



DÊNIO GARCIA SILVA DE OLIVEIRA

**TOXICIDADE EM PEIXES SUBMETIDOS À
FRAÇÃO SOLÚVEL DO BIODIESEL DE ÓLEO
DE SOJA QUEIMADO**

LAVRAS-MG

2013

DÊNIO GARCIA SILVA DE OLIVEIRA

**TOXICIDADE EM PEIXES SUBMETIDOS À FRAÇÃO SOLÚVEL DO
BIODIESEL DE ÓLEO DE SOJA QUEIMADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luis David Solis Murgas

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Oliveira, Dênio Garcia Silva de.

Toxicidade em peixes submetidos à fração solúvel do biodiesel
de óleo de soja queimado / Dênio Garcia Silva de Oliveira. – Lavras
: UFLA, 2013.

78 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Curimba - Biodiesel - Toxicidade. 2. Zebrafish - Biodiesel -
Toxicidade. 3. Peixes - Genotoxicidade. 4. Teste do micronúcleo. 5.
Peixes - Eritrócitos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.08959

DÊNIO GARCIA SILVA DE OLIVEIRA

**TOXICIDADE EM PEIXES SUBMETIDOS À FRAÇÃO SOLÚVEL DO
BIODIESEL DE ÓLEO DE SOJA QUEIMADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 01 de novembro de 2013.

Dra. Luciana de Mattos Alves Pinto	UFLA
Dra. Marinez Moraes de Oliveira	UFLA
Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado	PUC-GO
Dra. Priscila Vieira e Rosa	UFLA
Dra. Sheila Cristina da Silva Victorio	UNICAMP

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

LAVRAS-MG

2013

A minha esposa Roberta e meu filho Gabriel, pelo amor, pela força, por sempre acreditarem em mim e ser meu porto seguro. Por aturarem todos os meus ataques de nervos, minha ausência e afastaram todos os meus pessimismos quando enfrentei os piores problemas

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por fortalecer-me e ser meu alicerce diante de todas as minhas dificuldades.

A minha mãe Marcília, por todo apoio incondicional ao longo destes maravilhosos anos de existência

Ao meu pai Geraldo que mesmo não estando presente sempre estará em minha mente e meu coração.

A minha irmã Júnea, meu cunhado Marle, meu afilhado Mateus e meus sobrinhos Pedro e Felipe que sempre me apoiaram e incentivaram.

Ao meu cunhado Juliano, minha concunhada Gisela e minha sobrinha Laura pelo apoio, compreensão e solidariedade.

Aos meus sogros Aída e Roberto, que devo gentilmente chamá-los de pai e mãe pelo incentivo e torcida, além do apoio nas horas mais difíceis.

Ao Centro Universitário Formiguense na pessoa do professor Marco Leão por disponibilizar as condições necessárias para a realização deste doutorado.

Ao professor Dr. Luis David Solis Murgas, pela oportunidade e confiança durante o transcurso do doutorado.

À banca avaliadora composta pelas doutoras Marinez, Luciana, Mônica, Priscila e Sheila pelos comentários e sugestões pertinentes que ajudaram a engrandecer esta pesquisa.

À doutora Marinez pela sua imprescindível ajuda e colaboração em muitas oportunidades durante a realização do doutorado em especial na finalização da tese.

Ao José Reinaldo Berin (ou simplesmente Berin) pela ajuda, disposição no aspecto administrativo durante o tempo do doutorado, inclusive seu otimismo, bom humor e presteza.

A todos e a cada um dos meus colegas do curso de doutorado em ciências veterinárias da UFLA, pelas experiências compartilhadas durante os últimos anos, em especial Ulisses Pádua, Ulisses, Galileu, Viviane, José Antônio, Daniela.

Ao doutor Aladir pela ajuda imprescindível nas análises estatísticas.

Aos estagiários da UFLA e do UNIFOR pela ajuda na execução dos experimentos.

A Lucimar e Virgínia pela contribuição nas correções do português e das referências.

A todos meus parentes por terem participado de vários momentos da minha vida.

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, deixo aqui registrado os meus sinceros agradecimentos!!!!

“Não está em nosso poder escolher o tempo em que vivemos, mas todos nós
temos que decidir o que fazer com o tempo que nos é dado”

(O Senhor dos Anéis, A Sociedade do Ane. J. R. R. Tockien, 1966)

RESUMO GERAL

O biocombustível é uma fonte de energia considerada limpa e renovável, mas tem que se considerar quanto a sua contaminação do meio ambiente aquático no item toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade. Objetivou-se, no primeiro experimento, estudar o efeito de diferentes concentrações de fração solúvel do biodiesel de óleo de soja queimado (FSB) sobre o desenvolvimento embrionário de curimba (*Prochilodus lineatus*). O biodiesel foi obtido através da metilação do óleo de soja utilizado em frituras, sendo encontrado a concentração do biodiesel na solução de 0,0645 g/L. Os embriões foram obtidos de desova seminatural, coletados e transferidos para uma incubadora experimental em duplicata com aeração constante, contendo diferentes concentrações de FSB sendo: solução I (controle), solução II (0,0645 g.L⁻¹), solução III (0,129 g.L⁻¹), solução IV (0,645 g.L⁻¹), solução V (1,29 g.L⁻¹) e solução VI (6,45 g.L⁻¹). Os valores médios encontrados foram: para temperatura (°C) 23,0 ± 0,1; oxigênio dissolvido (mG/L) 4,58 ± 0,34 e pH: 7,3 ± 0,1. A taxa de fertilização variou de 50,88 a 81,61%, sofrendo alteração a partir do grupo IV (p<0,05). A partir da décima hora pós- fecundação, evidenciou-se o atraso no desenvolvimento embrionário, em relação ao tratamento controle. Os resultados para taxa de eclosão foram de 7,56 a 46,26%, sendo que todos os grupos se diferiram estatisticamente do grupo I (controle). Não foi encontrada diferença significativa para altura e diâmetro do vitelo. Conclui-se que houve interferência no desenvolvimento embrionário de curimba (*Prochilodus lineatus*) frente às diversas concentrações da FSB. No segundo experimento, objetivou-se verificar o aparecimento de micronúcleo em eritrócitos de peixes adultos de zebrafish (*Danio rerio*), expostos a soluções crescentes de fração solúvel do biodiesel de óleo de soja queimado. O biodiesel, a metodologia utilizada para obtenção da FSB e os tratamentos foram os mesmos do primeiro experimento. Os peixes foram colocados em aquários de polietileno, com aeração constante, sendo submetidos ao teste de toxicidade aguda em um delineamento inteiramente casualizado em duplicata. Foram analisados 2000 eritrócitos intactos com lente de imersão (1000X). Verificou-se uma diferença significativa (p < 0,05) entre o grupo I (controle), II, III e IV e os grupos V e VI nos tempos 24 e 96 horas de exposição. Em face dos resultados, podemos observar que a FSB tem efeito genotóxico em eritrócitos de adultos de zebrafish.

Palavras - chave: Biodiesel. Curimba. Zebrafish. Genotoxicidade. Teste do Micronúcleo. Eritrócitos

GENERAL ABSTRACT

Biofuel is a source of energy considered clean and renewable. However, we must consider its contamination to the aquatic environment regarding toxicity, genotoxicity and mutagenicity. The first experiment aimed at studying the effects of different soluble fraction concentrations of burnt soybean oil biofuel (FSB) over curimba (*Prochilodus lineatus*) embryonic development. The biofuel was obtained through the methylation of frying soybean oil, in the concentration of 0.0645g/L for biodiesel in the solution. The embryos were obtained from a semi-natural spawning, collected and transferred in duplicate to an experimental incubator with constant aeration, containing different FSB concentrations: solution I (control), solution II (0.0645g.L⁻¹), solution III (0.129g.L⁻¹), solution IV (0.645g.L⁻¹), solution V (1.29g.L⁻¹) and solution VI (6.45g.L⁻¹). The average values obtained were: temperature (°C) of 23.0 ± 0.1; dissolved oxygen of (mg/L), 4.58 ± 0.34 and pH of 7.3 ± 0.1. The fertilization rate ranged from 50.88 to 81.61%, suffering alterations starting at group IV (p<0.05). From the tenth hour post-fertilization, we verified the delay in embryonic development in relation to the control treatment. The results for hatching rate were of 7.56 to 46.26%, with all groups statistically differing from group I (control). There was no statistical difference for height and yolk diameter. We conclude that there was interference in the embryonic development of curimba (*Prochilodus lineatus*) with the many FSB concentrations. The second experiment aimed at verifying the appearance of a micronucleus in the erythrocyte of adult zebrafish (*Danio rerio*) exposed to increasing soluble fraction solutions of burnt soybean oil biodiesel. The biodiesel, the methodology used for obtaining FSB and the treatments were the same as in the first experiment. The fish were placed in polyethylene aquariums, with constant aeration, and submitted to acute toxicity test in a completely randomized design in duplicate. Analyzing 2000 intact erythrocytes using an immersion lens (1000X), we verified that there was significant difference (p<0.05) between groups I (control), II, III and IV, and groups V and VI in the periods of 24 and 96 hours of exposition. With these results we may observe that the FSB presents a genotoxic effect in the erythrocytes of adult zebrafish.

Keywords: Biofuel. Curimba. Zebrafish. Genotoxicity. Micronucleus Test. Erythrocytes.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Transesterificação de triacilgliceróis (triglicerídeos), onde R representa a cadeia carbônica dos ácido Graxos e R', a cadeia carbônica do álcool reagente..... 16
- Figura 2 Micronúcleos (setas) em eritrócito de peixe (aumento de 100X)..... 21
- Figura 3 Peixe adulto de curimba (*Prochilodus lineatus*) 22
- Figura 4 Peixe adulto de zebrafish (*Danio rerio*) peixe adulto..... 24

ARTIGO 1

- Figura 1. Fase de blástula dos ovócitos submetidos à concentrações crescentes da FSB..... 56
- Figura 2. Fase de gástrula dos ovócitos submetidos a concentrações crescentes da FSB..... 56
- Figura 3. Fases de segmentação dos embriões submetidos a concentrações crescentes da FSB..... 57
- Figura 4. Fases de segmentação e organogênese dos embriões submetidos a concentrações crescentes da FSB. 57
- Figura 5. Fase larval..... 57

ARTIGO 2

- Figura 1-Micronúcleo (seta) em eritrócito de peixe. (1000x)..... 65

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1. Resultados analíticos do biodiesel.....	52
Tabela 2. Concentrações da FSB utilizadas no experimento.	52
Tabela 3. Taxa de Fertilização de curimba, submetidos a diferentes concentrações da fração solúvel do biodiesel.	53
Tabela 4. Desenvolvimento embrionário de curimba, expostos a concentrações crescentes da FSB.....	54
Tabela 5. Taxa de eclosão de ovos de curimba submetidos a concentrações crescentes de FSB.....	55

ARTIGO 2

Tabela 1 - Resultados analíticos do biodiesel.....	63
Tabela 2 - Concentrações da FSB utilizadas no experimento.....	63
Tabela 3 - Frequência média de micronúcleos (n=15) em função de 24 e 96 horas de exposição nas diferentes concentrações da FSB	66

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Biodiesel	15
2.2	Mutagenicidade e Genotoxicidade	17
2.3	O Teste do Micronúcleo	20
2.4	Peixes como modelo experimental	21
2.4.1	<i>Prochilodus lineatus</i>	22
2.4.2	<i>Danio rerio</i>	23
3	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	31
	ARTIGO 1 Desenvolvimento embrionário de curimba submetido a diferentes concentrações de biodiesel	31
	ARTIGO 2 Avaliação da genotoxicidade em <i>Danio rerio</i> expostos a concentrações crescentes de fração solúvel do biodiesel de óleo de soja queimado	59
	ANEXO	76
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Os combustíveis derivados do petróleo desempenham um papel importante e dominante no setor de transportes, além disso, os combustíveis ditos alternativos irão ganhar importância devido aos aspectos ambientais, incluindo a redução de gases do efeito estufa e a crescente escassez de fontes de energia fósseis (SADLOWSKI et al., 2013).

O biodiesel é constituído de uma mistura de ésteres etílicos ou metílicos de ácidos graxos derivados de fontes renováveis (gorduras animais e óleos vegetais puros ou queimados), possuindo algumas características interessantes, tais como a biodegradabilidade, livre de enxofre e compostos aromáticos, alto número de cetanos (poder de ignição e combustão), excelente lubricidade e baixo nível de toxicidade (COSTA NETO et al., 2000; SANTOS, 2013).

O biodiesel pode ser poluente acidental em rios, mares e águas subterrâneas sendo sua toxicidade atribuída à fração solúvel. A escolha pelo peixe neotropical (*Prochilodus lineatus*) se deu por ser um animal de biologia e fisiologia conhecidas, além de ser sensível aos efeitos de poluentes. A escolha do peixe zebrafish (*Danio rerio*) se deve por serem de pequeno porte, com alta taxa reprodutiva, com seu genoma sequenciado e apresentarem importante homologia com os mamíferos.

Nesta pesquisa avaliou-se as respostas à exposição aguda de *P. lineatus* e *Danio rerio* à fração solúvel do biodiesel (FSB) através dos seguintes parâmetros biológicos: desenvolvimento embrionário e dano ao DNA através do teste do micronúcleo. Esta pesquisa foi delineada para detectar as possíveis mudanças fisiológicas em peixes de água doce expostos a diversas concentrações subletais da FSB, como meio de se ter um alerta precoce em casos

de verdadeiros derrames acidentais antes que o meio ambiente aquático seja comprometido permanentemente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biodiesel

O petróleo é a principal matéria prima da matriz energética mundial. Diante deste cenário, a utilização de outros tipos de combustíveis é necessária na tentativa de reduzir a dependência do mesmo. Sendo assim, surge a produção de biocombustíveis com o objetivo de fornecer uma fonte alternativa e renovável de combustíveis (COSTA NETO et al., 2000).

São vários os tipos de biocombustíveis, dentre eles podemos citar: o bioetanol, biogás, biometanol e biodiesel. No Brasil a Resolução ANP nº 7, de 19 de março de 2008, da Agência Nacional de Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis - ANP (2008) define o Biodiesel como sendo uma mistura de ésteres etílicos ou metílicos de ácidos graxos, derivados de gorduras animais e óleos vegetais já utilizados, ou não, que segue a especificação do Regulamento Técnico ANP nº 7 contido na mesma resolução (ANP, 2008; COSTA NETO et al., 2000).

O biodiesel possui características interessantes, tais como a biodegradabilidade, origem de fontes renováveis (gorduras animais, óleos vegetais puros, óleos vegetais já utilizados), reduz a emissão de gases poluentes, não apresenta enxofre e hidrocarbonetos poliaromáticos em sua composição, tem alto número de cetanos (poder de ignição e combustão), possui excelente lubricidade e baixo nível de toxicidade (COSTA NETO et al., 2000; SANTOS, 2013; SWANSON; MADDEN; GUIO, 2007).

Conforme a Resolução nº 6/2009, do Conselho Nacional de Política Energética, sancionada em outubro de 2009, o governo brasileiro estabeleceu a obrigatoriedade de adição de 5% de biodiesel no óleo diesel (BRASIL, 2009).

Observa-se que, nesta proporção, o biodiesel apenas funciona como um aditivo e não necessariamente um substituto ao diesel de petróleo, melhorando as propriedades de lubrificação dos motores em questão (BRASIL, 2009; SADLOWSKI et al., 2013).

Existem várias formas de obtenção de biodiesel. O método da transesterificação (Figura 1) é considerado a melhor tecnologia disponível no momento para a sua produção em escala industrial. A transesterificação consiste na reação química de um óleo vegetal com um álcool, que pode ser etanol ou metanol, na presença de um catalisador ácido (HCl) ou básico (NaOH), produzindo um éster e um co-produto, o glicerol. Este processo modifica a estrutura molecular de óleos vegetais equiparando-o ao óleo diesel e com propriedades físico-químicas semelhantes (COSTA NETO et al., 2000).

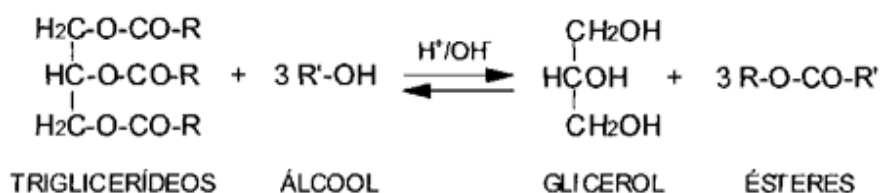


Figura 1 Transesterificação de triacilgliceróis (triglicerídeos), onde R representa a cadeia carbônica dos ácido Graxos e R', a cadeia carbônica do álcool reagente

Fonte: Costa Neto et al. (2000)

A contaminação ambiental com agentes e/ou substâncias tem merecido atenção crescente nos últimos anos. A sua descarga diária e contínua nos cursos de água dá origem a níveis de contaminação elevados que superam a capacidade de autodepuração. Em geral, estes agentes e/ou substâncias exibem baixa toxicidade aguda, mas podem provocar toxicidade crônica com efeitos na

reprodução, fisiologia e crescimento dos seres vivos incluindo os peixes. A toxicidade do biodiesel ainda é pouco estudada em ambientes aquáticos, incluindo seus efeitos sobre os peixes. As pesquisas já realizadas apontam para uma menor toxicidade do biodiesel (KHAN; WARITH; LUK, 2007; SANTOS, 2013; SWANSON; MADDEN; GHIO, 2007) e maior biodegradabilidade em relação ao diesel comum em ambientes aquáticos, para isso, foram utilizados testes de cromatografia gasosa e o método de produção de CO₂. Ambos apontam o biodiesel como mais biodegradável que o diesel de petróleo, mesmo com as suas misturas em diversas proporções (KHAN; WARITH; LUK, 2007; ZHANG et al., 2013).

Testes com organismos aquáticos como Tilápia e Dáfnia mostraram que a mortalidade e a CL₅₀ (concentração letal máxima) foram menores, quando expostos ao biodiesel e suas misturas, quando comparadas ao diesel de petróleo. Salienta-se que o biodiesel forma gotas na superfície, enquanto o diesel forma manchas, o que leva a um maior prejuízo dos organismos aquáticos incluindo os peixes (BIRCHALL; NEWMAN; GREAVES, 1995; REDDY, 2009), sendo um problema de contenção da contaminação em casos de acidentes.

De acordo com Leme et al. (2012), pesquisando contaminação de solo com biodiesel e suas misturas com o diesel de petróleo, confirmaram que a genotoxicidade/ mutagenicidade está associada ao próprio biodiesel ou a impurezas (esteróis livres, por exemplo) a partir da matéria prima utilizada para a produção de biocombustíveis no geral. Devendo-se considerar que o destino final de um derramamento acidental de biodiesel no solo é o corpo hídrico mais próximo.

2.2 Mutagenicidade e Genotoxicidade

Mutagenicidade são mudanças ou danos gênicos que ocorrem no DNA de cada célula, inibição ou dano no mecanismo de reparo ao DNA resultando em uma célula alterada. Podem ser causados por substâncias e/ou agentes que agem sobre o organismo, levando a uma redução no índice mitótico, o que pode comprometer o desenvolvimento e o crescimento do mesmo. Isto gera um impacto significativo sobre o *pool* gênico de uma população (POLETTI, 2011).

Não existe informação suficiente sobre a mutagenicidade das substâncias presentes nos gases produzidos pela combustão de biodiesel para humanos, o que pode ser extrapolado para os animais aquáticos incluindo os peixes (SANTOS, 2013; SWANSON; MADDEN; GHIO, 2007).

Genotoxicidade é o estudo dos efeitos adversos de agentes físicos e/ou químicos no DNA ou cromossomos de células e a subsequente demonstração de suas ações. A genotoxicidade não é uma indicação de mutagenicidade, embora possuam alta associação (REKHA; PRASAD, 2006). Agentes genotóxicos são substâncias que conseguem interferir e/ou modificar a replicação do DNA e, por conseguinte, a transmissão genética (COOMBES, 1992). Na maior parte dos acontecimentos, a lesão é reparada pelo próprio organismo ou a célula é eliminada (ABHILASH; SINGH, 2009; REKHA; PRASAD, 2006).

São medidas de genotoxicidade: danos ao DNA (quebra da dupla fita, formação de micronúcleo, intercâmbio de cromátides irmãs); mutações pontuais e aberrações cromossomais, assim como defeitos hereditários (mutações em células germinativas); efeitos teratogênicos; deleções; translocações e aneuploidia (COOMBES, 1992). Para os estudos de genotoxicidade são feitos testes *in vitro* e *in vivo* desenhados para detectar o potencial das substâncias e ou agentes em causar mutações genéticas e cromossômicas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2010; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 1997). Os ensaios *in vivo* são ferramentas

sensíveis para a detecção do potencial de carcinogenicidade de diversos compostos e/ou substâncias (MALUF; ERDTMANN, 2003).

2.3 O Teste do Micronúcleo

O micronúcleo constitui em uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal, permanecendo, entretanto, no citoplasma das células interfásicas, com a aparência de pequenos núcleos (Figura 2). Os micronúcleos são formados durante a telófase da mitose ou meiose e resultam de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. É importante ressaltar que os micronúcleos são formados independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo (FENECH, 1997; UDROIU et al., 2006).

Desenvolvido por Schmid (1975), o teste do micronúcleo é utilizado para avaliar genotoxicidade e danos citotóxicos, além de detectar mutações brutais, como as aberrações cromossômicas, e pode ser aplicado em qualquer tecido animal. É utilizado para: monitoramento biológico e ambiental; rastreamento de compostos para determinar a sua genotoxicidade após exposição direta ou indireta a alguma substância e/ou composto químico. Várias são as vantagens da técnica, dentre elas, podemos citar: simplicidade, análise rápida de um elevado número de células, menor custo, grande poder estatístico, velocidade e facilidade de análise, utilização de pequenas concentrações de células, eficácia em danos clastogênicos e aneugênicos.

A determinação da frequência de micronúcleos segue os seguintes critérios:

- a) tamanho menor que um 1/3 do núcleo;
- b) mesmo plano de foco do núcleo;
- c) padrão da estrutura e coloração da cromatina idênticos ao núcleo e
- d) nenhuma ligação com o núcleo (CARRASCO; TILBURY; MAYERS, 1990).

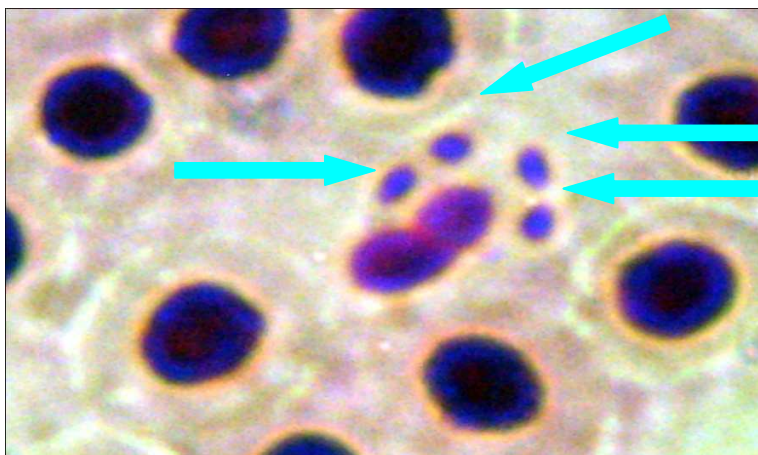


Figura 2 Micronúcleos (setas) em eritrócito de peixe (aumento de 100X)

Fonte: Arquivo pessoal

O teste do micronúcleo em peixes tem sido feito utilizando as mais diversas substâncias e os mais diversos contaminantes. Dentre eles, podemos citar: metais pesados (arsênico, cobre, cádmio), herbicidas, fertilizantes, benzeno, antibióticos e água contaminada. Sendo pesquisado em eritrócito e fragmentos de guelra (BUCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006; DISNER; ROCHA; MIRANDA, 2011; GOLDONE; SILVA, 2012; GÜNER; MURANH, 2011; ROCCO; PELUCO; STINGO, 2010).

2.4 Peixes como modelo experimental

Os peixes são, dentre os vertebrados, o maior e mais diversificado grupo e reúnem uma série de características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos em embriologia e biologia ambiental (POWERS, 1989).

2.4.1 *Prochilodus lineatus*

A curimba (*Prochilodus lineatus*) é usada como modelo experimental nas áreas de nutrição, reprodução e sanidade de espécies nativas (Figura 3). É uma espécie neotropical, amplamente distribuída pela América Latina. Tem o hábito alimentar limnófago ou iliófago (detritívoro), de baixo nível trófico, alimentando-se no ambiente natural de material orgânico, realiza migração reprodutiva e desova única, possui fecundação externa e ausência de cuidados parentais. A curimba representa uma espécie nativa econômica e ecologicamente importante, pois é considerada espécie forrageira para outras espécies. Apresenta alta rusticidade e elevada prolificidade, além de sensibilidade a variações de pH, a presença de xenobióticos e a diversos tipos de poluentes sendo, portanto, apropriada para o monitoramento ambiental (BOTTA et al., 2010; GALDIOLI; HAYASHI; SOARES, 2002; GODOY, 1975; HERNÁNDES CUADRADO, 2013).



Figura 3 Peixe adulto de curimba (*Prochilodus lineatus*)

Fonte: Arquivo pessoal.

2.4.2 *Danio rerio*

Na década passada, um novo vertebrado foi introduzido com êxito no cenário científico: o Zebrafish conhecido também como paulistinha (Figura 4). É um pequeno teleósteo (3 a 4 cm), da espécie *Danio rerio*. É um peixe tropical de água doce, proveniente dos rios do sul da Ásia, principalmente do norte da Índia. Pertence à família *Cyprinidae*, classe *Actinopterygii*, e ordem *Teleostei*, que nos últimos anos vem atraindo a atenção da comunidade científica.

As principais justificativas para isso decorrem de os peixes serem de pequeno porte, de manutenção fácil, econômicos para criação, com alta taxa reprodutiva, com seu genoma sequenciado e apresentarem importante homologia com os mamíferos (KARI; RODECK; DICKER, 2007; LIESCHKE; CURRIE, 2007).

O zebrafish também produz um grande número de descendentes, quando comparado a outros organismos modelos (como por exemplo, o rato) e, além disto, possui uma produção constante de ovos, fato que o distingue da maioria das espécies de peixe cultivadas. Quando mantidos em condições apropriadas, uma única fêmea pode produzir cerca de 200 ovos por semana durante todo o ano.

Constituem excelente modelo experimental para estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e para desvendar o mecanismo de diversas doenças humanas bem como testar novos agentes terapêuticos. Uma área de pesquisa que utiliza intensamente este peixe é a toxicológica (KARI; RODECK; DICKER, 2007; LIESCHKE; CURRIE, 2007). As vantagens deste modelo, combinadas com as ferramentas para sua manipulação e análise, tornaram o zebrafish particularmente adequado para estudar diferentes rotas de regulação gênica de maneira mais conveniente e barata que em qualquer outra espécie de peixe cultivada. Os resultados obtidos nos estudos de nutrição,

crescimento, resistência a doenças, estresse e reprodução produzem resultados com grande aplicabilidade no cultivo de peixes (DAHNS; GEISLER, 2006).



Figura 4 Peixe adulto de zebrafish (*Danio rerio*) peixe adulto

Fonte: Arquivo pessoal

3 CONCLUSÃO

Com a política brasileira prevendo um aumento do consumo de biodiesel na ordem de aproximadamente 40% em 2020, conforme o Plano Decenal de Expansão de Energia deve-se levar em consideração os riscos causados por um derrame acidental ou descuidos durante o transporte, armazenamento ou utilização do biodiesel e seus derivados. É importante que se desenvolvam pesquisas capazes de determinar sua toxicidade no meio ambiente aquático, principalmente para os organismos possivelmente expostos ao contaminante.

REFERÊNCIAS

ABHILASH, P. C.; SINGH, N. Pesticide use and application: an Indian scenario. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 165, n. 15, p. 1-12, June 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL. **Resolução nº 7**, de 19 de março de 2008. Regulamento Técnico aplicado ao biodiesel. Brasília, 2008. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucao_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml>. Acesso em: 4 set. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, 2010. 37 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/30dd7a0047457fa68b53df3fbc4c6735/GUIA+PARA+A+CONDU%C3%87%C3%83O+DE+ESTUDOS+N%C3%83O+CL%C3%8DNICOS+DE+SEGURAN%C3%87A+NECESS%C3%81RIOS+AO+DESENVOLVIMENTO+DE+MEDICAMENTOS.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

BIRCHALL, C.; NEWMAN, J.; GREAVES, M. **Degradation and phytotoxicity of biodiesel oil**. London: Institute of Arable Crops Research-Centre for Aquatic Plant Management, 1995. 27 p.

BOTTA, P. et al. Estudio del desarrollo embrionario del sábalo (*Prochilodus lineatus*). **Archivos de Medicina Veterinária**, Valdivia, v. 42, n. 2, p. 109-114, ene. 2010.

BRASIL. Conselho Nacional de Política Energética. **Resolução CNPE nº 6**, de 16 de setembro de 2009. Estabelece em cinco por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, de acordo com o disposto no art. 2º da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Brasília, 2009. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/folder_resolucoes/resolucoes_cnpe/2009/rcnpe%206%20-%202009.xml>. Acesso em: 4 set. 2013.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S. Assesment of the piscine micronuclei test as an *in situ* biological indicators of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, Nov. 1990.

COOMBES, R. D. Genotoxicity testing: recente advances and future trends. **Chemistry & Industry**, London, v. 24, p. 950-954, 1992.

COSTA NETO, P. R. et al. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 531-537, jul./ago. 2000.

DAHN, R.; GEISLER, R. Learning from small fry: the Zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. **Marine Biotechnology**, New York, v. 8, n. 4, p. 329-345, 2006.

DISNER, G. R.; ROCHA, M. V. da; MIRANDA, G. B. de. Avaliação da atividade mutagênica do Roundup® em *Astyanax altiparanae* (Chordata, Actinopterygii). **Evidência Interdisciplinar**, Joaçaba, v. 11, n. 1, p. 33-42, jan./jun. 2011.

FENECH, M. The advantages and disadvantage of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 392, n. 1/2, p. 11-18, July 1997.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry S2B genotoxicity: a standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals**. Rockville, 1997. 9 p. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm074929.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2013.

GALDIOLI, E. M.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M. Substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do farelo de canola em rações para alevinos de curimatá (*Prochilodus lineatus* V.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 552-559, mar./abr. 2002.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil**: subordem Characoidei. Piracicaba: Franciscana, 1975. v. 4, 216 p.

GOLDONI, A.; SILVA, L. B. da. Potencial mutagênico do fungicida Mancozebe em *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 2, p. 297-301, mar./abr. 2012.

GÜNER, U.; MURANH, F. D. G. Micronucleus test, nuclear abnormalities and accumulation of Cu and Cd on *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Trabzon, v. 11, p. 615-622, June 2011.

HERNÁNDEZ CUADRADO, E. E. **Indução da atividade espermática e desenvolvimento embrionário e larval de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2013. 182 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A. P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, Saint Louis, v. 82, n. 1, p. 70-80, 2007.

KHAN, N.; WARITH, M.; LUK, G. A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms. **Journal of the Air and Waste Management Association**, London, v. 57, n. 3, p. 286-296, 2007.

LIESCHKE, J. G.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews-Genetics**, London, v. 8, n. 5, p. 353-367, 2007.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Biomonitoração do dano genético em humanos. In: SILVA, J. da; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Org.). **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 183-205.

POLETTTO, P. O. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (Mart. Ex Benth. J. F. Macbr: Fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. **Revista Pesquisa & Criação**, Porto Velho, v. 10, n. 1, p. 163-175, jan./jun. 2011.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, New York, v. 246, n. 4928, p. 352-358, Oct. 1989.

REDDY, C. M. **Note on impacts of biofuel spills in the coastal environment**. Falmouth: Woods Hole Oceanographic Institution, 2009. 45 p.

REKHA, S. N.; PRASAD, R. Pesticide residue in organic and conventional food-risk analysis. **Journal of Chemical Health and Safety**, Washington, v. 13, n. 6, p. 12-19, Nov./Dec. 2006.

ROCCO, L.; PELUSO, C.; STINGO, V. Micronucleus test and comet assay for the evaluation of zebrafish genomic damage induced by Erythromycin and Lincomycin. **Environmental Toxicology**, New York, v. 27, n. 10, p. 598-604, Oct. 2010.

SADLOWSKI, T. et al. Storage stability and performance of biofuel blends. **Research Fuels**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 56-61, 2013.

SANTOS, F. A. **Biocombustíveis: prós e contras**. Disponível em:
<<http://home.utad.pt/~fsantos/pub-fas/Biocombustiveis.pdf>>. Acesso em: 10
mar. 2013.

SCHIMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31,
p. 9-15, 1975.

SWANSON, K. J.; MADDEN, M. C.; GHIO, A. J. Biodiesel exhaust: the need
for health effects research. **Environmental Health Perspectives**, Research
Triangle Park, v. 115, n. 4, p. 496-499, Apr. 2007.

UDROIU, I. et al. Detection of clastogenic and aneugenic damage in newborn
rats. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 47, n. 5, p.
320-324, June 2006.

ZHANG, X. et al. **Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment**.
Disponível em:
<http://www.biodiesel.org/resources/reportsdatabase/reports/mar/19950601_mar-009.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2013.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 Desenvolvimento embrionário de curimba submetido a diferentes concentrações de biodiesel

**Artigo preparado de acordo com as normas para submissão na revista
Pesquisa Agropecuária Brasileira**

**Desenvolvimento embrionário de curimba submetido a diferentes
concentrações de Biodiesel**

Dênio Garcia Silva de Oliveira⁽¹⁾, Marinez Moraes de Oliveira⁽²⁾, Luciana
de Mattos Alves Pinto⁽³⁾, Mônica Rodrigues Ferreira Machado⁽⁴⁾, Priscila
Vieira e Rosa⁽²⁾, Sheila Cristina da Silva Victorio⁽⁵⁾ e Luis David Solis
Murgas⁽⁶⁾

⁽¹⁾Centro Universitário Formiguense-UNIFOR, Avenida Dr. Arnaldo de Senna, nº 328. Bairro Água Vermelha, 35570-000, Formiga, MG. E-mail: deninvet@yahoo.com.br ⁽²⁾Universidade Federal de Lavras-UFLA, Departamento de Zootecnia, campus universitário, Caixa Postal: 3037, Lavras, MG. E-mail: marinez.moraes@ig.com.br, priscila@dzo.ufla.br ⁽³⁾UFLA, Departamento de Química. E-mail: luca@dqi.ufla.br ⁽⁴⁾Pontifícia Universidade Católica, Departamento de Zootecnia, endereço: Campus 2 Pontifícia Universidade Católica de Goiás, CEP: 74000-000, Goiânia, GO. E-mail: monicavet_2@hotmail.com ⁽⁵⁾Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Instituto de Biologia, Campinas, SP. E-mail: scvictorio@yahoo.com ⁽⁶⁾UFLA, Departamento de Medicina Veterinária. E-mail: ismurgas@ufla.br

Resumo - Objetivou-se, no presente trabalho, estudar o efeito de diferentes concentrações de fração solúvel do biodiesel (FSB) de óleo de soja queimado, sobre o desenvolvimento embrionário de curimba (*Prochilodus lineatus*). O biodiesel foi obtido através da metilação do óleo de soja utilizado em frituras, com a concentração de biodiesel de

0,0645 g/L. Os embriões de curimba foram coletados e transferidos para uma incubadora experimental em duplicata com aeração constante, contendo diferentes concentrações de FSB sendo: solução I (controle), solução II (0,0645 g.L⁻¹), solução III (0,129 g.L⁻¹), solução IV (0,645 g.L⁻¹), solução V (1,29 g.L⁻¹) e solução VI (6,45 g.L⁻¹). Os valores médios encontrados foram: temperatura (°C) 23,0 ± 0,1; oxigênio dissolvido (mg/L) 4,58 ± 0,34 e pH: 7,3 ± 0,1. A taxa de fertilização variou de 50,88 a 81,61%, sofrendo alteração a partir do grupo IV (p<0,05). A partir da décima hora pós- fertilização evidenciou-se o atraso no desenvolvimento embrionário de todos os tratamentos, em relação ao tratamento controle. Os resultados para taxa de eclosão foram de 7,56 a 46,26%, sendo que todos os grupos diferiram estatisticamente do grupo I (controle). Concluiu-se que houve interferência no desenvolvimento embrionário de curimba (*P. lineatus*) frente às diversas concentrações da FSB.

Termos para indexação: altura de vitelo, biocombustível, *Prochilodus lineatus*, taxa de eclosão, taxa de fertilização, toxicidade.

Embryonic development of curimba (*Prochilodus lineatus*) submitted to different concentrations of the soluble fraction of biodiesel made from burnt soy oil

Abstract- The present work aimed at studying the effect of different concentrations of the soluble fraction of biodiesel made from burnt soybean oil (FSB) over the embryonic development of curimba (*Prochilodus lineatus*). The biodiesel was obtained through the methylation of the soy oil used in frying, the concentration of 0.0645 g/L being found for the biodiesel in the solution. The embryos were obtained from a semi-natural spawning, collected and transferred in duplicate to an experimental nursery, with constant aeration, containing different concentrations of FSB, being: solution I (control), solution II (0.0645 g.L⁻¹), solution III (0.129 g.L⁻¹), solution IV (0.645 g.L⁻¹), solution V (1.29 g.L⁻¹) and solution VI (6.45 g.L⁻¹). The average values found were: temperature (°C) of 23.0 ± 0.1; dissolved oxygen (mg/L) of 4.58 ± 0.34 and pH of 7.3 ± 0.1. The fertilization rate ranged from 50.88 to 81.61%, suffering alterations starting at group IV (p<0.05). From the tenth hour post-fertilization, we verified the delay in embryonic development in relation to the control treatment. The results for the hatching rate were of 7.56 to 46.26%, with all groups statistically differing from group I

(control). We conclude that there was interference in embryonic development of curimba (*Prochilodus lineatus*) with the many FSB concentrations.

Keywords: biofuel, fertilization rate, hatching rate, toxicity, yolk height

Introdução

A busca pela interação entre desenvolvimento econômico e preservação do ecossistema é chamada de sustentabilidade, onde os pontos fundamentais visam a própria sobrevivência no planeta, tanto no presente quanto no futuro. Exemplos deste conceito são as medidas que vem sendo adotadas e os investimentos que vem sendo realizados no Brasil com relação aos biocombustíveis, uma fonte energética renovável. Por mais que não tenha a mínima autonomia para substituir o petróleo, ao menos visa reduzir seu uso.

O biocombustível é proveniente de fontes biológicas renováveis baseadas em óleo vegetal ou gordura animal que possui semelhanças físicas e químicas ao diesel mineral. É constituído de ésteres de ácidos graxos, ésteres de alquila (metila, etílica ou propila) de ácidos carboxílicos de cadeia longa (Teixeira & Taouil, 2010). É um

combustível biodegradável obtido comumente por transesterificação, uma reação química de lipídios (óleos de origem vegetal ou gorduras, com cadeia curta) com álcoois em meio ácido ou básico. Considerado um combustível menos poluente emitindo menos gases tóxicos, contribuindo potencialmente para o controle do aquecimento global (Poon et al., 2007; Santos, 2008).

Por ser um produto de recente interesse, poucas são as pesquisas relacionadas à toxicidade do biodiesel para organismos aquáticos incluindo os peixes, uma vez que os estudos direcionam para uma menor toxicidade e maior taxa de biodegradabilidade do biodiesel e suas misturas em várias proporções comparadas ao diesel convencional (Khan et al., 2007; Swanson et al., 2007; Santos, 2008).

Entre as espécies de peixe de interesse econômico -social, destaca-se a curimba (*Prochilodus lineatus*), peixe de piracema amplamente distribuído na América Latina, sendo mais frequente na bacia superior do rio Paraná, envolvendo os rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu. Tem o hábito alimentar limnófago ou iliófago (detritívoro), de baixo nível trófico, alimentando-se no ambiente natural de material orgânico. A curimba, entre os peixes nativos, é um dos que têm apresentado bons

resultados em pesquisas relacionadas à aquicultura, em virtude do rápido crescimento em cultivo intensivo, da alta rusticidade para manejo e da alta fertilidade (Galdioli et al., 2002).

Devido às poucas informações sobre os efeitos do biodiesel para espécies de peixes dulcícolas neotropicais, estudos experimentais sobre o impacto de concentrações de biocombustível nos peixes se tornam necessários, sendo assim este trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes concentrações da fração solúvel de biodiesel de óleo de soja queimado sobre o desenvolvimento embrionário de curimba (*Prochilodus lineatus*).

Material e métodos

Obtenção do biodiesel e preparo da fração solúvel do biodiesel (FSB)

O biodiesel foi adquirido no Laboratório de Biocombustível da Universidade Federal de Lavras, onde foi obtido através da metilação em meio ácido do óleo de soja utilizado em frituras, portanto não estava padronizado e nem purificado. Sua composição química consta da Tabela 1.

A metodologia para separação da fração solúvel do biodiesel (FSB) foi modificada de Simonato et al. (2011), onde se misturou uma parte de biodiesel em quatro partes de água e levou-se ao agitador magnético, durante 45 minutos. Após esse tempo, colocou-se a solução no decantador durante 60 minutos e retirou-se a fração solúvel, descartando o sobrenadante. Essa preparação foi feita no Laboratório de Química do UNIFOR (Centro Universitário de Formiga/MG). Foi encontrada a concentração do biodiesel na solução estoque de 0,0645 g/L

Tabela 1. Resultados analíticos do biodiesel.

Local e Animais

O experimento foi realizado no mês de janeiro de 2012, na Estação de Piscicultura e Hidrobiologia da Eletrobrás-Furnas, localizada no município de São José da Barra, MG. Características climáticas: Temperatura Mínima (18 °C); Temperatura Máxima (25 °C); Precipitação (278 mm) (CLIMATEMPO, 2013).

Durante o experimento, os parâmetros físico-químicos da água foram aferidos a cada duas horas (oxigênio dissolvido, pH e temperatura),

com o auxílio de uma sonda multiparâmetro YSI 85, sendo encontrados os valores médios: temperatura $23,0 \pm 0,1$ °C; oxigênio dissolvido $4,58 \pm 0,34$ mg L⁻¹ e pH: $7,3 \pm 0,1$ nas incubadoras.

Metodologia para obtenção dos embriões

Para a obtenção dos embriões foi utilizada a metodologia da reprodução induzida. Os reprodutores foram mantidos em tanques com capacidade de, aproximadamente, 1000 litros de água, com entrada de água e aeração constante e temperatura de 25 °C, numa relação de dois machos para uma fêmea. O hormônio utilizado foi o extrato bruto de hipófise de carpa. Nas fêmeas, foram aplicadas duas doses com intervalo de 14h e com concentração de 0,5 mg/kg. Nos machos, apenas uma dose foi aplicada no mesmo momento da aplicação da 2^a dose na fêmea, na concentração de 3mg/kg.

A desova aconteceu seminatural no aquário e em seguida os ovócitos foram coletados e transferidos para um sistema de incubação experimental para embriões de peixe (Pat. Req. BR102013017858-6) confeccionados de PVC em duplicata, com aeração constante, contendo diferentes concentrações de fração solúvel de biodiesel (FSB), sendo as

mesmas definidas com base no trabalho de Fadakar Masouleh et al. (2011), conforme Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações da FSB utilizadas no experimento.

Utilizando o teste cego, em cada incubadora foi adicionado um volume de 180 ml de solução juntamente com as concentrações da FSB e uma média de 250 ovos, contados através da utilização de uma lupa esterioscópica Olympus SZ 51[®].

A taxa de fertilização (TF) foi verificada após oito horas da fertilização e a taxa de eclosão (TE) foi realizada 18h e 40 min. pós-fertilização utilizando amostragens aleatórias de embriões e larvas ($n \geq 74$), em lupa esterioscópica Olympus SZ 51[®] conforme as seguintes fórmulas (Felizardo et al., 2010) descritas abaixo

Taxa de Fertilização = $[\text{n}^\circ \text{ de embriões viáveis} / (\text{n}^\circ \text{ de embriões viáveis} + \text{número de ovos inviáveis})] \times 100$;

Taxa de Eclosão = $[\text{n}^\circ \text{ de larvas} / (\text{n}^\circ \text{ larvas} + \text{n}^\circ \text{ de ovos gorados})] \times 100$

Para a observação de possíveis alterações no desenvolvimento embrionário, amostras foram coletadas em intervalos de duas horas e

fixadas em solução Karnowisk. Os embriões foram fotografados por câmera fotográfica digital ZEISS Axion Cam ERC 5G, utilizando um estereomicroscópio binocular AXIO/ZEISS Model Lab. A1. Nos ovócitos e embriões foram mensurados o diâmetro e a altura do vitelo, utilizando-se o programa livre “Image J” (versão 1.6.0).

Fez-se um teste de comparação de médias (teste de Tukey), para verificar quais tratamentos apresentaram diferença significativa entre si.

Resultados e discussão

Taxa de fertilização

Os resultados da taxa de fertilização, após oito horas pós fertilização (hpf), estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Taxa de Fertilização de curimba, submetidos a diferentes concentrações da fração solúvel do biodiesel.

Observou-se semelhança para taxa de fertilização nos tratamentos I, II e III ($p>0,05$) sendo que estes tratamentos diferem dos tratamentos IV, V e VI que não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) entre si. A

partir do grupo IV a taxa de fertilização sofreu alteração ($p < 0,05$) reduzindo o número de embriões de curimba.

Os valores encontrados no presente trabalho para taxa de fertilização variou de 50,88 a 81,61% sendo estes semelhantes ao relatados por Silva et al. (2009) e Paulino et al. (2011), respectivamente $40 \pm 5\%$ e 40 a 50%. Porém diferem dos resultados relatados por Souza (2006), que foi de 94,77%.

Desenvolvimento embrionário

No presente estudo foi observado efeito da FSB nas fases de desenvolvimento embrionário de curimba, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Desenvolvimento embrionário de curimba, expostos a concentrações crescentes da FSB.

Duas horas pós fertilização (hpf) quase todos os embriões estavam com, aproximadamente, 128 células exceto o tratamento III que estava com 64 células. Quatro horas pós fertilização observou-se mudanças no

desenvolvimento embrionário, porém sucintas, os tratamentos II, VI e o controle já estavam na fase de oblongo, enquanto os demais estavam na fase de alto (Figura 1), bem semelhantes aos resultados obtidos por Ninhaus-Silveira et al. (2006); Botta et al. (2010); Hernandez Cuadrado (2013).

Figura 1. Fase de blástula dos ovócitos submetidos à concentrações crescentes da FSB.

Na fase de gástrula, os embriões encontravam-se em torno de 50% de epibolia, a partir das seis hpf permanecendo até oito horas pós-fecundação (Figura 2).

Figura 2. Fase de gástrula dos ovócitos submetidos a concentrações crescentes da FSB.

Observou-se que as menores concentrações (II e III) de biodiesel não causaram alterações macroscópicas nos embriões, após oito horas de fecundação. Estes resultados podem ser visualizados, pois a avaliação

entre ovos viáveis e não viáveis, na forma que é feita se consegue uma observação efetiva, porém o efeito das concentrações de biodiesel (turvação do meio) mascaram a leitura da taxa de fertilização dos ovos de curimba. Segundo Meireles et al. (2011) a curimba produz ovócitos opacos e de coloração cinza e os embriões são translúcidos e transparentes.

Nas primeiras 10 hpf os embriões de todos os tratamentos tiveram um desenvolvimento semelhante ao tratamento controle. O resultado encontrado no grupo controle estão semelhantes aos observados por Ninhaus-Silveira et al. (2006); Botta et al. (2010); Hernandez Cuadrado (2013), mesmo trabalhando com temperaturas diferentes.

A partir da décima hora pós- fecundação evidenciou-se o atraso no desenvolvimento embrionário, em relação ao tratamento controle. Os embriões do tratamento VI estavam com 80% de epibolia, diferenciando dos demais tratamentos que estavam na fase de fechamento de blastóporo. Nas Figuras 3 e 4, apresenta-se a fase de segmentação dos embriões.

Figura 3. Fases de segmentação dos embriões submetidos a concentrações crescentes da FSB. **Figura 4.** Fases de segmentação e

organogênese dos embriões submetidos a concentrações crescentes da FSB.

A partir das 12 hpf até as 14 hpf, ocorreram os atrasos no desenvolvimento e uma diferença marcante foi que os embriões do tratamento VI estavam na fase de fechamento de blastóporo enquanto os embriões dos demais tratamentos e os do grupo controle estavam na fase desenvolvimento de somitos. Às 16 hpf, os embriões avançaram no desenvolvimento, equiparado ao desenvolvimento dos embriões do tratamento controle.

A partir das 18 hpf os embriões do grupo controle já haviam atingido a fase larval (Figura 5), enquanto os embriões dos demais tratamentos estavam na fase de 18 a 25 somitos.

Figura 5. Fase larval.

O período de desenvolvimento embrionário, desde a fecundação até a eclosão, foi de 18h e 40 min. Ninhaus-Silveira et al. (2006) encontraram 22h para a temperatura de 24 °C e 14h para 28 °C e Botta et

al. (2010) encontraram 18h a 25 °C, sendo o período de incubação dependente da temperatura da água.

Taxa de eclosão

Os resultados para taxa de eclosão (7,56 a 46,26%) (Tab. 5) diferem dos valores 50,88% a 95,00%, encontrados por Silva et al. (2009); Meireles et al. (2011); Paulino et al. (2011); Hernandez Cuadrado (2013).

Tabela 5. Taxa de eclosão de ovos de curimba submetidos a concentrações crescentes de FSB.

Todos os grupos diferiram estatisticamente do grupo I. Porém o grupo VI, que continha 6,45 g.L⁻¹ de biodiesel, apresentou diferença significativa ($p < 0,0001$).

Apesar da taxa de fertilização não diferir entre os tratamentos controle, II e III, observou-se que, na taxa de eclosão, os tratamentos II e III exerceram um efeito negativo no desenvolvimento embrionário.

De acordo com Rand & Petrocelli (1985), os efeitos tóxicos do biocombustível incluem letalidade (mortalidade) e efeitos subletais, tais como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas patológicas, bioquímicas e comportamentais.

Porém a falta de trabalhos nessa área dificulta a comparação direta dos resultados, visto a diferença na composição dos biocombustíveis estudados, divergências nas metodologias e variação dos organismos em estudo.

Conclusão

1. As diversas concentrações da fração solúvel do biodiesel de óleo de soja queimado interferiu no desenvolvimento embrionário de curimba (*Prochilodus lineatus*).

Referências

BOTTA, P.; SCIARA, A.; ARRANZ, S. Estudio del desarrollo embrionario del sábalo (*Prochilodus lineatus*). **Archivos de Medicina Veterinária**, v.42, p.109-114, 2010. DOI:10.4067/S0301-732X2010000200014.

CLIMATEMPO. Disponível em: www.climatempo.com.br. Acesso em: 02 Nov. 2013.

FADAKAR MASOULEH, F.; MOJAZI AMIRI, B.; MIRVAGHEFI, A.R.; NEMTOLLAHI, M.A. In vitro effects of diazinon on male reproductive tissue and sperm motility of caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*). **Research Journal of Environmental Toxicology**, v.5, p.108-116, 2011. DOI: [10.3923/rjet.2011.108.116](https://doi.org/10.3923/rjet.2011.108.116).

FELIZARDO, V.O.; MELLO, R.A.; MURGAS, L.D.; ANDRADE, E.S. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.259-263, 2010. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.020.

GALDIOLI, E.M.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M. Substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do farelo de canola em rações para alevinos de curimbatá (*Prochilodus lineatus* V.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.552-559, 2002.

HERNÁNDEZ CUADRADO, E.E. **Indução da atividade espermática e desenvolvimento embrionário e larval de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2013. 182p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

MEIRELES, W.A.; SANTOS, L.X.; FIGUEIREDO, S.A.; BUTERI, C.B. Reprodução induzida de alguns peixes migradores das bacias dos rios Pardo e Jequitinhonha. **V&Z Minas**, v.21, p.38-42, 2011.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, v.14, p.217-229, 2006.

PAULINO, M.S.; MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de busserelina. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.37, p.39-45, 2011.

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

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere, 1985. 666p.

SANTOS, F.A. **Biocombustíveis: prós e contras**. 17p. Disponível em: <<http://home.utad.pt/~fsantos/pub-fas/Biocombustiveis.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

SILVA, J.M. de A.; MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V. de O. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, p.668-677, 2009.

SIMONATO, J.D.; ALBINATI, A.C.; MARTINEZ, C.B.R. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. **Bull Environmental Contamination Toxicology**, v.76, p.505-511, 2011. DOI: 10.1007/s00128-006-0949-3.

SOUZA, B.E. **Fertilização artificial em ovócitos de curimatá (*Prochilodus lineatus*)**. 2007. 67p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SWANSON, K.J.; MADDEN, M.C.; GHIO, A.J. Biodiesel exhaust: the need for health effects research. **Environmental Health Perspectives**, v.115, p.496-499, 2007. DOI: 10.1289/ehp.9631.

TEIXEIRA, M.C.; TOUIL, D.S.G. Biodiesel: uma alternativa verde. **Vértices**, v.12, p.17-40, 2010.

Tabelas

Tabela 1. Resultados analíticos do biodiesel.

Parâmetro	Unidade	Resultado	Metodologia
Etanol	% v/v	Não detectado	CG
Hidróxido de Sódio	mg/L	Não detectado	Titulométrico
Lipídeos	g/100 mL	0,003	IAL 032-34/IV
Metanol	% v/v	0,24	POP. CROMO.14

Fonte: HIDROCEPE Laudo de Análise n° 12571 (04/02/2013). CG,

Cromatografia Gasosa; IAL, Instituto Adolfo Lutz.

Tabela 2. Concentrações da FSB utilizadas no experimento.

Tratamento	Concentração	Fator de diluição
Solução I	Água do tanque (controle)	0
Solução II	0,0645 g.L ⁻¹ de biodiesel	1/1000
Solução III	0,129 g.L ⁻¹ de biodiesel	1/500
Solução IV	0,645 g.L ⁻¹ de biodiesel	1/100
Solução V	1,29 g.L ⁻¹ de biodiesel	1/50
Solução VI	6,45 g.L ⁻¹ de biodiesel	1/10

Tabela 3. Taxa de Fertilização de curimba, submetidos a diferentes concentrações da fração solúvel do biodiesel.

Tratamentos	Taxa de Fertilização (%)*
Água do tanque (controle)	72,73 a
0,0645 g.L ⁻¹	81,61 a
0,129 g.L ⁻¹	72,97 a
0,645 g.L ⁻¹	57,69 b
1,29 g.L ⁻¹	53,03 b
6,45 g.L ⁻¹	50,88 b

*p<0,05. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Desenvolvimento embrionário de curimba, expostos a concentrações crescentes da FSB.

HPF	Tratamentos					
	I	II	III	IV	V	VI
2	128 cel.	128 cel.	64 cel.	Alto	128 cel.	128 cel.
4	Oblongo	Oblongo	Alto	Alto	Alto	Oblongo
6	50%	50%	60%	50%	30%	50%
8	50%	50%	60%	60%	60%	50%
10	FB	FB	FB	FB	FB	80%
12	10 S	5 S	FB	10 S	3 S	FB
14	15 S	10 S	10 S	10 S	10 S	FB
16	20 S	20 S	20 S	18 S	16 S	13 S
18	Larva	25 S	25 S	19 S	18 S	18 S

HPF, horas pós fertilização; FB, fechamento de blastóporo; S, somitos.

Tabela 5. Taxa de eclosão de ovos de curimba submetidos a concentrações crescentes de FSB.

Tratamentos	Taxa de eclosão (%)
Água do tanque (controle)	46,26 a
0,0645 g.L ⁻¹	25,73 b
0,129 g.L ⁻¹	29,87 b
0,645 g.L ⁻¹	30,58 b
1,29 g.L ⁻¹	31,18 b
6,45 g.L ⁻¹	7,56 c

*p<0,05. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey.

Figuras

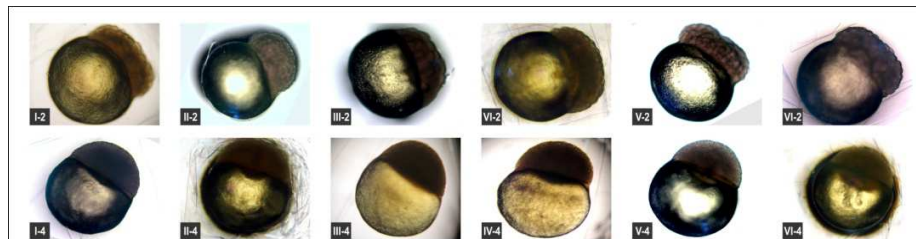


Figura 1. Fase de blástula dos ovócitos submetidos à concentrações crescentes da FSB.

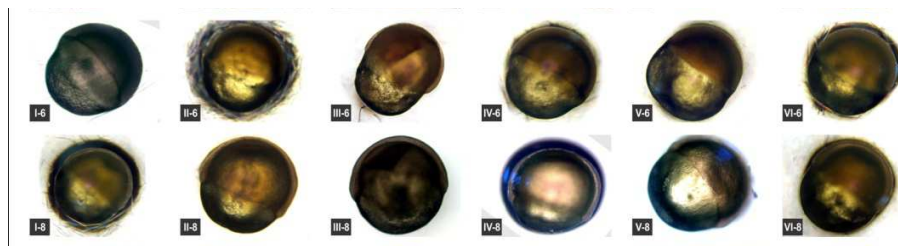


Figura 2. Fase de gástrula dos ovócitos submetidos a concentrações crescentes da FSB.

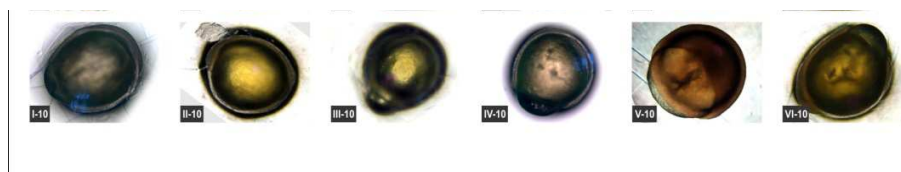


Figura 3. Fases de segmentação dos embriões submetidos a concentrações crescentes da FSB.

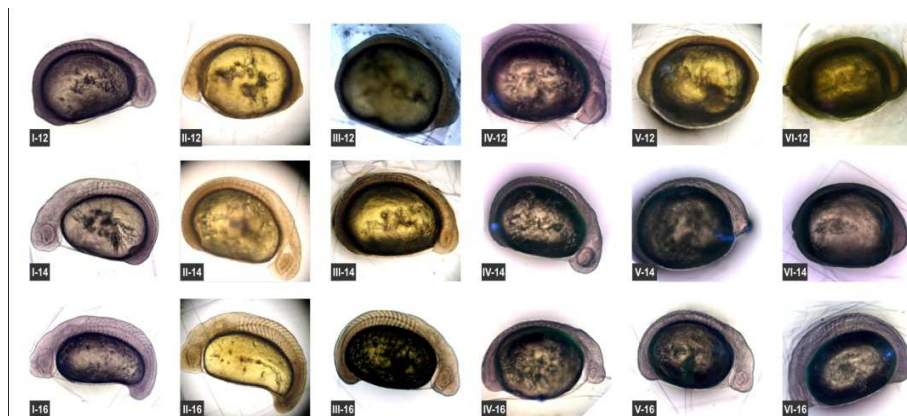


Figura 4. Fases de segmentação e organogênese dos embriões submetidos a concentrações crescentes da FSB.

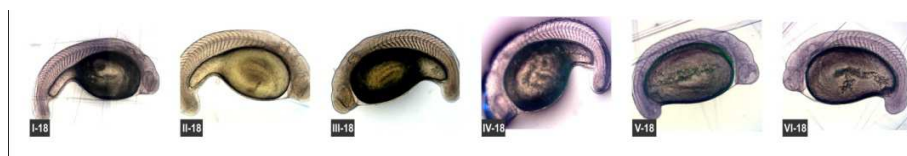


Figura 5. Fase larval.

(VERSÃO PRELIMINAR DO ARTIGO)

ARTIGO 2 Avaliação da genotoxicidade em *Danio rerio* expostos a concentrações crescentes de fração solúvel do biodiesel de óleo de soja queimado

Dênio Garcia Silva de Oliveira *

Luciana de Mattos Alves Pinto

Luis David Solis Murgas

Marinez Moraes de Oliveira

Mônica Rodrigues Ferreira Machado

Priscila Vieira e Rosa

Sheila Cristina da Silva Victorio

Artigo preparado de acordo com as normas da NBR 6022 (ABNT, 2003)

* Centro Universitário Formiguense-UNIFOR, Avenida Dr. Arnaldo de Senna, nº 328. Bairro Água Vermelha, 35570-000, Formiga, MG. E-mail: deninvet@yahoo.com.br
Universidade Federal de Lavras-UFLA, Departamento de Química. E-mail: luca@dqi.ufla.br
Universidade Federal de Lavras-UFLA, Departamento de Medicina Veterinária. E-mail: lsmurgas@ufla.br
Universidade Federal de Lavras-UFLA, Departamento de Zootecnia, campus universitário, Caixa Postal: 3037, Lavras, MG. E-mail: marinez.moraes@ig.com.br
Pontifícia Universidade Católica, Departamento de Zootecnia, endereço: Campus 2 Pontifícia Universidade Católica de Goiás, CEP: 74000-000, Goiânia, GO. E-mail: monicavet_2@hotmail.com
Universidade Federal de Lavras-UFLA, Departamento de Zootecnia, campus universitário, Caixa Postal: 3037, Lavras, MG. E-mail: priscila@dzo.ufla.br
Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Instituto de Biologia, Campinas, SP. E-mail: scvictorio@yahoo.com.

RESUMO

Objetivou-se, com esta pesquisa, a observação do aumento do aparecimento de micronúcleo em eritrócitos de peixes juvenis de zebrafish (*Danio rerio*), expostos a concentrações crescentes de fração solúvel do biodiesel (FSB) de óleo de soja queimado. Os peixes foram colocados em aquários de polietileno, sendo submetidos ao teste de toxicidade aguda em um delineamento em bloco inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e duas repetições. Os tratamentos consistiam de diferentes concentrações de FSB, sendo as soluções: I (controle), II (0,0645 g L⁻¹), III (0,129 g L⁻¹), IV (0,645 g L⁻¹), V (1,29 g L⁻¹) e VI (6,45 g L⁻¹). Foi realizado um esfregaço sanguíneo para cada peixe, sendo analisados 2000 eritrócitos intactos. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo I, II, III e IV e os grupos V e VI, nos tempos 24 e 96 horas de exposição. Diante dos resultados, podemos observar que a FSB tem efeito genotóxico em eritrócitos de peixes juvenis de zebrafish.

Palavras chave: teste do micronúcleo, zebrafish, toxicidade.

INTRODUÇÃO

Uma maneira de verificar os efeitos tóxicos em uma população aquática exposta a agentes químicos e/ou biológicos é conduzir estudos de monitoramento, utilizando-se parâmetros biológicos, de preferência, estudos com manifestações em curto prazo, tais como ensaios de toxicidade aguda. Para avaliar a ocorrência de prováveis mutações ou alterações genéticas em uma célula é preciso utilizar algumas técnicas, dentre elas o Teste de Micronúcleos. Esse consiste na identificação do aumento na frequência de mutação em células, que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos. O teste alia simplicidade, análise rápida de um elevado número de células, menor custo, grande poder estatístico, velocidade e facilidade de análise, utilização de pequenas concentrações de células, além da eficácia em danos clastogênicos e aneugênicos (REDDY, 2009; SANTOS, 2013; SWANSON; MADDEN; GHIO, 2007).

O micronúcleo é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formado na telófase, durante a divisão celular por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que se atrasam em relação aos demais. O teste do micronúcleo pode ser aplicado em qualquer tecido animal, sendo dependente da proporção de células que estão se dividindo, ocorrendo, durante um tempo equivalente ao ciclo celular, que resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentalmente induzidas ou de falhas no fuso celular (FENECH, 1997; SANTOS, 2013; UDROIU et al., 2006).

Objetivou-se, nesta pesquisa, observar o aumento de micronúcleos em eritrócitos de zebrafish, expostos a concentrações crescentes de fração solúvel do biodiesel de óleo de soja queimado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Nesta pesquisa, exemplares juvenis de zebrafish (*Danio rerio*), pesando, aproximadamente $0,89 \pm 0,177$ g, adquiridos de Loja de Aquarismo, foram aclimatados durante aproximadamente 48 horas, em aquário de polietileno de 50 L, contendo água desclorada, no laboratório de Fisiopatologia da Reprodução, Parasitologia e Análises Clínicas do UNIFOR-MG (Centro Universitário de Formiga/MG). Durante o período experimental, os animais foram alimentados *ad libitum* com ração comercial, a cada 48 horas.

Obtenção do biodiesel e preparo da fração solúvel do biodiesel (FSB)

O biodiesel foi adquirido no Laboratório de Biocombustível da Universidade Federal de Lavras sendo obtido através da metilação do óleo de soja utilizado em frituras, portanto não estava padronizado e nem purificado.

A metodologia para separação da fração solúvel do biodiesel (FSB) foi modificada de Simonato, Albinati e Martinez (2006). Misturou-se uma parte de biodiesel em quatro partes de água que foi levada ao agitador magnético, durante 45 minutos. Após esse, tempo colocou-se a solução no decantador durante 60 minutos e retirou-se a fração solúvel, descartando o sobrenadante. Essa preparação foi feita no Laboratório de Química do UNIFOR (Centro Universitário de Formiga). Foi encontrada

a concentração do biodiesel na solução: 0,0645 g L⁻¹ e sua composição consta na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados analíticos do biodiesel

Parâmetro	Unidade	Resultado	Metodologia
Etanol	% v v ⁻¹	Não detectado	CG
Hidróxido de Sódio	Mg L ⁻¹	Não detectado	Titulométrico
Lipídeos	g 100 mL ⁻¹	0,003	IAL 032-34/IV
Metanol	% v v ⁻¹	0,24	POP. CROMO.14

Fonte: HIDROCEPE Laudo de Análise nº 12571 (04/02/2013).

Teste de toxicidade

Os peixes foram submetidos ao teste de toxicidade aguda, no qual são coletadas amostras com seis, 24 e 96 horas após exposição ao agente, em aquários de polietileno, com capacidade para três litros de água, com aeração constante, em um delineamento em bloco inteiramente casualizado (DBIC), sendo seis tratamentos com duas repetições, totalizando doze aquários. Em cada unidade experimental, contendo diferentes concentrações de FSB, foram colocados 15 peixes, totalizando 180 animais e as concentrações definidas com base no trabalho de Fadakar Masouleh et al. (2011), conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações da FSB utilizadas no experimento

Tratamento	Concentração de biodiesel (g L ⁻¹)	Fator de diluição
Solução I	Água do tanque (controle)	0
Solução II	0,0645	1. 1000 ⁻¹

Solução III	0,129	$1. 500^{-1}$
Solução IV	0,645	$1. 100^{-1}$
Solução V	1,29	$1. 50^{-1}$
Solução VI	6,45	$1. 10^{-1}$

Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo foi realizado de acordo com metodologia descrita por Al-Sabti e Metcalfe (1995) e a coleta de sangue conforme descrito por Vilches (2009). Imediatamente após serem retirados dos aquários, os peixes foram anestesiados com benzocaína e o sangue foi retirado por um corte na região caudal e, em seguida, foram preparados esfregaços sanguíneos para a confecção de uma lâmina por animal. Após a secagem por 24 horas em temperatura ambiente, as lâminas foram coradas, utilizando-se o corante Panótico Rápido, devido à distinção satisfatória entre eritrócitos, de forma rápida e prática, pois cora o núcleo de azul escuro e o citoplasma de azul claro (MENEGUETTI et al., 2011). A análise citológica foi realizada usando teste cego (SILVA; NEPOMUCENO, 2010), utilizando-se um estereomicroscópio binocular AXIO/ZEISS Model Lab. A1[®] com lente de imersão (1000X).

Foram analisados 2000 eritrócitos intactos por lâmina, de acordo com a metodologia proposta por Carrasco, Tilbury e Mayers (1990) e a determinação da frequência de micronúcleos seguiu os seguintes critérios:

1. tamanho menor que 1/3 do núcleo;
2. mesmo plano de foco do núcleo;
3. padrão da estrutura e coloração da cromatina idênticos ao núcleo;
4. nenhuma ligação com o núcleo.

Durante o experimento, os parâmetros físico-químicos da água nos aquários foram aferidos a cada duas horas (oxigênio dissolvido, pH e temperatura), com o auxílio de uma sonda multiparâmetro YSI 85. Foram encontrados os valores médios: temperatura $24,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; oxigênio dissolvido $4,58 \pm 0,34 \text{ mg L}^{-1}$; pH: $7,8 \pm 0,1$.

Utilizou-se o teste de Scott-Knott, pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2011). Sendo considerados significativos os valores de p, ao nível de 5% entre os tratamentos.

RESULTADOS

Foi possível observar os micronúcleos (Fig. 1) nos eritrócitos de zebrafish em todas as amostras e tempos coletados.

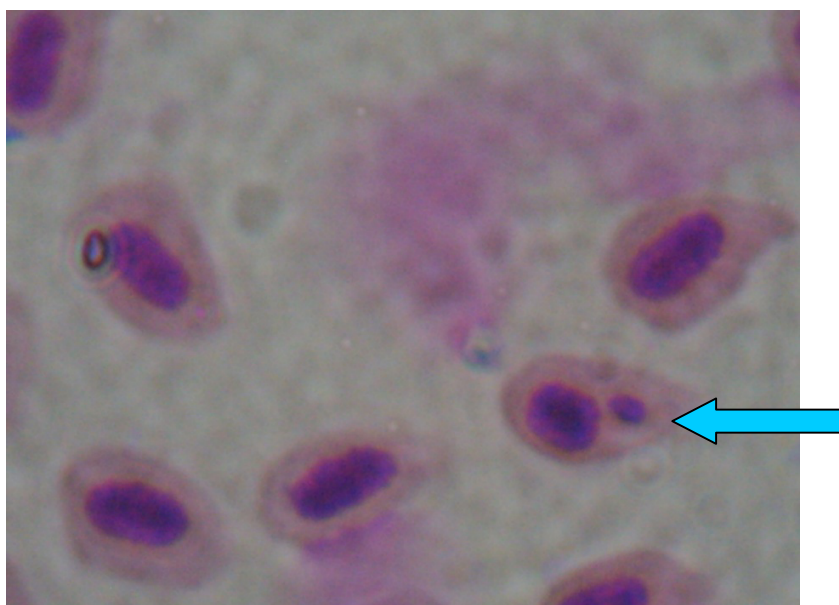


Figura 1-Micronúcleo (seta) em eritrócito de peixe. (1000x)

Fonte: Arquivo pessoal

Nas primeiras seis horas do experimento, foi observado que não houve diferença ($p>0,05$), para a variação da presença de micronúcleo entre os tratamentos e grupo controle. (Tabela 3)

Após 24 horas de experimentação, a frequência média de micronúcleo variou de 11,8 no tratamento controle até o número máximo de 69,2 micronúcleos, no tratamento V. Em 96 horas, a frequência média de micronúcleo foi de 31 no tratamento controle até 147,8, no tratamento VI.

Os dados coletados em 24 horas mostraram que os tratamentos V e VI diferem significativamente ($p<0,05$) dos demais tratamentos e do grupo controle, o mesmo ocorrendo no tempo de exposição de 96 horas (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência média de micronúcleos (n=15) em função de 24 e 96 horas de exposição nas diferentes concentrações da FSB

Tratamento	Média de micronúcleos*	
	24 horas	96 horas
I (CONTROLE)	11,8 a	31,0 a
II (0,0645 g L ⁻¹)	19,8 a	60,0 a
III (0,129 g L ⁻¹)	29,4 a	34,4 a
IV (0,645 g L ⁻¹)	32,2 a	81,4 a
V (1,29 g L ⁻¹)	69,2 b	124,0 b
VI (6,45 g L ⁻¹)	65,2 b	147,8 b

*letras minúsculas diferentes na coluna indica diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

DISCUSSÃO

Considerando que o biodiesel é um combustível que pode vir a substituir o diesel de petróleo, devem-se avaliar os riscos da contaminação de corpos hídricos que apontam para o seu potencial tóxico e genotóxico. Pouco se sabe sobre o efeito das frações que compõem o biodiesel sobre os organismos aquáticos, que potencialmente podem entrar em contato por várias rotas de exposição (ABHILASH; SINGH, 2009; BIRCHALL; NEWMAN; GREAVES, 1995; KHAN; WARITH; LUK, 2007; PETERSON; MÖLLER, 2004; REKHA; NAIK; PRASAD, 2006).

Segundo Baéz Ramírez e Prieto García (2005), Campos et al. (2008), Mendes et al. (2011), Pretti (2007), Özkan et al. (2011), Rocco, Peluso e Stingo (2012) e Silva e Nepomuceno (2010), se a quantidade de micronúcleo for superior a três a substância é considerada genotóxica. A frequência média de micronúcleo encontrada nesta pesquisa foi de 43,16 no tempo de 24 horas e de 89,52 no tempo de 96 horas, excluindo-se os valores do grupo controle. Portanto, as concentrações da FSB utilizadas podem ser consideradas genotóxicas.

Conforme Moreira et al. (2010) o estresse causado aos peixes durante a captura, estoque e transporte induz danos genotóxicos e fisiológicos. Sendo este fato atribuído ao mecanismo de formação dos micronúcleos. O que corrobora com os resultados desta pesquisa em que o grupo controle apresentou 11,8 micronúcleos por 2000 células nas primeiras 24 horas e 31 micronúcleos por 2000 células em 96 horas após o início do experimento.

Com os resultados observados neste experimento os peixes zebrafish tiveram tolerância a baixas concentrações de FSB, nas primeiras seis horas de experimentação. Alguns autores (BAÉZ RAMÍREZ; PRIETO GARCÍA, 2005; CAMPOS et al., 2008; MENDES et al., 2011) afirmam que o aparecimento de neoplasias está diretamente relacionado com o aumento da frequência de micronúcleos nas células.

Mota, Barboni e Jesus (2009) e Souza e Fontanetti (2006), em estudo utilizando tilápias (*Oreochromis* sp) capturadas diretamente no curso d'água, observaram alta incidência de micronúcleos nos seus eritrócitos. Estas observações foram corroboradas por Silva e Nepomuceno (2010) que, pesquisando mandis amarelo (*Pimelodus maculatus*), encontraram um número de micronúcleos compreendido entre 56 e 226, evidenciando que a formação do micronúcleo pode estar relacionada com a contaminação da água dos rios.

No presente estudo, foi observado que, nos tempos de 24 e 96 horas de exposição, houve diferença ($p < 0,05$) para a variação da presença de micronúcleo nos tratamentos V e VI em relação aos outros tratamentos e o tratamento controle. Esses resultados são semelhantes aos relatados por Özkan et al. (2011) e Rocco, Peluso e Stingo (2012) que encontraram um aumento do dano genético em relação ao tempo de exposição, ou seja, quanto maior for o tempo de exposição, maior é o dano. Mesmo pesquisando o efeito de substâncias diferentes.

Na pesquisa realizada por Khan, Warith e Luk (2007), sobre os efeitos toxicológicos causados pela fração solúvel em água (FSA) do biodiesel (derivado de óleos e gorduras recicláveis), óleo diesel e de misturas de ambos sobre organismos testes *Oncorhynchus mykiss* (peixe

truta arco-íris) e de dáfnia (*Daphnia magna*), através da realização de testes de toxicidade aguda, comprovaram que a FSA do biodiesel é consideravelmente menos tóxica para os organismos aquáticos do que a FSA do óleo diesel convencional. Porém, os resultados demonstraram que ainda assim há risco substancial para os organismos aquáticos, no caso de uma contaminação por biodiesel.

CONCLUSÃO

Pode-se observar que no tratamento controle, existe uma indução da geração de micronúcleo, sendo uma ocorrência comum, principalmente em situações de estresse.

A fração solúvel do biodiesel de óleo de soja queimado tem efeito genotóxico em eritrócitos de juvenis de zebrafish, com o surgimento de micronúcleos.

Como resultado final o tratamento VI ($6,45 \text{ g.L}^{-1}$) induz a formação de micronúcleos em eritrócitos de zebrafish 4,77 vezes maior que o tratamento controle.

Evaluation of the genotoxicity in *Danio rerio* exposed to increasing concentrations of the soluble fraction of burnt soybean oil biofuel

ABSTRACT

The objective of this research was the observation of the increased appearance of micronuclei in erythrocytes of juvenile zebrafish (*Danio rerio*) exposed to increasing soluble fraction concentrations of burnt soybean oil biodiesel (FSB). The fish were placed in polyethylene aquariums and submitted to acute toxicity test in a completely randomized block design, with five treatments and two replicates. The treatments consisted of different FSB concentrations: solution I (control), solution II (0.0645 g L⁻¹), solution III (0.129 g L⁻¹), solution IV (0.645 g L⁻¹), solution V (1.29 g L⁻¹) and solution VI (6.45 g L⁻¹). We collected a blood smear lamina for each fish, analyzing 2000 intact erythrocytes. There was significant difference (p<0.05) between groups I (control), II, III and IV, and groups V and VI, in the periods of 24 and 96 hours of exposition. With these results we may observe that the FSB presents a genotoxic effect in the erythrocytes of juvenile zebrafish.

Keywords: micronucleus test, zebrafish, toxicity.

REFERÊNCIAS

ABHILASH, P. C.; SINGH, N. Pesticide use and application: an Indian scenario. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 165, n. 15, p. 1-12, June 2009.

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

BAÉZ RAMÍREZ, O. A.; PRIETO GARCÍA, F. Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapán, Hidalgo, Mexico. **Mutagenesis**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 291-295, June 2005.

BIRCHALL, C.; NEWMAN, J.; GREAVES, M. **Degradation and phytotoxicity of biodiesel oil**. London: Institute of Arable Crops Research-Centre for Aquatic Plant Management, 1995. 27 p.

CAMPOS, L. M. F. R. et al. Prevalence of micronuclei in exfoliated uterine cervical cells from patients with risk factors for cervical cancer. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 126, n. 6, p. 323-328, Nov. 2008.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S. Assessment of the piscine micronuclei test as an *in situ* biological indicators of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, Nov. 1990.

FADAKAR MASOULEH, F. et al. In vitro effects of diazinon on male reproductive tissue and sperm motility of caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*). **Research Journal of Environmental Toxicology**, New York, v. 5, n. 2, p. 108-116, July 2011.

FENECH, M. The advantages and disadvantage of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 392, n. 1/2, p. 11-18, July 1997.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, abr. 2011.

KHAN, N.; WARITH, M.; LUK, G. A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms. **Journal of the Air and Waste Management Association**, London, v. 57, n. 3, p. 286-296, 2007.

LEME, D. M. et al. An overview of biodiesel soil pollution: data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. **Journal of Hazardous Materials**, Philadelphia, n. 199/200, p. 343-349, 2012.

MENDES, C. F. et al. Micronúcleos em células do colo uterino em mulheres HIV+ segundo sua condição de imunidade. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 10, p. 305-309, out. 2011.

MENEGUETTI, D. U. O. et al. Adaptação da técnica de micronúcleo em *allium cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos rios da região do vale do Jamari, Rondônia, Amazônia Ocidental. **Revista Pesquisa & Criação**, Porto Velho, v. 10, n. 2, p. 181-187, jul./dez. 2011.

MOREIRA, T. N. et al. Influência dos métodos de captura de peixes na avaliação genotóxica utilizando diferentes tecidos de *Astyanax fasciatus* (Osteichthyes, Characidae). **Jornal Brasileiro de Ecotoxicologia**, Itajaí, v. 5, n. 1, p. 1-7, nov. 2010.

MOTA, G. G. P.; BARBONI, S. A. V.; JESUS, M. C. Tilápias (*actinopterygii: cichlidae*) comercializadas em Feira de Santana (Bahia) como bioindicadores de poluição ambiental em rios da bacia do

Paraguaçu. **Pesticidas Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, n. 19, p. 11-18, jan./dez. 2009.

ÖZKAN, F. et al. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, following exposure to sublethal cadmium doses. **Turkish Journal of Zoology**, Ankara, v. 35, n. 4, p. 585-592, July 2011.

PETERSON, C.; MÖLLER, G. **Biodegradability, BOD5, COD and toxicity of biodiesel fuels**. Idaho: University of Idaho, 2004. Disponível em: <<http://web.cals.uidaho.edu/biodiesel/publication/04.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2013.

PRETTI, E. L. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e neurotóxicos da fração solúvel da gasolina para *Prochilodus lineatus***. 2007. 50 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

REDDY, C. M. **Note on impacts of biofuel spills in the coastal environment**. Falmouth: Woods Hole Oceanographic Institution, 2009. 45 p.

REKHA, S. N.; NAIK, P. R. Pesticide residue in organic and conventional food-risk analysis. **Journal of Chemical Health and Safety**, New York, v. 13, n. 13, p. 12-19, Nov./Dec. 2006.

ROCCO, L.; PELUSO, C.; STINGO, V. Micronucleus test and comet assay for the evaluation of zebrafish genomic damage induced by Erythromycin and Lincomycin. **Environmental Toxicology**, New York, v. 27, n. 10, p. 598-604, Oct. 2010.

SANTOS, F. A. **Biocombustíveis: prós e contras**. Disponível em: <<http://home.utad.pt/~fsantos/pub-fas/Biocombustiveis.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2013.

SILVA, A. C. e; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Perquirêre Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, Patos de Minas, v. 1, n. 1, p. 167-179, ago. 2010.

SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, n. 76, p. 505-511, Jan. 2006.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 605, n. 1, p. 87-93, June 2006.

SWANSON, K. J.; MADDEN, M. C.; GHIO, A. J. Biodiesel exhaust: the need for health effects research. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 115, n. 4, p. 496-499, Apr. 2007.

UDROIU, I. et al. Detection of clastogenic and aneugenic damage in newborn rats. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 47, n. 5, p. 320-324, June 2006.

VILCHES, M. **Análise genotóxica do rio cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores**. 2009. 59 p. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Centro Universitário Fevale, Novo Hamburgo, 2009.

ANEXO**ANEXO A - Resultado Análise Estatística Artigo 2**

6 horas

Variável analisada: valor

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

tratamento 5 10778.666667 2155.733333 1.096 0.3883

erro 24 47211.200000 1967.133333

Total corrigido 29 57989.866667

CV (%) = 164.67

Média geral: 26.9333333 Número de observações: 30

Teste Scott-Knott (1974) para a FV tratamento

NMS: 0,1

Média harmonica do número de repetições (r): 5

Erro padrão: 19,8349859255475

 Tratamentos Médias Resultados do teste

 I 1.000000 a

II 9.400000 a

III 21.400000 a

IV 29.200000 a

V 45.400000 a

VI 55.200000 a

=====

24 horas

 TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

 FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

 tratamento 5 14192.666667 2838.533333 2.123 0.0473

erro 24 32083.200000 1336.800000

Total corrigido 29 46275.866667

CV (%) = 96.39

Média geral: 37.9333333 Número de observações: 30

Teste Scott-Knott (1974) para a FV tratamento

-----NMS: 0,1

-----Média harmonica do número de repetições (r): 5

Erro padrão: 16,3511467487758

-----Tratamentos Médias Resultados do teste

I 11.800000 a

II 19.800000 a

III 29.400000 a

IV 32.200000 a

VI 65.200000 b

V 69.200000 b

=====

96 horas

-----TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

tratamento 5 57074.166667 11414.833333 2.189 0.0490

erro 24 125141.200000 5214.216667

-----Total corrigido 29 182215.366667

-----CV (%) = 90.53

Média geral: 79.7666667 Número de observações: 30

-----Teste Scott-Knott (1974) para a FV tratamento

-----NMS: 0,1

-----Média harmonica do número de repetições (r): 5

Erro padrão: 32,2930849150919

-----Tratamentos Médias Resultados do teste

I 31.000000 a

III 34.400000 a

II 60.000000 a

IV 81.400000 a

V 124.000000 b

VI 147.800000 b

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o biodiesel de óleo de soja queimado e suas misturas sejam menos tóxicos, demonstraram efeitos nocivos em embriões de curimba (*Prochilodus lineatus*) e aumento do número de micronúcleos em juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) devendo-se levar em consideração os riscos a outros organismos aquáticos.

Houve interferência no desenvolvimento embrionário de curimba (*Prochilodus lineatus*), frente às diversas concentrações da fração solúvel do biodiesel de óleo de soja queimado.

A fração solúvel do biodiesel de óleo de soja queimado tem efeito genotóxico em eritrócitos de juvenis de zebrafish, com o aumento do surgimento de micronúcleos.

Mais e novos estudos voltados para toxicidade do biodiesel de óleo de soja queimado devem ser realizados para elucidar seus efeitos em organismos aquáticos.