar e início de fusão apical das lamelas secundárias. Santos *et al.*, (2011) observaram alterações severas em brânquias de *Trachinotus carolinus* após exposição ao naftaleno. Altinok e Capkin (2007) avaliaram o efeito do agrotóxico endossulfan sobre brânquias, fígado, rins, baço e cérebro de trutas arco-íris. Alterações significantes foram observadas nestes órgãos.

Além das brânquias, o fígado também pode ser considerado um órgão-alvo em águas contaminadas, devido a sua grande importância no metabolismo de xenobióticos e sua alta sensibilidade a esses compostos. Portanto, alterações na estrutura hepática podem ser significativas na avaliação do estresse em peixes (HEATH, 1995). O fígado é uma glândula digestiva composta por parênquima celular (hepatócitos) e por fibras que promovem sua sustentação. A superfície hepática é revestida por uma membrana serosa e o tecido conectivo dessa cápsula penetra no parênquima hepático. Os hepatócitos são células uninucleadas com forma poligonal que possuem importantes funções metabólicas. Também é possível visualizar no fígado vascularização de grande calibre, sinusóides (vasos sanguíneos de pequeno calibre), ductos biliares, tecido pancreático e centro melanomacrofágico (HIBIYA, 1982). De acordo com Hinton; Lauren (1990) existem muitas razões para selecionar o fígado como um importante órgão em estudos de toxicologia. O fígado é o primeiro órgão a atuar na biotransformação de xenobióticos e excreção de alguns metais pesados; atua na estocagem de carboidratos (glicogênio) e, especialmente em peixes, acumulam lipídeos. O fígado é um dos órgãos mais afetados por lesões provocadas por agentes químicos, devido a sua importante participação em reações do metabolismo e na biotransformação de substâncias químicas no organismo. As lesões do fígado associadas a agentes químicos abrangem desde alterações bioquímicas e estruturais adaptativas, até lesões morfológicas com danos muitas vezes irreversíveis do metabolismo ou da estrutura celular (MADUENHO; MARTINEZ *et al.*, 2008.)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar a toxicidade das frações solúveis em água (FSA) de B100 (biodiesel) produzido por via metílica, B5 comercial (5% biodiesel/95% diesel) e diesel, por meio da verificação de alterações dos biomarcadores bioquímicos, de genotoxicidade/citotoxicidade e histológicos em *Oreochromis niloticus*.

2.2 Objetivos específicos:

Determinar e quantificar as principais substâncias disponíveis nas frações solúveis em água (FSA) dos diferentes tipos de combustíveis.

- Determinar, em homogeneizado de fígado de *O. niloticus*, expostos às FSA de B100, B5 comercial e diesel, a atividade da:
 - enzima lisossômica β -glucuronidase - EC 3.2.1.31
 - enzima alanina aminotransferase (ALT/TGP) - EC 2.6.1.2
 - enzima aspartato aminotransferase (AST/TGO) - EC 2.6.1.1
- Determinar, em sangue de *O. niloticus*, expostos e não expostos às FSA de B100, B5 comercial e diesel, a frequência de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares (AN) em eritrócitos .
- Verificar alterações histopatológicas e fazer avaliação semiquantitativa das lesões em brânquias e fígado de *O. niloticus*.
- Correlacionar as possíveis alterações enzimáticas e genotóxicas (ou mutacionais), e histológicas com a análise química das frações solúveis em água (FSA), para comparar e explicar a toxicidade potencialmente encontrada pelos diversos biomarcadores aplicados ao diesel, blenda B5 e biodiesel.

3. RESULTADOS E PRODUTOS GERADOS

3.1 ARTIGO 01

Avaliação ecotoxicológica em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), expostos às frações solúveis de biodiesel e petrodiesel: efeitos bioquímicos e mutagênicos

Maria Bernadete Neiva Lemos Leite¹, Luiz Erlon Araujo Rodrigues², Iracema Andrade Nascimento¹.

¹ Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento – LABIOMAR. Instituto de Biologia – Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA

² Laboratório de Pesquisas Básicas da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (FBDC), Salvador/BA.

Este artigo será submetido à revista: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, is a peer-reviewed Journal; portanto, foi elaborada no formato segundo os padrões da revista.

RESUMO

Efeitos tóxicos em Tilápias expostas às frações solúveis em água (FSA) de B100, B5 e Diesel foram estimados por biomarcadores enzimáticos (β -Glucuronidase, Aspartato-aminotransferase - AST, Alanina-aminotransferase - ALT) e genotóxicos (presença de micronúcleos- MN e de anormalidades nucleares - NA). A β -glucuronidase apresentou efeito dose/resposta significativo ($p < 0,05$) em 46 e 100% das FSA de B5 e Diesel e de 100%, da FSA de B100. Houve aumento significativo de atividade ALT em 46 e 100% das FSA dos três produtos testados. AST não mostrou diferença significativa entre as concentrações e o controle. A presença de MN foi significativa em peixes expostos a 10 e 22 % das FSA de B5 e Diesel e de 22%, da FSA de B100, enquanto AN aumentaram significativamente a partir de 46%. Apesar das análises GC evidenciarem apenas o metanol como possível contaminante presente no B100 enquanto o B5 e o Diesel apresentaram teores de hidrocarbonetos aromáticos, acima de níveis legislados para água de consumo humano, o B100 ativou respostas enzimáticas e citogenotóxicas em peixes, indicando possíveis riscos para a biota aquática.

Palavras chave: β -Glucuronidase, aminotransferases, micronúcleos, *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

Toxic effects on *Tilapia* exposed to water-soluble-fractions (WSF) of biodiesel (B100), its blend (B5) and Diesel were estimated by biomarkers such as β -Glucuronidase, Aspartate-aminotransferase (AST), Alanine-aminotransferase (ALT), besides the presence of micronuclei (MN) and other nuclear abnormalities (AN). β -glucuronidase activity increased under exposition of 46% and 100%-B5 and Diesel-WSF, and 100% B100-WSF. A significant increase of ALT activity was showed under 46%- and 100%-WSF-exposure of all the tested products. AST showed no significant difference in relation to control. The presence of MN was significant at exposures of 10 and 22%-WSF of B5 and Diesel, and to 22%-WSF of B100, while AN increased significantly under exposures from 46% and 100%-WSF, for all tested products. Despite the GC analyzes showing only methanol as a possible contaminant in B100, while B5 and Diesel showed high levels of PAH, Biodiesel has activated enzymatic and cytogenotoxic responses in fishes, indicating possible risks to aquatic biota.

Key words: β -glucuronidase, aminotransferases, micronúclei, *Oreochromis niloticus*.

1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes energéticas alternativas tem aumentado recentemente, devido à preocupação em diminuir a dependência dos combustíveis fósseis e os índices elevados de poluição por eles gerados (Goldemberg, 2011). A utilização de biocombustíveis como o biodiesel, produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras (Fukuda et al. 2001; Ramandhas et al. 2005) é uma das opções mais utilizadas por alguns países, inclusive Brasil (ANP, 2011). A introdução do biodiesel na matriz energética brasileira foi autorizada em 2005 pela Lei 11097. No entanto, somente em 2008, a mistura diesel/biodiesel (2%) foi tornada obrigatória. No Brasil, já vem sendo adicionado 5% desse biocombustível ao diesel, desde 2010.

O alto potencial de biodegradabilidade do biodiesel, bem como a redução relativa de CO, CO₂ e material particulado nas emissões da queima de biodiesel em relação ao diesel, além da ausência de hidrocarbonetos aromáticos e de enxofre, contribuem para a redução do efeito estufa, e representam vantagens ambientais deste biocombustível em relação aos combustíveis fósseis. (Atadashi et al. 2010). Embora tenha sido atribuída ao biodiesel uma mais baixa toxicidade em relação ao diesel (Lapinskien et al. 2006), a toxicidade de suas frações solúveis podem se constituir em um risco ambiental considerável, em virtude da possibilidade de derrames em corpos de água (Pereira et al. 2011). Os combustíveis, de forma acidental ou deliberada, podem atingir os corpos hídricos, causando efeitos à biota (Cavas; Ergene-Gozukara. 2005). Poluentes orgânicos como hidrocarbonetos entre outros, presentes nas blendas de biodiesel, vêm sendo liberados no ambiente (Van Der Oost et al. 2003), assim como o metanol, liberado pela hidrólise do biodiesel, causando uma reversão parcial do processo de transesterificação, quando acidentalmente este biocombustível atinge corpos de água (Nascimento et al., 2009) . Apesar destas evidências, os efeitos adversos desses compostos químicos e o risco potencial que eles representam para os ecossistemas aquáticos ainda não foram avaliados, de modo a garantir uma perfeita análise dos riscos. Neste sentido, o uso de biomarcadores em peixes tem sido bastante utilizado (Venzella, et al. 2007; Rodrigues et al. 2010; Cruz et al. 2012). Livingstone (1993) considera como biomarcadores os fluídos corpóreos, as células ou os tecidos que indicam, em termos bioquímicos ou celulares, a presença de contaminantes. Também considera como biomarcadores, as respostas fisiológicas, comportamentais ou energéticas dos organismos expostos.

As respostas dos lisossomos são amplamente aceitas como biomarcadores de estresse geral (Cajaraville et al. 1998). Os lisossomos são orgânulos citoplasmáticos multifuncionais, cuja integridade é essencial para garantir a resistência do organismo às doenças. Eles desempenham um papel central na desintoxicação de contaminantes, na degradação de materiais fagocitados e na defesa imune celular (Moore 1985; Cajaraville et al. 1995). Como estas funções são processos dependentes da membrana, a estabilidade da membrana lisossômica, tem sido usado para determinar a eficiência dos lisossomos como biomarcadores de efeitos tóxicos e no desempenho do sistema imunológico. (Moore et al. 1987, Marigomez et al. 1996). De modo geral, a exposição a contaminantes aumenta significativamente o tamanho lisossômico (Moore 1987; Cajaraville et al. 1998; Regoli et al. 1998), que é geralmente acompanhada por uma redução na estabilidade da membrana lisossomal (Regoli et al. 1998). Em certos casos, outras respostas tais como aumento na atividade de enzimas lisossômicas (Cajaraville et al. 1989; Marigomez et al. 1996) foram observadas (Moore et al. 1987; Krishnakumar et al. 1994).

Para executar suas múltiplas funções, os lisossomos contêm hidrolases que são enzimas capazes de quebrar as moléculas dos seus substratos, interpondo os íons da água nos grupamentos atômicos resultantes. São, portanto, fisiologicamente mais ligadas aos processos de transformações catabólicas que aos de biossíntese (Rodrigues, 2001,. Algumas delas, ligadas aos processos digestivos e de desintoxicação celulares são extremamente importantes no diagnóstico de certas afecções relacionadas aos órgãos responsáveis pela digestão, absorção e desintoxicação, como o intestino, fígado e rim. Entre elas destaca-se a β -glucuronidase (EC 3.2.1.31) que hidrolisa os éteres semiacetálicos entre o ácido glicurônico e alcoóis ou fenóis (Rodrigues 2001). É uma enzima também conhecida por exercer papel na regulação de glucuronidação de xenobióticos e compostos endógenos (Chilke, 2010). A β -glucuronidase está envolvida na circulação entero-hepática como parte do mecanismo de intoxicação/detoxicação de uma grande variedade de produtos químicos. Portanto, a importância da investigação desta enzima no fígado está relacionada com seu papel no metabolismo hepático de xenobióticos (Lucier; Daniel, 1972).

Quase todos os tecidos possuem atividade β -glucuronidase, sendo o fígado um dos mais ricos. Nas células, esta enzima acha-se localizada principalmente no compartimento lisossômico e tem sido durante muito tempo, utilizada como marcador enzimático deste compartimento celular (Rodrigues, 2001). A avaliação de sua atividade é utilizada como

indicativa de lesão de membrana lisossômica. Embora esta enzima seja importante como marcador enzimático, poucos trabalhos foram feitos em teleósteos (Chilke 2010). No entanto alguns autores têm trabalhado com a cinética da β -glucuronidase em mamíferos, e suas propriedades funcionais em pH ácido (Pettengill; Fishman 1962). Vários estudos tem relatado que a ingestão de organofosforados provoca a liberação de β -glucuronidase no plasma (Inayat-Hussain et al. 2007). Williams (1970) observou aumento da atividade β -glucuronidase no plasma de ratos dentro de algumas horas após exposição ao paration. Recentemente Chilke (2010) estudou as propriedades cinéticas da β -glucuronidase em fígado e rim do peixe *Labeo rohita*, fornecendo subsídios para o uso desta enzima como biomarcadora de toxicidade. Entretanto, trabalhos sobre sua atividade decorrente de exposiç

Alterações no metabolismo hepático são observadas com frequência em organismos expostos a contaminantes. Um possível dano ao fígado pode ser também avaliado quando são verificadas alterações na atividade de enzimas, como alanina aminotransferase (ALT: EC 2.6.1.2) e aspartato aminotransferase (AST: EC 2.6.1.1) (Asztalos et al. 2001). Essas enzimas podem ser usadas para detectar dano tecidual causado por substâncias tóxicas, também no monitoramento aquático (Nemcsok; Benedecky. 1990). A AST atua catalizando a transferência reversível do grupo amínico dos aminoácidos L-glutâmico ou L-aspartico para cetoácidos específicos como o α -cetoglutárico ou oxaloacético respectivamente. A ALT catalisa reação de transferência do grupo amínico da L-alanina para o ácido α -cetoglutárico (Rodrigues, 2001). Portanto estas enzimas participam em reações de transaminação e são encontradas predominantemente no fígado, células cardíacas e tecidos muscular estriado. Danos celulares liberam o ALT e AST na corrente sanguínea e os níveis dessas enzimas ou o aumento de suas atividades têm potencial para indicar hepato-toxicidade (Kumari et al. 2011).

Entre os biomarcadores utilizados para a avaliação de respostas aos xenobióticos, está o ensaio de micronúcleo (MN). O teste de micronúcleo em Tilápia tem sido largamente utilizado (Çavas; Ergene-Gozuka. 2003, Matsumoto et al. 2005; Cabanelas; Moreira 2009). Micronúcleos são cromossomos ou fragmentos destes, formados durante a divisão celular (anáfase) em consequência de um evento clastogênico (quebra cromossômica) ou aneugênico (segregação cromossômica anormal). São biomarcas expressas nas células filhas em decorrência de danos induzidos às células mães (Ribeiro 2003). De acordo com Çavas; Ergene-Gozukara (2003), alterações morfológicas nucleares (AN) são consideradas biomarcas de estresse ambiental; tais alterações morfológicas nucleares são indicadores de

citotoxicidade, enquanto que micronúcleos indicam genotoxicidade (Benincá, 2006). Por não ser uma molécula estática, o DNA de um organismo frequentemente apresenta suas bases expostas a agentes naturais e artificiais, que podem provocar modificações químicas e estruturais. Tais alterações do material genético são consideradas mutações, quando não resultam de segregação ou recombinação (Cabriotti, 2005).

O objetivo do presente estudo foi estimar e comparar a toxicidade das frações solúveis em água (FSA) de B100 (biodiesel) produzido por via metílica, B5 comercial (5% biodiesel/95% diesel) e diesel, por meio dos marcadores enzimáticos como β -glucuronidase, alanina- aminotrasferase (ALT/TGP), aspartato-aminotransferase (AST/TGO) e pelo teste de micronúcleo (MN) e alterações nucleares (AN) em *Oreochromis niloticus*. A eficiência e facilidade de uso como biomarcadores de toxicidade, poderão possibilitar a indicação dos mais apropriados para monitoramento e prevenção de problemas ambientais causados por combustíveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de combustíveis:

A Petrobrás Biocombustíveis foi fornecedora das amostras de biodiesel B100, cujas características constam no Certificado de Ensaio, destacando-se o teor de éster (99,4 g/100g), teor de triglicerídeos (0,168g/100g), metanol (0,11g/100g), dentre outros. Este biodiesel foi produzido por transesterificação metílica, utilizando óleo de soja (70%), de algodão (20%) e sebo bovino (10%) como matérias-primas. Amostras de Diesel (S500) foram fornecidas pela Petrobrás, (São Francisco do Conde /BA) e as de B5 comercial foram adquiridas em postos de gasolina da bandeira BR. Estas amostras foram mantidas em frascos âmbar, na temperatura de 4° C, no Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento – LABIOMAR/UFBA, até o momento das análises.

2.2 Obtenção da fração solúvel em água – FSA

As amostras dos combustíveis foram tratadas de acordo com Anderson et al., (1974)

para obtenção das frações solúveis em água (FSA). Em frascos de Mariotte, as FSA foram geradas por mistura de uma parte da amostra em nove partes de água destilada (v/v). As misturas permaneceram, sob agitação constante por 20 horas (150 rpm, vórtex da mistura equivalente a 25% da coluna do líquido), seguidas de repouso, por uma hora. A fase aquosa foi utilizada para a realização dos ensaios.

As análises químicas das FSA foram realizadas no Laboratório de controle de qualidade - LCQ na Unidade de Insumos Básicos, Braskem S.A, na Bahia, seguindo procedimento de QA/QC instalado no laboratório. Todas as amostras foram analisadas para monoaromáticos C6-C8 (BTEX), total de hidrocarbonetos pesados (C9s+, representando todos os aromáticos –HC tendo nove ou mais átomos de carbono), e metanol. Os dados cromatográficos (benzeno, tolueno, etil-benzeno, xileno e C9s+ HC aromático) foram obtidos usando cromatógrafo à gás (Varian, modelo CP3800) com um detector de ionização de chama e uma coluna capilar 50 mm x 0,20 mm i.d. X 0.2 µm DB wax, usando hidrogênio como gás de transporte. Um concentrador (Tekmar, modelo de 3000) com uma coluna Tenax foi utilizada para quantificar níveis de hidrocarbonetos. Foram também realizadas análises de condutividade elétrica (Gehaka, modelo CG 2200), pH (Metrohm, 654 modelo), e densidade relativa 20/4 ° C (Anton Paar, 4500 modelo).

2.3 Organismo-teste

Juvenís de Tílápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758 (Teleostei Ciclidae), muito utilizados como modelo biológico em estudos de toxicidade, foram usados como organismos-teste. Esses peixes, (média de $26,40 \pm 3,80$ g de peso) foram adquiridos na Estação de Piscicultura do DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra a Seca) Itiúba, Bahia, e aclimatados por um período de 8 dias, em tanques contendo água desclorinizada. A cada 24 horas, o material fecal era retirado, a água renovada em 1/3 e os organismos alimentados com ração proveniente da estação de piscicultura de origem. Os parâmetros físico-químicos da água dos tanques foram monitorados diariamente durante o período de aclimação e ao longo do período experimental, mantendo-se os níveis recomendados para a espécie (Pereira; Silva. 2012).

2.4 Protocolo experimental

Os animais aclimatados foram distribuídos aleatoriamente em aquários de vidro contendo as soluções-teste, preparadas com as frações solúveis em água (FSA) dos diferentes combustíveis (B100, B5 comercial e Diesel) nas concentrações de 0 (controle), 4.6, 10, 22, 46 e 100%. Em cada aquário foi colocado 01 peixe/4 litros da solução-teste e a aeração foi mantida constante. O controle recebeu somente água desclorinizada como solução-teste. O período de exposição foi de 24h (fotoperíodo de 12 h escuro/12h claro). Foram expostos 10 peixes/tratamento para garantir maior confiabilidade aos resultados. A alimentação dos peixes foi suspensa 24 horas antes do início do experimento e durante o período de exposição. Os aquários foram monitorados quanto aos parâmetros físico-químicos (pH, temperatura, oxigênio dissolvido e amônia total) para evitar interferência nos resultados. As soluções-teste apresentaram os seguintes valores médios: $25 \pm 2^\circ \text{C}$; $\text{pH} = 6,9 \pm 0,3$; OD (oxigênio dissolvido) variou entre 6,2 a 5,2 mg.L^{-1} até a concentração de 46% , reduzindo para 4,0 a 4,8 mg.L^{-1} nas concentrações de 100%, permanecendo dentro dos padrões estabelecidos pela Resolução CONAMA 357, para águas doce de classe 3.

2.5 Efeitos bioquímicos

2.5.1 Coleta e preparo de material biológico:

Decorrido o período de exposição, os animais foram submetidos à: 1) biometria; 2) coleta de sangue por punção branquial para teste de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares (AN); 3) dissecação do animal com retirada do fígado para determinação das enzimas β - glucuronidase, aspartato- aminotransferase e alanina- aminotranferase. Nesta espécie, o tecido pancreático encontra-se difuso no fígado, sendo chamado de pâncreas intra-hepático ou hepatopâncreas (Rotta, 2003)

O preparo das amostras para determinação destas enzimas, consistiu na homogeneização de 200 mg de fígado em 2ml de solução de sacarose 0,25M, utilizando um homogeneizador Potter Elvehjem, com pistilo de teflon, por 2 minutos, seguido de centrifugação a 1500g, em centrífuga refrigerada (4°C) por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzimas para as análises de atividade da β - glucuronidase, aspartato- aminotransferase e alanina-aminotranferase e de proteínas totais. Leituras de absorbâncias

foram realizadas em um espectrofotômetro (Fento 482). As aminotransferases foram determinadas, por colorimetria, com utilização de técnicas empregadas em análises clínicas. Todo o procedimento foi realizado em banho de gelo para conservar a integridade dos tecidos. As análises foram realizadas no LABIOMAR – Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento da UFBA e no Laboratório de Pesquisas Básicas da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (FBDC).

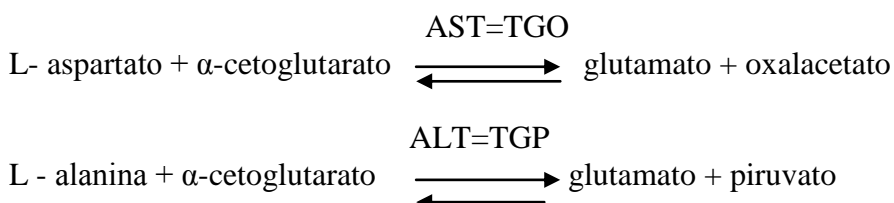
2.5.2 β -Glucuronidase.

A técnica de dosagem da β -glucuronidase se baseou na hidrólise do substrato β -glucoronídeo de fenolftaleína constante do kit da Sigma-Aldrich. A fenolftaleína liberada, proporcional à atividade enzimática, foi quantificada espectrofotometricamente em 540 nm. Maiores detalhes serão encontrados no anexo 01.

Uma unidade "Fishman" corresponde à liberação de 1.0 micrograma de fenolftaleína do substrato glucuronídeo de fenolftaleína por hora em pH 4.5 e 37°C. Para efeito de cálculo, a concentração de proteínas totais nos homogenados foi determinada por espectrofotometria, pela técnica do Folin-biureto, segundo metodologia padronizada por Lowry et al (1951) e modificada por Rodrigues et al. 1989, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Para cada amostra o valor da fenolftaleína liberada por hora foi dividido pelo teor de proteínas totais, obtendo-se assim o valor da atividade específica da β - Glucuronidase, que corresponde a unidade "Fishman"/ (U.F/ μ g de proteínas totais).

2.5.3 Aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase.

As aminotransferases são enzimas que catalisam a transferência de grupamentos amina de α - aminoácidos para α -acetoácidos..



O piruvato e o oxalacetato formados são proporcionais à atividade enzimática e medidos através da formação de suas hidrazonas intensamente coradas, em meio alcalino. A atividade das enzimas ALT e AST no fígado foi estimada utilizando-se kit de laboratório,

segundo o método de Reitman e Franckel (1957). A absorbância foi medida em 505 nm em espectrofotômetro. A curva padrão foi simultaneamente realizada. Os valores foram interpretados a partir da curva padrão e a atividade enzimática foi expressa como U.Reitman e Frankel./mL. Maiores detalhes serão encontrados no anexo 02.

2.6 Efeito Genotóxico: ensaio de micronúcleos e anormalidades nucleares

O sangue foi coletado por punção branquial com seringa heparinizada, e utilizado para formar esfregaços em 3 lâminas de microscopia devidamente identificadas. As lâminas foram secas ao ar por 24h e posteriormente fixadas em solução de metanol a 70%, em tampão fosfato (pH 6,4), por 15 minutos. Após a fixação, as lâminas foram coradas com Giemsa 20%, por 5 minutos, no mesmo tampão. Foram analisadas, de cada exemplar, 2000 células bem evidentes e sem sobreposição (1000 por lâmina, em microscópio óptico, usando lente de imersão e aumento total de 1000x). Foram contados os micronúcleos que apresentaram as seguintes características: (i) morfologia idêntica ao núcleo; (ii) diâmetro entre 1/16 e 1/3 e coloração igual à do núcleo principal; (iii) ausência de refringências;(iv) ausência de ligação, conexão e sobreposição ao núcleo principal (Fenech 2000). Foram também registradas outras alterações nucleares e sua classificação seguiu os critérios de Çavas; Ergene-Gözükara (2003), que discriminaram as seguintes anormalidades nucleares:

- (i) Célula binucleada (BN - célula com dois núcleos bem evidentes e sem sobreposições);
- (ii) Núcleo lobado (LB - com a presença de evaginação);
- (iii) Núcleo bilobado (BL – com uma ou várias evaginações, podendo tornar-se disforme);
- (iv) Núcleo entalhado (NT - que apresenta um corte bem definido em sua forma).

Foram realizadas fotomicrografias de algumas células selecionadas, com auxílio do sistema de captura de imagem (Image Pro), acoplado a um microscópio Olympus.

2.7 Análise estatística

Os dados foram tabulados no software Microsoft Excel e a análise estatística feita no programa GraphPad InStat, com valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos. O Teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para a análise de distribuição. Análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias múltiplas por Tukey-Kramer foi utilizada para determinar a significância estatística das diferenças entre os grupos.

O delineamento experimental para o presente estudo foi composto de dois fatores: tipo de produto com 3 níveis (B5, B100 e Diesel) e concentração com 6 níveis (Controle, 4,6 , 10, 22, 46 e 100 %). Portanto, o fator produto foi aninhado dentro do fator concentração, o que conduziu para um delineamento incompleto, uma vez que não há como incluir o fator produto dentro do nível controle (0 %) do fator concentração. Portanto, os graus de liberdade para o fator produto aninhado na concentração foram $(3-1)*(6-1) = 10$ graus de liberdade. Os graus de liberdade do resíduo foram $160-16 = 144$. Para análise dos dados foi realizada uma análise de variância de dupla entrada para delineamento aninhado incompleto ao nível de significância de 0,05. Quando o fator aninhado foi significativo foi realizado um teste de Tukey para avaliar os tratamentos comparados ao controle ao nível de significância de 0,05 (UNDERWOOD, 1997; DONCASTER; DAVEY, 2007; VAZ, 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises cromatográficas das frações solúveis em água (FSA) de B5 comercial e diesel indicaram a presença de compostos polares de baixo peso molecular, isto é, hidrocarbonetos toxicologicamente relevantes: BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno), compostos não aromáticos e aromáticos (Tabela 01). Esses compostos são os principais responsáveis pela toxicidade aquática do diesel (Anderson et al. 1974, Venzella et al. 2007, Simonato et al, 2008). Foi possível observar que entre os BTEX, o benzeno contribuiu com a maior concentração, seguido do tolueno e xileno, com valores acima dos limites permitidos em água para consumo humano. As amostras de B5 comercial apresentaram concentrações ligeiramente inferiores às observadas para o diesel. Essa diferença ocorre devido às distintas matrizes utilizadas para a obtenção das FSA. Contudo, a FSA de B100, livre de hidrocarbonetos aromáticos, apresentou elevado teor de metanol (83mg/L). O biodiesel pode produzir uma quantidade significativa de metanol quando em contato com uma matriz aquosa conforme foi anteriormente reportado (Pereira et al. 2011).

Tabela 01. Resultados das concentrações de BTEX, hidrocarbonetos aromáticos (C9s+), não aromáticos e metanol nas frações solúveis em água (FSA) de diesel, B5comercial e B100 com os limites máximos permitidos para o BTEX em água para consumo humano (Portaria 1469/2000 do Ministério da Saúde).

Compostos				Limite
	Diesel	B5	B100	Máximo
Benzeno (µg/L)	280	270	0	05
Tolueno (µg/L)	410	420	0	170
Etilbenzeno (µg/L)	100	90	0	200
O-m-p-xileno (µg/L)	1.110	920	0	300
Total BTEX (µg/L)	1.900	1.700	0	675
C9s+ Aromáticos (µg/L)	230	150	40	-
Não aromáticos (µg/L)	200	170	40	-
Metanol (mg/L)	1.9	0.7	83	-

Uma das principais características dos hidrocarbonetos do petróleo é a alta lipossolubilidade, o que faz com que sejam rapidamente absorvidos pelos organismos aquáticos, através das membranas lipídicas das brânquias, pele e trato digestivo, podendo acumular-se no tecido adiposo. Estes compostos tendem a permanecer nos compartimentos orgânicos, através dos processos de distribuição e armazenamento, determinando, assim, seus efeitos tóxicos. O organismo, no entanto, apresenta um conjunto de reações catalisadas por enzimas, conhecido como biotransformação, responsável pela conversão das substâncias lipossolúveis em hidrossolúveis, facilitando, assim, sua eliminação (Pedrozo et al. 2002). Neste sentido, o fígado nos peixes, por desempenhar diferentes funções associadas ao metabolismo de xenobióticos (Jimenes; Stegeman. 1990) é considerado o principal órgão de biotransformação, razão pela qual foi escolhido para o presente estudo.

Alterações na atividade da β -glucuronidase e aminotransferases no sobrenadante do homogeneizado de fígado foram constatados em 24 horas de exposição de *O. niloticus* às

frações solúveis em água dos combustíveis. Nesses organismos, foi possível também observar alterações nos eritrócitos, através do ensaio de micronúcleos e as anormalidades nucleares, indicando que os hidrocarbonetos do petróleo, presentes em B5 comercial e diesel e o metanol, em B100, proporcionaram alterações nestes biomarcadores. Os valores médios e desvios-padrão destes biomarcadores estão apresentados na Tabela 02.

3.1 β -glucuronidase

Os resultados (Tabela 02, Figura 01) obtidos em relação à atividade da enzima lisossômica β -glucuronidase, em homogeizado de fígado, mostraram, para os peixes expostos às FSA de B5 comercial e diesel, um aumento significativo ($p < 0,05$) da resposta enzimática apenas a partir da concentração de 46% das FSA. Nos peixes expostos ao B100 esta diferença ocorreu na concentração de 100%, indicando que a exposição mais acentuada alterou, de forma significativa ($p < 0,05$), a atividade da enzima β -glucuronidase nas concentrações citadas. Possivelmente, os elevados teores de hidrocarbonetos (BTEX) nas FSA de B5 e diesel e de metanol na FSA de B100 (Tabela 01), produtos reconhecidamente tóxicos, aumentaram a fragilidade das membranas dos diferentes compartimentos do lisossômico (Cruz et al. 2012) proporcionando assim a liberação desta enzima para o citosol. Muitas substâncias tóxicas se acumulam nos lisossomos (hidrocarbonetos heterocíclicos e HPAs, íons metálicos, dentre outras), podendo causar perturbação e danos à membrana lisossômica. Os lisossomos e as membranas celulares são os primeiros alvos de efeitos de poluentes uma vez que os lisossomos estão associados com a biotransformação de material estranho, e a membrana é a primeira barreira encontrada pelo xenobiótico (Moore et al 2007). A avaliação da estabilidade da membrana lisossômica vem sendo utilizada como um biomarcador celular generalizado de estresse à poluição (Nicholson; Lam 2005), embora ainda não aplicado à estimativa da toxicidade de combustíveis em ambientes aquáticos.

Nas células, a hidrolase ácida β -glucuronidase, acha-se localizada principalmente no compartimento lisossômico (Rodrigues 2001). Esta enzima é envolvida na circulação entero-hepática como parte do mecanismo de desintoxicação/intoxicação de uma grande variedade de produtos químicos. Assim, a integridade da membrana lisossômica é essencial para a manutenção dos níveis normais de β -glucuronidase nos tecidos e nos fluidos corporais (George, 2008). O comprometimento da integridade desta membrana, proveniente da ação de um estressor, pode resultar na liberação das enzimas lisossômicas para o citosol. Neste

trabalho ficou claro que os elevados níveis de hidrocarbonetos presentes nas amostras de B5 comercial e diesel e o metanol no B100 contribuíram para o aumento da fragilidade das membranas dos vários componentes do compartimento lisossômico e para o consequente aumento da atividade da enzima β -glucuronidase no citosol, em peixes expostos à concentrações mais altas tanto dos hidrocarbonetos, quanto do metanol. Portanto, a elevação da atividade enzimática β -glucuronidase indica um aumento da fragilidade da membrana lisossômica (Myers et al.1993). George (2000) observou uma correlação positiva entre o aumento da peroxidação lipídica no fígado e o aumento da atividade β -glucuronidase e concluiu que a peroxidação lipídica, induzido por estresse oxidativo é um mecanismo de aumento da fragilidade lisossomal. Níveis elevados de β -glucuronidase no soro de ratos foram observados com a indução por tetracloreto de carbono (Rasal et al. 2011).

3.2. Aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase.

A análise estatística mostrou que houve aumento de dose/dependência na atividade da enzima ALT (Tabela 02; Figura 02) entre as concentrações das FSA dos três produtos testados. O grupo controle diferiu significativamente de: B100 nas concentrações de 46% ($p < 0,005$) e 100% ($p < 0,008$); de B5 comercial, em 22% ($p < 0,001$), 46% ($p < 0,001$) e 100% ($p < 0,001$); e de diesel em 46% ($p < 0,001$) e 100% ($p < 0,002$). Entre os três produtos testados, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para a atividade desta enzima. Entretanto, em todas as concentrações, os valores médios foram menores em B100, indicando uma menor toxicidade deste combustível. Assim, a indução da atividade ALT nas concentrações mais elevadas indicou que as FSA de B100, B5 comercial e diesel apresentam efeito tóxico e que esta enzima se mostrou como biomarcador de hepatotoxicidade. Os valores médios de atividade da enzima AST (Tabela 02; Figura 03), por sua vez, mostraram que não houve diferença significativa entre as concentrações e o controle ($p > 0,05$) para os peixes expostos as FSA de B100, B5 comercial e diesel, caracterizando apenas uma resposta de dose/dependência das enzimas analisadas para as concentrações testadas. Neste caso a atividade AST mostrou-se menos eficiente para o diagnóstico da hepatotoxicidade.

Encontrada predominantemente no fígado a ALT pode ser um indicador de alterações fisiológicas para esse órgão, visto que, a AST além de presente no fígado é também encontrada em uma diversidade de tecidos, o que talvez explique os resultados encontrados no presente estudo. Estas duas enzimas exercem um importante papel no metabolismo dos

carboidratos e aminoácidos, no tecido de peixes e de outros organismos (Vinodhini; Muthnswamy, 2008); desempenham um papel importante em condições de estresse ocasionadas por agentes químicos e têm sido objeto de estudos devido à alteração de sua atividade em organismos aquáticos, sob exposição aguda ou crônica (Rao et al. 1999; Nunes et al. 2010; Lin et al 2011; Malarvizhi et al. 2011). Este estudo indica que especialmente a atividade ALT pode ser usada como biomarcadora do dano tecidual e fornece uma nova visão sobre hepato e cardiotoxicidade após a exposição de peixe às FSA de biodiesel e petrodiesel.

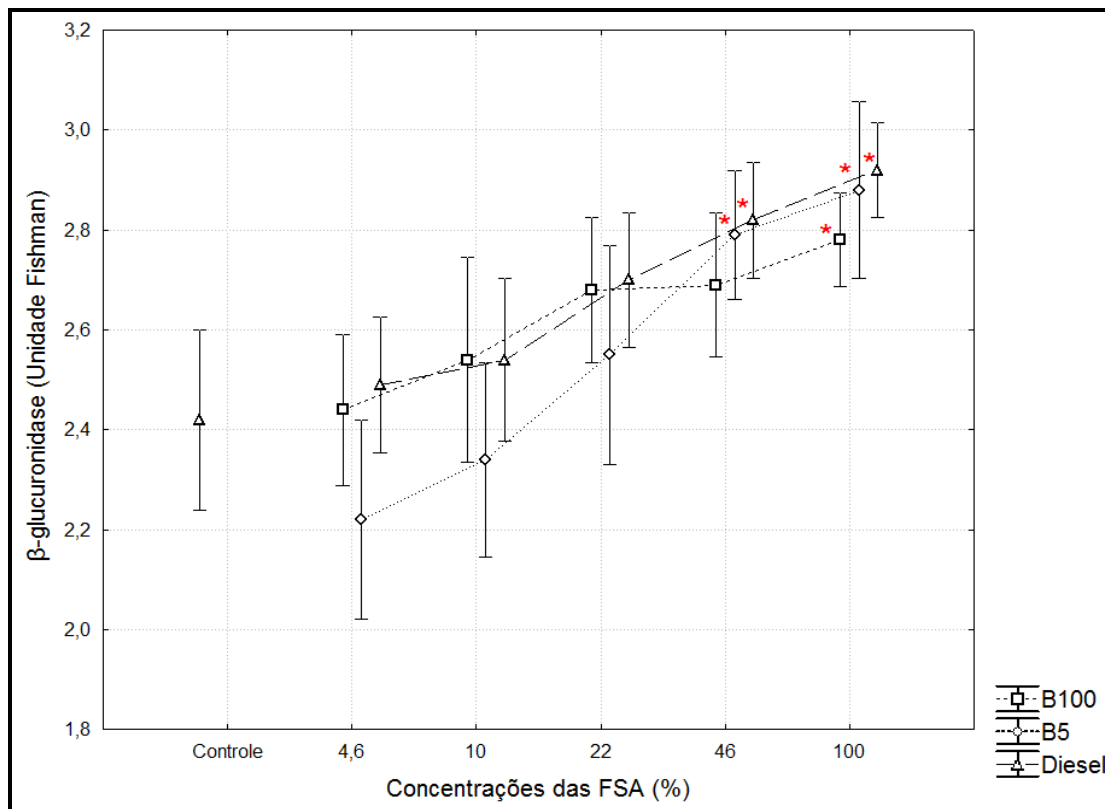


Figura 01. Médias e intervalos de confiança à 95% de probabilidade da atividade β -glucuronidase (Unidade Fishman) nas diferentes concentrações das FSA (eixo x) dos produtos testados (linha). Os asteriscos (*) indicam os tratamentos significativos ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, sempre comparados ao controle.

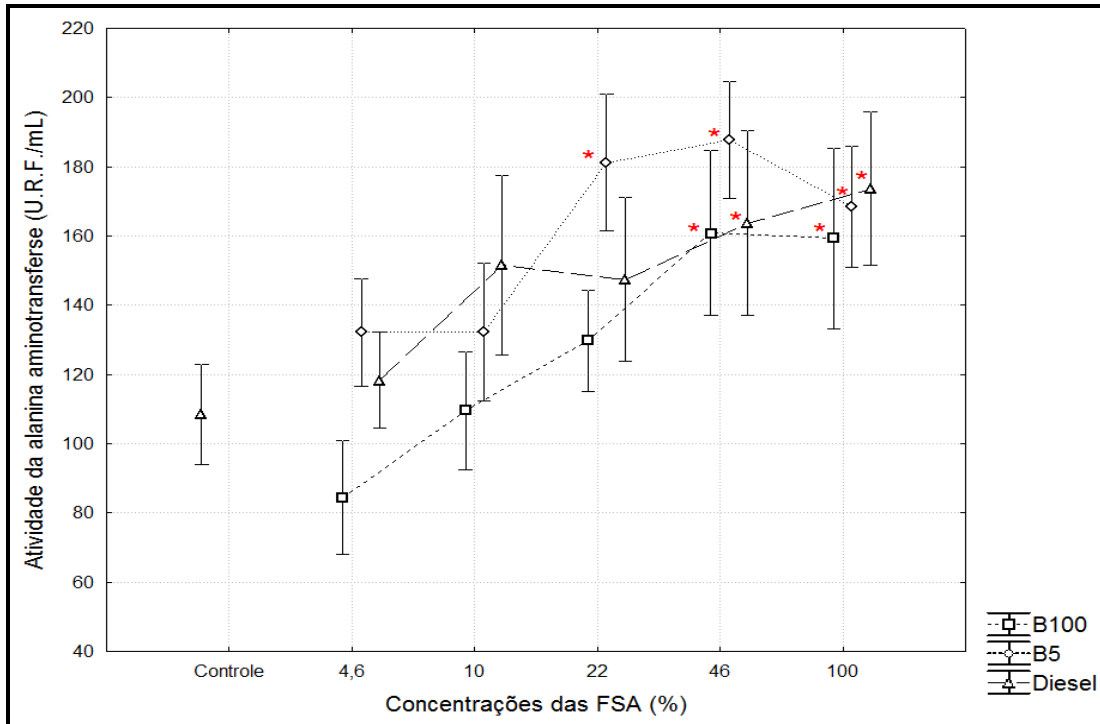


Figura 02. Médias e intervalos de confiança à 95% de probabilidade da atividade alanina-aminotransferase – ALT (U.R.F./mL) nas diferentes concentrações das FSA (eixo x) dos produtos testados (linha). Os asteriscos (*) indicam os tratamentos significativos ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, sempre comparados ao controle.

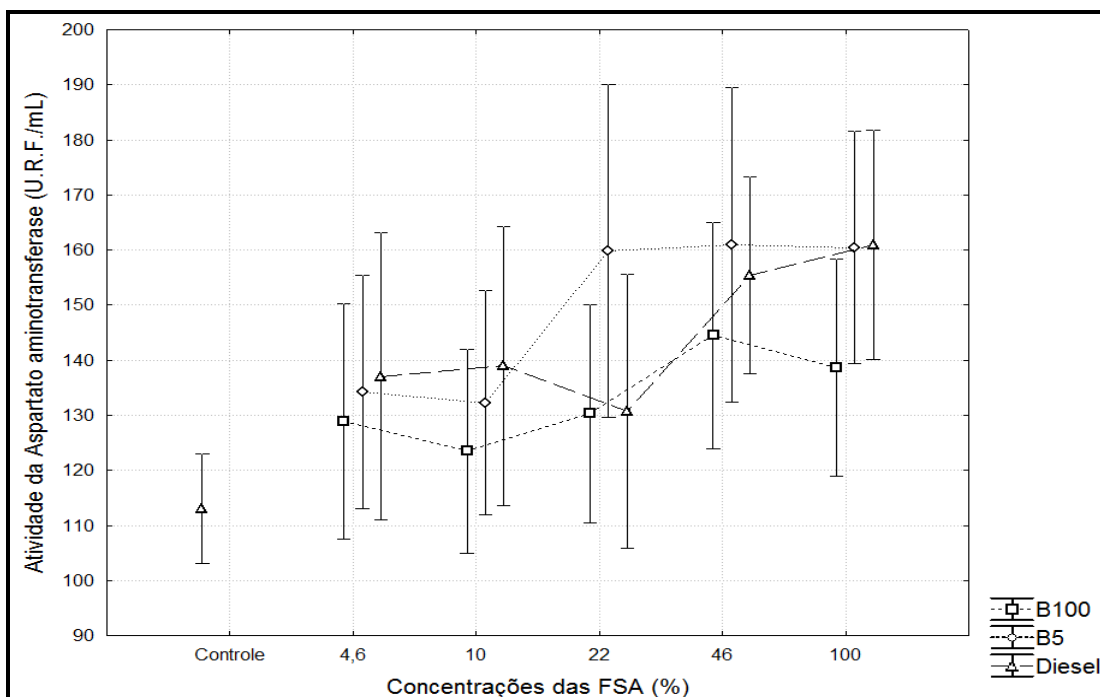


Figura 03. Médias e intervalos de confiança à 95% de probabilidade da atividade aspartato-aminotransferase – AST (U.R.F./mL) nas diferentes concentrações das FSA (eixo x) dos produtos testados (linha). Os tratamentos não significativos ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey foram sempre comparados ao controle.

3.3. Micronúcleos (MN) e alterações nucleares (AN)

Valores médios (\pm desvio padrão) do número micronúcleos e outras alterações nucleares em eritrócitos de *O. niloticus*, estão apresentados na Tabela 02 e figuras 3, 4 e 5. A análise estatística dos resultados do ensaio de MN mostrou que nas concentrações de 10 e 22% das FSA de B5 comercial e diesel, os valores médios foram mais elevados e significativamente diferentes do controle e das demais concentrações testadas ($p < 0,05$). Contudo, para o B100 esta diferença significativa foi observada apenas em 22%, indicando que nestas concentrações as células começaram a atingir o seu limite máximo de resposta em relação a formação de micronúcleos, seguido de um declínio nas concentrações mais elevadas (46 e 100%). No entanto, as alterações nucleares aumentaram progressivamente obedecendo uma resposta de dose/dependência, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações de 46 e 100% de B5 comercial e diesel e 100% de B100, quando comparadas ao controle e com as demais concentrações. Portanto, foi possível observar neste estudo que a FSA do biodiesel, quando comparada ao diesel e a B5 comercial, mostrou ser menos tóxica. Danos citogenotóxicos foram, entretanto, observados nos eritrócitos de *O. niloticus* expostos às FSA dos três combustíveis testados.

Embora alguns mecanismos relacionados aos micronúcleos não estejam inteiramente explicados, a literatura sugere que essas alterações morfológicas nucleares possam ser induzidas em resposta à exposição aos agentes genotóxicos (Serrano-Garcia; Montero-Montoya, 2001; Ferraro et al., 2004). É possível que a formação de alterações nucleares seja decorrente de distúrbios na segregação das cromátides durante a divisão celular, ou mesmo durante a amplificação gênica (Ferraro et al., 2004). Apesar das dúvidas relativas à influência de contaminantes nestes processos, o ensaio de micronúcleo e alterações nucleares tem sido importantes ferramentas para avaliar a poluição ambiental e os efeitos de diferentes compostos químicos sobre os organismos (Çavas; Ergene-Gozukara 2005, Ergene et al. 2007). Alterações nucleares têm sido estudadas em peixes como biomarcadores de danos genotóxicos, tanto em condições de laboratório quanto em campo (Al-Sabati ; Metcalfe, 1995; Çavas e Ergene, 2003).

Muitos estudos utilizaram o ensaio de MN e AN como ferramentas para avaliação do efeito de diferentes xenobióticos à biota aquática sendo que, alguns autores analisam o número de micronúcleos no conjunto das células micronucleadas somando-as com alterações

morfológicas nucleares (Bücker et al. 2006; Vanzella et al. 2007); no entanto, outros estudos (Çavas; Ergene-Gozukara (2005); Galindo et al.2009, Cabanelas; Moreira (2012) analisam essas alterações de forma distinta. Segundo Benicá, (2006) os micronúcleos são biomarcas de atividade genotóxica, enquanto as alterações nucleares são biomarcas de atividade citotóxica, justificando assim, a análise utilizada no presente estudo. Este ponto de vista é corroborado por Cabanelas ; Moreira (2012) que avaliaram o potencial citogenotóxico de efluente urbano concluindo pela importância do teste de micronúcleos e as outras alterações nucleares, analisadas separadamente.

Há diversos outros estudos na literatura que indicam a indução das alterações morfológicas nucleares em organismos aquáticos expostos a xenobiontes sob condições de laboratório. Por exemplo, altas frequências de alterações morfológicas nucleares foram detectadas em eritrócitos de *Mytilus galloprovincialis* expostos ao benzo[a]pireno (Vernier *et al.*,1997). Çavas & Ergene-Gozukara (2005) demonstraram a indução de alterações em eritrócitos e células do epitélio branquial de *O. niloticus*, expostos a resíduos de refinaria do petróleo. Estes resíduos induziram, aparentemente, a formação de várias anomalias nucleares, como as formas *lobada* e *entalhada* em significativo aumento, quando comparadas ao grupo controle. Tais resultados foram também observados no presente estudo com *O niloticus*, onde as AN foram possivelmente induzidas pelos hidrocarbonetos presentes nas FSA do B5 comercial e diesel, especialmente os BETEX, e pelo metanol presente na FSA de B100.

As alterações na estrutura do DNA, incluindo rupturas, modificações na ordem da seqüência de bases no DNA, têm sido encontradas associadas com a exposição à grande número de contaminantes, incluindo os PAH (Steinert *et al.*, 1998). Muitos PAH e seus metabólitos são conhecidos pelo seu potencial carcinogênico (Aas *et al.*, 2001) sendo considerados os compostos derivados do petróleo de maior potencial tóxico (Yanik *et al.*, 2003). Alguns dos metabólitos produzidos por PAH são altamente reativos e possuem uma alta afinidade com a molécula de DNA. As alterações nas cadeias de DNA podem causar mutações críticas e desencadear uma cascata de eventos subseqüentes levando, dentre outros, à morte celular, disfunções na replicação e reparação das fitas ou mesmo a um processo descontrolado de divisões celulares (Vernier 2001)

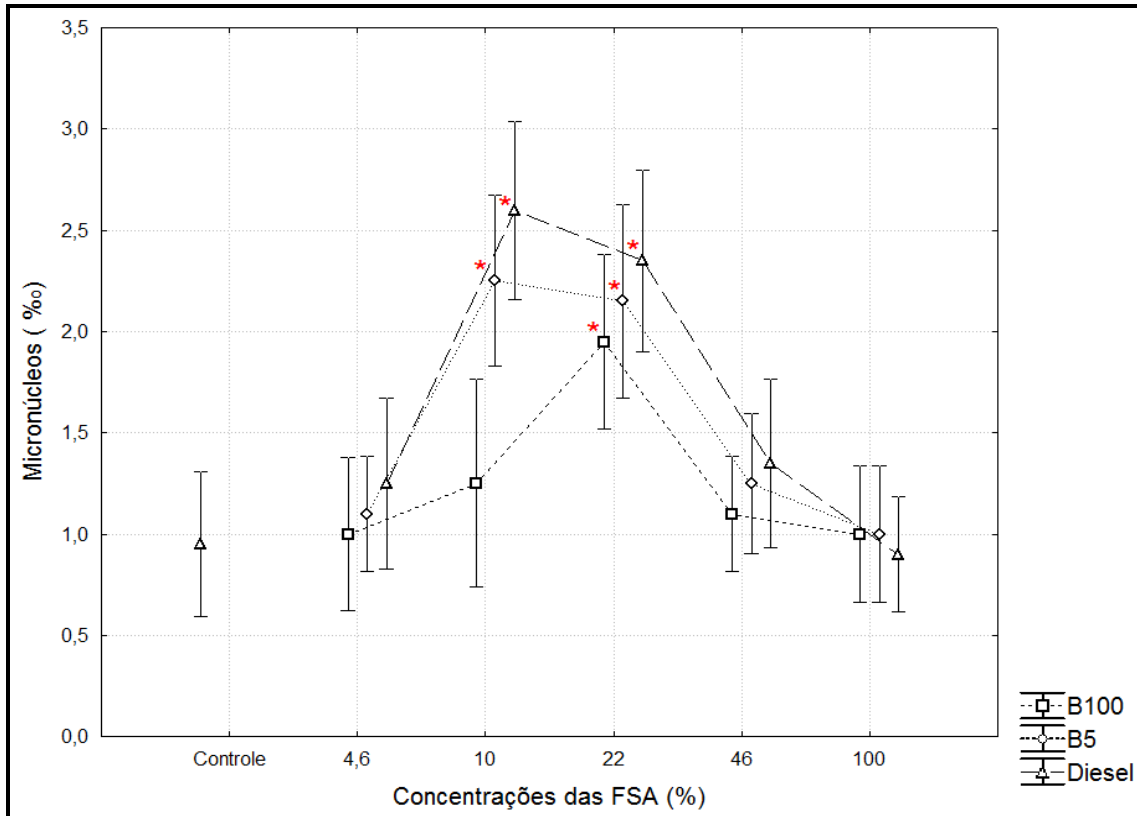


Figura 04. Médias e intervalos de confiança à 95% de probabilidade do número de micronúcleos (‰) nas diferentes concentrações das FSA (eixo x) dos produtos testados (linhas). Os asteriscos (*) indicam os tratamentos significativos ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, sempre comparados ao controle.

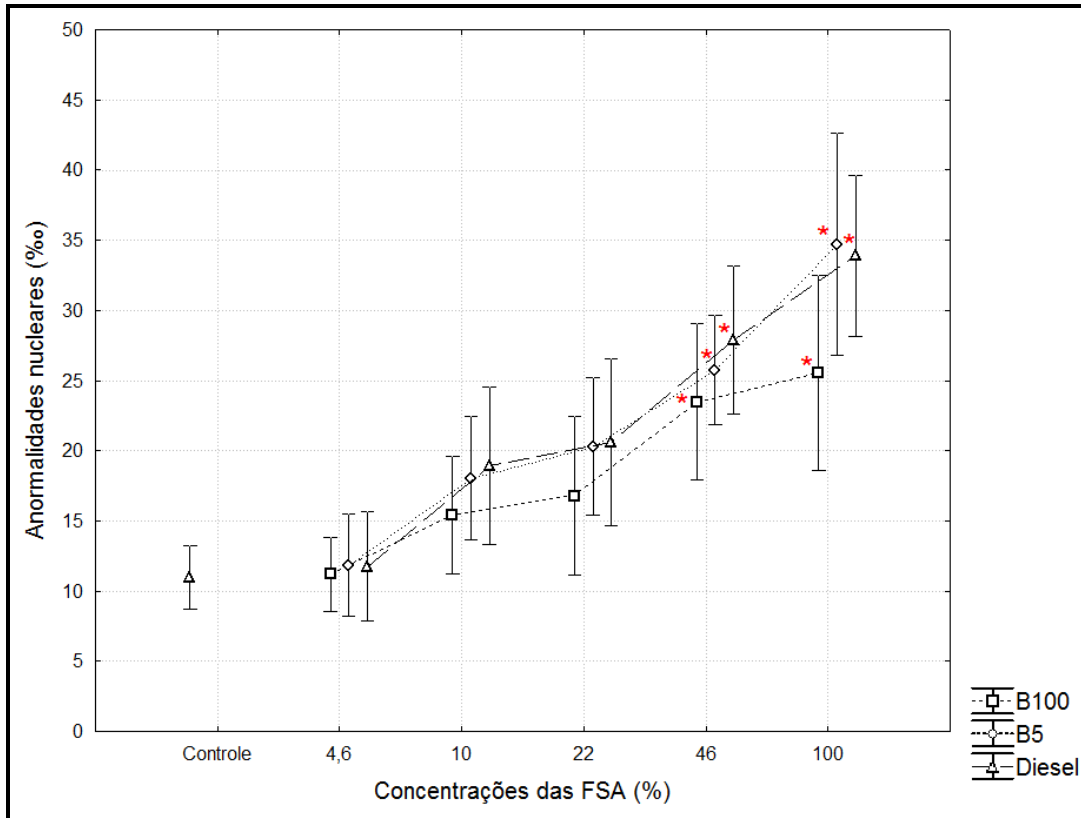


Figura 05. Médias e intervalos de confiança à 95% de probabilidade do número Anormalidades nucleares (%o) nas diferentes concentrações das FSA (eixo x) dos produtos testados (linhas). Os asteriscos (*) indicam os tratamentos significativos ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, sempre comparados ao controle.

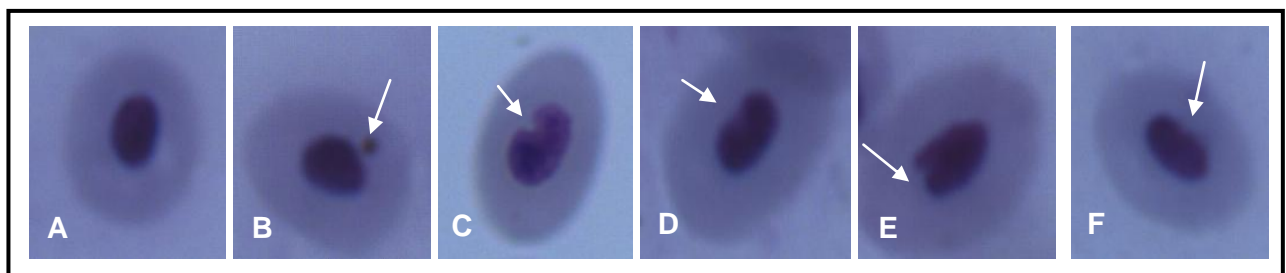


Figura 06. Fotomicrografias de eritrócito de *O. niloticus*. Célula normal (A), micronucleada (B), entalhado (C), núcleo bilobado (D), lobado (E) e célula binucleada (F) (100X).

Tabela 02. Valores médios \pm SD da atividade das enzimas β -glucuronidase (U.F/ μ g de proteínas totais), aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase no fígado e do número de micronúcleos e alterações nucleares (%) no sangue de *O. niloticus* expostos às FSA de B100 , B5 e Diesel.

Concent. (%)	B-glucuronidase (U.F./ μ g Proteínas totais)			ALT (U.R.F/mL)			AST (U.R.F/mL)			MN (%)			AN (%)		
	B100	B5	Diesel	B100	B5	Diesel	B100	B5	Diesel	B100	B5	Diesel	B100	B5	Diesel
0 (Cont.)	2,42 \pm 0,25	2,42 \pm 0,25	2,42 \pm 0,25	108,4 \pm 20,3	108,4 \pm 20,3	108,4 \pm 19,4	113,0 \pm 13,8	113,0 \pm 13,8	113,0 \pm 13,8	0,95 \pm 0,49	0,95 \pm 0,49	0,95 \pm 0,49	10,9 \pm 3,16	10,9 \pm 3,16	10,9 \pm 3,16
4,6	2,44 \pm 0,21	2,22 \pm 0,27	2,49 \pm 0,19	94,4 \pm 22,6	132,2 \pm 21,7	118,3 \pm 19,4	128,9 \pm 29,8	134,3 \pm 29,6	137,1 \pm 36,3	1,00 \pm 0,52	1,10 \pm 0,39	1,25 \pm 0,58	11,2 \pm 3,72	11,8 \pm 5,05	11,7 \pm 5,45
10	2,54 \pm 0,28	2,34 \pm 0,27	2,54 \pm 0,22	109,6 \pm 23,7	132,3 \pm 27,6	151,5 \pm 36,2	123,5 \pm 25,8	132,3 \pm 28,5	139,0 \pm 35,3	1,45 \pm 0,56	2,25 \pm 0,58	2,60 \pm 0,61	15,4 \pm 5,84	18,0 \pm 6,13	18,9 \pm 7,82
22	2,68 \pm 0,20	2,55 \pm 0,30	2,70 \pm 0,19	129,8 \pm 20,5	181,3 \pm 27,4	147,5 \pm 32,9	130,3 \pm 27,6	159,8 \pm 42,2	130,7 \pm 34,7	1,95 \pm 0,59	2,15 \pm 0,61	2,35 \pm 0,62	16,8 \pm 7,91	20,3 \pm 6,87	20,6 \pm 8,32
46	2,69 \pm 0,20	2,79 \pm 0,17	2,82 \pm 0,16	160,8 \pm 33,3	187,8 \pm 23,5	163,8 \pm 37,2	144,5 \pm 28,7	161,0 \pm 33,9	155,5 \pm 24,9	1,10 \pm 0,39	1,25 \pm 0,43	1,35 \pm 0,57	21,5 \pm 5,99	25,7 \pm 5,42	27,9 \pm 7,37
100	2,78 \pm 0,18	2,89 \pm 0,27	2,92 \pm 0,15	159,4 \pm 36,4	168,5 \pm 24,4	173,7 \pm 30,6	138,6 \pm 29,5	160,5 \pm 27,4	161,0 \pm 29,1	1,00 \pm 0,45	1,00 \pm 0,41	0,90 \pm 0,39	25,5 \pm 9,72	34,7 \pm 11,08	33,9 \pm 8,03

4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados deixam claro que a FSA do biodiesel B100, B5 comercial e diesel promovem alterações citoquímicas, citológicas e morfológicas importantes em *O niloticus*. Contudo, o B100 mostrou-se menos tóxico que os demais. Em nível bioquímico observou-se a ativação das vias de biotransformação de xenobióticos, constatada pelo aumento da atividade da β -glucuronidase, considerada um novo candidato a biomarcador para monitoramento de áreas contaminadas por combustíveis. Alterações na atividade ALT reforçam as conclusões já citadas enquanto a ausência de alterações na atividade da AST sugere que os contaminantes presentes não induzem aumento de atividade desta enzima que, neste estudo mostrou-se como inadequada como biomarcadora de poluição aquática pelo hidrocarbonetos ou metanol e que estes compostos não estariam interferindo numa das importantes fases de transaminação relacionada ao metabolismo de aminoácidos

Danos citogenotóxicos foram observados nos eritrócitos dos peixes expostos aos três combustíveis testados. Embora neste estudo o B100, quando comparado ao petrodiesel e blenda B5, mostrou ser menos tóxico, os resultados sugerem também para o biodiesel, a presença de compostos com potencial clastogênico e/ou aneugênico.

Apesar das análises feitas por cromatografia gasosa evidenciarem apenas o metanol como possível contaminante presente no B100 enquanto o B5 e o Diesel apresentaram teores de hidrocarbonetos aromáticos, acima de níveis legislados para água de consumo humano, o B100 ativou respostas enzimáticas e citogenotóxicas em peixes, indicando possíveis riscos para a biota aquática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aas E, Beyer J, Jonsson G, Reichert WL, Andersen OK (2001) Evidence of uptake, biotransformation and DNA binding of polyaromatic hydrocarbons in Atlantic cod and corkwing wrasse caught in the vicinity of an aluminium works. *Mar. Environ. Res.* 52, 213–216.
- Anderson JW, Neff JM, Cox BA (1974) Characteristics of Dispersions and Water Soluble Extracts of Crude and Refined Oils and Their Toxicity to Estuarine Crustaceans and Fish. *Mar Biol* 27:75–88.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Boletim Anual de Preços (2011): preços do petróleo, gás natural e combustíveis nos mercados nacional e internacional / Rio de Janeiro: ANP, 2011.
- Asztalos B, Nemcsok JG, Benedeczky I, Gabriel R, Szabó A, Refaie OJ (2001) The effects of pesticides on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L. *Journal: Arch Environ. Contam Toxicol* 19 (2):275-282.
- Atadashi IM, Aroua MK, Abdul AA. (2010) High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7):1999-2008.
- Benincá C. (2006) Biomonitoramento das lagoas estuarinas do Camacho – Jaguaruna (SC) e Santa Marta – Laguna (SC); utilizando *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae). Dissertação de Mestrado, Curitiba: UFPR (Universidade Federal do Paraná), PR.p. 94.
- Bücker A, Carvalho W, Alves-Gomes JA (2006) Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amaz.* 36(3)357-364.
- Cabanelas ITD; Moreira LMA (2009) Danos Citogenotóxicos em ecossistemas aquáticos submetido a esgotamento sanitário urbano. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol* 7 (2): 31-35.
- Cabrioti LN, (2005) Estudo da antigenotoxicidade, genotoxicidade e citotoxicidade de frações do extrato metanólico em *Agaricus brasiliensis* *in vitro*. Dissertação de Mestrado. Londrina: UEL (Universidade Estadual de Londrina),PR
- Cajaraville MP, Cancio I, Orbea A, Lekube X, Marigomez I. (1998) Detection, control and monitoring of pollution using early warning cellular biomarkers: conventional and innovative approaches based on biotechnology. *Cuad Inv Biol* ;20:545-548.
- Cajaraville MP, Robledo Y, Etxeberria M, Marigomez I (1995). Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes. In: Cajaraville MP, editor. *Cell Biology and Environmental Toxicology*. Bilbo: University of the Basque Country Press Service. 29-55.
- Çavas; Ergene-Gözüka S (2003) Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organized regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis*

niloticus exposed to textile mill effluent. *Mutat Res.*, 534: 93-99. (doi:10.1016/S1383-5718(03)00091-3)

- Çavas; Ergene-Gozukara (2005) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents. *Aquat. Toxicol.* 74:264–271.
- Cabanelas ITD; Moreira LMA (2012) Danos Citogenotóxicos em ecossistemas aquáticos submetido a esgotamento sanitário urbano. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 7 (2):31-35.
- Chilke AM (2010) Kinetic study of hepatic β -glucuronidase in Indian Major Carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Fish Physiol Biochem* 36: 1145-1149.
- Cruz ACS, Leite MBNL, Rodrigues LEA, Nascimento IA (2012) Estimation of Biodiesel Cytotoxicity by Using Acid Phosphatase as a Biomarker of Lysosomal Integrity. *Bull of Environ Contam Toxicol* 90:32-49.
- Doncaster PC, Davey A (2007) *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ergene S, Çavas T, Çelik A, Köleli, N, Aymak C (2007) Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. *Environ Mol Mutagen* 48:1–9.
- Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455:81-95. (doi:10.1016/S0027-5107(00)00065-8).
- Ferraro MVM, Fenocchio AS, Mantovani MS, Oliveira RCA, Cestari MM (2004) Mutagenic effects of trybutyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genet Mol Biol* 27:103-107.
- George J (2008) Elevated serum β -Glucuronidase reflects hepatic lysosomal fragility following toxic liver injury in rats. *Biochem Ell Biol* 86: 235-243.
- Goldemberg J (2011) The Role of Biomass in the World's Energy System. In M.S. Burckeridge and G.H. Goldman (eds.), *Routes to Cellulosic Ethanol*, DOI 10.1007/978-0-387-92740-4_1, © Springer Science + Business Media, LLC.
- Fukuda H, Kondo A, Noda H (2001) Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioen* 405–416.
- Galindo TPS; Moreira LMA (2009) Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). *Genet Mol. Biol.*, 32(2): 394-398. (doi: 10.1590/S1415-47572009000200029).
- Inayat-Hussain SH, Lubis SH, Satoh T et al. (2007) Is plasma β -glucuronidase a novel human biomarker for monitoring anticholinesterase pesticides exposure A Malaysian experience. *Toxicol Appl Pharm* 219: 210–216

- Jimenez BD, Stegeman JJ (1990) Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. In: Adams, S.M. (Ed). Biological Indicators of Stress in Fish. Bethesda: American Fisheries Symposium 8(6):67-79.
- Krishnakumar PK, Casillas E, Varanasi U (1994) Effects of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget sound, Washington, USA.I. Cytochemical measuris of lysossomal responses in the digestive cells using automatic image analysis Mar Ecol Prog Ser 106:249-261.
- Kumari K, Ranjan N, Sinha RC (2011) Multiple biomarker response in the fish, *Labeo rohita* due to hexavalent chromium. 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science. IPCBEE 7:155-158.
- Lapinskien A, Martinkus P, Rchzdaite V (2006) Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. Environ Pollut 142:432–437
- Lin S; Luo L (2011) Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Animal Feed Sci Tech 168:80– 87.
- Livingstone DR (1993) Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the Aquatic Environment. J Chem Tech. Biotech. 57:195-211.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275.
- Lucier GW; MC Daniel OS (1972) Alterations in rat liver microsomal and lysosomal β -glucuronidase by compounds which induce hepatic drug-metabolizing enzymes. Biochim. biophys. Acta 261:168-176.
- Malarvizhi A, Kavitha C, Saravanan M, Ramesh M (2011) Carbamazepine (CBZ) induced enzymatic stress in gill liver and muscle of a common carp, *Cyprinus carpio*. J King Saud University. doi:10.1016/j.jksus.2011.01.001
- Matsumoto ST, Mantovani MS, Malaguttii MIA, Dias AL, Fonseca IC & Marin-Morales MA. 2006. 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. Genet Molec Biol 29:48-158.
- Myers BM, Prendergast FG, Holman R, Kuntz SM, Larusso NF (1993) Alterations in hepatocyte lysossomes in experimental hepatic copper overload, in rats. Gastroent 105: 1814-1823. PMID:8253357
- Moore MN (1985) Celular responses to pollutants. Mar Pollu Bull 16:134-139.
- Moore MN, Pipe RK, Farrar SV, Thompson S, Donkin P (1987) Lysosomal and microsomal responses to oil-derived hydrocarbons in *Littorina littorea*. In: Capuzzo JM, Kester DR editors. Oceanic processes in marine pollution, vol. I. Malobar, Florida: Robert E Krieger Publishing Company, 89-96.

- Marigomez I, Orbea A, Olabarrieta I, Etxeberria M, Cajaraville MP. (1996) Structural changes in the digestive lysosomal system of sentinel mussels as biomarkers of environmental stress in mussel-watch programmes. *Comp Biochem Physiol*;113:291-297.
- Moore MN, Viarengo A, Donkin, P, Hawkins, AJ (2007) Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquat Toxicol* 84, 80
- Moore MN, Allen JI, Acveigh A , Shaw J (2006) Lysosomal and autophagic reactions as predictive indicators of environmental impact in aquatic animals. *Autoph* 2(3):217-220.
- Nascimento IA, Pereira AS, Leite MBNL, Cruz ACS, Santos JM, Barros DA, Vêras TF, Alvarez HM, Nascimento MA (2009) Is Biodiesel an Eco-Compatible Fuel? Toxicity Estimation using Organisms of Different Trophic Levels. ISBN: 9781604569179. In: Harry Newbury; William de Lome. (Org.). *Industrial Pollution, Including Oil*. Hauppauge, NY: Nova Scieci Publish 1:1-30.
- Nemcsok J, BenedeczkyI (1990) Effect of sublethal concentrations of phenol on some enzyme activities and blood sugar level of carp, *Cyprinus carpio* (L.). *Environ Monit Assess* 14:377–383.
- Nicholson S; Lan PK (2005) Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna perna* (Mytilidae: Bivalvia). *Environ Internat* 31(1):121-132.
- Nunes PMQ, Foizer ER, Gomes LC, Chippari-Gomes AR (2010) Avaliação da toxicidade do cobre para o piaçu (*Leporinus macrocephalus*, Garavello & Britski, 1988) por meio de parâmetros leucocitários e enzimáticos. *Acta Scient Biol Scieci Maringá* 32(1)87-92. DOI: 10.4025/actascibiolsci.v32i1i.4939.
- Pedrozo MFM, Barbosa EM, Corseuil HX, Scheneider MR, Linhares M (2002) *Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo*. Série Cadernos de Referência Ambiental 12: 229 Salvador/BA.
- Pereira AC, Silva RF (2012) *Produção de tilápias*. Manual técnico 31, ISSN 1983-5671, 52p
- Pereira SA, Araújo VQ, Rebouças MV, Vieira FSV, Almeida MVA, Chinalia FA, Nascimento IA (2011) Toxicity of biodiesel, diesel and biodiesel/diesel blends: comparative sub-lethal effects of water-soluble fractions to microalgae species. *Bull Environ Contam Toxicol* 88:234-238.
- Pettengill OS, Fishman WH (1962) The preparation and purification of β -glucuronidase from mouse liver, kidney and urine. *J Biol Chem* 237:24–28.
- Rao RVK, Surendranath P, Kodavanti PRS (1990) Levels of transaminases in tissues of the penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) following sublethal kelthane exposure. *Bull Environ Contam Toxicol* 44:114-120.
- Rasal VP, Ashok P, Pasha I, Srivastava P, Alatgi AC (2011) Modulation of lysosomal enzymes activity in hepatoprotection by silymarin in carbon tetrachloride vapour induced liver damage in rats. *Ind J Pharm Edu Res*, Jul-Sept 45(3)282-289.

- Ramandhas AS, Jayaraj S, Muraleedharan C (2005) Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. *Fuel*, Índia 84(4):335-340.
- Regoli F, Nigro M; Orlando E (1998) Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat Toxicol* 40:375-392.
- Reitman S, Franckel S (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 28:56–63.
- Ribeiro LR (2003) Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo, pp. 173-200. In: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. (Orgs.), *Mutag Amb* 355 p., Ed. ULBRA, Canoas.
- Rodrigues LEA (2001) *Enzimologia clínica*, ISBN 857309-443-5. Copyright©, p.157.
- Rodrigues RV, Miranda-Filho KC, Gusmão EP, Moreira CB, Romano LA, Sampaio LA (2010) Deleterious Effects of Water-Soluble Fraction of Petroleum, Diesel and Gasoline on Marine Pejerrey *Odontesthes argentinensis* Larvae. *Scienc Total Environ* 408:2054–2059.
- Rotta, MA (2003) Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. (Documentos / Embrapa Pantanal ISSN 1517-1973; 53), 48 p.
- Serrano-Garcia L, Montero-Montoya R (2001) Micronuclei and chromatine buds are related genotoxic events. *Environ. Mol. Mutagen* 38:38 - 45.
- Simonato JD, Guedes CLB, Martinez CBR (2008) Biochemical, Physiological, and Histological Changes in the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* Exposed to Diesel Oil. *Ecotox Environ Saf* 69:112–120.
- Steinert SA, Streib-Montee R, Leather, JM, Chadwick DB (1998) DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat Res* 399:65–85.
- Underwood AJ (1997) *Experiments in Ecology: Their Logical Design and Interpretation Using Analysis of Variance*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharm* 13:57-149.
- Vaz MAB (2013) *Estudo de Delineamentos Experimentais no Esquema Fatorial Duplo com um Tratamento Adicional*. Universidade de São Paulo.
- Vanzella TP, Martinez CBR, Cólus IMS (2007) Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water- soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat Res* 631:36–43.
- Venier P, Maron S, Canova S (1997) Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo [a] pyrene. *Mutat Res* 390:33-44. (doi:10.1016/S01 65-1218(96)00162-0).

- Vinodhini R ; Muthuswamy N (2008) Effect of heavy metals induced toxicity on metabolic biomarkers in common carp, *Cyprinus carpio*. Maejo Int J Sci Techol 2:192-200.
- Williams CH (1970) Beta-glucuronidase activity in the serum and liver of rats treated with parathion. Toxicol Appl Pharmacol 16:533–539.
- Yanik PJ, O'Donnell TH, Macko SA, Qian Y, Kennicutt I, Mahlon C (2003) The isotopic compositions of selected crude oil PAHs during biodegradation. Org Geochem 34:291–304.

3. RESULTADOS E PRODUTOS GERADOS

3.2 ARTIGO 02

Toxicidade do Biodiesel comparada ao Diesel fóssil e blends: uso de biomarcador histológico aplicado à Tilápia, como ferramenta preventiva de poluição em corpos de água.

Maria Bernadete Neiva Lemos Leite¹, Luiz Erlon Araujo Rodrigues², André Luis da Cruz³, Iracema Andrade Nascimento¹.

¹ Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento – LABIOMAR. Instituto de Biologia – Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA

² Laboratório de Pesquisas Básicas da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (FBDC), Salvador/BA.

³ Laboratório de Fisiologia Animal – LAFISA. Instituto de Biologia – Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA.

Este artigo será submetido à Revista: Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology is a peer-reviewed Journal portanto, foi elaborada no formato segundo os padrões da Revista

RESUMO

O estudo avaliou o potencial preventivo de um biomarcador histológico ao comparar efeitos da exposição de *Oreochromis niloticus* às frações solúveis em água (FSA) do biodiesel (B100-metílico), B5 comercial e diesel, através de análise histopatológica em brânquias e fígado. Amostras dos peixes (controle e expostos às FSA) foram fixadas em Bouin, processadas, coradas (H&E) e analisadas sob microscópio de luz. As FSA foram analisadas quimicamente por cromatografia gasosa para quantificação de hidrocarbonetos e metanol (B100-FSA). Peixes controle e expostos a 4,6% das FSA apresentaram tecidos normais. A partir da exposição a 10% das FSA dos produtos testados ocorreram alterações histopatológicas, com progressivo grau de severidade dose/dependente, mais frequentes nas exposições de B5 e diesel. Exceto os focos de necrose, todas foram consideradas reversíveis; o biomarcador evidenciou a ação danosa dos produtos na integridade dos tecidos e manutenção da homeostase nos peixes, indicando o potencial poluente destes combustíveis ao atingirem corpos de água.

Palavras-chave: Biodiesel, B5 comercial, Diesel, Histopatologia, *Oreochromis niloticus*

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the preventive potential of a histological biomarker by comparing effects on *Oreochromis niloticus* exposed to the water soluble fractions (WSF) of biodiesel (B100-methylester), commercial B5 and diesel, through histopathologic analysis of gills and liver. Fish-tissues (from control and WSF-exposed) were fixed in Bouin, processed, stained (H&E) and examined under light microscope. The WSF were chemically analyzed (GC) for quantification of hydrocarbons and methanol (B100-WSF). Control and exposed fishes to 4.6%-WSF showed normal tissues. When exposed to 10% up to 100%-WSF, the fishes showed histopathological changes, characterized as progressive severity dose/dependent responses to all the tested products, which were more evident for B5 and diesel-WSF. Except for the necrotic foci, all the changes were considered as reversible. The biomarker proved the harmful action of the fuels on the integrity of tissues and on the fish homeostasis, indicating the polluting potential of these fuels when reaching water-bodies.

Key-words: Biodiesel; B5 commercial; Diesel; Histopathology; *Oreochromis niloticus*.

1. INTRODUÇÃO

A redução mundial das reservas de petróleo, somada à crescente preocupação com a poluição ambiental gerada por combustíveis fósseis, tem estimulado a busca por novas fontes de energia. Nesse contexto, surge o biodiesel, como um combustível renovável e biodegradável (Wang et al. 2000), produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais, como uma fonte de energia alternativa (Knothe 2006). Em geral, sua produção é feita através da transesterificação com o metanol, resultando no éster metílico (biodiesel) e na glicerina (Fukuda et al. 2001; Knothe 2006). As vantagens ambientais do biodiesel em relação aos combustíveis fósseis são relacionadas à diminuição de emissões tóxicas (óxido de enxofre e material particulado, além de hidrocarbonetos aromáticos, considerados cancerígenos) ao ser queimado em motores diesel, sem exigir modificação, e com eficiência semelhante àquela do diesel fóssil (Turrio-Baldassarri et al. 2004).

Observa-se que no processo de produção e na distribuição dos combustíveis existem riscos de acidentes ambientais, podendo ocorrer contaminação de ecossistemas (Zhang et al. 2003; Tiburtius et al. 2005; Khan et al. 2007). Neste caso, os ecossistemas aquáticos representam os receptáculos finais de qualquer poluição aquática, atmosférica ou do solo (Fleeger et al. 2003). Assim, diante das perspectivas de aumento da produção e uso do biodiesel, a avaliação dos riscos de derrames deste novo combustível e de possíveis danos a organismos aquáticos devem ser avaliados para prover meios mais eficientes de controle e prevenção. No caso do biodiesel, quando em presença de água, a reação de transesterificação pode potencialmente ser revertida, gerando novamente o metanol que é reconhecidamente tóxico (Nascimento et al. 2009).

No que tange às blendas biodiesel/diesel, pesquisadores afirmam que a dissolução, representada pela Fração Solúvel em Água - FSA do combustível fóssil é responsável por grande parte da contaminação ambiental causada por esses acidentes (Saeed; AL-Mutairi. 1999; Almeida-Val et al. 2002; Navas et al. 2006). Vale salientar que os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de origem petrolífera são uma das classes de poluentes mais frequentemente encontradas nos ambientes aquáticos (Kettrup; Marth, 1998). Benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos (BTEX) e os hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH) são

frequentemente associados com poluição por combustíveis fósseis, gerando altos níveis de efeitos tóxicos (Khan. 1998; Paixão et al. 2007). Quando combustíveis fósseis entram em contacto com uma matriz à base de água, vários hidrocarbonetos aromáticos e não aromáticos tornam-se bio-disponíveis. Estudos relacionando o uso do petróleo e combustíveis derivados com seus impactos ambientais demonstram que são tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e que possuem substâncias de baixa biodegradabilidade e que é evidenciado por técnicas, geralmente de longo prazo (Al-Yakoob et al. 1996, Vieira 2004, Vanzella et al. 2007, Hollebhone 2009, Rodrigues et al. 2010, Muller 2011); o presente trabalho pretende desenvolver técnicas que estimem efeitos danosos a curto prazo.

Análise de riscos aplicada à proteção de ecossistemas aquáticos exige o uso de indicadores biológicos, cujas respostas possam levar a uma avaliação eficaz, capaz de embasar ações de controle. Nesse contexto, torna-se de fundamental importância a utilização de biomarcadores, que são considerados ferramentas promissoras para detecção prévia de efeitos adversos de poluentes em organismos (Depledge; Fossi. 1994, Martins et al. 2005). Os efeitos tóxicos de poluentes podem ser evidentes em células e tecidos, antes que mudanças significativas no comportamento ou na aparência externa possam ser identificadas (Albinati et al. 2009). Dentre os biomarcadores mais utilizados, destacam-se os histopatológicos aplicados em peixes, que têm sido propostos como ferramentas sensíveis para diagnosticar efeitos tóxicos diretos e indiretos que afetem tecidos destes animais (Monteiro et al. 2008, Pal et al. 2011).

A histopatologia se constitui em um dos métodos rápidos e sensíveis na detecção dos níveis tóxicos de exposição, refletindo assim a poluição do ambiente aquático (Cazenave et al. 2005). Consequentemente, são também instrumentos importantes para biomonitoramento da qualidade da água (Heath 1995, Schwaiger et al. 1997, Albinati et al. 2009). Entretanto, a escolha dos órgãos que serão alvos de estudo é crucial para a relevância dos dados obtidos. Diferentes órgãos de peixes reagem de maneira diversa, ou com intensidade diferente à presença de substâncias tóxicas (Cazenave et al. 2005). Órgãos de contato direto com o agente tóxico, como as brânquias e os órgãos de metabolismo e excreção de xenobióticos – como o fígado, podem indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica desses agentes em tecidos animais (Costa et al. 2006, Lins et al. 2010). Danos às brânquias e ao fígado de peixes expostos a contaminantes derivados de petróleo têm sido amplamente utilizados nos últimos anos como parâmetros para avaliação da qualidade de diferentes ambientes (Simpson et al.

2000, Stentiford et al. 2003, Akaishi et al. 2004, Nero et al. 2006, Simonato et al. 2008, Rodrigues et al. 2010, Pal et al. 2011).

Em razão de importantes características como grande superfície de absorção, pequenas distâncias de difusão e grande fluxo contracorrente, as brânquias são consideradas órgãos dominantes na captação e absorção de substâncias dissolvidas na água, relacionadas a alterações fisiológicas no organismo (Garcia-Santos 2007, Monteiro et al. 2008, Fontáinhas-Fernandes 2008). A maioria dos peixes respira através de brânquias que estão localizadas na cavidade opercular e são divididas em arcos. Dos arcos divergem filamentos branquiais nos quais se inserem duas fileiras de lamelas secundárias, como ocorre na maioria dos teleósteos (Fergusson 1989). As lamelas são ricamente vascularizadas, revestidas por um epitélio pavimentoso simples, sustentado por células pilares, as quais formam lacunas por onde se inserem os capilares sanguíneos (Hibiya 1982). Segundo Garcia-Santos et al. (2007) e Cruz et al. (2013) as brânquias são importantes também nas trocas gasosas (O_2/CO_2), na regulação osmótica, no balanço ácido-base e no transporte e excreção de compostos nitrogenados. Essa multifuncionalidade faz das brânquias um órgão chave no monitoramento dos poluentes presentes no meio aquático. Nesse sentido, as alterações histológicas são reconhecidas como método rápido e válido na caracterização dos danos causados pela exposição dos peixes a diferentes poluentes (Garcia-Santos et al. 2007).

Em estudos de impacto ambiental, as brânquias apresentam diversas alterações patológicas indicativas de toxicidade. Simonato (2006), em avaliação do efeito de óleo diesel sobre corimbatás, observou alterações vasculares como congestão, aneurisma e hemorragia, além de lesões estruturais como descolamento do epitélio, fusão lamelar, hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar, além de rompimento e descamação epitelial. Peixoto et al., (2008), em experimento com herbicida em *Oreochromis niloticus*, observou hiperplasia das células de revestimento, desenvolvimento do epitélio interlamelar e início de fusão apical das lamelas secundárias. Santos et al., (2011) observaram alterações severas em brânquias de *Trachinotus carolinus*, após exposição ao naftaleno.

Além das brânquias, o fígado também pode ser considerado um órgão-alvo em águas contaminadas devido a sua grande importância no metabolismo de xenobióticos e sua alta sensibilidade a esses compostos. Portanto, alterações na estrutura hepática podem ser significativas na avaliação do estresse em peixes (Heath 1995). Segundo Albinati et al.

(2009), dentre os órgãos usados como biomarcadores histopatológicos, o fígado foi o que apresentou os melhores resultados, sendo considerado um bom biomarcador histológico para a contaminação aquática. O fígado é uma glândula digestiva composta por parênquima celular (hepatócitos) e por fibras que promovem sua sustentação. A superfície hepática é revestida por uma membrana serosa e o tecido conectivo dessa cápsula penetra no parênquima hepático. Os hepatócitos são células uninucleadas com forma poligonal que possuem importantes funções metabólicas. Também é possível visualizar no fígado vascularização de grande calibre, sinusóides (vasos sanguíneos de pequeno calibre), ductos biliares, tecido pancreático e centro melanomacrofágico (Hibiya 1982). De acordo com Hinton; Lauren (1990), existem muitas razões para selecionar o fígado como um importante órgão em estudos de toxicologia. O fígado é o primeiro órgão a atuar na biotransformação de xenobióticos e excreção de alguns metais pesados; atua na estocagem de carboidratos (glicogênio) e, especialmente em peixes, acumulam lipídeos. É um dos órgãos mais afetados por lesões provocadas por agentes químicos, devido a sua importante participação em reações do metabolismo e na biotransformação de substâncias químicas no organismo. As lesões do fígado associadas a agentes químicos abrangem desde alterações bioquímicas e estruturais adaptativas, até lesão morfológica com danos muitas vezes irreversíveis do metabolismo ou da estrutura celular (Maduenho; Martinez. 2008).

A Tilapia (*O. niloticus*) tem sido utilizada como modelo biológico em muitos estudos de toxicidade (Van Dyk et al. 2007; Monteiro et al. 2008; Cruz et al. 2012), e assim foi escolhido como modelo experimental neste estudo que objetivou a verificação de lesões histopatológicas nos tecidos branquiais e hepáticos de *O. niloticus* exposta à toxicidade aguda das frações solúveis em água (FSA) do B100 (biodiesel) produzido por via metílica, B5 comercial (5% biodiesel/95% diesel) e diesel.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de combustíveis:

Amostras de biodiesel B100 foram fornecidas pela Petrobrás Biocombustíveis. Suas características constam no Certificado de Ensaio destacando-se o teor de éster (99,4 g/100g),

teor de triglicerídeos (0,168g/100g), metanol (0,11g/100g), dentre outros. Este biodiesel foi produzido por transesterificação metílica, utilizando óleo de soja (70%), de algodão (20%) e sebo bovino (10%) como matérias-primas. Amostras de Diesel (S500) foram fornecidas pela Petrobrás, (São Francisco do Conde /BA) e as de B5 comercial foram adquiridas em postos de gasolina da bandeira BR. No Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento–LABIOMAR/UFBA, estas amostras foram mantidas em frascos âmbar, na temperatura de 4° C, até o momento das análises.

2.2 Obtenção e análise da fração solúvel em água – FSA

As amostras dos combustíveis foram tratadas de acordo com Anderson et al. (1974) para obtenção das frações solúveis em água (FSA). Em frascos de Mariotte, as FSA foram geradas por mistura de uma parte da amostra em nove partes de água destilada (v/v). As misturas permaneceram sob agitação constante por 20 horas, com o vórtex da mistura equivalente a 25% da coluna do líquido. As amostras permaneceram em repouso por uma hora. Em seguida, foi recolhida a fase aquosa para a realização dos ensaios.

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de controle de qualidade - LCQ na Unidade de Insumos Básicos, Braskem S.A, na Bahia, seguindo procedimento de QA/QC instalado no laboratório. Todas as amostras foram analisadas para monoaromáticos C6-C8 (BTEX), total de hidrocarbonetos pesados (C9s+, representando todos os aromáticos –HC tendo nove ou mais átomos de carbono), e metanol. Os dados cromatográficos (benzeno, tolueno, etil-benzeno, xileno e C9s+ HC aromático) foram obtidos usando um cromatógrafo de gás (Varian, modelo CP3800) com um detector de ionização de chama e uma coluna capilar 50 m x 0,20 mm i.d. X 00.2 µm DB wax, usando hidrogénio como gás de transporte. Um concentrador (Tekmar, modelo de 3000) com uma Coluna Tenax foi utilizada para quantificar níveis de hidrocarbonetos. Condutividade elétrica (Gehaka, modelo CG 2200), pH (Metrohm, 654 modelo), e a densidade relativa 20/4 ° C (Anton Paar, 4500 modelo) foram análises também realizadas.

2.3 Organismo-teste

Juvenis de tílápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758 (Teleostei Cichlidae), bastante utilizados como modelo biológico em estudos de toxicidade foram usados como

organismos-teste. Estes peixes ($26,40 \pm 3,80$ g) foram adquiridos na Estação de Piscicultura do DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra a Seca) Itiúba, Bahia, e aclimatados por um período de oito dias, em tanques contendo água desclorinizada. A cada 24 horas, o material fecal foi retirado, a água renovada em 1/3 e os organismos alimentados com ração proveniente da estação de piscicultura de origem. Diariamente, os parâmetros físicos e químicos da água dos tanques foram monitorados durante o período de condicionamento e ao longo do período experimental, mantendo-se os níveis recomendados para a espécie (Pereira; Silva . 2012). Nesta espécie, o tecido pancreático encontra-se difuso no fígado, sendo chamado de pâncreas intra-hepático ou hepatopâncreas (Rotta, 2003).

2.4 Protocolo experimental

Os animais condicionados foram distribuídos aleatoriamente em aquários de vidro. Em cada aquário foi colocado 01 peixe/4 litros da solução-teste e a aeração foi mantida constante contendo as soluções-teste, preparadas com as frações solúveis em água (FSA) dos diferentes combustíveis (B100, B5 e diesel) nas concentrações de 0 (controle), 4,6, 10, 22, 46 e 100%. O controle recebeu somente água desclorinizada como solução-teste. O período de exposição foi de 24h (fotoperíodo de 12 h escuro/12h claro). Foram expostos 10 peixes/tratamento; a alimentação foi suspensa 24 horas antes do início do experimento e durante o período de exposição. Os aquários foram monitorados quanto aos parâmetros físicos e químicos (pH, temperatura, oxigênio dissolvido e amônia total) para evitar interferência nos resultados. As soluções-teste apresentaram os seguintes valores: $25 \pm 2^\circ$ C; pH= $6,9 \pm 0,3$; OD variou entre 6,2 a $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ até a concentração de 46% , reduzindo para 4,0 a $4,8 \text{ mg.L}^{-1}$ nas concentrações de 100%, permanecendo dentro dos padrões estabelecidos pela Resolução CONAMA 357 para águas doce de classe 3.

2.5 Procedimento histológico

Para as análises histológicas, amostras de fígado e de brânquias (segundo arco branquial direito) foram fixadas em solução de Bouin durante 24 horas, e a seguir, mantidas em álcool 70%. Os órgãos foram desidratados em série alcoólica crescente, diafanizados em xilol (PA), impregnados e incluídos em parafina. Os cortes realizados em micrótomo LEICA, RM 2125 RT) de $4 \mu\text{m}$ de espessura. Foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisados em microscópio de luz Nikon acoplado a um sistema de captura de imagem (Q

CAPTURE IMAGE). Para análise semi-quantitativa, considerou-se dois estágios segundo a severidade das lesões observadas. As lesões branquiais foram adaptadas segundo a classificação estabelecida por Monteiro et al (2008) e as lesões hepáticas, segundo Van Dyk et al. (2007). Para isso, cada alteração, branquial e hepática, foi classificada em estágios progressivos quanto ao comprometimento das estruturas teciduais: **estágio I**, primeiras alterações observadas na estrutura do órgão em resposta à exposição a um estressor e que podem ser reversíveis; **estágio II**, lesões secundárias, que correspondem a um maior comprometimento da estrutura do órgão, são mais severas podendo ser irreversíveis.

3. RESULTADOS

As análises cromatográficas mostraram as concentrações de hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), aromáticos com nove ou mais átomos de carbono (C₉s+aromáticos), não aromáticos e metanol presentes nas frações solúveis em água (FSA) de B100, B5 comercial e Diesel (Tabela 01).

Os peixes expostos às FSA dos combustíveis B100 (biodiesel), B5 (Blenda = 5% biodiesel, 95% diesel) e diesel, apresentaram uma série de alterações importantes nas brânquias (Tabela 02; figura 01; 02 e 03) e no fígado (Tabela 03; figura 01; 02 e 03).

Análise histopatológica das brânquias

A morfologia das brânquias de *O. niloticus*, é similar às outras espécies de teleósteos (Wilson; Laurent, 2002); apresenta lamelas branquiais, de onde saem perpendicularmente os filamentos primários, interligados por um epitélio escamoso estratificado (tecido interfilamentar) constituído por diferentes tipos celulares: células de cloreto, mucosas e pilares. As brânquias nos indivíduos controle (Figuras 1, 2 e 3 [A]) seguiram a morfologia padrão descrita para a espécie (Monteiro et al. 2008), o que demonstra o uso de indivíduos sadios e sem registro de alterações morfológicas importantes. Nos indivíduos submetidos aos tratamentos com as FSA dos combustíveis (B100, B5 comercial e diesel), foi possível visualizar áreas do epitélio branquial (Figuras 1, 2 e 3) com importantes alterações, que foram classificadas de acordo com Monteiro et al. (2008). Estas alterações foram também classificadas conforme os respectivos estágios progressivos de comprometimento das funções

teciduais (I e II). Para efeito de avaliação, as alterações observadas, inclusive com algumas das modificações propostas no presente estudo, seguiram os padrões descritos no quadro abaixo:

Alterações histopatológicas nas brânquias	Estágio
(ed) Edema do epitélio filamentar	I
(hef) Hiperplasia do epitélio filamentar	I
(dep) Descolamento epitelial	I
(vd) Vasodilatação do eixo vascular lamelar	I
(an) Aneurisma	II
(fl) Fusão lamelar:	II

O epitélio filamentar (**ef**) corresponde ao tecido localizado entre as lamelas secundárias (figura 1 A) que pode apresentar edema (**ed**) e hiperplasia (**hef**). Essas alterações podem proliferar por todo o espaço interlamelar (**ei**), conduzindo a formação de fusão lamelar (**fl**). No descolamento epitelial (**dep**), o epitélio lamelar se separa da lamela podendo também levar a formação de edema. A vasodilatação do eixo vascular das lamelas (**vd**) pode conduzir a formação de aneurisma (**an**).

Os resultados das análises quali-quantitativas destas alterações em *O. niloticus* expostos às FSA dos combustíveis testados, com seus respectivos estágios de comprometimento funcional (I e II) e registro de frequência, estão representados na Tabela 02 e visualizados nas figuras 01, 02 e 03. As alterações histopatológicas tais como edema (**ed**) e hiperplasia do epitélio filamentar (**hef**), foram observadas tanto nas brânquias dos animais controle quanto nos expostos à 4,6% (v/v) das FSA de B100, B5 e Diesel. Estas alterações foram raramente frequentes (+) e, portanto, consideradas normais para a espécie. No entanto, a partir da exposição às FAS a 10% (v/v), estas alterações foram se tornando mais frequentes e novas alterações foram surgindo progressivamente ao aumento das concentrações, (Tabela 1). Foi possível observar também que as FSA de B5 e diesel proporcionaram alterações relativamente semelhantes nas brânquias dos peixes, quando comparadas entre as diferentes concentrações. No entanto, a FSA de B100, apesar de induzir as mesmas alterações, teve redução na frequência. O registro de algumas lesões ocorreu em concentrações mais elevadas quando comparadas com as demais FSA. (Tabela 02). Alterações como descolamento epitelial (**dep**) e vasodilatação lamelar (**vd**) seguindo também um comportamento de dose/dependência, foram observadas com menor frequência nos peixes expostos à FSA de B100, quando submetidos aos produtos testados. Uma das alterações mais

recorrentes consistiu na formação de aneurismas (**an**). Esta lesão foi induzida pelas FSA de B5 e diesel, a partir da concentração de 10% e de B100, a partir de 22%, seguindo uma frequência progressiva até o rompimento do vaso e a formação da fusão lamelar (**fl**), apresentando-se sempre de forma incompleta, evidenciando assim a desorganização severa dos filamentos nas concentrações mais elevadas. Ocorreram raros registros de focos de necrose apenas nas brânquias dos peixes expostos às FSA de B5 comercial e diesel (Tabela 02). Outra alteração, também observada no tecido branquial dos peixes foi a hipertrofia de células de cloreto (**cc**), bastante frequentes em todas as brânquias dos peixes expostos a partir da concentração de 10% das FSA dos produtos. Células de cloreto estão localizados principalmente no filamento epitelial, podendo ser ocasionalmente observadas entre células pavimentosas lamelares.

Análise histopatológica do fígado

No fígado de teleósteos não é possível distinguir subdivisões hexagonais do parênquima. As tríades portais, constituídas pela ramificação da veia porta, a artéria hepática e ducto biliar, são indistintas, se não ausentes, em quase todos os teleósteos. As alterações histopatológicas mais relevantes, observadas no fígado dos peixes *O. niloticus* expostos às FSA de B100 (biodiesel), B5 comercial (Blenda = 5% biodiesel, 95% diesel) e diesel, foram classificadas em seus respectivos estágios progressivos (I e II) de severidade observada na estrutura do órgão. Para efeito de avaliação, as alterações observadas, inclusive as modificações propostas no presente estudo, seguiram os padrões descritos no quadro abaixo.

Alterações histopatológicas no fígado		Estágio
(V)	Vacuolização dos hepatócitos	I
(ln)	Lateralização de núcleo	I
(np)	Núcleos picnóticos	II
(an)	Ausência de núcleo	II
(fn)	Focos de necrose	II
(dc)	Degeneração celular	II
(Hm)	Hiperemia ou congestão	II
(G)	Granulações citoplasmáticas *	

* Não há referência na literatura citada; esta alteração foi identificada no presente estudo.

A frequência das alterações, observadas no tecido hepático dos peixes controle e dos grupos expostos estão apresentadas na Tabela 03 e as respectivas alterações visualizadas nas figuras 4, 5 e 6. As alterações histopatológicas dos peixes expostos a 4,6% (v/v), das FSA de B100, B5 e diesel, como raros vacúolos e lateralização de núcleos, foram semelhante às observadas no grupo controle, consideradas normais. No entanto, a partir da exposição a 10% (v/v) das FSA, novas alterações foram notadas e as já existentes foram sendo mais frequentes seguindo um grau progressivo de severidade, compatível com o aumento das concentrações (Tabela 02). As FSA de B5 e diesel proporcionaram alterações hepáticas relativamente semelhantes, sendo ligeiramente inferiores com o B5, enquanto a FSA de B100, induziu as mesmas alterações, porém de menor gravidade e em menor frequência.

Uma das alterações mais frequentes no tecido hepático dos peixes, induzida pela FSA de B100, foi a vacuolização dos hepatócitos, observando-se pequenos e grandes vacúolos nas concentrações mais baixas (sob exposição 10 e 22%), tornando-se mais acentuada e difusa com o aumento das concentrações, atingindo um estágio grave, sugestivo de alterações muito intensas, na concentração de 100%. Outras alterações como lateralização de núcleos (**ln**), heperemia (**Hm**), degeneração celular (dc), núcleos picnóticos (np), hepatócitos sem núcleo (**an**) e foco de necrose (**fn**) foram também induzidas pela FSA de B100. As alterações hepáticas induzidas pelas FSA de B5 e diesel foram semelhantes, sendo as mesmas apresentadas em B100, com exceção da presença de granulações (G) sugestivas de fragmentos de mitocôndrias ou de núcleos, registradas apenas em 100% da FSA de diesel. No entanto, a frequência e intensidade das alterações foram mais elevadas em B5 e diesel, observando-se também a presença de concentração de capilares, indicando a primeira fase da necrose.

4. DISCUSSÃO

Os combustíveis testados no presente estudo (B100 - biodiesel, B5 comercial e diesel) apresentam baixa solubilidade em água e, portanto, as investigações em laboratório sobre seus efeitos envolveram o preparo de frações solúveis em água (FSA). As análises cromatográficas mostraram que as FSA de B5 e diesel continham compostos polares de baixo peso molecular

como BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno), hidrocarbonetos aromáticos (C₉s+) e não aromáticos toxicologicamente relevantes conforme indicados em outros trabalhos (Anderson et al. 1974; Pacheco; Santos 2001; Ribeiro et al. 2007; Simonato et al. 2008). As concentrações de BTEX, determinadas nas FSA de diesel e B5, comparadas com valores de referência para água de consumo humano (Portaria 1469/2000 do Ministério da Saúde) mostram altos índices de benzeno, indicando a existência do potencial tóxico. Essas substâncias são consideradas perigosas por serem potenciais depressivos do sistema nervoso central e por causarem leucemia em exposições crônicas (Corseuil; Marins, 1998). Os componentes BTEX relativamente estáveis e difíceis de serem degradados, estão entre os que mais facilmente se solubilizam em água, o que lhes confere uma alta mobilidade, um intenso efeito tóxico agudo e consequente biodisponibilidade (Costa et al. 2006, Silva 2002). O benzeno é considerado o mais tóxico dentre os BTEX, por se tratar de um composto carcinogênico. A FSA do B100, relativamente livre de hidrocarbonetos aromáticos, destacou-se pela presença de elevado teor de não aromáticos e principalmente, de metanol.

Derramamentos e vazamentos de combustíveis podem causar impactos nos sistemas naturais (Lapinskiene et al. 2006, Leite et al. 2011). Alguns deles são frequentemente atribuídos à biodisponibilidade de compostos solúveis em água tais como BTEX e outros compostos aromáticos de menor peso molecular. O presente estudo demonstrou que a contaminação da água por diesel e B5 pode gerar concentrações elevadas dos referidos compostos. Da mesma forma, o biodiesel pode produzir quantidades significativas de metanol (83 mg / L) quando em contato com uma matriz aquosa, como resultado da hidrólise parcial do biodiesel. A hidrólise é a primeira etapa da biodegradação dos ésteres, quando reagem com a água, se decompondo em metanol e ácidos carboxílicos (Harris 1982, Lalman 2000). O metanol, presente na FSA do biodiesel em concentração de 1.10^{-4} %, foi apontado como tóxico para a biota (Leite et al. 2011). Entretanto, em análise cromatográfica da FSA de amostras de Biodiesel e B5, Muller (2011) não identificou ésteres metílicos solúveis na fração aquosa. É importante considerar as modificações que os agentes químicos sofrem no ambiente, alterando a sua biodisponibilidade. Em vista disso, considera-se que as análises químicas auxiliam na determinação da contaminação antropogênica, identificando quantitativamente os poluentes; porém, só fornecem informações do efeito tóxico sobre a biota quando corroboradas com dados biológicos que, na maioria dos casos, são derivados da interação entre químicos e não apenas do efeito de uma substância em particular (Kennicutt et al. 1994). Neste sentido, peixes têm sido amplamente utilizados para fins de monitoramento,

porque concentram poluentes diretamente absorvidos a partir da água e da dieta, em seus tecidos, alterando-os histologicamente.

Os tecidos branquiais são sensíveis a hidrocarbonetos de cadeias longas (Norton, 1985) de modo que são considerados como bons indicadores de qualidade da água e consequentemente, como eficientes modelos de estudo para o impacto ambiental (Fanta et al. 2003). É um fato conhecido que quando os animais são expostos a compostos químicos, mudanças patológicas podem ocorrer num curto espaço de tempo podendo ser reversíveis ou não (Rand; Petrocelli 1985). No presente estudo, a análise histopatológica das brânquias de *O. niloticus* expostos às FSA dos combustíveis, comparadas às dos animais utilizados no controle, apresentaram alterações morfológicas desde aquelas de estágio I (edema, hiperplasia do epitélio filamentar, descolamento epitelial, vasodilatação) que podem não comprometer o funcionamento do órgão e ser reversível até as de estágios II (aneurisma e fusão lamelar) que comprometem o funcionamento do órgão, mas de uma forma irreversível. Estas alterações tornaram-se mais frequentes a partir da concentração de 10% das FSA e aumentaram progressivamente com o aumento das concentrações. Desse modo, foi observado no presente estudo que, em exposição aguda (24 horas), período considerado curto, alterações branquiais severas como **aneurismas, fusões lamelares** foram induzidas pelas FSA de B100, B5 e diesel e raros **focos de necrose** foram observados em B5 e diesel. Com base nestes resultados, espera-se que em FSA mais concentradas ou em exposição crônica estas alterações possam evoluir, tornando-se irreversíveis, comprometendo assim a saúde dos peixes.

As brânquias são extremamente importantes na respiração, osmorregulação, balanço ácido-básico e excreção de nitrogênio em peixes (Heath 1995), e constituem a maior área de contato do animal com o ambiente externo, a análise de sua morfologia pode, como demonstrado neste estudo, ser um biomarcador, uma técnica de aviso, que propicie ações de controle e prevenção de impactos, muito útil como parâmetro para o monitoramento ambiental (Schwaiger et al. 1997).

Segundo Laurent; Perry (1991), as alterações morfológicas das brânquias, em resposta a mudanças ambientais, podem representar estratégias adaptativas para conservação de algumas funções fisiológicas. Assim, os tipos de lesões histopatológicas observadas neste estudo indicaram que os peixes responderam aos efeitos de agentes tóxicos, especialmente os BTEX e ao metanol, presentes nas soluções teste. O **descolamento epitelial** é uma das

primeiras alterações que ocorrem quando o animal está sob algum tipo de estresse. Neste caso, o epitélio lamelar se separa da lamela, formando um espaço que pode ser preenchido por água, podendo levar à formação de um edema. Este tipo de alteração pode servir como mecanismo de defesa, uma vez que aumenta a distância de difusão entre a água e o sangue (Mallat 1985), interferindo na eficiência das trocas gasosas e transporte iônico. Segundo Pesce et al. (2008), o **descolamento epitelial** aumenta a distância em que a substância tóxica tem que percorrer para alcançar a corrente sanguínea. A **hiperplasia** pode também servir como um mecanismo de defesa que leva a uma diminuição da superfície respiratória e um aumento na distância da difusão sangue-tóxico (Cengiz; Unlu 2006). Assim o edema, como o **descolamento epitelial e a hiperplasia**, podem ser considerados como ajustes morfológicos a respostas adaptativas do organismo, já que aumentam a distância entre o meio externo e o sangue, funcionando como **barreira protetora** (Sepici-Dinçel et al. 2009), por dificultar a entrada de xenobióticos. Alguns estudos revelam que estas alterações são muito frequentes em brânquias de peixes submetidos a diferentes poluentes, como hidrocarbonetos (Simonato et al. 2008, Santos et al. 2011), drogas (Schwaiger et al. 2004) e metais pesado (Mallatt 1985, Monteiro et al. 2008). Essa barreira protetora, por outro lado, reduz a distância entre as lamelas e superfície respiratória lamelar, o que pode prejudicar a absorção de O₂ da água e resultar em uma condição de hipoxemia.

Segundo Pesce et al. (2008), **fusão lamelar**, resultante da proliferação epitelial, também pode ser protetora, diminuindo a área de superfície vulnerável da brânquia apesar de que pode também causar o aumento da barreira água/sangue, como já discutido acima. Por outro lado, o **aneurisma ou ectasia**, ocorre devido ao acúmulo de sangue nas lamelas respiratórias que pode levar ao rompimento das **células pilares** e conseqüente desarranjo estrutural das lamelas (Heath 1995) e, portanto, corresponde a um efeito deletério do xenobiótico sobre o tecido branquial (Martinez et al. 2004). No presente estudo, fusão lamelar e **aneurisma** foram as alterações mais recorrentes nas concentrações de 46 e 100% das FSA, com ocorrência do aneurisma apical somente na FSA do diesel. Alguns autores interpretam o aparecimento de **aneurisma apical** como uma dilatação relacionada à necessidade de maior aumento da superfície de trocas gasosas (Monteiro et al. 2008). Os aneurismas foram previamente observados com uso de outras substâncias intoxicantes, cuja severidade variou de acordo com a espécie química e o tempo de exposição (Van Den Heuvel et al. 2000, Thopson et al. 2003, Schwaiger et al. 2004, Monteiro et al. 2008, Simonato et al. 2008). No entanto, neste estudo não foi possível correlacionar os tipos de lesão com os produtos testados, apenas

foi possível observar elevada presença de aneurismas em todas as FSA testadas, indistintamente.

As análises semi-quantitativas das lesões mostraram que as brânquias dos animais expostos às FSA de B5 e Diesel foram mais afetadas que em B100, indicando a ocorrência de danos severos induzidos pela presença de elevados teores de hidrocarbonetos nas FSA destes combustíveis, enquanto na presença da FSA do B100 as alterações foram possivelmente induzidas pelo metanol. Khan (1998) também encontrou nas brânquias de linguados (*Pleuronectes americanus*), coletados próximos a uma refinaria de petróleo, hiperplasia nas lamelas e no espaço inter-lamelar, bem como descolamento epitelial, e sugeriu uma conexão entre derramamentos de petróleo e as anormalidades encontradas. Em outro trabalho, com linguados coletados em local contaminado com PAH, as brânquias apresentaram alterações como, hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar, culminando em fusão e um aumento na produção de muco (Khan 2003).

Hipertrofia de **células de cloreto** foram também observadas no tecido branquial dos peixes expostos às FSA nas concentrações mais elevadas de todos os produtos testados. As **células de cloreto** (cc) são grandes, encontram-se esparsas na superfície lamelar, são ricas em mitocôndrias e atuam em processos de transporte ativo de íons. Suas funções são relacionadas à regulação iônica, balanço ácido-básico e redução de transferências gasosas, uma vez que as brânquias são multifuncionais (Perry 1997). Segundo Evans (2008), desde o início dos estudos fisiológicos, numerosos grupos têm demonstrado que as células de cloreto de teleósteos podem manifestar-se como Na-K-ATPase ativas. Em condições iônicas desfavoráveis ou em contato com agentes tóxicos, ocorre a proliferação das células de cloreto nos filamentos e na superfície lamelar da brânquia (Perry 1997). Recentemente, Costa et al. (2013) identificaram em brânquias de peixes expostos ao cádmio, hipertrofia difusa de células de cloreto com aspecto vacuolado devido a retenção de líquido e aumento de tamanho. Este estudo corrobora os resultados encontrados no presente trabalho, onde as células de cloreto apresentaram-se bastante vacuoladas e relativamente numerosas. Estas alterações histopatológicas podem ter consequências adversas sobre a saúde dos peixes, particularmente devido a obstrução da difusão de oxigênio através das brânquias e o comprometimento da função de osmoregulação.

Monteiro et al. (2008), em estudo da exposição de *O. niloticus* ao cobre, concluiu que algumas lesões como edema e aneurisma estavam relacionados com a exposição aguda e a fusão lamelar com a exposição crônica e que descolamento epitelial e o espessamento do epitélio filamentar estavam relacionados com o menor e maior concentração do metal, respectivamente. Não foi possível no presente estudo estabelecer correlações entre as lesões e os produtos testados. Porém, comparando-se os resultados entre as diferentes concentrações de FSA para cada produto, notou-se que a hiperplasia do epitélio filamentar e o descolamento epitelial foram as alterações observadas em concentrações mais baixas, enquanto aneurismas e fusões lamelares foram mais comuns em concentrações mais elevadas das FSA, obedecendo sempre uma relação de dose/dependência.

Em fígados de organismos controle ou daqueles submetidos a dose mais baixa (4,6%) das FSA não foram observadas anormalidades significativas, assim como nas brânquias. No entanto, a avaliação histopatológica no fígado dos animais expostos às concentrações mais altas das FSA (B100, B5 e diesel) evidenciaram alterações hepáticas na arquitetura parenquimatosa, como **vacuolização, lateralização nuclear, deformação do contorno celular**, consideradas respostas ao agente estressor, por indicarem a ativação funcional deste órgão. Diversos estudos descreveram alterações similares por exposição a diferentes xenobióticos (Uguz et al. 2003, Thophon et al. 2003, Cengiz; Unlu 2006, Simonato et al. 2008). Outras alterações importantes como **núcleo picnótico, ausência de núcleo, focos de necrose e degeneração celular**, representam lesões que podem culminar no comprometimento do órgão, e, portanto, correspondem à evidência da danos causados pela exposição ao xenobiótico. A vacuolização de hepatócitos, alteração bastante recorrente neste estudo, é associada com a inibição da síntese de proteínas, esgotamento energético, desagregação de microtúbulos ou deslocamento na utilização do substrato (Hilton et al. 1990). Devido á exposição aguda dos peixes, possivelmente a vacuolização observada no presente estudo é de origem hidrópica.

A análise quali-quantitativa das lesões hepáticas mostrou que, nos animais expostos às FSA, nas concentrações experimentais acima de 10% das FSA, o fígado foi extremamente afetado, indicando danos severos ao órgão. Estas alterações seguiram uma resposta de dose/dependência para todos os produtos testados. Um estudo com linguados (*Pleuronectes vetulus*) mantidos em sedimento contaminado com PAHs, também revelou a presença de lesões hepáticas severas, além de metabólitos desses compostos na bile (Myers et al. 1998).

Linguados (*Pleuronectes americanus*) coletados nas proximidades de uma refinaria de petróleo apresentaram várias lesões histológicas no fígado que foram consideradas indicativas do impacto do petróleo na saúde desses peixes (Khan 1998; 2003). Simonato et al. (2008) em estudo com *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do óleo diesel observou danos severos no fígado desses animais. Estes estudos corroboram com as respostas obtidas no presente estudo.

5. CONCLUSÕES

Mesmo sendo verificado que os parâmetros físicos e químicos das soluções teste estiveram com valores dentro do limite estabelecido para a conservação da vida aquática, foram detectadas efeitos toxicológicos em peixes expostos às frações solúveis de todos os combustíveis utilizados, sendo que a FSA do biodiesel foi a menos tóxica.

Dentre os sinais de alterações resultantes da análise histopatológica foram verificados nas brânquias: edema, descolamento epitelial, hiperplasia do epitélio filamental, vasodilatação, aneurisma, fusão lamelar e focos de necrose. Todas essas são alterações reversíveis exceto os focos de necrose. No fígado: vacuolização, lateralização de núcleos, núcleos picnóticos, ausência de núcleos, focos de necrose e hiperemia) que se constituem em evidências de estresse que devem ser tomadas como aviso das possibilidades de alteração da homeostase e de saúde dos organismos expostos.

A partir de todas as análises foram detectadas respostas nos tecidos branquiais e hepático de *O. niloticus* indicando a potencialidade de risco. Assim, os biomarcadores histopatológicos investigados, mostraram ser úteis na avaliação para o conhecimento e prevenção dos efeitos de produtos derivados do biodiesel e do diesel sobre a biota aquática.

6. REFERÊNCIAS

- Albinati ACL, Moreira ELT, Albinati RCB, Carvalho De Lira AD, Santos GB, Vidal LGO. (2009) Biomarcadores histológico – toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). Arq Bras Med Vet Zootec 61(3):621-627.
- Almeida-Val VMF, Duncan AL, Val AL (2002) Crude Oil Effects on Fish of the Amazon: Current Status. In: Tropical Fish: News and Reviews. International Congress on The Biology of Fish. Vancouver, Canada, p. 49–60.
- Al-Yakoob SN, Gundersen D, Curtis L (1996) Effects of the Water Soluble Fraction of Partially Combusted Crude Oil from Kuwait's Oil Fires (from Desert Storm) on Survival and Growth of the Marine Fish *Menidia beryllina*. Ecotoxicol Environ Saf 35:142–149.
- Anderson JW, Neff JM, Cox BA. (1974) Characteristics of Dispersions and Water Soluble Extracts of Crude and Refined Oils and Their Toxicity to Estuarine Crustaceans and Fish. Mar Biol 27:75–88.
- Akaishi FM, Silva, AHC, Jakobi, SCG, Stjean S, Couternay SC, Lima E, Wagner, ALR, Scofield, Ribeiro CA. (2004) Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. Arch Environ Contam Toxicol 46:244–253.
- Camargo MM; Martinez CB (2007) Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. Neotrop. Ichthyol 5:327-336.
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução N° 357, 17 de março de 2005.
- Corseuil HX, Marins MDM (1998) Efeitos causados pela mistura de gasolina e álcool em contaminações de águas subterrâneas. Bol. téc. PETROBRAS 41(3/4):133-138.
- Cazenave J, Wunderlin DA, Bistoni MA, Ame MV, Wiegand C, Krause E, Pflugmacher S (2005). Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study. Aquat Toxicol 75:178–190.
- Cengiz E, Unlu E (2006) Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: a microscopic study. Environ. Toxicol. Pharmacol. 21:246–253.
- Costa PM, Caeiro S, Costa M.H (2013) Multi-organ histological observations on juvenile Senegalese soles exposed to low concentrations of waterborne cadmium. Fish Physiol Biochem 39:143–158.
- Costa PM, Diniza MS, Caeiro S, Lobo J, Martins M, Ferreira MA, Caetano M, Valec CT, Vallsd AD, Costa MH (2006) Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. Aquatic Toxicol 92:202–212.
- Cruz ACS, Leite MBNL, Rodrigues LEA, Nascimento IA (2012) Estimation of Biodiesel Cytotoxicity by Using Acid Phosphatase as a Biomarker of Lysosomal Integrity. Bull Environ Contamin Toxicol 90: 32-49.

- Cruz AL, Lundstedt LM, Schwantes AR, Moraes G, Klein W, Fernandes MN (2013) Air-breathing behavior and physiological responses to hypoxia and air exposure in the air-breathing loricariid fish, *Pterygoplichthys anisitsi*. *Fish Physiol Biochem* 39:243–256.
- Depledge MH, Fossi MC (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Ecotoxicol* 3:161-172.
- Evans DH (2008) Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *The American J Physiol.* 295:704-713.
- Fanta E, Rios FS, Romão S, Vianna ACC, Freiburger S (2003) Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicol Environ Saf* 54:119-130.
- Ferguson HW (1989) .Systemic pathology of fish, a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Ames: Iowa State University Press.
- Fukuda H, Kondo A, Noda H (2001) Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J of Biosc Bioengine* 92(5):405–416.
- Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RM (2003) Indirects Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems. *The Science of the Total Environ* 317:207-233.
- Fontainhas-Fernandes A, Luzio A, Garcia-Santos S, Carrola J, Monteiro S (2008). Gill histopathological alterations in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to treated sewage water. *Brazilian Archives of Biol. and Technol.* , Curitiba, 52 (5): 1057-1063.
- Garcia-Santos S, Monteiro JCA, Fontainhas-Fernandes (2007) Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59(2) 376-381.
- Harris JC (1982) Rate of Hydrolysis. In: *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*. McGraw-Hill Book Co, NY.
- Heath AG (1995) *Water pollution and fish physiology*. 2ed. Boca Raton : CRC.
- Hollebone B (2009) *Biofuels in the Environment: A Review of Behaviors, Fates and Effects Remediation Techniques*. Freshwater Spills Symposium. St. Louis, MO, USA.
- Hibiya T (1982) *Atlas of fish histology: normal and pathological features*. kodansha, Tokyo, p. 147.
- Hinton DE, Lauren DJ (1990) Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *American Fish. Soc. Symposium* 8:51–65.
- Kennicutt MC, Wade TL, Presley BJ, Requejo AG, Brooks JM, Denoux GJ (1994) Sediment contaminants in Casco Bay, Maine: inventories, sources, and potential for biological impact. *Environ. Sci. Technol.* 28:1–15.
- Khan RA (1998) Influence of petroleum at a refinery terminal on winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Bull Environ Contamina Toxicol* 61:770-777.

- Khan RA (2003) Health of flatfish from localities in Placentia Bay, Newfoundland, contaminated with petroleum and PCBs. *Arch Environ Contamin Toxicol* 44:485-492.
- Khan N, Warith AM, Luk GA (2007) Comparison of Acute Toxicity of Biodiesel, Biodiesel Blends, and Diesel on Aquatic Organisms. *J Air Waste Manag Assoc* 57:286–296.
- Knothe G, Gerpen JV, Krahl J, Ramos LP (2006) *Manual do Biodiesel*. 1a ed. Tradução: Luiz Pereira Ramos. São Paulo: Edgard Blücher, 340 p.
- Krause LC (2008) Desenvolvimento do processo de produção de biodiesel de origem animal. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Porto Alegre. 130 p.
- Kettrup A; Marth P (1998) Specimen banking as environmental surveillance toll. In: Schüürmann G, Markert B (Ed.). *Ecotoxicology-ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects*. New York: John Wiley & Sons.
- Lalman JDA (2000) Anaerobic Degradation of Linoleic (C18:2), Oleic (C18:1) and Stearic (C18:0) Acids and their Inhibitory Effects on Acidogens, Acetogens and Methanogens. Tese apresentada ao curso de Engenharia Civil. Departamento de Eng. Civil. Universidade de Toronto. Toronto, CA, 187 p.
- Lapinskienė A, Martinkus P, Rchzdaite V (2006) Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. *Environ Pollut* 142:432–437.
- Leite MBNL, Araújo MMS, Nascimento IA, Cruz ACS, Pereira SA, Nascimento NC (2011) Toxicity of Water-Soluble Fractions of Biodiesel Fuels Derived from Castor Oil, Palm Oil, and Waste Cooking Oil. *Environ Toxicol Chem* 30(4):893–897.
- Laurent P, Perry SF (1991) Environmental effects on fish gill morphology. *Physiol Zool*. 64:4-25.
- Lins JAPN, Kirschnik PG, Queiroz VS, Cirio SM (2010) Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Rev Acad Ciênc Agrár Ambient Curitiba*. 8(4): 469-484.
- Maduenho LP, Martinez CBR (2008) Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp biochem physiol* 148:265–272.
- Myers MS, Johnson LL, Olson OP, Stehr CM, Horness BH, Collier TK, McCain BB (1998) Toxicopathic hepatic lesions as biomarkers of chemical contaminant exposure and effects in marine bottomfish species from the northeast and Pacific Coast, USA. *Mar Pollut Bull* 37: 92-113.
- Martinez CBR, Nagaie MY, Zaia CTBV, Zaia DAM (2004) Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Brazil J of Biol* 64: 797-807.
- Martins LK, Nascimento IA, Fillman G, King R, Depledge M, Readman J, Evangelista AJA (2005) Lysosomal responses as diagnostic tool for the detection of oil chronic pollution at Todos os Santos Bay. *Environ Res USA* 98 (2):387-396.

- Mallatt J (1985) Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can J Fish Aquat Sci* 42:630-648.
- Monteiro SME, Rocha A, Fontainhas-Fernandes, Sousa M (2008) Quantitative histopathology of *Oreochromis niloticus* gills after copper exposure. *J Fish Biol* 73:1376–1392.
- Müller JB (2011) Avaliação da toxicidade da fração solúvel em água do biodiesel, diesel e da mistura binária diesel/biodiesel de 5% (B5). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC). 112p.
- Nero V, Farwell A, Lister A, Van Der Kraak G, Meer TV, Mackinnon MD, Dixon DG (2006) Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicol Environ Saf Canadá* 63:365–377.
- Nascimento IA, Pereira SA, Leite MBNL, da Cruz AC, Santos JM, Barros DA, Veras TF, Alvarez HM, Nascimento MA (2009) 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 Scie, New York, NY, USA, pp 61–90.
- Navas JM, Babín M, Casado S, Fernández C, Tarazona, JV (2006) The Prestige Oil Spill: A Laboratory Study about the Toxicity of the Water-Soluble Fraction of the Fuel Oil. *Mar Environ Res* 62:352–355.
- Pacheco M, Santos MA (2001) Biotransformation genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) *Ecotoxicol Environ Saf* 53:331-347.
- Paixão JF, Nascimento IA, Pereira SA, Leite MBL, Correia G, Severiano J, Rebouças M, Matias GRA, Rodrigues ILP (2007) Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostre rhizophorae*) embryos: an approach to minimize pollution risks. *Environ Res* 103:365–374
- Pal S, Kokushi E, Cheikyula JO, Koyama J, Uno S (2011) Histopathological effects and EROD induction in common carp exposed to dietary heavy oil. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:307–314.
- Peixoto F, Alves-Fernandes D, Santos D, Fontainhas-Fernandes A (2008) Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochem Physiol* 85(2):91-96.
- Pereira AC, Silva RF (2012) Produção de tilápias. Manual técnico, 31, ISSN 1983-5671, 52p.
- Perry SF (1997) The Chloride Cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. *Ann Rev Physiol* 59:325-47.
- Pesce SF, Cazenave J, Monferra MV, Frede S, Wunderlin, DA (2008) Integrated survey on toxic effects of lindane on neotropical fish: *Corydoras paleatus* and *Jenynsia multidentata*. *Environ Poll* 156:775–783.

- Rand GM, Petrocelli SR (1985) Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. Washington, D.C.:Hemisphere 666 p.
- Ribeiro NM, Pinto AC, Quintella CM, Rocha GO, Teixeira LSG, Guarieiro LLN, Rangel M.C, Veloso M C, Rezende MJC, Cruz RS, Oliveira AM., Torres EA, Andrade JB (2007) The role of additives for diesel and diesel blended (ethanol or biodiesel) fuels: a review. *Energy Fuels* .21:2433-2445.
- Rodrigues RV, Miranda-Filho KC, Gusmão EP, Moreira CB, Romano LA, Sampaio LA (2010) Deleterious Effects of Water-Soluble Fraction of Petroleum, Diesel and Gasoline on Marine Pejerrey *Odontesthes argentinensis* Larvae. *Scienc of the Total Environ.* 408:2054–2059.
- Rotta MA (2003) Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. (Documentos / Embrapa Pantanal ISSN 1517-1973; 53), 48 p.
- Sepici-Dinçel A, Cağlan Karasu Benli A, Selvi M, Sarikaya R, Sahin D, Ayhan Ozkul I, Erkoç F. (2009). Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: Biochemical, hematological, histopathological alterations. *Ecotoxicol. Environm Saf* 72:1433-1439.
- Stentiford GD, Longshaw M, Lyons BP, Jones G, Green M, Feist SW (2003) Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Mar Environ Res* 55:137–159.
- Santos TCA, Gomes V, Passos MJACR, Rocha AJS, Salaroli, R.B, Van Ngan. P (2011) Histopathological alterations in gills of juvenile Florida pompano *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) following sublethal acute and chronic exposure to naphthalene. *Pan-American J Aquat Sci* 6(2):109-120.
- Schwaiger J, Wanke R, Adam S, Pawert M, Honnen W, Triebkorn R (1997) The use of histopathological indicators to evaluate contaminant related stress in fish. *Dordrech. J Aquat Ecosy Stress and Recovery* 6(1):75-86.
- Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele RD (2004) Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat Toxicol* 68: 141–150.
- Saeed T, Al-Mutairi M (1999) Chemical Composition of the Water Soluble Fraction of the Leaded Gasolines in Seawater. *Environ Internat* 25(1):117-129.
- Simpson MG, Parry M, Kleinkauf D, Swarbreck D, Walker P, Leah RT (2000) Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from a UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals. *Mar Environ Res* 50:283–287.
- Simonato JD (2006) Biomarcadores funcionais e histológicos associados à exposição do peixe *Prochilodus lineatus* ao óleo diesel. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina. 66 p.

- Simonato JD, Guedes CLB, Martinez CBR. (2008) Biochemical, Physiological, and Histological Changes in the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* Exposed to Diesel Oil. *Ecotoxicol Environ Saf* 69:112–120.
- Tiburtius ERL, Peralta-Zamora P, Emmet A, Leal ES (2005) Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. *Quím Nova* 28: 61- 64.
- Turrio-Baldassarri L, Battistelli CL, Conti L, Crebelli R, De Berardis B, Iamiceli AL, Gambino M, Iannaccone S (2004) Emission comparison of urban bus engine fueled with diesel oil and biodiesel blend. *Sci Total Environ* 327:147–162
- Thopson S, Kruatrachue M, Upatham ES, Pokethitiyook P, Sahaphong S, Jaritkhuan (2003) Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ Poll* 121:307–320.
- Uguz C, Iscan M, Ergu A, Isgor B, Togan I (2003) The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Environ Res* 92: 262–270.
- Vanzella TP, Martinez CBR, Cólus IMS (2007) Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat Re* 631:36–43.
- Van Den Heuvel MR et al (2000) Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated water. *Ecotoxicol Environ Saf* 46:334-341.
- Van Dyk JC, Pieterse GM, Van Vuren JHJ (2007) Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicol. Environ Saf* 66:432–440.
- Vieira FCS (2004) Toxicidade de Hidrocarbonetos Monoaromáticos do Petróleo sobre *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea: Mysidacea). Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis 72 p.
- Wang WG, Lyons DW, Clark NN, Gautam M (2000) Emissions from nine heavy trucks fueled by diesel and Biodiesel blend without engine modification. *Environ Sci Technol* 34:933–939.
- Wilson JM, Laurent P (2002) Fish Gill Morphology: Inside out. *J Exp Zool* 293:192-213.
- Zhang Y, Dub MA, McLean DD, Kates M (2003) Biodiesel Production from Waste Cooking Oil: Economic Assessment and Sensitivity Analysis; *Biores Technol* 90:229-240.

Tabela 01. Resultados das concentrações de BTEX, hidrocarbonetos aromáticos (C9s+), não aromáticos e metanol nas frações solúveis em água (FSA) de diesel , B5 e B100 e os limites máximos permitidos para o BTEX em água para consumo humano (Portaria 1469/2000 do Ministério da Saúde)

Compostos	Diesel	B5	B100	Limite Máximo
Benzeno (µg/L)	280	270	0	05
Tolueno (µg/L)	410	420	0	170
Etilbenzeno (µg/L)	100	90	0	200
O-m-p-xileno (µg/L)	1.110	920	0	300
Total BTEX (µg/L)	1.900	1.700	0	675
C9s+ Aromático (µg/L)	230	150	40	-
Não aromáticos (µg/L)	200	170	40	-
Metanol (mg/L)	1.9	0.7	83	-

Tabela 02. Alterações histológicas branquiais com seus respectivos estágios de comprometimento funcional (I e II) e a frequência dessas alterações em *O. niloticus* expostos às FSA de B100 (biodiesel), B5 (Blenda = 5% biodiesel, 95% diesel) e Diesel.

Alterações	Estágio	Controle	B100					B5					Diesel				
			4,6	10	22	46	100	4,6	10	22	46	100	4,6	10	22	46	100
Edema do epitélio filamentar	I	+	+	+	++	++	+++	+	++	++	+++	++++	+	++	++	+++	++++
Hiperplasia do epitélio filamentar	I	+	+	++	++	+++	+++	+	++	+++	+++	++++	+	++	+++	+++	++++
Descolamento epitelial	I	0	0	+	++	+++	+++	0	+	+++	++++	++++	0	+	+++	++++	++++
Vasodilatação do eixo vascular lamelar	I	0	0	0	++	++	+++	+	++	++	+++	++++	+	++	++	+++	++++
Aneurisma	II	0	0	+	++	+++	++++	0	++	++	++++	++	0	++	++	++++	++
Fusão lamelar	II	0	0	0	+	++	+++	0	+	++	+++	++++	0	+	++	+++	++++

As lesões no tecido foram classificadas como: ausente (0), raramente presente (+), pouco frequente (++), frequente (+++) e muito frequente (++++).

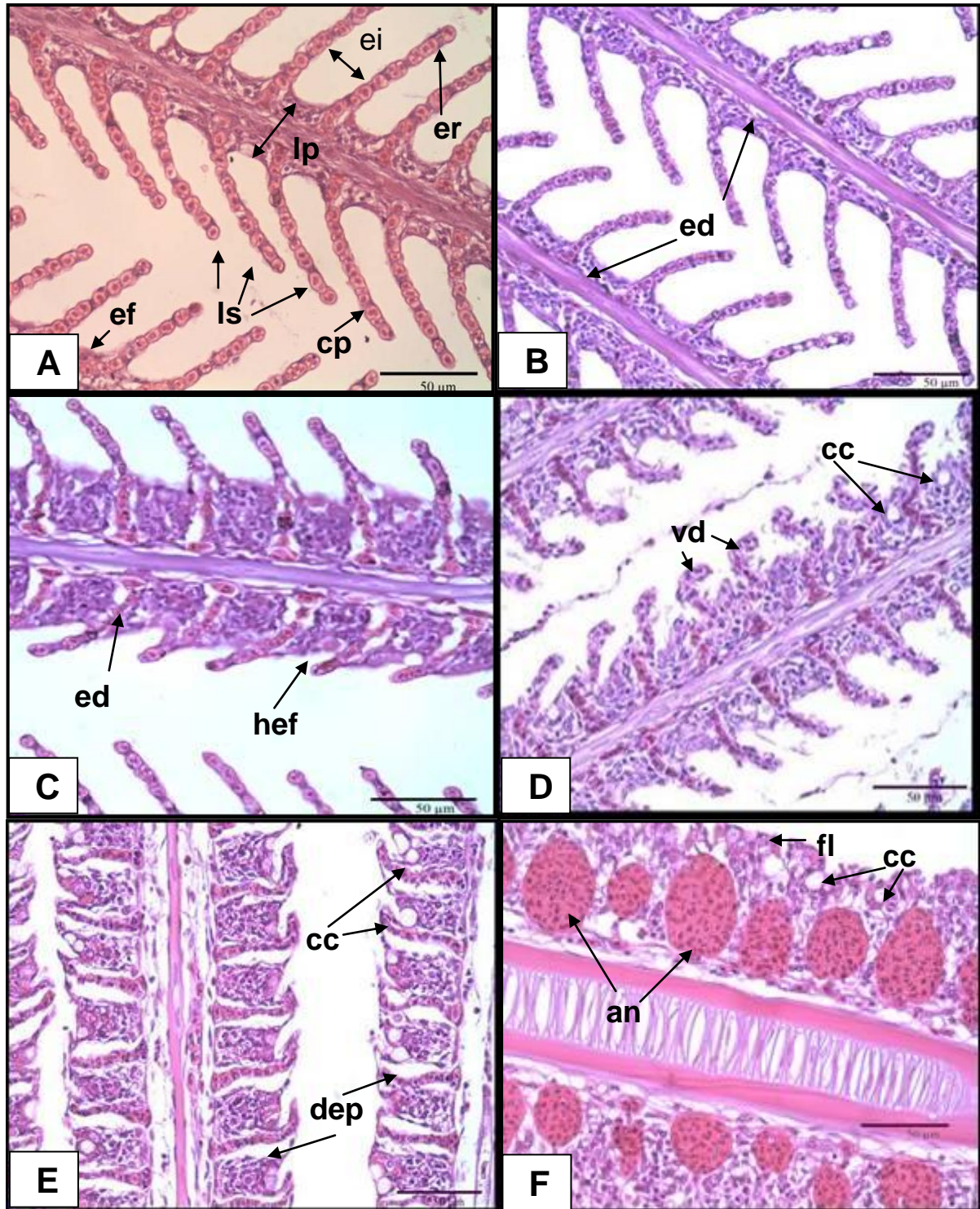


Figura 01. Fotomicrografias das brânquiais de *O. niloticus*: [A] animal controle (aspecto normal), mostrando lamela primária (lp); lamela secundária (ls); epitélio filamento (ef); célula pilar (cp); eritrócitos (er); espaço interlamelar (ei). [B – F], tecido branquial após exposição a 4,6, 10, 22, 46 e 100% da FSA de **Biodiesel (B100)**, respectivamente: [B] edema (ed); [C] hiperplasia do epitélio filamento (hef); [D] vasodilatação lamelar (vd) ; [E] descolamento epitelial (dep), hipertrofia de células de cloreto (cc) ; [F], aneurisma (an) na base da lamela, fusão lamelar (fl) e hipertrofia de células de cloreto (cc). H&E (barra = 50 µm).

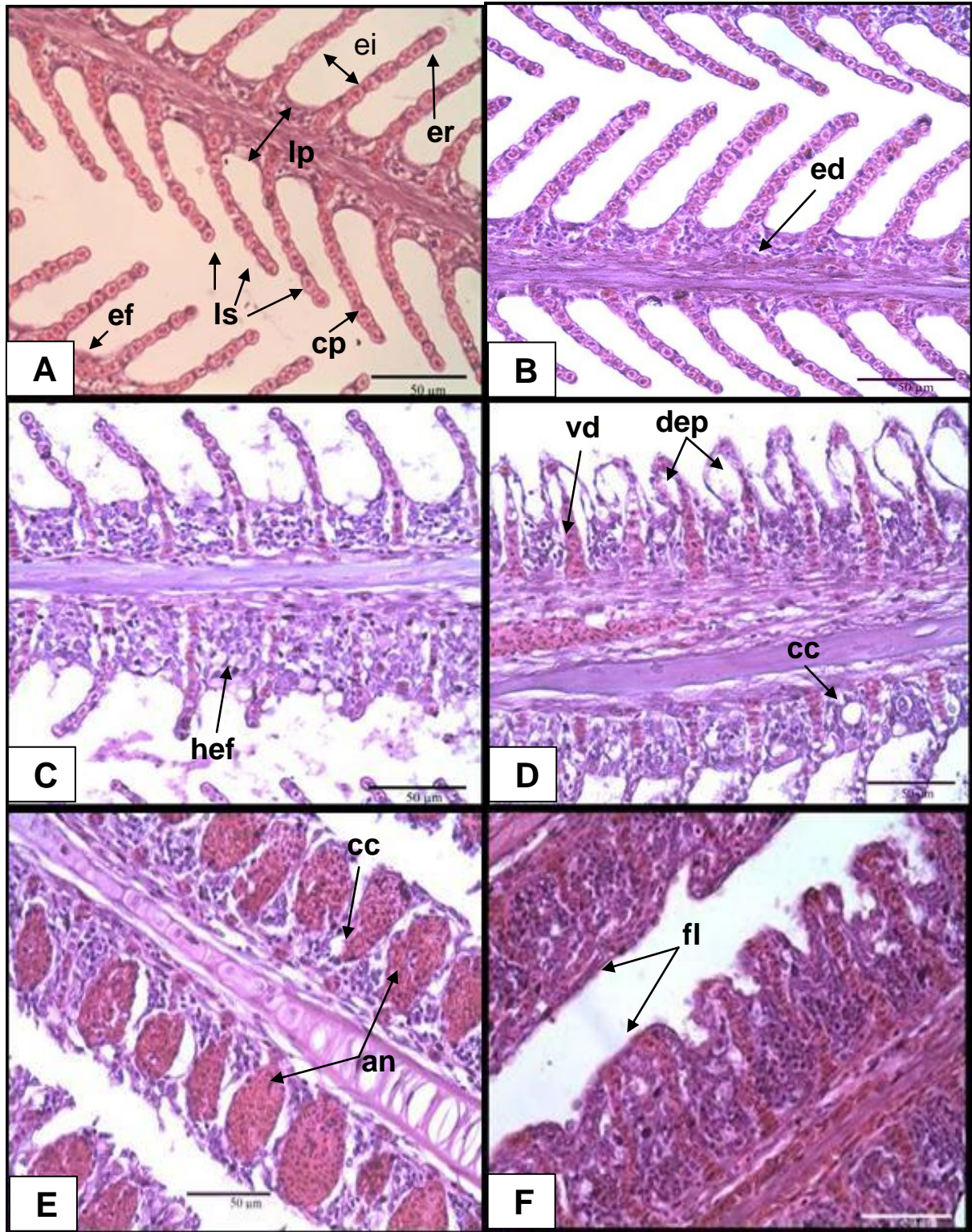


Figura 02. Fotomicrografias das brânquiais em *O. niloticus*: [A] animal controle (aspecto normal) mostrando lamela primária (lp); lamela secundária (ls); epitélio filamento (ef); célula pilar (cp); eritrócitos (er); espaço interlamelar (ei). [B a F] tecido branquial após exposição à 4,6, 10, 22, 46 e 100% das FSA de B5, respectivamente: [B] edema (ed); [C] alteração do epitélio filamento (hef); [D] descolamento epitelial (dep), vasodilatação lamelar (vd) intensa; [E] descolamento epitelial (dep); [F] fusão lamelar (fl). H&E (barra = 50 µm).

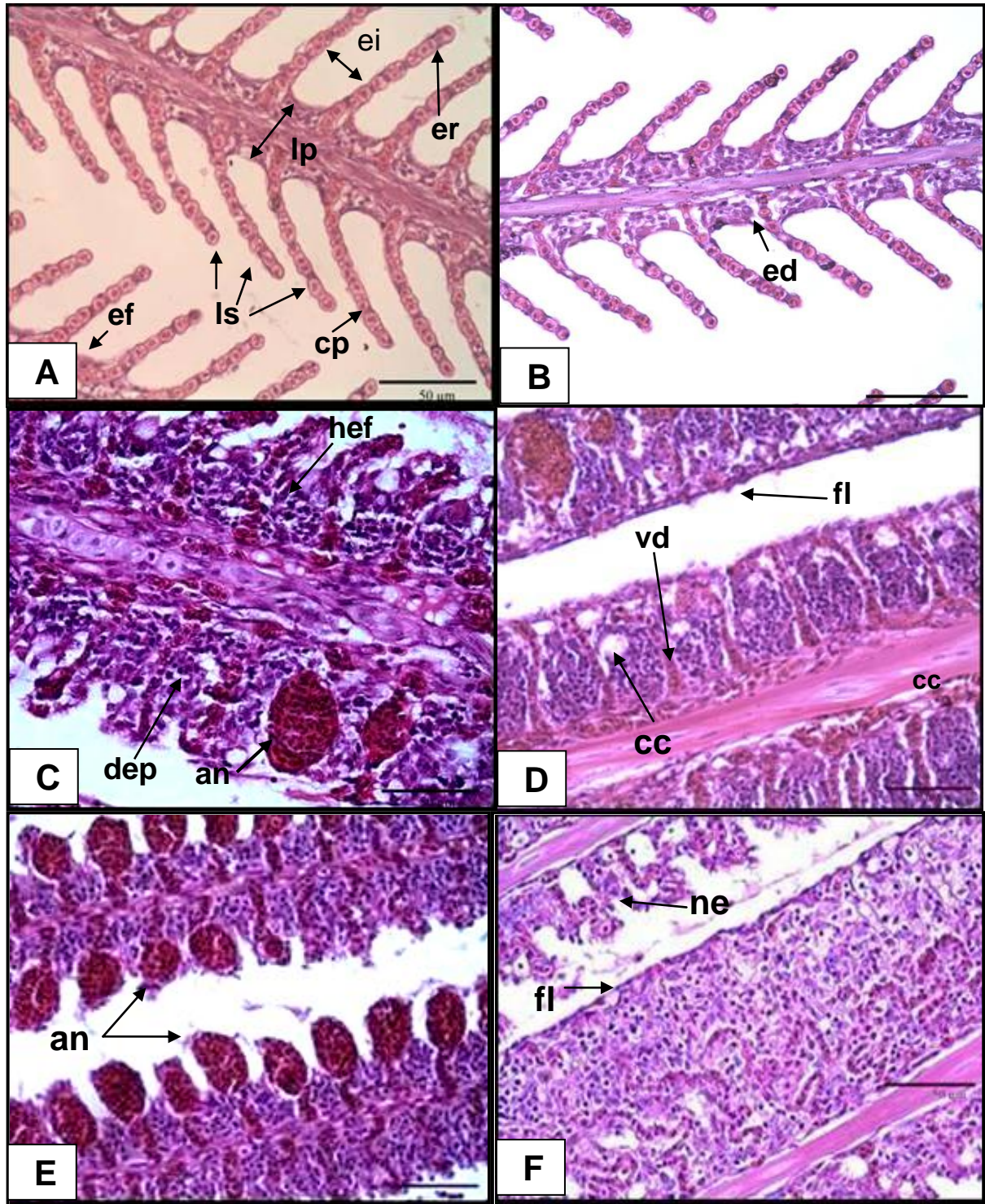


Figura 03. Fotomicrografias das brânquiais em *O. niloticus*: [A] animal controle (aspecto normal) mostrando lamela primária (lp); lamela secundária (ls); epitélio filamento (ef); célula pilar (cp); eritrócitos (er); espaço interlamelar (ei). [B a F] tecido branquial após exposição à 4,6, 10, 22, 46 e 100% das FSA de Diesel, respectivamente: [B] edema (ed); [C] hiperplasia do epitélio filamento (hef), aneurisma (an), descolamento epitelial (dep); [D] fusão lamelar (FL), vasodilatação lamelar (vd); [E] aneurisma apical (an), hiperplasia acentuada do epitélio filamento (hef); [F] fusão lamelar (fl), focos de necrose (ne). H&E. Barra = 50 μm.

Tabela 03. Frequência de alterações histológicas hepáticas com seus respectivos graus de comprometimento funcional (I e II) e a frequência dessas alterações em *O. niloticus* expostos às FSA de **B100 (biodiesel), B5 (Blenda = 5% biodiesel, 95% diesel) e Diesel.**

Alterações	Estágio	Controle	B100					B5					Diesel				
			4,6	10	22	46	100	4,6	10	22	46	100	4,6	10	22	46	100
Vacuolização dos hepatócitos	I	+	+	+++	+++	+++	++++	++	+++	+++	++++	++++	++	+++	+++	++++	++++
Lateralização de núcleo (núcleo na periferia da célula)	I	+	+	+++	+++	+++	++++	++	++	+++	++++	++++	++	+++	+++	++	++++
Núcleos picnóticos	II	0	0	+	++	+++	+++	0	++	+++	++++	++++	0	++	+++	++++	++++
Ausência de núcleo	II	0	0	+	+	++	+++	+	++	++	++++	++++	+	++	++	+++	++++
Focos de necrose (ruptura celular)	II	0	0	0	++	++	+++	0	+	++	+++	++++	0	+	++	+++	++++
Degeneração celular	II	0	0	+	+	++	+++	0	+	+	+++	++++	0	+	++	+++	++++
Hiperemia ou congestão	II	0	0	+	++	+++	+++	0	+++	+++	+++	++++	0	+++	+++	+++	++++

As lesões no tecido foram quantificadas como: ausentes (0), raramente presentes (+), pouco frequentes (++) , frequentes (+++) e muito frequentes (++++).

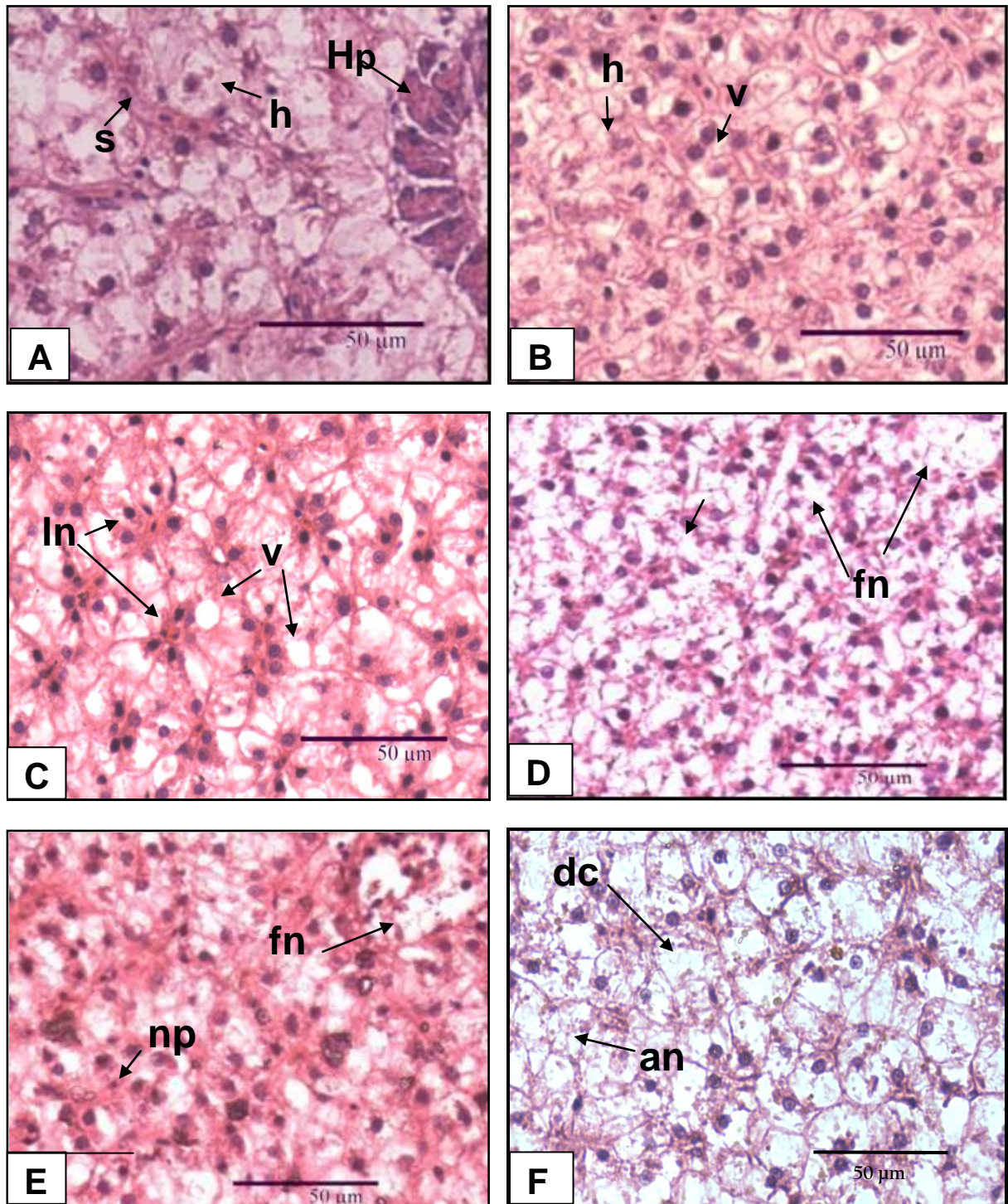


Figura 04 Fotomicrografias do tecido hepático de *O. niloticus* : [A] (controle) mostrando hepatócitos normais (**h**), sinusoides (**s**), hepatopâncrea (**Hp**), vacúolos (**v**). [B a F] tecido hepático após exposição a 4,6, 10, 22, 46 e 100% das FSA de **Biodiesel (B100)** : [B] hepatócitos normais com raros vacúolos; [C] pequenos e grandes vacúolos (**v**), lateralização de núcleos (**ln**) ; [D]. vacuolização acentuada , focos de necrose (**fn**); [E] vacuolização mais acentuada, foco de necrose (**fn**), núcleos picnóticos (**np**), e hepatócitos sem núcleo (**an**); [F] vacuolização grosseira sugerindo alterações muito intensas, ausência de núcleos (**an**), degeneração celular (**dc**). Barra= 50 µm.

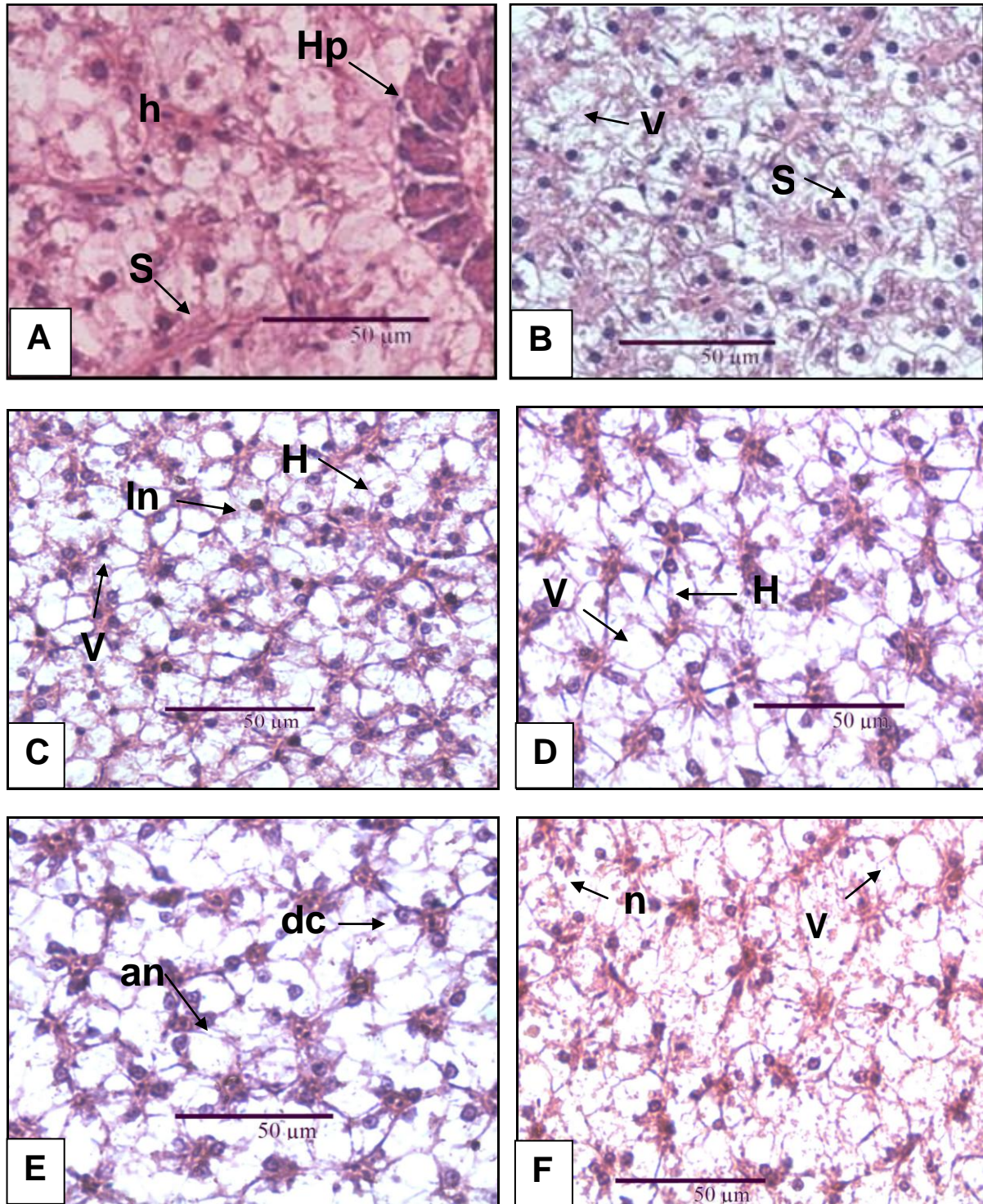


Figura 05 Fotomicrografias do tecido hepático de *O. niloticus*: [A] (controle) mostrando hepatócitos normais (h), sinusoides (S), hepatopâncrea (Hp), vacúolo (V); [B a F] tecido hepático após exposição a 4,6, 10, 22, 46 e 100% das FSA de B5 comercial, respectivamente: [B] hepatócitos normais com raros vacúolos; [C] grandes vacúolos, lateralização de núcleos (ln) bastante acentuada e hiperemia (Hm) muito frequente; [D] vacuolização acentuada e difusa; [E] vacuolização mais acentuada, hiperemia (hm), degeneração celular (dc), núcleos picnóticos (np) e grande número de hepatócitos sem núcleo (an), [F] Hiperemia (Hm), vacuolização (V) grosseira sugerindo alterações muito intensas, ausência de núcleos (an), necrose (n). Barra = 50 µm.

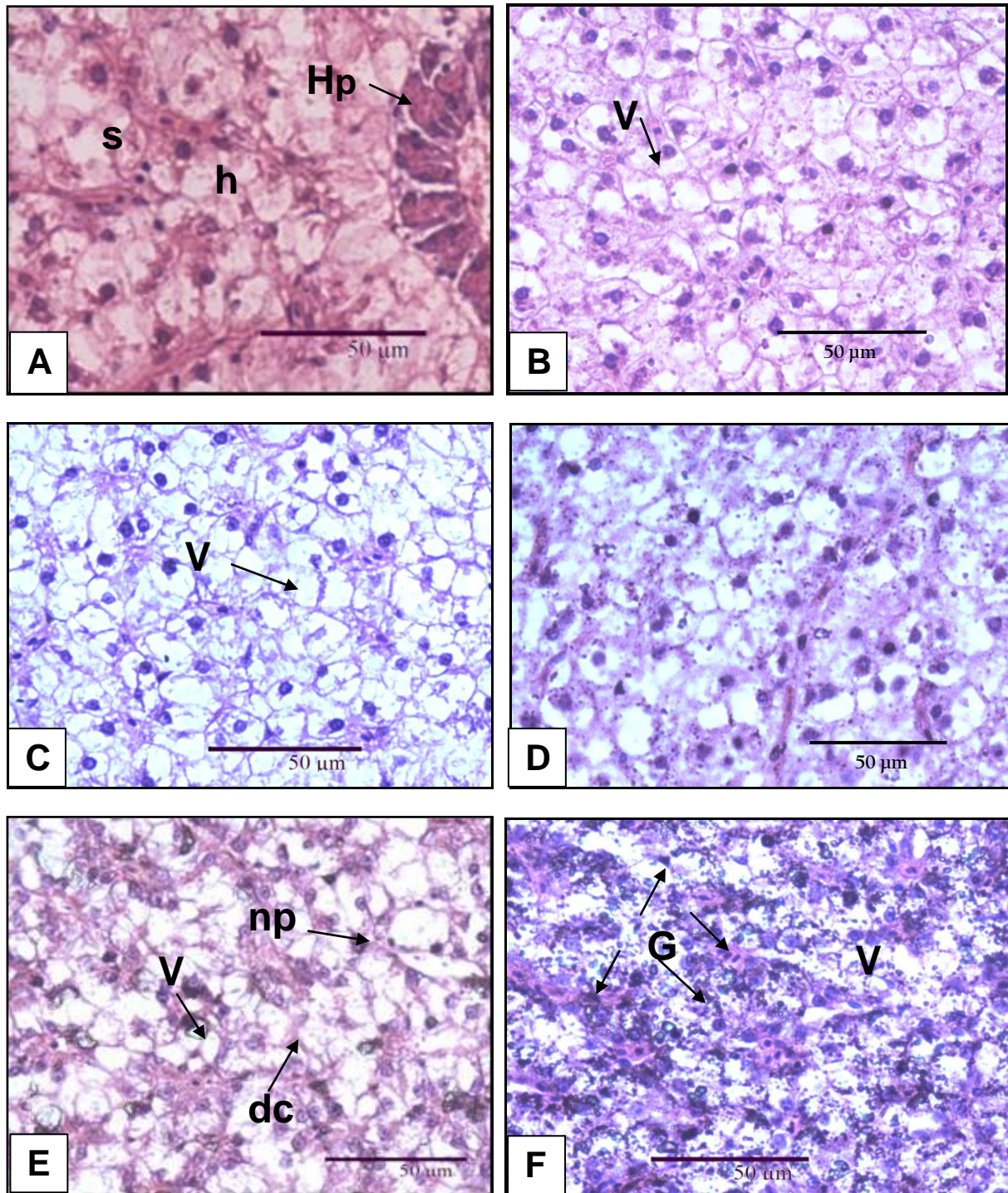


Figura 06. Fotomicrografias do tecido hepático do peixe *O. niloticus*: [A] (controle) mostrando hepatócitos normais (h) com contornos regulares, sinusoides (s), hepatopâncrea (Hp), vacúolo (v). [B a F] tecido hepático após exposição a 4,6, 10, 22, 46 e 100% da FSA de Diesel, respectivamente: [B] hepatócitos normais (h) com contornos regulares e raros vacúolos (v); [C] grandes vacúolos (V), alterações nos hepatócitos; [D] vacuolização acentuada e mais difusa; [E] vacuolização grosseira e difusa (v), não há limitação entre os hepatócitos indicando que houve ruptura da membrana celular (dc), núcleos picnóticos (np) e grande número de hepatócitos sem núcleo (an); [F] vacuolização grosseira (V), ausência de núcleos (an), degeneração celular (dc) presença de granulação (G) intensa, (40X H&E). Barra= 50 µm.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os biomarcadores são importantes para avaliar o potencial de risco dos contaminantes, uma vez que somente as análises químicas não possibilitam esse tipo de avaliação. Neste sentido, análises de toxicidade já vêm sendo exigidas por leis ambientais no Brasil. A Resolução no. 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), referente às condições e padrões de lançamento de efluentes, estabelece que os critérios de toxicidade devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos. Nesse contexto, os resultados dos biomarcadores bioquímicos, de cito/genotoxicidade e histopatológicos, juntamente com as análises cromatográficas, possibilitaram a avaliação do efeito tóxico dos combustíveis (B100, B5 comercial e diesel) quando lançados no meio aquoso, além de propiciar a comparação da sensibilidade entre as diversas técnicas. (Figura 03).

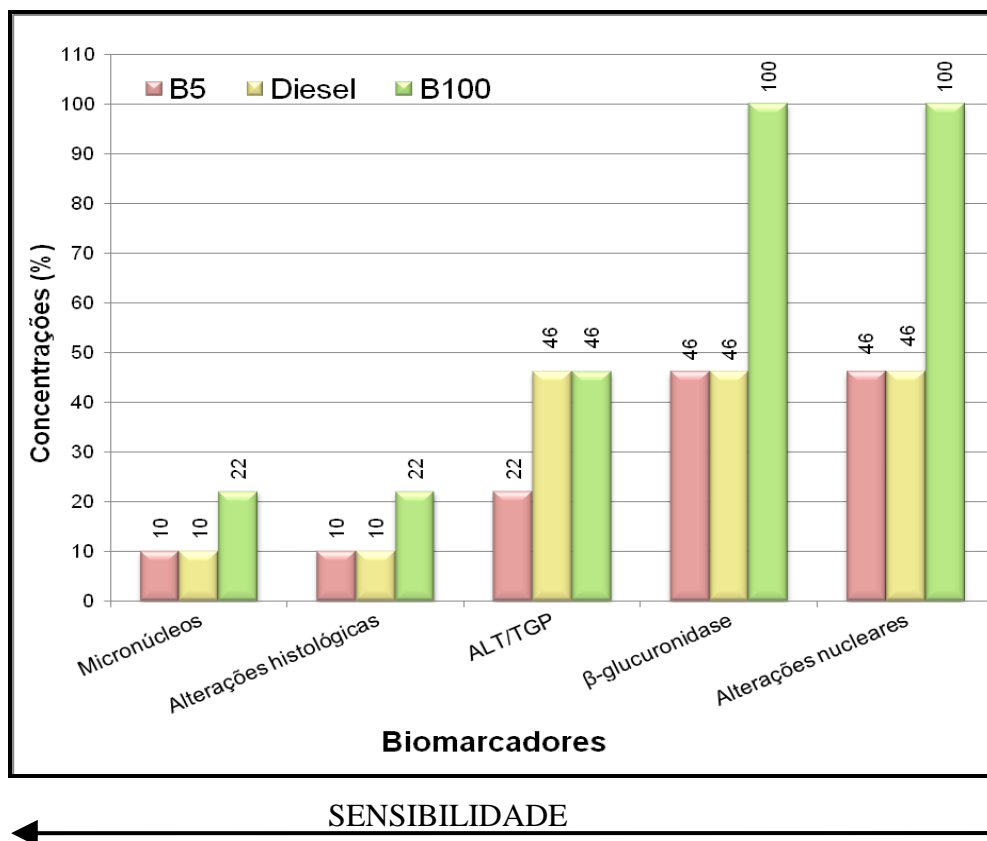


Figura 03. Sensibilidade de biomarcadores à exposição das FSA de biocombustíveis: concentrações indicativas de LOEC (Lowest observed effect concentration) com significância estatística.

A avaliação ecotoxicológica se faz em termos de respostas biológicas à concentrações dos tóxicos (isolados ou em conjunto) que causem efeitos (agudos, geralmente com morte do organismo-teste, ou crônico, com alterações recuperáveis ou não). Como objeto de avaliação toma-se a menor concentração de efeito observado (LOEC - Lowest observed effect concentration) como aquela que deve ser evitada para preservar alterações da homeostase ambiental. Entretanto, buscando prevenir efeitos deletérios ao ambiente, os órgãos de controle exigem, na legislação pertinente, a consideração da concentração de não efeito (NOEC – no observed effect concentration) para garantir a qualidade do ambiente.

Os resultados apresentados nos artigos 01 e 02 mostram claramente que as frações solúveis em água (FSA) dos três combustíveis testados promovem alterações importantes em *Oreochromis niloticus*, possivelmente decorrente da presença de teores elevados de BTX (benzeno, tolueno e xileno), C9s+ aromáticos e não aromáticos nas FSA dos petrocombustíveis e do metanol nas FSA do B100 (biodiesel).

Em nível bioquímico observou-se a alteração das vias de biotransformação de xenobióticos, constatada pelo aumento da atividade da enzima lisossômica β -glucuronidase, supostamente induzida por compostos tóxicos presentes nas FSA de B5, diesel e B100. A atividade desta enzima, que catalisa reações de hidrólise, mostrou ser um biomarcador de baixo custo e facilmente mensurável; entretanto o nível de sensibilidade deste biomarcador foi comparativamente mais baixo (Figura 03) que os baseados em alterações histológicas e genéticas (presença de micronúcleos).

A atividade das aminotransferases (AST e ALT), já empregadas em estudos de toxicidade, com base nos resultados obtidos neste trabalho, é questionável quanto a sua eficiência para este fim. Enquanto a atividade ALT, induzida pelas FSA dos três combustíveis, mostrou alguns transtornos metabólicos no fígado, a atividade AST não apresentou alteração significativa, supostamente por não ser um indicador específico de dano ao fígado, sendo mais eficiente para detecção de danos no músculo cardíaco, não pesquisado neste trabalho.

Danos citogenotóxicos, menos evidentes na exposição ao B100, foram observados nos eritrócitos dos peixes expostos aos três combustíveis testados, o que sugere a presença de

compostos com potencial clastogênico e/ou aneugênico nas FSA testadas. A hipótese para explicar a formação de tais alterações é a ocorrência de problemas durante a segregação das cromátides no processo de divisão celular, ou mesmo durante a amplificação gênica. Os dados obtidos pelo teste de micronúcleo e o registro de alterações morfológicas nucleares em avaliações genotóxicas confirmam sua utilidade em avaliação ecotoxicológica, sendo o primeiro de maior eficiência, pela maior sensibilidade.

O estudo histopatológico aplicado aos peixes expostos aos três combustíveis mostrou importantes alterações nos tecidos branquiais e hepáticos obedecendo a um grau progressivo de severidade dose/resposta, refletindo a ação dos produtos tóxicos presentes nas FSA sobre a integridade dos tecidos estudados e os consequentes danos para a manutenção da homeostase nos peixes. A FSA do biodiesel mostrou-se também com o uso da abordagem histológica, como menos tóxica em comparação com as FSA de B5 comercial e diesel. Entretanto, o B100 foi capaz de ativar respostas bioquímicas, mutagênicas e histopatológicas, o que evidencia a possibilidade de riscos ambientais, sobretudo pelas estimativas de aumento de sua produção e uso, e pelas possibilidades ampliadas de derrames acidentais em corpos de água. Em função disso, a presente pesquisa resultou não apenas no desenvolvimento de ferramentas eficientes, rápidas e de baixo custo para salvaguarda de riscos ambientais, como também evidenciou comparativamente a sensibilidade entre as técnicas empregadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Boletim Anual de preços: preços do petróleo, gás natural e combustíveis nos mercados nacional e internacional.** Rio de Janeiro: ANP, 2012.

ADAMS, S.M. **Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish.** American Fisheries Societies Symposium, 8:1-8, 1990.

AKAISHI, F.M *et al.* **Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil.** Archives Environ. Contam. Toxicol., v. 46, p. 244–253, 2004.

ALBINATI, A.C.L *et al.* **Biomarcadores histológico – toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*).** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 61, n. 3, p. 621-627, 2009.

ALMEIDA, J.S; MELETTI, P.C; MARTINEZ, C.B.R. **Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*.** Comp. Biochem. and Physiol. 140: 356-363, 2005.

ALMEIDA-VAL, V.M.F; DUNCAN, A.L; VAL, A.L. **Crude oil effects on fish of the amazon: current status. in: tropical fish: news and reviews.** International Congress on the Biology of Fish. Vancouver, Canada, p. 49–60, 2002.

ALTINOK, I; CAPKIN E. **Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan. toxicologic pathology,** v. 35, n.3, p. 405. 2007.

ALTIERI, M. **Agroecologia a dinâmica produtiva da agricultura sustentável.** ISBN 85-7025-538-1. 5ª Ed. 2010.

AL-SABTI, K; METCALFE, C.D. **Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water.** Mutat. Res. 343:121–135, 1995.

AL-YAKOUB, S.N; GUNDERSEN, D; CURTIS, L. **Effects of the water soluble fraction of partially combusted crude oil from kuwait's oil fires (from desert storm) on survival and growth of the marine fish *menidia beryllina*.** Ecotoxicol. Enviro. Saf. 35:142–149, 1996.

ANDERSON, J.W; NEFF, J.M; COX, B.A. **Characteristics of Dispersions and Water Soluble Extracts of Crude and Refined Oils and Their Toxicity to Estuarine Crustaceans and Fish.** Mar. Biology, 27:75–88, 1974.

ATADACHI, I.M; AROUA, M.K; AZIZ, A.A. **High quality biodiesel and its diesel engine application: A review.** Renewa and Sustai Energy Reviews, 14, 1999-2008, 2010.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura.** Santa Maria: Ed. UFSM, 2002.

BENINCÁ, C. **Biomonitoramento das lagoas estuarinas do Camacho – Jaguaruna (SC) e Santa Marta – Laguna (SC); utilizando *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae)**. Dissertação de Mestrado, Curitiba: UFPR (Universidade Federal do Paraná), PR, 2006.

BILGEN, S; KELES, S; KAYGUSUZ, A; SARI, A.; KAYGUSUZ, K. *Renew. Sust. Energ. Rev.* DOI:10.1016/j.rser, 2006.

CABRIOTI, L.N. **Estudo da antigenotoxicidade, genotoxicidade e citotoxicidade de frações do extrato metanólico em *Agaricus brazei* *in vitro***. Dissertação de Mestrado. Londrina: UEL (Universidade Estadual de Londrina) PR, 2005.

ÇAVAS, T; ERGENE-GÖZÜKA, S. **Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organized regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent**. *Mutat. Res.*, 534:93-99. (doi:10.1016/S1383-5718(03)00091-3), 2003.

CAZENAVE, J *et al.* **Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study**. *Aquat. Toxicol.* 75:178–190, 2005.

CHILKE, A.M. **β -Glucuronidase activity during ontogeny and seasonal cycle of Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton)**. Ph.D. Thesis, RTM Nagpur University, Nagpur, India, 2006.

CHILKE A.M. **Kinetic study of hepatic β -glucuronidase in Indian Major Carp, *Labeo rohita* (Hamilton)**. *Fish Physiol. Biochem.* 36:1145-1149, 2010.

CONSELHO NACIONAL DE POLÍTICA ENERGÉTICA. CNPE. **Resolução n°6, de 16 de setembro de 2009**. Diário Oficial da União, Brasília, 26 de outubro.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução No 273, de 29 de novembro de 2000**. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res>, 2000.

CRUZ, A.L *et al.* **Air-breathing behavior and physiological responses to hypoxia and air exposure in the air-breathing loricariid fish, *Pterygoplichthys anisitsi***. *Fish Physiol Biochem* 39:243–256, 2013.

CRUZ *et al.* **Estimation of Biodiesel Cytotoxicity by Using Acid Phosphatase as a Biomarker of Lysosomal Integrity**. *Bull, of Environ. Contam. and Toxicol.* 90:2-49, 2012.

DEMIRBAS, D; DEMIRBAS, S. **Role of the State in Developing countries: Public Choice versus Schumpeterian Approach** *Business and Economics Research Journal*, 2(1):15-30, 2011.

DEPLEDGE, M.H; FOSSI, M.C. **The role of biomarkers in environmental assessment**. *Ecotoxicology* 3:161 172, 1994.

DE FLORA, et al . **Multiple biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water**. *Mutat. Res.*, 319: 167-177, 1993.

Di GIULIO, R.T; BENSON, W.H; SANDERS, B.M; VAN VELD, P.A. **Biochemical Mecanisms: Metabolism, Adaptation and Toxicity.** In: RAND, G. (Ed.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmenta Fate and Risk Assessment.* London: Taylor & Francis, 1995.

EL-SHEHAWI *et al.* **Estimation of water pollution by genetic biomarkers in tilápia and catfish species shows species-site interation.** *African. Journ. of Biotec..* 6(7): 840-846, 2007.

ENCINAR, J.M *et al.* **Preparation and Properties of Biodiesel from *Cynara cardunculus* L. Oil.** *Industrial & Engineering Chemistry Res.* v. 38, p. 2927–2931, 1999.

FENECH,M. **The in vitro micronucleus technique.** *Mut. Res.* 455:81-95. (doi:10.1016/S0027-5107(00)00065-8), 2000.

FERGUSON, H.W. **Systemic pathology of fish, a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts.** Ames: Iowa State University Press, 1989.

FILHO, A.K.K. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do impacto do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce.** Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, 2006.

FLEEGER J.W; CARMAN K.R.; NISBET R.M. **Indirects Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems.** *The Sciec. of the Total Environ.,* 317:207-233, 2003.

FREIRE, MM *et al.* **Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos.** *Oecol. Bras.* 12(3):347-354, 2008.

FUKUDA, H; KONDO, A; NODA, H. **Biodiesel fuel production by transesterification of oils.** *J of Bioscand Bioengineering.* 92, Issue 5: 405–416, 2001.

GARCIA-SANTOS, S; MONTEIRO, J.C.A; FONTAINHAS-FERNANDES. **Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* vol.59 no.2 Belo Horizonte Apr, 2007.

GAUR, J.P; SINGH, A.K. **Comparative Studies on the Toxicity of Petroleum Oils and Their Aqueous Extracts Towards *Anabaena doliolum*.** *Proceedings: Plant Sciences,* v. 99, n° 5, p. 459–466, 1989.

GERIS, R *et al.* **Biodiesel from soybean oil - experimental procedure of transesterification for organic chemistry laboratories.** *Quím. Nova* vol.30 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2007.

GRIFFIN, L.F, CALDER, J.A. **Toxic Effect of Water-Soluble Fractions of Crude, Refined, and Weathered Oils on the Growth of a Marine Bacterium.** *Applied and Environmental Microbiology,* v. 33, n° 5:1092–1096, 1997.

GRISOLIA, C.K; CORDEIRO, C.M.T. **Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish.** *Genetics and Mol. Biol.* 23: 235-239, 2000.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. 2nd ed. Florida: Lewis Publishers, 1995.

HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. Kodansha, Tokyo, p. 147, 1982.

HINTON, D.E; LAUREN, D.J. **Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes**. American Fisheries Society Symposium 8, pp. 51–65, 1990.

HOLLEBONE B. **Biofuels in the Environment: A Review of Behaviors, Fates and Effects & Remediation Techniques**. Freshwater Spills Symposium. St. Louis, MO, USA, 2009.

HUGGET, R.J; UNGER, M.A; SELIGMAN, P.F; VALKIRS, A.O. **The marine biocide tributyltin**. Environmental Science & Technology, 26: 233–410, 1992.

IEA – INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **The International Energy Agency, World Energy Outlook**. International Energy Agency, Paris 2012.

INAYAT-HUSSAIN, S.H; LUBIS, S.H; SATOH, T *et al.* **Is plasma β -glucuronidase a novel human biomarker for monitoring anticholinesterase pesticides exposure? A Malaysian Experience**. Toxicology and Applied Pharmacology 219: 210–216, 2007.

KAVITHA C *et al.* **Toxicological effects of arsenate exposure on hematological, biochemical and liver transaminases activity in an Indian major carp, *Catla catla***. Food and Chem. Toxicol. 48:2848–2854, 2010.

KENNISH, M.J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. Londres: CRC Press, 494 p. 1992.

KETTRUP, A; MARTH, P. **Specimen banking as environmental surveillance toll**. In: Schüürmann, G.; Markert, B. (Ed.). Ecotoxicology-ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects. New York: John Wiley & Sons, 1998.

KHAN, R.A. **Influence of petroleum at a refinery terminal on winter flounder, *Pleuronectes americanus***. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 61: 770-777 1998.

KNOTHE, G; GERPEN, J.V; KRAHL, J; RAMOS, L.P. **Manual do Biodiesel**. 1a ed. Tradução: Luiz Pereira Ramos. São Paulo: Edgard Blücher, 340 p, 2006.

KRAUSE, L.C. **Desenvolvimento do processo de produção de biodiesel de origem animal**. (Tese de doutorado) Programa de Pós Graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

KUMARI, K; RANJAN, N; SINHA, R.C. **Multiple biomarker response in the fish, *Labeo rohita* due to hexavalent chromium**. 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science. IPCBEE vol 7. 155-158. 2011.

- LANDIS, W.G; YU, M.H. **Introduction to environmental toxicology. Impacts of chemicals upon ecological systems.** Boca Raton, Lewis Publishers, 328 p. 1995.
- LAPINSKIENE, A; MARTINKUS, P; RCHZDAITE, V. **Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil.** Environ. Pollut. 142:432–437, 2006.
- LEITE, M.B.N.L *et al.* **Toxicity of water-soluble fractions of biodiesel fuels derived from castor oil, palm oil and wastecooking oil.** Environ. Toxicol. Chem. 30(4):893–897, 2011.
- LINS, J.A.P.N *et al.* **Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático.** Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient. Curitiba, 8(4): 469-484, 2010.
- MARTINEZ C.B.R *et al.* **Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*.** Brazilian Journal of Biology, 64: 797-807, 2004.
- MADUENHO, L.P; MARTINEZ, C.B.R. **Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*.** Comparative biochemistry and physiology, part c 148: 265–272, 2008.
- MARTINS, L.K *et al.* **Lysosomal responses as diagnostic tool for the detection of oil chronic pollution at Todos os Santos Bay.** Environmental Research, USA, v. 98 (2), p. 387-396, 2005.
- MATSUMOTO, S.T *et al.* **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.** Genet. and Mol. Biol., 29: 48-158, 2006.
- MCCARTHY, J.F; SHUGART, L.R. **Biomarkers of Environmental Contamination.** Lewis Publishers. Chelsea, Mich. 457pp. 1990.
- MELEN, K *et al.* **Lysosomal enzymes in plasma, liver and spleen from rats with carbon tetrachloride induced liver cirrhosis.** Enzime, 33:84-88, PMID:3159568. 1985.
- MONTEIRO, S.M.E *et al.* **Quantitative histopathology of *Oreochromis niloticus* gills after copper exposure.** Journal of Fish Biology 73:1376–1392, 2008.
- MOORE, MN. **Celular responses to pollutants.** Marine Pollution Bulletin, 16: 134-139, 1985.
- MOORE, M.N *et al.*, **Lysosomal and autophagic reactions as predictive indicators of environmental impact in aquatic animals.** Autophagy, 2(3);217-220, 2006.
- MÜLLER, J.B. **Avaliação da toxicidade da fração solúvel em água do biodiesel, diesel e da mistura binária diesel/biodiesel de 5% (B5).** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis (SC). 2011.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A; LEITE, M.B.N.L. **Biomarcadores como Instrumentos Preventivos de Poluição.** In: Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. Zagatto, P.A. & Bertolotti, E. Eds. Ed.RiMa, p.414-432, 2006.

NASCIMENTO, I.A *et al.* **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, pp 61–90, 2009.

NAVAS J.M *et al.* **The Prestige Oil Spill: A Laboratory Study about the Toxicity of the Water-Soluble Fraction of the Fuel Oil.** Mar. Environ. Research, v. 62, p. 352–355, 2006.

NERO, V *et al.* **Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process- affected water.** Ecotoxicol. Environ. Saf., Canadá, v. 63, p. 365–377, 2006.

NICHOLSON, S. **Ecocytological and toxicological responses to copper in *Perna virides* (L.) (Bivalvia: Mytilidae) haemocyte lysosomal membranes.** Chemosphere, 45:399-407, 2001.

NICHOLSON, S; LAN, PK. **Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna perna* (Mytilidae: Bivalvia).** Environ. Internat, 31(1): 121-132, 2005.

OLIVEIRA RIBEIRO, *et al.* **Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France.** Aquatic Toxicology, v. 74, p. 53 – 69, 2005.

PACHECO, M; SANTOS M.A. **Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.).** Ecotoxicology and Environmental Safety, 53: 331-347. 2001.

PAIXÃO, J.F *et al.* **Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: an approach to minimize pollution risks.** Environ. Res. 103:365–374, 2007.

PAL, S *et al.* **Histopathological effects and EROD induction in common carp exposed to dietary heavy oil.** Ecotoxicology and Environmental Safety 74:307–314, 2011.

PEIXOTO, F *et al.* **Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*.** Pesticide Biochemistry and Physiology 85(2):91-96, 2008.

PEREIRA, S.A *et al.* **Toxicity of biodiesel, diesel and biodiesel/diesel blends: comparative sub-lethal effects of water-soluble fractions to microalgae species.** Bull Environ Contam Toxicol. 88:234-238, 2011.

PIPE, R.K. **The generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*.** Developmental and Comparative Immunology, 16: 111-122, 1993.

RAMADHAS, A.S; JAYARAJ S; MURALEEDHARAN C. **Biodiesel production from high FFA rubber seed oil.** Fuel, Índia, v. 84, n.4, p. 335-340, 2005.

RAND, G.M; WELLS, P.G; MCCARTY, L.S. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**; Rand, G. M., ed.; 2nd ed., Taylor & Francis: Washington, cap. 1,1995.

RANESES, A.R *et al.* **Potential Biodiesel Markets and Their Economic Effects on the Agricultural Sector of the United States**. Industrial Crops and Products, v. 9, p. 151–162, 1999.

RANK, J *et al.*, **DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark**. Aquatic Toxicology, 84(1):50-61, 2007.

RIBEIRO, L.R. **Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo, pp. 173-200**. In: Ribeiro, LR.; Salvadori, DMF.; Marques, E. K. (Orgs.), Mutagênese Ambiental, 355 p., Ed. ULBRA, Canoas, 2003.

RODRIGUES, L.E.A. **Enzimologia clínica**. ISBN 857309-443-5. Copyright©, P.157, 2001.

RODRIGUES, R.V *et al.* **Deleterious Effects of Water-Soluble Fraction of Petroleum, Diesel and Gasoline on Marine Pejerrey *Odontesthes Argentinensis* Larvae**. Science of the Total Environment, v. 408, p. 2054–2059, 2010.

RUDNICKI, C.A.M. **Análise qualitativa e quantitativa das histopatologias causadas pelo organofosforado Azodrin®400 sobre o tecido branquial do peixe de água doce *Piaractus mesopotamicus***. Dissertação. Curitiba. 2004.

SAEED, T; AL-MUTAIRI M. **Chemical Composition of the Water Soluble Fraction of the Leaded Gasolines in Seawater**. Environ. Internat, 25(1):117-129. 1999

SANTOS, T.C.A *et al.* **Histopathological alterations in gills of juvenile Florida pompano *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) following sublethal acute and chronic exposure to naphthalene**. Pan-American Journal of Aquatic Sciences 6(2):109-120, 2011.

SAQIB, T.A. **Detection of pesticide residues in muscles, liver and fat of 3 species of Labeo found in Kalri and Haleji lakes**. J Environ Biol. Jun;26(2 Suppl):433-8, 2005.

SCHWAIGER, J *et al.* **The use of histopathological indicators to evaluate contaminant related stress in fish**. Dordrecht. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 6(1):75-86, 1997.

SIMONATO, J.D. **Biomarcadores funcionais e histológicos associados à exposição do peixe *Prochilodus lineatus* ao óleo diesel**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, 2006. 66 p.

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**. Ecotoxicol. and Environ. Saf. 69:112–120, 2008.

SIMPSON, M.G *et al.* **Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from a UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals.** Mar. Environ. Res. 50:283–287, 2000.

SORIANO, J.A. *et al.* **Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the Prestige oil spill.** Sci of the Total Environ, 70: 80-90, 2006.

SOUZA, T.S; FONTANELLI C.S. **Micronucleus test and observations of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent.** Genetic Toxicol. and Environ. Mutagen. 605: 87-93. 2006.

STEFANONI, M.F; ABESSA, D.M.S. **Lysosomal membrane stability of the Brown mussel *Perna perna* (Linnaeus) (Mollusc, Bivalvia) exposed to the anionic surfactant Linear alkylbenzene sulfonate (LAS).** Pan-American Journal of Aquatic Sci, 3(1):6-9, 2008.

STENTIFORD, G.D *et al.* **Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants.** Mar. Environ. Res. 55:137–159, 2003.

TELES, M; PACHECO M; SANTOS M.A. **Abnormalities *Anguilla anguilla* L. ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear, and endocrine responses to naphthalene and -naphthoflavone.** Ecotoxicol. and Environ. Saf. 55: 98-107, 2003.

TIBURTIUS E.R.L; PERALTA-ZAMORA, P. **Degradação de benzeno, tolueno e xilenos em águas contaminadas por gasolina, utilizando-se processos foto-fenton.** Quim. Nova. 32, 8)2058-2063, 2009.

THOMAS, P. **Molecular and Biochemical Responses of fish to stressors and Their Potential Use in Environmental Monitoring in Biological indicators of stress in fish.** Symposium of the American Fisheries Society ed. Adans, S.M., Bethesda, Maryland, USA pp 9-28, 1990.

TURRIO-BALDASSARRI L *et al.* **Emission comparison of urban bus engine fueled with diesel oil and biodiesel blend.** Sci Total Environ 327:147–162, 2004.

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

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

VIARENGO, A. **Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level.** Critical Review in: Aquatic Sci, 1:295-317, 1989.

VIARENGO, A. **Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level.** Critical Review in: Aquat Sci, 1:295-317, 1989.

VIEIRA, F.C.S. **Toxicidade de Hidrocarbonetos Monoaromáticos do Petróleo sobre *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea: Mysidacea)**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 72 p. 2004.

VIJAYAVEL, K; BALASUBRAMANIAN, M.P. **Interaction of potash and decis in the ecophysiology of a freshwater fish *Oreochromis mossambicus***. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 66:154–158, 2007.

WALKER, C.H. *et al.* **Principles of Ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis, 321 p. 1996.

WANG, W.G *et al.* **Emissions from nine heavy trucks fueled by diesel and Biodiesel blend without engine modification**. *Environ. Sci. Technol.* 34:933–939, 2000.

WILLIAMS, C.H. **Beta-glucuronidase activity in the serum and liver of rats treated with parathion**. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 16:533–539, 1970.

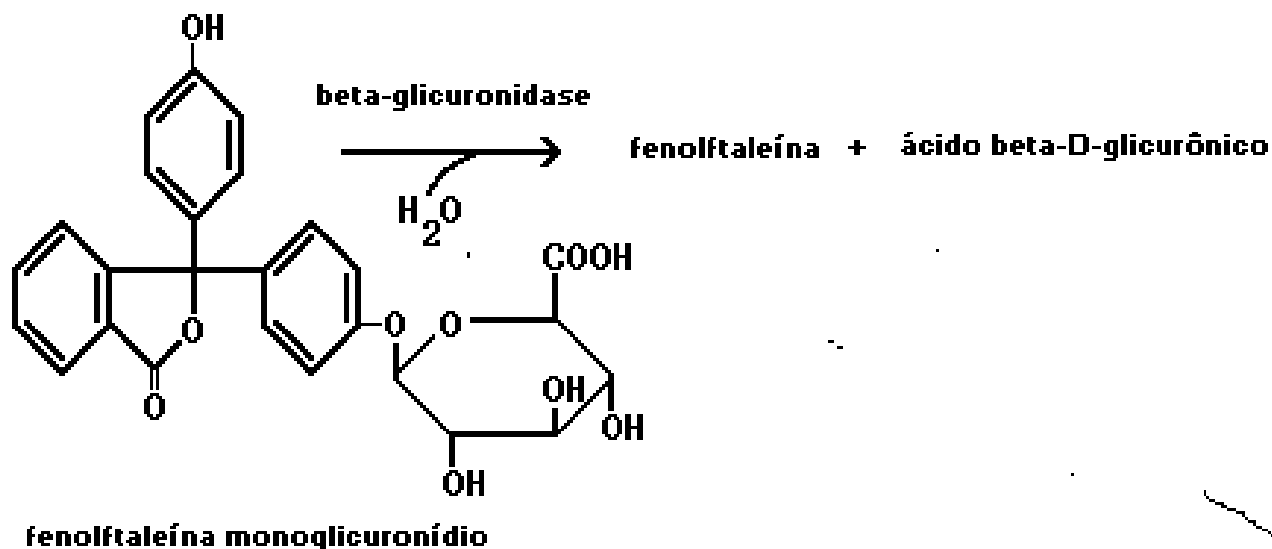
ZHANG, Y *et al.* **Biodiesel Production from Waste Cooking Oil: Economic Assessment and Sensitivity Analysis; Biores. Technol.** 90:229-240, 2003.

ANEXO 01

Protocolo para determinação da atividade β -glucuronidase (E.C.3.2.1.31) em homogeneizado de fígado de peixe.

A β -glucuronidase, β -glucuronídeo glicuronohidrolase, E.C. 3.2.1.31, hidrolisa os éteres semiacetálicos entre o ácido glicurônico e álcoois ou fenóis.

O método de dosagem utilizado na determinação da atividade β -glucuronidásica no homogeneizado de fígado de peixe foi colorimétrico e bastante simples. Baseou-se na leitura em 540 nm da fenolftaleína liberada pela atividade enzimática a partir do substrato monoglicuronídeo de fenolftaleína, incubado a 37°C, durante uma hora, a pH 4.5.



Objetivo: Correlacionar a atividade da enzima β -glucuronidase aos fenômenos fisiopatológicos do fígado.

Reagentes:

- A. Tampão de acetato de sódio 100 mM, pH 3.8 a 37° C.
- B. Substrato enzimático fenolftaleína glucuronide (PheP-Gluc) 1.2 mM.
- C. Tampão de glycina 200 mM, pH 10.4.
- F. Etanol 95% (v/v) em água deionizada.
- G. Solução padrão de fenolftaleína 0.05%.

AMOSTRA : Homogeneizado de fígado de peixe , após centrifugação a 1500g.

Procedimento técnico:

Reagentes	Teste (μL)	Branco (μL)
A (Tampão)	140	140
B (PheP-Gluc)	140	140
Homogeneizar por inversão e incubar a 37° C por 5 minutos.		
E (AMOSTRA)	20	0
Homogeneizar por inversão e incubar a 37° C por 60 minutos		
C (Tampão glycina)	1000	1000
E (AMOSTRA)	0	20

Homogeneizar, por inversão, determinar a DO em 540 nm para o teste e branco, usando espectrofotômetro. Calcular o total em μg de fenolftaleína liberada usando a seguinte curva padrão:

Reagentes (μL)	Padrão 1	Padrão 2	Padrão3	Padrão4	Branco
A (Tampão)	140	140	140	140	140
B (PheP-Gluc)	140	140	140	140	140
F (Etanol)	28	20	12	--	40
G (Padrão)	12	20	28	40	--
C (Tampão glycina)	980	980	980	980	980

Uma unidade FISHMAN equivale à atividade β -glicuronidásica capaz de liberar um micrograma de fenolftaleína em pH 4.5, a 37°C, em uma hora de incubação.

Para efeito de cálculo, a concentração de proteínas totais no homogeneizado foi determinada por espectrofotometria, pela técnica do Folin-biureto, segundo metodologia padronizada por Lowry et al (1951) e modificada por Rodrigues et al. 1989, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Para cada amostra o valor da fenolftaleína liberada por hora foi dividido pelo teor de proteínas totais, obtendo-se assim o valor da atividade específica da β - Glucuronidase, que corresponde a unidade "Fishman" (U.F/ μg de proteínas totais).

ANEXO 02

Dosagem das aminotransferases (AST e ALT) em homogeneizado de fígado de peixe.

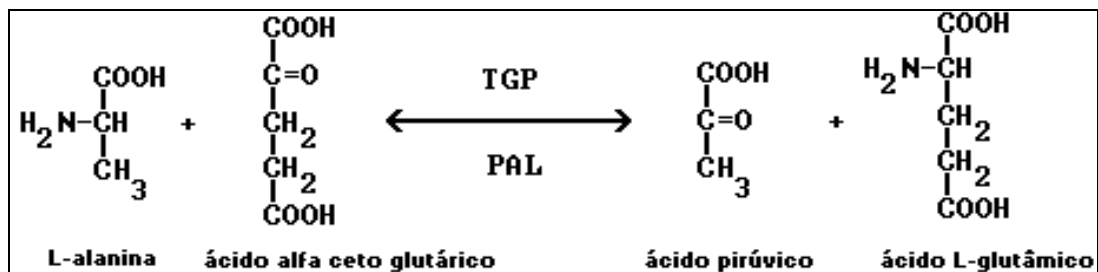
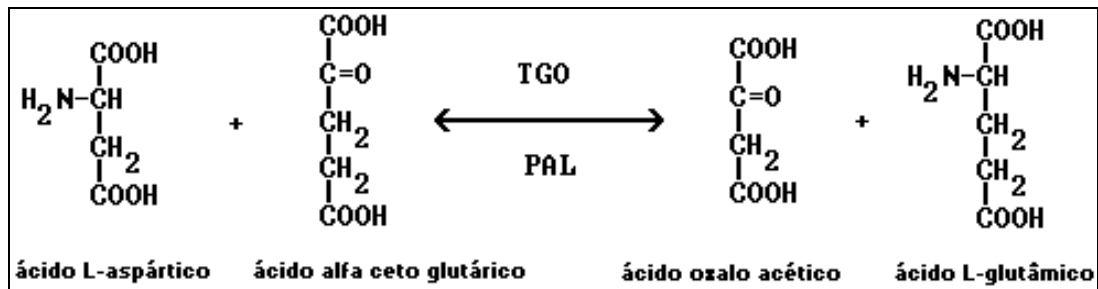
As reações de desaminação e aaminação, onde o grupo amínico de um aminoácido é, reversivelmente, transferido para um cetoácido, são denominadas transaminações. As enzimas que catalisam estes tipos de reações são as transaminases (aminotransferases ou aminoferases).

- Aspartato-aminotransferase (**AST**) ou transaminase glutâmico-oxalacética (**TGO**) (L-aspartato: 2-oxoglutarato aminotransferase, E.C 2.6.1.1).
- Alanina-aminotransferase (**ALT**) ou transaminase glutâmico-pirúvica (**TGP**) (L-alanina: 2-oxoglutarato aminotransferase, E.C 2.6.1.2).

As transaminases formam um importante elo entre o metabolismo das proteínas e dos carboidratos. Elas são encontradas em todos os tecidos animais, principalmente nos músculos, coração, fígado, cérebro e rins.

Objetivo: Correlacionar atividades das aminotransferases aos fenômenos fisiopatológicos, especialmente do fígado.

As transaminases são enzimas que catalisam as transferências de grupamentos amínicos de α -aminoácido para α -cetoácidos, conforme equação geral a seguir:



O piruvato e o oxaloacetato formados são proporcionais à atividade enzimática e são medidos através da formação de hidrazonas intensamente coradas em meio alcalino.

O oxaloacetato tende a descarboxilar-se espontaneamente in vitro, resultando em piruvato, o qual, como cetoácido, contribuirá para a formação de hidrazonas.

Reagentes: substrato AST / TGO, substrato ALT / TGP, solução padrão, reagente de cor: 2,4-dinitrofenilhidrazina e hidróxido de sódio 0,4 N

Amostra : Homogeneizado de fígado de peixe , após centrifugação a 1500g.

Procedimento técnico:

Reagentes	Tubos	
	TGP	TGO
Substrato TGP	0,5 mL	-
Substrato TGO	-	0,5 mL

Colocar em banho-maria à 37 °C por 5 minutos

Amostra	0,1 mL	0,2 mL
---------	--------	--------

Homogeneizar e incubar a 37 °C por 30 minutos

Reagente de cor	0,5 mL	0,5 mL
-----------------	--------	--------

Homogeneizar e deixar em repouso por 20 minutos à temperatura ambient

Hidróxido de sódio 0,4 N	5,0 mL	5,0 mL
--------------------------	--------	--------

Misturar, deixar em repouso por 2 minutos. Ler a transmitância em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em 505 nm ou filtro verde. Calibrar o aparelho com água destilada. Utilizando a curva de calibração, procurar os valores em unidades TGP e TGO através da curva de regressão.

Preparo da curva de calibração

Nº do tubo	Água (mL)	Substrato TG (mL)	Padrão (mL)	Unidades R.F *	
				TGP	TGO
1	0,2	1,0	0,0	0	0
2	0,2	0,9	0,1	28	24
3	0,2	0,8	0,2	57	61
4	0,2	0,7	0,3	97	114
5	0,2	0,6	0,4	150	190

Adicionar a cada tubo 1,0 mL do reagente de cor. Homogeneizar e deixar em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Adicionar 10 mL de hidróxido de sódio 0,4 N e após 2 minutos ler os tubos do 1º ao 5º contra o branco constituído de água destilada, ajustando a 100% transmitância, em 505 nm (filtro verde). Valores de referência em Unidades Reitman – Frankel (U.R.F./mL).