

GEONILDO RODRIGO DISNER

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO NAFTALENO EM *Astyanax altiparanae* E *Geophagus
brasiliensis***

CURITIBA

2014

GEONILDO RODRIGO DISNER



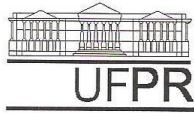
EFEITO DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO NAFTALENO EM *Astyanax altiparanae* E *Geophagus brasiliensis*

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta
Margarete Cestari

CURITIBA

2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **GEONILDO RODRIGO DISNER**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 25 de março de 2014

Doutora Wanessa Algarte Ramsdorf
UTFPR – Membro Titular

Doutor Marcos Vinicius Mocellin Ferraro
UFSC – Membro Titular

Doutora Marta Margarete Cestari
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

Prof^o Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matricula 176702

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

À memória de meu pai, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dra. Marta Margarete Cestari pela oportunidade, acolhimento e confiança.

A todos do laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese ambiental. Em especial a Taynah, Gabrieli, Tatiane e Laercio que pacientemente me ensinaram e ajudaram com os experimentos. À toda equipe do laboratório agradeço por sermos mais do que simples colegas, obrigado pela amizade e por fazerem as horas de trabalhos serem, no mínimo, mais divertidas.

Aos professores e funcionários do departamento de Genética, pelos ensinamentos e contribuição no decorrer do mestrado.

À minha família que incentiva e apóia minha carreira, mesmo que para isso tenhamos que abdicar da companhia constante uns dos outros.

Aos meus amigos, que fazem tudo ter mais sentido. Em especial a Michelly, Rachel e Daila, das quais a saudade é onipresente; ao Gabriel e a minha família curitibana por opção Karina e Luciana. Obrigado pelo carinho e por me completarem de alegria.

À banca de acompanhamento, formada pelas professoras Dra. Paula Moiana da Costa e Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf, pelas pertinentes sugestões durante o trabalho.

Aos professores Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf e Dr. Marcos V. Mocellin Ferraro por aceitarem o convite de participar da banca de avaliação.

Ao Laboratório de Toxicologia Aquática, do departamento de Farmacologia pela colaboração.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada,
ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.” (*Einstein*)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	03
LISTA DE FIGURAS	04
LISTA DE TABELAS	05
RESUMO	06
ABSTRACT	07
1 INTRODUÇÃO GERAL	08
1.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs).....	09
1.1.1 Naftaleno	10
1.2 PEIXES COMO BIOINDICADORES.....	12
1.3 BIOMARCADORES.....	14
1.3.1 Biomarcadores de genotoxicidade	14
1.3.1.1 Teste de Micronúcleo.....	14
1.3.1.2 Ensaio Cometa.....	15
1.3.2 Biomarcador bioquímico	16
1.3.2.1 Glutathione S-Transferase (GST).....	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 ARTIGO	18
INTRODUÇÃO.....	19
METODOLOGIA.....	19
RESULTADOS.....	21
<i>Astyanax altiparanae</i> (lambari).....	21
<i>Geophagus brasiliensis</i> (acará).....	24
DISCUSSÃO.....	28
CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AMN- Alterações Morfológicas Nucleares
CEUA- Comissão de Ética no Uso Animal
CL50- Concentração Letal Média
CN- Controle Negativo
CN+Et- Controle negativo acrescido de Etanol
DNA- Ácido Desoxirribonucleico
GST- Glutathione S-transferase
HPAs- Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IUPAC- *International Union of Pure Applied Chemistry*
MMS- Metil-metano Sulfonato
MN- Micronúcleo
MNP- Teste de Micronúcleo Písceo
NAF- Naftaleno
TMN- Teste de Micronúcleo
UFPR- Universidade Federal do Paraná

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESTRUTURA QUÍMICA DOS 16 PRINCIPAIS HPAS.....	09
FIGURA 2- EXEMPLAR DE <i>Astyanax altiparanae</i>	13
FIGURA 3- EXEMPLAR DE <i>Geophagus brasiliensis</i>	13
FIGURA 4- ESCORES DO ENSAIO COMETA DE SANGUE DE <i>A.</i> <i>altiparanae</i>	22
FIGURA 5- ESCORES DO ENSAIO COMETA DE FÍGADO DE <i>A.</i> <i>altiparanae</i>	22
FIGURA 6- CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS COM DOIS ANEIS AROMÁTICOS NA BILE DE <i>A. altiparanae</i>	23
FIGURA 7- ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE DE <i>A.</i> <i>altiparanae</i>	24
FIGURA 8- ESCORES DO ENSAIO COMETA DE SANGUE DE <i>G.</i> <i>brasiliensis</i>	25
FIGURA 9- ESCORES DO ENSAIO COMETA DE FÍGADO DE <i>G.</i> <i>brasiliensis</i>	26
FIGURA 10- ESCORES DO ENSAIO COMETA DE BRÂNQUIA DE <i>G.</i> <i>brasiliensis</i>	26
FIGURA 11- CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS COM DOIS ANEIS AROMÁTICOS NA BILE DE <i>G. brasiliensis</i>	27
FIGURA 12- ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE DE <i>G.</i> <i>brasiliensis</i>	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS HPAS.....	11
TABELA 2- FREQUÊNCIA DE DIFERENTES ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM <i>A. altiparanae</i>	21
TABELA 3- FREQUÊNCIA DE DIFERENTES ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM <i>G. brasiliensis</i>	24

RESUMO

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são considerados poluentes orgânicos prioritários em estudos ambientais. São substâncias tóxicas, precursoras de efeitos mutagênicos e carcinogênicos, sendo o naftaleno um dos principais constituintes dos HPAs. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda do naftaleno, nas espécies de peixes *Astyanax altiparanae* e *Geophagus brasiliensis*. As concentrações de naftaleno diluídas em água foram: 0,005; 0,03; 0,3 e 3 mg/L. Foram realizados os testes de micronúcleo pisco em eritrócitos, teste cometa para análise de dano em DNA em células de sangue, fígado e brânquia, atividade da enzima glutatona s-transferase no fígado e acumulação de naftaleno na bile. As duas espécies apresentaram semelhança quanto à suscetibilidade à exposição ao naftaleno. Pelo teste cometa verificou-se que o naftaleno, nas condições testadas, não é genotóxico. Porém a toxicidade deve ser considerada devido à indução da atividade da enzima hepática. A atividade da GST pode ter sido a responsável pelo menor dano ao fígado em comparação aos demais tecidos analisados. Em eritrócitos ocorreu o maior dano no DNA. Baixas concentrações de naftaleno presentes na água podem estimular benefícios aparentes (hormese), como menos danos ao DNA, sendo esta uma resposta compensatória a um desequilíbrio da homeostase. O naftaleno é absorvido por peixes quando presente no meio e este, bem como seus metabólitos, podem acumular-se na bile dos peixes expostos. Foi verificada maior acumulação de HPA com dois anéis na espécie *A. altiparanae*.

Palavras-chave: Genotoxicidade. Peixes. Bioensaio. HPAs.

ABSTRACT

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are considered priority organic pollutants in environmental studies. These compounds are toxic, precursors of mutagenic and carcinogenic effects, and naphthalene is one of the major constituent of PAHs. The aim of this study was to assess the acute toxicity of naphthalene in two Neotropical fish species, *Astyanax altiparanae* and *Geophagus brasiliensis*. The tested concentration of naphthalene in water was: 0.005, 0.03, 0.3 and 3 mg/L. The piscine micronucleus test in erythrocytes, comet assay in blood, liver and gill cells, glutathione s-transferase activity in the liver and accumulation of naphthalene in the bile were performed. The two species were similar in susceptibility to exposure to naphthalene. For the comet assay it was found that naphthalene under the conditions tested was not genotoxic. However, the toxicity must be considered due to liver enzyme induction activity. The GST activity may have been responsible for less damage in the liver. The highest DNA damage occurred in erythrocytes. Low concentrations of naphthalene in water can stimulate apparent benefits (hormesis), such as less DNA damage, which is a compensatory response to an imbalance of homeostasis. The naphthalene is absorbed by fish when in the water and this, as well as their metabolites, can accumulate in bile of exposed fish. A greater accumulation of PAH was observed in *A. altiparanae*.

Keywords: Genotoxicity. Fish. Bioassay. PAHs.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Muitos ambientes aquáticos como rios, córregos, lagos e reservatórios são expostos constantemente às variadas classes de substâncias químicas. Tais compostos provem de origem natural ou, mais comumente, ingressam no ambiente como resultado de atividades antrópicas. Como consequência, esses ambientes podem perder suas características naturais e sua diversidade biológica. O resultado dessas alterações pode ser representado por uma queda acentuada da biodiversidade aquática, em função da desestruturação do ambiente, alterações na dinâmica e composição das comunidades biológicas (GOULART; CALLISTO, 2003). Os compostos que não fazem naturalmente parte de um dado ambiente, sendo estranhos a este, são chamados de xenobióticos (LIVINGSTONE, 1998). Seu estudo, especialmente quando associado à água é importante por ser fonte direta para a exposição humana. Além disso, os poluentes podem se acumular nos sedimentos e na cadeia trófica (CAVALCANTI, 2003). O caráter especial do ambiente aquático deve-se em função deste ser o principal receptáculo de contaminantes, seja por meio de lançamento direto, por descargas de efluentes, emissões aéreas ou depósitos em solo próximo (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990; TUCCI, 2008).

Dentre as diversas substâncias químicas existentes, apenas parte destas tem o seu efeito tóxico claramente elucidado. A toxicologia é a ciência responsável por estudar os efeitos nocivos causados por compostos químicos sobre os organismos vivos (LANGMAN; KAPUR, 2006). Seus principais objetivos são identificar os riscos associados a uma determinada substância e determinar em quais condições de exposição esses riscos são induzidos (COSTA et al., 2008; BURATINI; BRANDELLI, 2006). Tendo em vista que o padrão de efeito de qualquer composto depende de diversos fatores, como as condições físicas do ambiente, além da biodisponibilidade, da taxa de assimilação, metabolização e eliminação (HERRICKS, 2002).

A ecotoxicologia é uma área especializada da toxicologia ambiental que tem seu enfoque nos efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica de populações e comunidades integrantes de ecossistemas definidos (COSTA et al., 2008). Por sua vez, a ecotoxicologia aquática envolve o transporte, a distribuição, a transformação e o destino final dos contaminantes nos ambientes aquáticos, bem como os possíveis efeitos danosos aos organismos expostos (SILVA; SANTOS, 2007).

Entretanto, no que tange a qualidade da água, os parâmetros legais geralmente observados durante as análises possuem um enfoque voltado, habitualmente, apenas ao consumo humano, estabelecendo valores que demonstram os níveis de potabilidade, independente da manutenção da biota aquática. Além disso, somente o uso destes parâmetros não é suficiente para retratar a

condição de um ambiente, sendo necessários indicadores biológicos, como peixes, para a obtenção de melhores resultados (VIEIRA; SHIBATTA, 2007).

1.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs)

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são compostos químicos constituídos unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, arranjados em dois ou mais anéis de benzeno ligados de forma linear ou aglomerada (POTIN; RAFIN; VEIGNIE, 2004). São considerados poluentes orgânicos prioritários em estudos ambientais (BRUSICK et al., 2008). Alguns compostos dessa classe apresentam elevado potencial de toxicidade, podem ser precursores de efeitos mutagênicos e carcinogênicos, além de apresentarem alta persistência ambiental (IARC, 2002; MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007) e facilidade de detecção em amostras de ambientes aquáticos (POLAKIEWICZ, 2008).

Devido à possibilidade de fusão de um número variável de anéis e em diversas posições que podem se ligar, há atualmente mais de 100 HPAs reconhecidos pela *International Union of Pure Applied Chemistry* (IUPAC), porém somente 16 são prioritariamente considerados em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica (Figura 1) (POTIN; RAFIN; VEIGNIE, 2004; MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007).

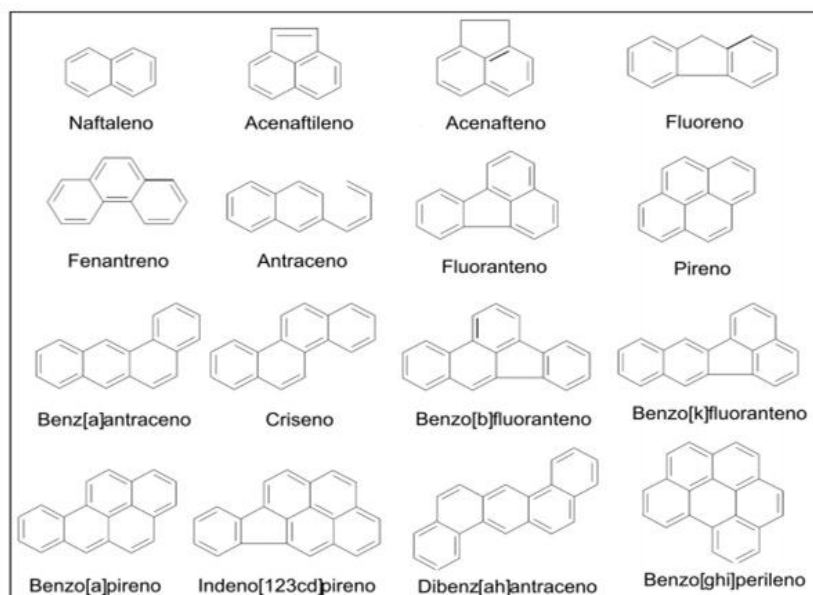


Figura 1: Representação da estrutura química dos 16 principais HPAs considerados de maior importância em estudos ambientais de acordo com as agências de proteção ambiental.

Fonte: MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007

A produção de HPAs ocorre naturalmente ou por processos industriais. Fontes naturais incluem incêndios florestais, escoamento de petróleo, vulcões e produção por organismos vivos (DUNBAR et al., 2001). Entretanto, são as fontes antropogênicas que predominam na entrada desses compostos na natureza. As maiores emissões são oriundas da exaustão de motores movidos a combustíveis fósseis em geral; além de processos industriais ligados à produção de aço e alumínio, plástico, borrachas sintéticas, fibras, fertilizantes, a partir de derramamentos de petróleo, descargas dos navios, da exaustão de incineradores de rejeito e efluentes industriais (WRIGHT; WELBOURN, 2002). Estes compostos podem ser distribuídos nos mais variados compartimentos ambientais como ambiente aquático, solo e atmosfera. No solo, especificamente, os HPAs encontram-se geralmente adsorvidos no material constituinte e ficam retidos nas camadas superiores (NETTO et al., 2000). Em contrapartida a degradação ambiental de HPAs pode se dar por processos físico-químicos, como, por exemplo, degradação por foto-oxidação, ou pela ação biológica de microrganismos (HWANG; CUTRIGHT, 2002).

Em razão dos processos de produção e liberação dos HPAs, os maiores níveis destes são observados geralmente nos grandes centros urbanos e industriais. No Brasil, por exemplo, isso acontece principalmente nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo conforme constatado nos trabalhos de Bicego et al. (2006) e de Menicon et al. (2002).

O peso molecular dos HPAs está proporcionalmente relacionado com o número de anéis aromáticos presentes em sua constituição. Assim como acontece com a volatilidade dessa classe de substâncias, compostos com menores pesos moleculares apresentam elevada pressão de vapor (são mais voláteis) e conseqüentemente ampla dispersão ambiental, como é o caso do naftaleno (Tabela 1). Já compostos de maior peso molecular e maior número de anéis apresentam degradação lenta e maior poder recalcitrante, ou seja, são mais persistentes (NETTO et al., 2000; BRITO et al., 2005).

1.1.1 Naftaleno

O naftaleno é um dos compostos mais intensivamente estudados dentre os HPAs devido à sua alta toxicidade, baixa sensibilidade à foto-oxidação e baixo peso molecular (VIJAYAVEL et al., 2004). Apresenta-se como um hidrocarboneto aromático bicíclico (Figura 1), sendo derivado do alcatrão ou a partir de óleo cru (PUBLIC HEALTH SERVICE, 2010; BISCHOFF, 2004). É considerado pouco solúvel em água e altamente volátil (MEIRE; AZEVEDO; TORRES, 2007). Acredita-se que o naftaleno esteja entre os principais responsáveis pela toxicidade aguda do óleo cru. Este contém aproximadamente 1,5% de HPAs, dos quais o naftaleno é o principal

componente, perfazendo 65% da constituição de HPAs totais (TRUSCOTT; IDLER; FLETCHERET, 1992).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos HPAs. Número de anéis aromáticos; PM, peso molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); S, solubilidade ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); PV, pressão de vapor (Pa-Pascal); H, constante de Henry ($\text{Pa m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$); Log K, coeficiente de partição (octanol/água).

HPAs	Nº. de anéis	PM ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	S ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	PV (Pa)	H ($\text{Pa m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$)	Log K _{oa}
Naftaleno	2	128	31	10,4	43,01	3,37
Acenaftileno	3	150	16,1	0,9	8,4	4,00
Acenafteno	3	154	3,8	0,3	12,17	3,92
Fluoreno	3	166	1,9	0,09	7,87	4,18
Fenantreno	3	178	1,1	0,02	3,24	4,57
Antraceno	3	178	0,045	0,001	3,96	4,54
Fluoranteno	4	202	0,26	0,00123	1,037	5,22
Pireno	4	202	0,132	0,0006	0,92	5,18
Benz[a]antraceno	4	228	0,011	$2,80\cdot 10^{-5}$	0,581	5,91
Criseno	4	228	nd	$5,70\cdot 10^{-7}$	0,065	5,86
Benz[b]fluoranteno	5	252	0,0015	nd	nd	5,80
Benz[k]fluoranteno	5	252	0,0008	$5,20\cdot 10^{-8}$	0,016	6,00
Benzo[a]pireno	5	252	0,0038	$7,00\cdot 10^{-7}$	0,046	6,04
Indeno[1,2,3-cd]pireno	6	278	nd	nd	0,003	nd
Dibenzo[a,h]antraceno	5	278	0,0006	$3,70\cdot 10^{-10}$	nd	6,75
Benzo[g,h,i]perileno	6	268	0,00026	nd	0,075	6,50

nd – Não determinado.

Fonte: MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007. NETTO et al., 2000

O naftaleno tem sido utilizado, principalmente nos Estados Unidos, para produção de plástico, corante, resinas, lubrificantes, combustíveis, e como pesticida, principalmente no controle de traças em áreas de estocagem (IARC, 2002). É um poluente onipresente introduzido no ambiente aquático principalmente através de processos de produção e destilação de produtos do carvão, bem como subprodutos de petróleo e por derramamentos deste (PACHECO; SANTOS, 2001).

Organismos aquáticos, especialmente peixes, podem absorver contaminantes orgânicos lipofílicos, tais como o naftaleno, do ambiente. A exposição é capaz de induzir uma variedade de respostas tanto em nível celular como sistêmico em peixes teleósteos (NAVAS; SEGNER, 2000; TELES; PACHECO; SANTOS, 2003). Após a exposição, o naftaleno é metabolicamente ativado pelo corpo, onde diferentes tecidos irão produzir metabólitos característicos levando a uma toxicidade sítio-específica (BOGEN et al., 2008).

O impacto do naftaleno em humanos e outros mamíferos tem sido objeto de pesquisas. Entretanto, um número limitado de estudos vem sendo conduzidos para avaliar a toxicidade do naftaleno em espécies aquáticas, sobretudo peixes. Não obstante, considerando estudos em outras espécies que não peixes, o potencial genotóxico do naftaleno parece ser de difícil consenso (PACHECO; SANTOS, 2002).

1.2 PEIXES COMO BIOINDICADORES

Peixes são excelentes instrumentos para estudos do potencial mutagênico ou carcinogênico de contaminantes presentes na água, devido ao fato de serem capazes de metabolizar, concentrar e acumular poluentes (LINS et al., 2010). Em função dos peixes frequentemente responderem a xenobióticos de forma similar a outros vertebrados, eles podem ser usados para identificação de compostos químicos que são potencialmente teratogênicos e carcinogênicos em humanos. Um modelo de estudo usando peixes tem como principal aplicação a determinação da distribuição e efeitos de contaminantes químicos na ambiente aquático, sendo que este reflete a real situação do ambiente (LINS et al., 2010). Sobretudo, é um grande e diverso grupo de vertebrados, os quais atuam em diversos níveis da cadeia trófica, requerem grande volume de água para respiração intensificando sua exposição via hídrica aos contaminantes presentes no ambiente aquático (AL-SABTI, 1991).

Um indicador biológico ideal em estudos de toxicologia deve ser taxonomicamente bem definido, apresentar distribuição geográfica ampla, ser abundante e de fácil coleta, ter baixa variabilidade genética e ecológica, preferencialmente possuir tamanho grande, apresentar baixa mobilidade e longo ciclo de vida, dispor de características ecológicas bem conhecidas e ser de fácil manejo em laboratório (AL-SABTI, 1991).

A espécie *Astyanax altiparanae* pertence à família Characidae, é conhecido popularmente como lambari ou lambari-do-rabo-amarelo, está enquadrado em um gênero conhecido por não realizar migração, possuir papel central na cadeia trófica e tolerância relativamente elevada à poluição (SCHULZ; MARTINS-JÚNIOR, 2001), além de apresentar ampla distribuição em rios e córregos das bacias brasileiras. São peixes de pequeno porte, atingem em média 10 cm de comprimento padrão e apresentam grande flexibilidade alimentar, ingerindo principalmente insetos e sementes (BENNEMANN; SHIBATTA, 2002), servindo também como importante fonte alimentar para peixes carnívoros (PRIOLI et al., 2002). Apresentam o corpo prateado, com a região ventral esbranquiçada e dorsal cinzenta, as nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas. Na caudal, ainda, há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando o lobo superior do inferior. Acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (Figura 2) (GARUTTI; BRITSKI, 2000). Devido à ocorrência desta espécie em uma grande diversidade de microambientes, as populações desse lambari não são homogêneas quanto à morfologia. Essa espécie apresenta grande capacidade adaptativa exploratória, utilizando estratégias diferenciadas na estrutura da população (ORSI; SHIBATA; SILVA-SOUZA, 2002).



Figura 2: Exemplar de *Astyanax altiparanae*
 Fonte: o autor, 2013

A espécie *Geophagus brasiliensis* (Acará) (Figura 3), pertence à família Cichlidae, sendo muito comum em lagos e reservatórios da região central e sul do Brasil (SCHWANTES; BARTLETTI; SCHWANTES, 1991). É um habitante natural de ambientes lênticos, como lagos, lagoas, reservatórios (ASSUMPÇÃO et al., 2005), lagoas de planície de inundação (MESCHIATTI, 1995) e também ambientes lóticos como riachos (AGOSTINHO, 1999) e rios (UIEDA, 1995). São peixes muito versáteis, territorialistas e resistentes (FATTORI et al., 1997 apud ABILHOA; SILVA, 2003). Quanto à alimentação, possuem hábitos muito diversificados, como vegetais, material depositado no fundo, peixes, gastrópodos, larvas de insetos, microcrustáceos cladocera, escamas de peixes e alevinos, caracterizando uma dieta onívora (STEFANI; REIS; ROCHA, 2008; SABINO e CASTRO 1990)



Figura 3: Exemplar de *Geophagus brasiliensis*
 Fonte: o autor, 2013

1.3 BIOMARCADORES

Os biomarcadores podem ser definidos, de maneira geral, como respostas biológicas aos poluentes ambientais que podem ser mensurados indicando a presença, os efeitos e, em alguns casos, o grau de contaminação ambiental. Uma questão que pode ser respondida por biomarcadores é se há contaminação ambiental em grau suficiente para causar efeitos fisiológicos. Neste caso, investigações adicionais podem ser justificadas para determinar a natureza e o grau de contaminação. Por esta razão, biomarcadores devem ser considerados como indicadores precoces de contaminação (AMORIN, 2003).

1.3.1 Biomarcadores de genotoxicidade

1.3.1.1 Teste de Micronúcleo

O Teste de Micronúcleo (TMN) foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos da medula óssea de camundongos por Schmid (1975). Este é o ensaio *in vivo* mais utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). Os cromossomos ou fragmentos que resultam de quebras podem não ser incorporados ao núcleo principal das células filhas após a mitose, então uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula (RIBEIRO, 2003).

O TMN tem sido usado com sucesso como um ensaio de mutagenicidade devido ao fato de ser simples, confiável, sensível e independente de características cariotípicas (AL-SABTI; METCALFE, 1995). O ensaio pode ser usado também, por exemplo, para avaliar o risco dos trabalhadores expostos a diferentes tipos de substâncias perigosas, além de ser aplicado nas mais diferentes espécies de peixes, anfíbios, camundongos e até mesmo invertebrados (RODRIGUEZ; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2003). O método que utiliza especificamente eritrócitos de peixes é rápido e pode ser feito sem causar nenhum sofrimento ao animal. Por essas razões, o teste em peixes, chamado teste de micronúcleo písceo (MNP), é um ensaio adequado para investigação da mutagenicidade ambiental (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Durante as análises, observa-se, concomitantemente, anormalidades morfológicas nucleares (AMN) que foram inicialmente descritas e propostas por Carrasco et al. (1990). Porém, a formação das AMN não é claramente compreendida e não existe um consenso sobre o tipo de irregularidades da morfologia nuclear que podem ser consideradas como análogas ao

micronúcleo, isto é, resultado da ação de um agente mutagênico (RIVERO, 2007; VILCHES, 2009). As principais anormalidades morfológicas (ANEXO 1) foram classificadas em *blebbed*, *lobed*, *notched* e *vacuolated* (CARRASCO et al., 1990). Sugere-se que essas malformações devam ser levadas em consideração durante a contagem convencional de micronúcleos, pois podem estar relacionadas aos processos de citotoxicidade, ação sobre divisão celular e genotoxicidade ou mutagenicidade. Em peixes, algumas anomalias nucleares são registradas após a exposição à substâncias químicas ou poluentes da água (RIVERO, 2007).

1.3.1.2 Ensaio Cometa

O ensaio cometa, também conhecido como *Single cell gel electrophoresis*, é uma técnica capaz de detectar danos precoces ao DNA em células individualizadas dos mais diversos tecidos, estando ou não em divisão. Tal análise dá-se por meio da medição da migração do DNA dos nucleoides em gel de agarose, sob condições alcalinas, após corrida eletroforética, conforme método proposto por Singh et al. (1988). O nome do ensaio refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica, sendo similar a um cometa (ANEXO 2).

O princípio da técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não possuir dano migrará em conjunto, compondo um círculo uniforme. No entanto, caso ocorra maiores danos ao DNA, especialmente quebras, serão formados fragmentos de diversos tamanhos, sendo que os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores, e as diferenças geradas devido à velocidade diferenciada de migração formam a típica figura quando corados com brometo de etídio e analisados por meio de microscópio de epifluorescência (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009). Comparado com outros ensaios de genotoxicidade, as vantagens desta técnica incluem: sensibilidade na detecção de baixos níveis de dano ao DNA, necessidade de um pequeno número de células por amostra, aplicação em diferentes tipos celulares e tecidos, baixo custo, fácil aplicabilidade e relativo curto período de tempo para completar o experimento (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009).

1.3.2 Biomarcador bioquímico

1.3.2.1 Glutathione S-Transferase (GST)

Além das funções intracelulares, um papel crítico da GST é a defesa contra dano oxidativo e produtos peroxidativos do DNA e lipídios. A suscetibilidade de diferentes espécies de peixes a carcinogênicos químicos pode ser modulada pela atividade de GST. Esta enzima é principalmente localizada na fração citosólica dos hepatócitos, no fígado. Um acréscimo na atividade hepática tem sido descrita em vários estudos após exposição de peixes a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, bifenilas policlorados e dibenzodioxinas policlorados (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). As enzimas de fase II tem um importante papel na homeostase, detoxificação e eliminação de diversas substâncias exógenas e os níveis de cofatores desta fase podem ser afetados após exposição a poluentes ambientais (RIOL et al., 2000). Estes tipos de enzimas podem ser utilizadas como biomarcadores tanto de exposição como de efeito, por serem alteradas por vários xenobióticos.

Ligando-se covalentemente a compostos eletrofílicos, essas transferases reduzem a probabilidade desses compostos se ligarem a outras moléculas, como o DNA. Esta representa uma importante ferramenta para a detoxificação de xenobióticos, portanto tem sido sugerida como um biomarcador de exposição ambiental a poluentes (HUBER; ALMEIDA, 2008; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade aguda do naftaleno através de marcadores genéticos e bioquímicos, em duas espécies nativas de peixes, *Astyanax altiparanae* e *Geophagus brasiliensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a toxicidade aguda de diferentes concentrações do naftaleno em duas espécies de peixes (*Astyanax altiparanae* e *Geophagus brasiliensis*), através de biomarcadores genéticos (teste de micronúcleo pisco e ensaio cometa) e bioquímico (atividade de enzima hepática);
- Comparar se há danos tecido-específicos por meio da análise do DNA de células do sangue, do tecido hepático e branquial;
- Comparar a sensibilidade de resposta frente ao naftaleno nas duas espécies analisadas;
- Realizar a quantificação do HPA na bile dos indivíduos expostos ao naftaleno.

3 ARTIGO

Toxicidade aguda do naftaleno em peixes neotropicais utilizando biomarcadores genéticos e bioquímicos

INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são considerados poluentes orgânicos prioritários em estudos ambientais (BRUSICK et al., 2008). Isso se deve ao fato de serem substâncias precursoras de efeitos mutagênicos e carcinogênicos, possuírem elevado potencial de toxicidade, alta persistência ambiental (MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007) e facilidade de detecção em amostras de ambientes aquáticos (POLAKIEWICZ, 2008).

Os HPAs são constituídos de átomos de carbono e hidrogênio, formando anéis aromáticos que podem estar arrançados de forma linear ou aglomerados e em variável número. Dentre todos os HPAs existentes apenas 16 deles estão entre o grupo mais extensamente estudado, sendo considerados em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica (POTIN; RAFIN; VEIGNIE, 2004). O naftaleno, incluído neste seletivo grupo, apresenta-se como um hidrocarboneto aromático bicíclico, obtido naturalmente do alcatrão ou a partir do óleo cru (PUBLIC HEALTH SERVICE, 2010; BISCHOFF, 2004).

O naftaleno pode entrar em contato com organismos aquáticos causando uma variedade de respostas tanto em nível celular como sistêmico (NAVAS; SEGNER, 2000; TELES; PACHECO; SANTOS, 2003), podendo ser fonte de exposição indireta a humanos e outros animais, além de acumular-se no sedimento e pela cadeia trófica (MACKEY; HODGKINSON, 1996).

Os peixes são bons bioindicadores do potencial mutagênico e carcinogênico de contaminantes presentes na água, podendo metabolizar, concentrar e acumular poluentes (LINS et al., 2010). Sobretudo, os peixes formam um grande e diverso grupo de vertebrados, presentes em diversos níveis da cadeia trófica e requerem grande volume de água para respiração intensificando sua exposição, por via hídrica, aos contaminantes presentes no ambiente aquático (AL-SABTI, 1991).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a toxicidade aguda do naftaleno e comparar as respostas entre *Astyanax altiparanae* e *Geophagus brasiliensis* através de biomarcadores genéticos e bioquímicos.

METODOLOGIA

Foram utilizados 135 peixes da espécie *Astyanax altiparanae* e 105 peixes da espécie *Geophagus brasiliensis* de ambos os sexos, saudáveis e em fase juvenil. Os exemplares foram obtidos em piscicultura comercial e aclimatados em tanques de 2.000 litros, sob temperatura média de 25°C, por 30 dias antes do início do experimento. Em seguida os animais foram

transferidos para aquários de 20 litros e mantidos sob temperatura ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e aeração constante, fotoperíodo 12/12 horas claro/escuro, onde ocorreu a contaminação com o naftaleno (CAS n. 91-20-3). Cada grupo amostral consistiu em 15 indivíduos de *G. brasiliensis* e 20 de *A. altiparanae*, expostos às concentrações de naftaleno de 0,005 (MELANCON; LECH, 1978); 0,03; 0,3 e 3 mg/L; dois controles negativos, um mantido apenas em água e outro com etanol, em função deste ter sido usado como solvente na diluição do naftaleno. Para cada concentração de naftaleno foi feita uma solução uso diferente, para que o volume inserido no aquário fosse sempre o mesmo, compatível com o respectivo controle. O tempo de exposição foi de 96 horas, em sistema semi-estático, com renovação diária de dois terços da água e do contaminante. Outro grupo de 15 *A. altiparanae* e 15 *G. brasiliensis* (controle positivo) receberam injeção intraperitoneal de metilmetano sulfonado (MMS) um dia antes do sacrifício, na concentração de 5 mg/kg. Decorrido o tempo de exposição os peixes foram anestesiados com benzocaína a 10% (GONTIJO et al., 2003), foram tomadas as medidas morfológicas e então os peixes foram sacrificados para retirada de amostras de sangue, fígado, brânquias e vesícula biliar. Os procedimentos experimentais realizados neste trabalho estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos para experimentação animal, e o trabalho foi aprovado pela comissão de ética no uso animal (CEUA) da Universidade Federal do Paraná sob o protocolo 724/2013.

Os testes utilizados para análise de mutagenicidade e genotoxicidade foram teste de micronúcleo em eritrócitos, com metodologia baseada em Heddle (1973) e Schmid (1975), com coloração proposta por UEDA et al., (1992). Ensaio cometa em células do sangue, fígado e brânquias, metodologia de Singh e colaboradores, (1988) com modificações de Ferraro et al. (2004), Cestari et al. (2004) para eritrócitos e Ramsdorf et al. (2009) para tecidos. A mensuração dos níveis enzimáticos de GST no fígado foi realizada segundo KEEN; HABIG; JAKOBY, (1976) e a quantificação de HPAs na bile proposta por Hanson, Persson e Larsson (2009) com modificações do Laboratório de Toxicologia Celular- UFPR.

Para análise estatística dos resultados primeiramente foi aplicado o teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. Tendo os dados apresentado distribuição anormal, aplicou-se o teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido do *Student-Newman-Keuls*, para comparar tratamentos entre si. Dados com distribuição normal utilizou-se ANOVA para comparar os grupos. Os pacotes estatístico empregados foram BioEstat 5.0. e GraphPad Prism 5.00 (Trial).

RESULTADOS

Astyanax altiparanae (lambari)

O peso médio dos indivíduos utilizados no estudo foi de 5,60 gramas e o comprimento médio de 7,73 centímetros. Foram observadas alterações de comportamento, principalmente a diminuição da mobilidade e exploração do aquário pelos peixes expostos às duas maiores concentrações de naftaleno (0,3 e 3 mg/L).

Quanto ao MNP e AMN em eritrócitos de *A. altiparanae* a estatística não mostrou diferença entre os grupos em relação ao controle em nenhuma das concentrações testadas. Porém ficou evidente que a AMN mais comumente encontrada em lambari foi *notched* (Tabela 2).

Tabela 2: Frequência (%) de diferentes alterações morfológicas encontradas em eritrócitos de *A. altiparanae* expostos ao naftaleno (mg/L) e respectivos controles. Os valores estão expressos em mediana e quartis (25%;75%). (*) diferença estatística com o controle negativo, considerando $p < 0,05$ como significativo.

	MN	Notched	Lobed	Blebbled	Vacuolated	Total
CN	0	0 (0;0,875)	0	0	0	0,5 (0;1)
CN+Et	0	0 (0;1,375)	0	0,25 (0;0,5)	0	0,75 (0,125;1,875)
Naf. 0,005	0	0 (0;0,75)	0	0 (0;0,25)	0	0,5 (0;1)
Naf. 0,03	0	0 (0;0,5)	0	0	0	0 (0;0,5)
Naf. 0,3	0	0 (0;1)	0	0	0	0 (0;1,25)
Naf 3	0	0 (0;0,5)	0	0 (0;0,5)	0	0,5 (0,25;1,25)
MMS	0	0 (0;0,5)	0	0	0	0,25 (0;0,5)

Os resultados quanto à genotoxicidade do naftaleno obtidos pelo ensaio cometa em células de *A. altiparanae*, em escore, estão representados a seguir. Para esta espécie a genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio cometa em eritrócitos e células do fígado. Na figura 4 estão representados os danos encontrados em eritrócitos. Há diferença entre os contaminados 0,005 e 0,03 mg/L em relação ao CN, e 0,03 em relação ao CN+Et. Sendo que existe uma tendência a significância entre os grupos CN e 0,3 mg/L e CN+Et e 0,005 mg/L de naftaleno. Os escores dos grupos contaminados com naftaleno foram, ligeiramente, menores que os respectivos controles negativos.

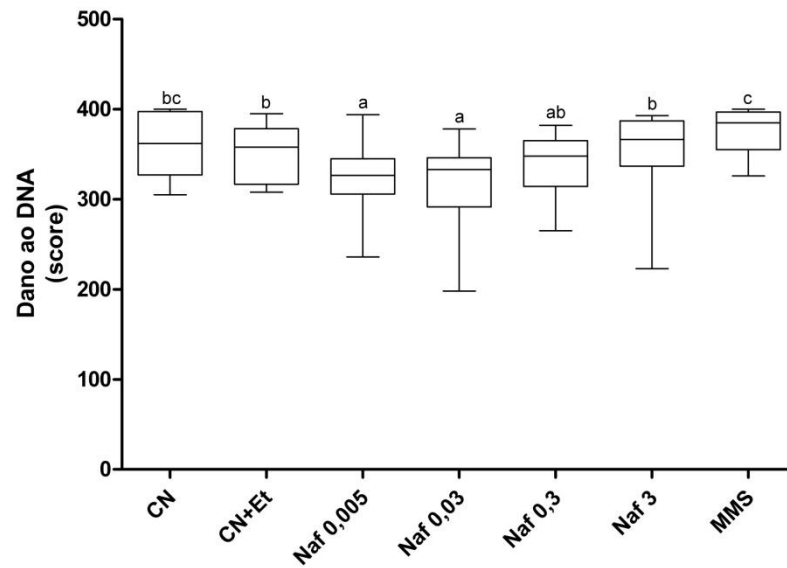


Figura 4: Escores obtidos no ensaio cometa de sangue de *A. altiparanae* em diferentes grupos, controle e expostos ao naftaleno (mg/L). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Considerando $p < 0,05$ como significativo.

Os escores obtidos pela análise de células do fígado de lambari não apresentaram diferença entre nenhum dos grupos testados, tanto entre os grupos expostos ao naftaleno, como em relação aos controles negativos (Figura 5).

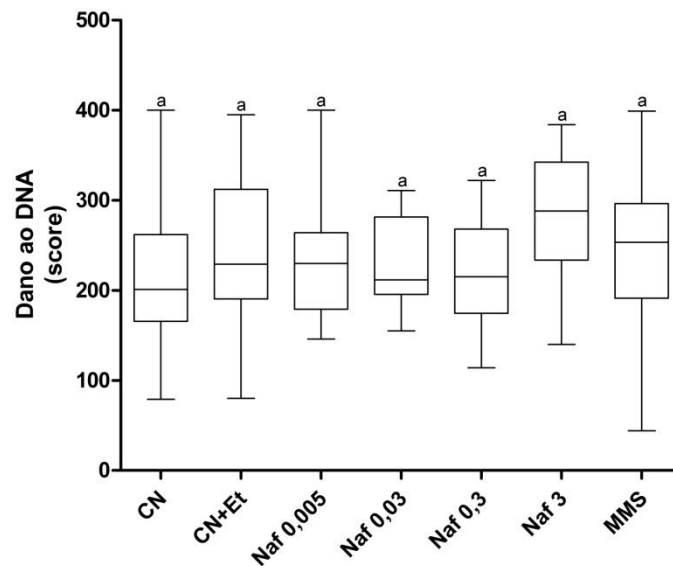


Figura 5: Escores obtidos no ensaio cometa de fígado de *A. altiparanae* em diferentes grupos, controle e expostos ao naftaleno (mg/L). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Considerando $p < 0,05$ como significativo.

A acumulação de compostos com dois anéis de benzeno na bile, seja naftaleno ou metabolitos, indicam que em lambari expostos as três maiores concentrações de naftaleno houve

diferença significativa em relação ao CN+Et quanto a acumulação, e a menor concentração, 0,005 mg/L, apresentou tendência a ser significativa (Figura 6). Para a análise, foram feitos *pools* de biles de animais do mesmo grupo. O CN está apenas representado na figura, porém não foi utilizado na comparação por ter um baixo poder estatístico, decorrente de um número amostral reduzido

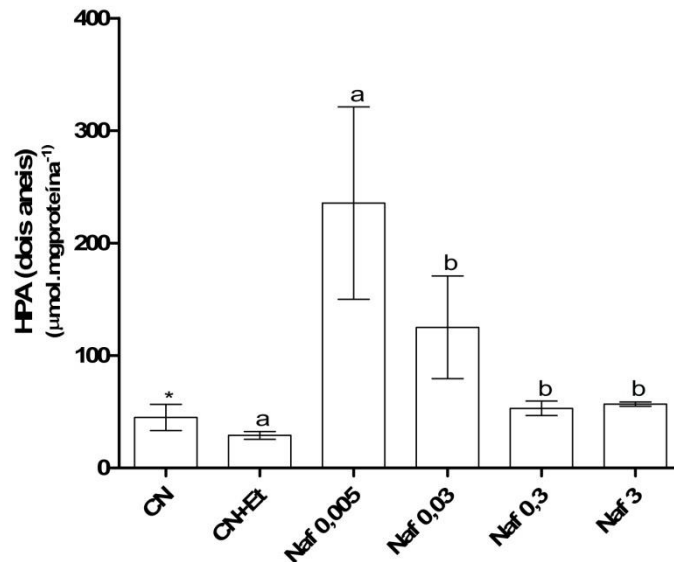


Figura 6: Concentração de compostos com dois anéis aromáticos presentes na bile de *A. altiparanae* expostos a diferentes concentrações de naftaleno (mg/L). As barras expressam a média±desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística com o controle negativo+etanol (CN+Et); Considerando $p < 0,05$ como significativo. (*) grupo apenas representado na figura, não obteve poder estatístico para ser incluído na análise.

A atividade da GST, mensurada por meio da análise bioquímica a partir do tecido hepático, mostrou a atividade de GST significativamente elevada com relação ao etanol presente na água, o mesmo acontecendo com todas as concentrações de naftaleno em relação ao CN para os lambaris. Quando comparados os grupos expostos ao NAF em relação ao CN+Et apenas a mais elevada das concentrações, 3 mg/L, foi diferente, indicando que o naftaleno, especialmente numa maior concentração, tem capacidade de aumentar a ativação desta enzima (Figura 7). Em uma comparação entre os grupos, pode-se perceber um aumento da atividade da GST do grupo exposto a 3 mg/L de NAF em relação aos grupos 0,005 e 0,3, assim como uma tendência de diferença entre os grupos expostos a 0,03 e 3 mg/L de NAF.

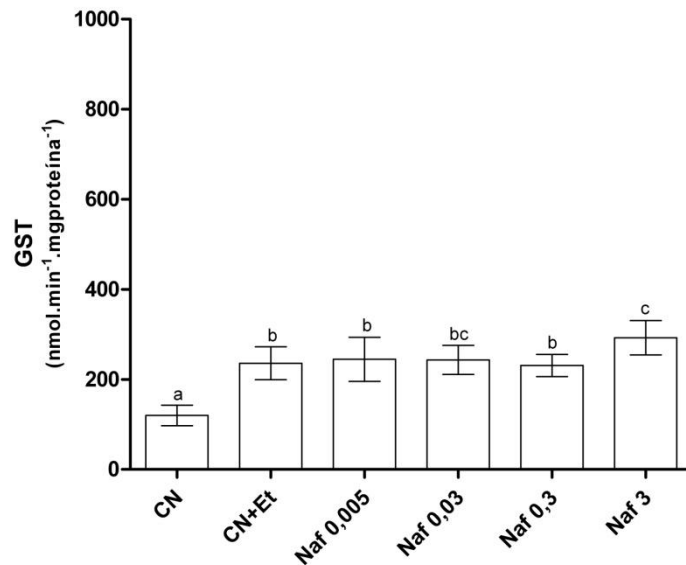


Figura 7: Atividade da glutatona S-transferase de *A. altiparanae* expostos a diferentes concentrações de naftaleno (mg/L). As barras expressam a média±desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Considerando $p < 0,05$ como significativo.

Geophagus brasiliensis (acará)

O peso médio dos indivíduos utilizados no estudo foi de 3,48 gramas e o comprimento médio de 6,42 centímetros. Durante o experimento, foi observado que os acarás apresentaram alteração de comportamento, caracterizado principalmente pela redução da mobilidade e exploração, especialmente nos aquários onde os peixes foram expostos às duas maiores concentrações de naftaleno (0,3 e 3 mg/L). Quanto à análise dos dados obtidos pelo TMN e AMN em eritrócitos de *G. brasiliensis*, a análise estatística não mostrou diferença entre os grupos em relação ao controle em nenhuma das concentrações testadas. Foi observado que *notched* esteve entre a AMN mais frequentemente encontrada em acará. A tabela 3 apresenta os valores médios para todos os tipos de alteração nesta espécie.

Tabela 3: Frequência (%) de diferentes alterações morfológicas encontradas em eritrócitos de *G. brasiliensis* expostos ao naftaleno (mg/L) e respectivos controles. Os valores estão expressos em mediana e quartis (25%;75%). (*) diferença estatística com o controle negativo, considerando $p < 0,05$ como significativo.

	MN	Notched	Lobed	Blebbled	Vacuolated	Total
CN	0	3 (1;4)	0 (0;2)	0 (0;1)	0	4 (2;7)
CN+Et	0 (0;05)	3 (2;4,5)	0 (0;1)	0 (0;2,5)	0	4 (3;7)
Naf. 0,005	0	3 (2;8)	0	1 (0;1)	0	6 (2;9)
Naf. 0,03	0	3 (1;4)	0 (0;1)	0 (0;1)	0	4 (2;6)
Naf. 0,3	0	4 (3;7)	0 (0;1)	0	0	4 (3;7)
Naf 3	0	6 (5;8)	0 (0;1)	0 (0;1)	0	8 (6;10)
MMS	0	3 (2;4)	0	0 (0;1)	0	4 (2;5)

Os resultados referentes à genotoxicidade do naftaleno estão representados a seguir, em escores, e foram obtidos pelo ensaio cometa em células de *G. brasiliensis*. Na figura 8 estão representados os danos encontrados em eritrócitos. Nesta espécie o CN+Et teve um escore bastante elevado, sendo diferente da maioria dos todos grupos expostos ao naftaleno. Em relação ao CN a diferença foi significativa apenas em relação aos grupos: 0,005; 0,3 e 3 mg/L de NAF. Em geral, os escores dos grupos contaminados com naftaleno foram menores que os respectivos controles negativos. Como mostra a figura 8, os danos ao DNA visualizados nos grupos expostos ao NAF são menores que nos controles negativos.

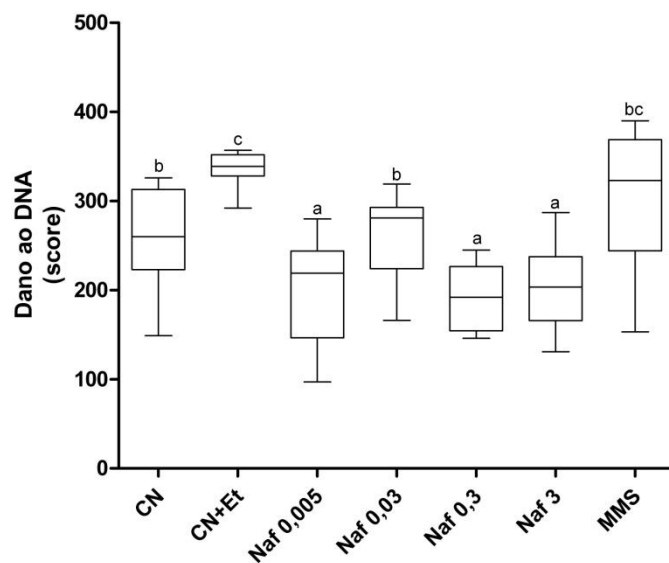


Figura 8: Escores obtidos no ensaio cometa de sangue de *G. brasiliensis* em diferentes grupos, controle e expostos ao naftaleno (mg/L). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Considerando $p < 0,05$ como significativo.

Os escores obtidos pela análise de células do fígado de acará não apresentaram diferença entre nenhum dos grupos testados, tanto entre os grupos expostos ao naftaleno, como em relação aos controles negativos (Figura 9).

As informações referentes à genotoxicidade do naftaleno em células da brânquia de *G. brasiliensis* (Figura 10) apontam para um menor dano ao DNA para todos os grupos expostos ao NAF em relação ao CN+Et, enquanto apenas o grupo 0,005 de NAF foi diferente do CN. Entre os grupos tratados com diferentes concentrações de naftaleno a estatística não mostrou diferença, apesar do grupo de NAF 0,3 ter uma tendência a ser maior que os demais.

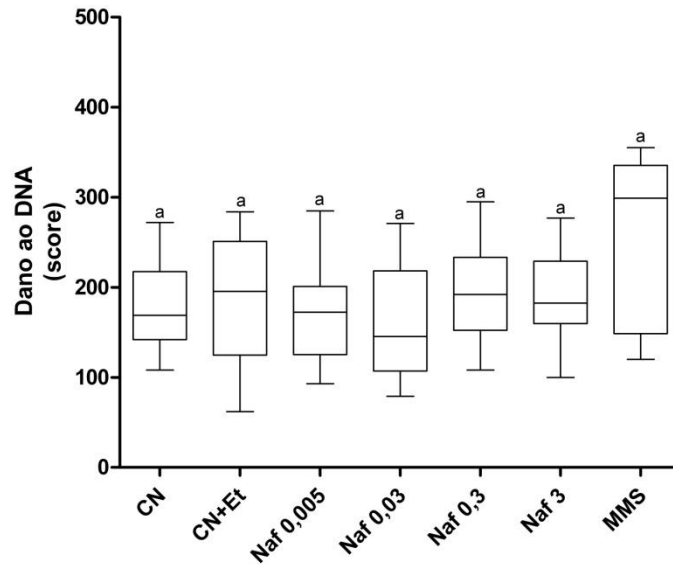


Figura 9: Escores obtidos no ensaio cometa de fígado de *G. brasiliensis* em diferentes grupos, controle e expostos ao naftaleno (mg/L). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Considerando $p < 0,05$ como significativo.

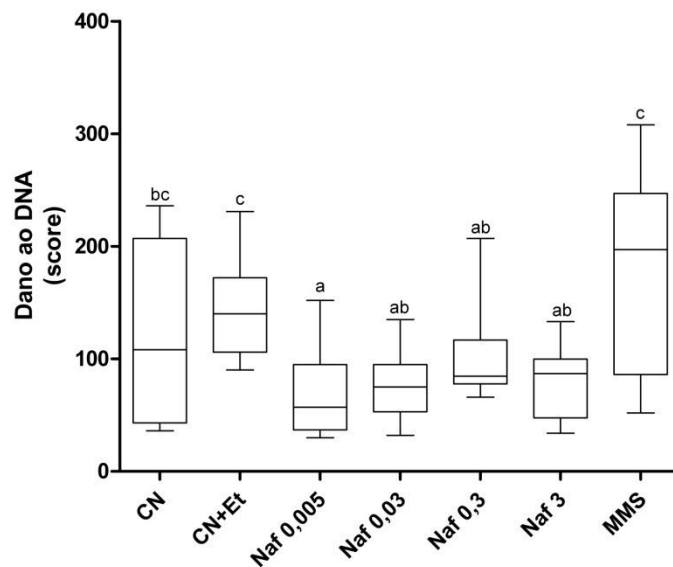


Figura 10: Escores obtidos no ensaio cometa de brânquia de *G. brasiliensis* em diferentes grupos, controle e expostos ao naftaleno (mg/L). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Considerando $p < 0,05$ como significativo.

A presença de compostos com dois anéis de benzeno na bile de acarás foi investigada, a fim de verificar a acumulação de naftaleno ou metabolitos deste (Figura 11). Os dados sugerem a ausência de diferença entre os grupos em relação aos controles.

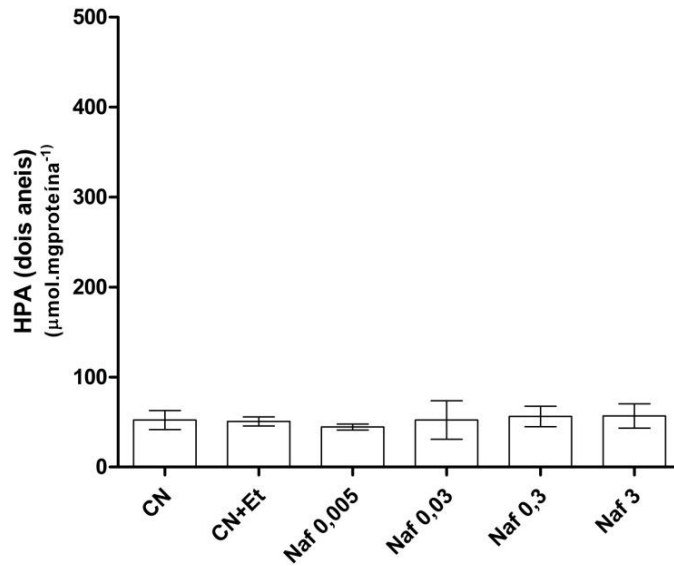


Figura 11: Concentração de compostos com dois anéis aromáticos presentes na bile de *G. brasiliensis* expostos a diferentes concentrações de naftaleno (mg/L). As barras expressam a média±desvio padrão. (*) diferença estatística com o controle negativo+etanol (CN+Et). Considerando $p < 0,05$ como significativo.

A análise bioquímica a partir do fígado, por meio da avaliação da atividade da GST, demonstrou que em acará todas as concentrações de naftaleno testadas apresentaram diferença em relação ao CN. Já em comparação com o CN+Et a estatística mostrou diferenças entre 0,005 e 0,3 mg/L de NAF, além do grupo NAF 3,0 mg/L que apresentou tendência a ser diferente. Também nesta espécie o etanol sozinho contido na água foi capaz de elevar a atividade da GST (Figura 12).

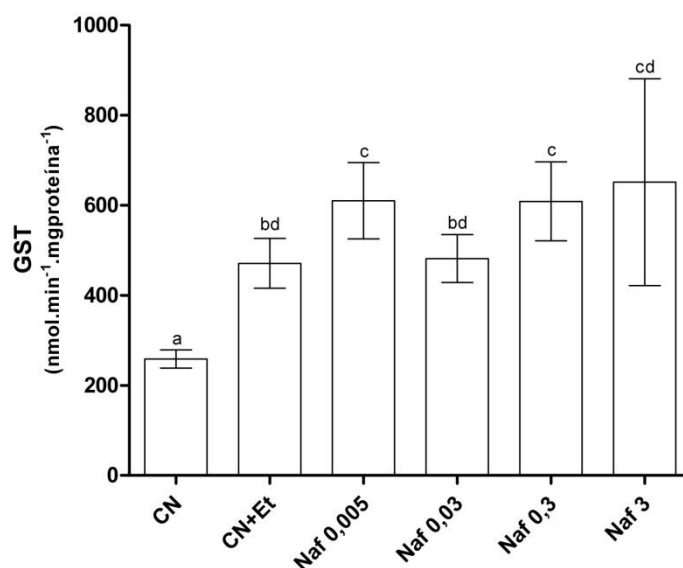


Figura 12: Atividade da glutathione S-transferase de *G. brasiliensis* expostos a diferentes concentrações de naftaleno (mg/L). As barras expressam a média±desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Considerando $p < 0,05$ como significativo.

DISCUSSÃO

A globalização e os processos industriais relacionados a esta provocam intensos impactos no ambiente. No ambiente aquático, em especial, o aumento da poluição por hidrocarbonetos aromáticos tem sido relevante desde o início da exploração do petróleo. Ecossistemas aquáticos geralmente são os principais receptores de resíduos industriais e urbanos, assim o estudo dos efeitos de poluentes nestes locais é de grande interesse. Principalmente pelo fato de estar relacionado com a exposição humana direta, seja pelo consumo de água ou organismos contaminados. Além disso, o ambiente aquático apresenta ampla biodiversidade e existem muitas populações de organismos, como peixes, que podem ser afetadas negativamente em decorrência de substâncias xenobióticas lançadas nesses habitats.

O naftaleno é o principal HPA presente em óleo cru, petróleo e seus derivados, e devido à sua ampla dispersão torna-se um dos mais importantes em estudos dessa natureza. No experimento deste trabalho optou-se por testar baixas concentrações de naftaleno, menores que às presentes em ambientes com histórico ou que apresentam contaminação. Alguns trabalhos relatam que, em geral, as populações dos peixes podem ser expostas no ecossistema aquático à uma concentração total do HPA variando de 50 a 410 mg/L (KAYAL; CONNEL, 1989; SMITH; BAGG; WRIGLEY, 1991). Desta forma, o estudo torna-se mais realista em relação ao ambiente natural, tendo em vista que a proporção de naftaleno presente no meio pode variar muito. O naftaleno é pouco estável e as características do ambiente como o volume do corpo d'água, sua movimentação, temperatura, entre outras, geralmente tendem a diminuir ainda mais a quantidade de naftaleno biodisponível. Por isso foram escolhidas quatro diferentes concentrações, para ampliar a gama de representação de possíveis situações de contaminação ambiental.

Foram selecionados variados tipos de biomarcadores (genéticos, bioquímicos e de bioacumulação) para uma abrangente investigação dos potenciais efeitos do naftaleno nos peixes estudados. O teste de micronúcleo (TMN) é um dos ensaios mais utilizados para detecção de mutagenicidade pela ocorrência de quebras e perdas cromossômicas. Neste trabalho não foram observadas diferenças na contagem de MN, bem como de AMN entre os grupos tratados e controles (Tabelas 2 e 3), principalmente, porque apenas células em divisão celular podem potencialmente apresentar MN (FENECH, 2000), e peixes em geral apresentam baixo índice hematopoiético e seus eritrócitos podem permanecer em circulação por tempos que variam de 60 a 160 dias dependendo da espécie utilizada nos bioensaios (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Assim, devido ao experimento ter sido conduzido por 96 horas é provável que poucos eritrócitos

tenham sido produzidos durante o período experimental, justificando as poucas anormalidades e ausência de MN encontradas.

Esta sugestão é corroborada por diversos estudos, nos quais a exposição dos peixes foi aguda e os pesquisadores não encontraram aumento relevante na frequência de MN nos grupos expostos aos xenobióticos. Como por exemplo, experimentos realizados por Disner, Rocha e Miranda (2011) com *A. altiparanae* expostos ao Roundup[®], e de Ghisi et al. (2013), utilizando *Corydoras paleatus* também expostos ao Roundup[®], não encontrou diferenças significativas entre os grupos controle e expostos. Winter, Ellis e Hutchinson (2007), com *Pimephales promelas* expostos a ciclofosfamida e Bücker, Carvalho e Alves-Gomes (2006) avaliando benzeno em peixes elétricos, *Eingenmannia virescens*, também não observaram indução de MN. Desse modo, o MNP deve ser prioritariamente utilizado para estudos de exposição sub-crônica ou crônica.

Os resultados obtidos para genotoxicidade, através do ensaio cometa, apontam para a ausência de efeito genotóxico de todas as concentrações do naftaleno sobre o material genético das duas espécies de peixes utilizadas no presente trabalho. Como verificado através das análises estatísticas, os grupos expostos às variadas concentrações do naftaleno não apresentaram diferença em relação aos controles que permitisse a comprovação do efeito genotóxico. Informações semelhantes ao presente trabalho podem ser encontradas na literatura no que diz respeito à resposta tóxica do naftaleno. Como sugere Scheiner (2003), a fragmentação do DNA e quebra de cromossomos são consistentes com mecanismos indiretos relacionados à resposta ao contaminante, e este tipo de resposta pode levar mais tempo para ser visualizada. No presente trabalho, a ausência de efeito pronunciado em razão da exposição ao xenobiótico se deve, inicialmente, às baixas concentrações testadas. No entanto, os valores de naftaleno foram de grande relevância ambiental, por serem mais realistas que os dados encontrados em testes de toxicidade aguda. DeGraeve e colaboradores (1982) observaram toxicidade aguda do naftaleno em duas espécies de peixes, com valores de CL50 (concentração letal média) de 1,6 mg/L para *Oncorhynchus mykisse* e 7,9 mg/L para *Pimephales promelas*.

Apesar da heterogeneidade dos dados encontrados sobre naftaleno, este parece não ter afinidade específica para se ligar diretamente ao DNA. Estudos indicam apenas a possibilidade de que metabolitos sejam capazes de ligarem-se ao DNA (IARC, 2002), o que explicaria uma resposta tóxica, porém causada como efeito secundário resultante de produtos do metabolismo e não do composto em si. Apesar disto, em função do período experimental no presente trabalho (96 horas), é possível que o tempo de exposição não tenha sido suficiente para que os metabolitos produzidos gerassem uma resposta danosa aos alvos.

Brusick et al. (2008), realizaram uma revisão crítica de dezenas de trabalhos que abordavam o tema em questão, e a análise dos resultados encontrados sobre o naftaleno em genética toxicológica mostrou que 80% dos estudos não encontraram evidências de genotoxicidade. O exame destes dados sugere, em razão do peso das evidências, uma interpretação negativa quanto à genotoxicidade do naftaleno. Ainda conforme a análise desse pesquisador, estudos que não encontraram evidências de genotoxicidade do naftaleno foram, por exemplo, teste de mutação de ponto em bactérias e culturas celulares, teste de Ames, quebra cromossômica, testes de reparo de DNA e ensaios de transformação morfológica celular. Diante disso, as respostas do naftaleno, na maioria dos testes, indicam que este componente não é reativo com DNA e, portanto, não é propriamente genotóxico.

Em relação à avaliação da genotoxicidade, pode ser visto na maioria das figuras (Figuras 4, 8 e 10) que não há uma linearidade da resposta, o efeito concentração-resposta não foi consistentemente observado. Os dados sugerem uma curva em U, que é típico em casos de hormese e pode ser explicado quando este fenômeno estiver presente (CALABRESE, 2008).

Hormese é definida como o fenômeno de dose-resposta caracterizado por estimulação em baixas doses e inibição em altas doses. É altamente generalista, e tem sido frequentemente observada independentemente do agente químico ou físico, modelo biológico, biomarcador mensurado, classe química e variabilidade interindividual (CALABRESE, 2008). Calabrese e Baldwin (2003) sugerem que a hormese traga uma “revolução dose-resposta”, onde não ocorre resposta linear, mas com curva bifásica em forma de U. A resposta observada pode ser devida estimulação direta da hormese (como um fenômeno ativo) ou o resultado de um processo biológico compensatório que segue uma disrupção inicial da homeostase (CALABRESE; BALDWIN, 2002). Em suma, hormese é, basicamente, uma resposta ao estresse (CHAPMAN, 2001).

A disrupção da homeostase, ou o rompimento desse equilíbrio estabelece a natureza toxicológica da hormese (CALABRESE; BALDWIN, 2002). Tipicamente, seus efeitos aumentam de 30-60% sobre os níveis controle (CHAPMAN, 2001). A modesta resposta de compensação implica em uma contínua resposta da mensagem de regulação compensatória até que a condição homeostática seja restabelecida. A eficiência deste restabelecimento demanda alocação apropriada de recursos. Em termos biológicos, trata-se de uma estratégia do organismo para otimizar a alocação de recursos que asseguram a manutenção da homeostase (CALABRESE; BALDWIN, 2002).

Pesquisas em toxicologia nem sempre veem efeitos da hormese, devido a esta ciência ser focada, principalmente, em altas concentrações ou doses (CHAPMAN, 2001). O aspecto

dinâmico da avaliação toxicológica requer a inclusão não só de uma gama maior de tratamentos como também uma série de avaliações temporais. Hormese é mais que simplesmente uma relação de dose-resposta ou dose-resposta-tempo, pode ser a manifestação de um processo reparativo que é adaptativo na natureza (CALABRESE, 2008).

Segundo Chapman (2001), publicações bibliográficas que apresentem curvas de hormese ainda não são comumente publicadas devido à dificuldade de consenso sobre a interpretação dos dados, e trabalhos debatendo a importância e até relevância deste fenômeno não são comuns na literatura de ecologia toxicológica. Existe ainda, sobre este assunto, falta de consenso e consistência de informações para uma completa compreensão. O que deve ser levado em consideração para evitar errôneas interpretações é que os efeitos benéficos ocasionados em resposta a substâncias tóxicas em baixas doses não é permanente, e não é em função do contaminante em si, mas sim do sistema intrínseco de proteção do organismo. Possivelmente, o mais correto é não afirmar que baixas doses em qualquer exposição possam causar efeito benéfico. Por exemplo, a estimulação causada por baixas doses de radiação, ocorre apenas como resultado de uma compensação reparativa (CALABRESE; BALDWIN, 2002), e não como um benefício conferido após exposição. É este tipo de resultado que pode, geralmente, levar a uma confusão no conceito.

Outras evidências parecem suportar a ideia de que o naftaleno é rapidamente eliminado dos organismos e do ambiente experimental de exposição, assim, o dano resultante geralmente é reduzido em função da baixa permanência do organismo em contato com o contaminante. Eisele (1985) realizou um trabalho onde galinhas foram expostas via gavagem ao naftaleno por 31 dias, cessada a exposição e decorridas 48 horas após este evento, os animais já haviam eliminado entre 75-80% do composto, demonstrando uma baixa permanência deste agente no indivíduo. Varanasi et al. (1978) de forma similar observaram grande perda do contaminante pelo organismo em curto espaço de tempo. Tais pesquisadores expuseram truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) ao naftaleno e verificaram que após 96 horas grande parte do composto havia sido eliminada, sendo o muco epidérmico sugerido como principal via de excreção. Do mesmo modo, Melancon e Lech (1978) relataram uma meia-vida do naftaleno e do metil-naftaleno nos tecidos de truta-arco-íris como sendo menor que 24 horas, exceto em gorduras. Estes pesquisadores, usando dados de eliminação do ^{14}C -naftaleno, puderam distinguir a eliminação após exposições agudas ou crônicas, sendo que, devido à metabolização do composto que ocorre geralmente em exposições crônicas, a perda dá-se mais lentamente.

Devido às características de instabilidade relacionadas ao naftaleno o método experimental de exposição utilizado no presente trabalho poderia ser visto como inadequado.

Contudo, a exposição hídrica e em níveis reduzidos foi utilizada, principalmente, para representar condições ambientalmente realísticas nos sistemas aquáticos naturais. Esta questão também foi pertinente a Melancon e Lech (1978). Estes pesquisadores estudaram a acumulação e eliminação do ^{14}C em tecidos de truta-arco-íris depois de exposição ao ^{14}C -naftaleno ou ^{14}C -2-metil-naftaleno. Após oito horas de contato a 0,005 ou 0,023 mg/L de ^{14}C -naftaleno, os tecidos dos alevinos estudados continham de 20 a 100 vezes mais ^{14}C que os níveis da água, enquanto gordura e bile continha um aumento excedente a centenas de vezes mais que a água, que se deve basicamente pela natureza lipofílica dos HPAs. Como observado pelos pesquisadores, o naftaleno foi rapidamente absorvido, logo após o início da exposição. Desta forma, este estudo dá embasamento ao método de exposição (via hídrica) utilizado e não deixa dúvidas que o naftaleno é biodisponibilizado aos organismos antes mesmo que sofra degradação.

Caso análises químicas da água fossem realizadas em uma situação experimental como a descrita, seria possível que o índice de naftaleno fosse drasticamente reduzido no final do experimento. Não obstante, deve-se levar em consideração que os animais acabam por absorver o contaminante antes mesmo da sua total degradação, e desse modo, danos celulares ou genéticos podem ser ocasionados, bem como interrupção da homeostase, como resposta da exposição ao contaminante.

Além das evidências biológicas sobre eliminação do naftaleno, parece que a volatilização exerce importante papel na transformação deste composto. Isso pode ser explicado a partir de sua pequena massa molecular, avaliada em 128,18 g/mol (GERVAIS et al., 2010). A pressão de vapor, ou seja, o quão facilmente o naftaleno é perdido, depende diretamente do seu peso molecular. Desta forma, por ter baixo peso molecular, o naftaleno pode ser facilmente volatilizado a partir da água dos sistemas naturais, como indica as meia-vidas da volatilização de 0,4 a 3,2 horas (SOUTHWORTH, 1979). Além disso, a movimentação da água acelera o processo de perda, principalmente devido à elevada taxa de conversão a CO_2 apontada como 4,7 g/L/dia (CETESB, 2010).

A alta capacidade de volatilização do naftaleno pode ser uma explicação alternativa para os menores escores nos animais contaminados em relação aos demais grupos. Mesmo sabendo que o naftaleno é rapidamente absorvido, é possível que devido à alta taxa de conversão e perda do contaminante o período de contato dos peixes com este tenha sido insuficiente para provocar danos observáveis ao DNA pelos métodos utilizados no presente trabalho.

Para possibilitar a exposição dos peixes ao contaminante, este precisou ser dissolvido em um solvente específico, no caso álcool etílico, em função da insolubilidade do naftaleno em água. Isso pode gerar uma associação entre dois tipos de substâncias de diferentes classes

químicas podendo levar a uma dificuldade na interpretação dos resultados. Em razão de alguns dados controversos, é difícil sabermos se um composto interfere na ação do outro, aumentando ou diminuindo sua atividade sobre os indivíduos, ou ainda facilitando sua eliminação. O ideal seria averiguar melhor cada um dos compostos isoladamente, bem como seu mecanismo de ação, para uma melhor interpretação dos efeitos de forma individualizada.

Outra possível explicação dos resultados obtidos pode ser, conforme sugerido por Santos (2006), que o etanol aumente a taxa metabólica dos organismos. Assim, com o aumento da taxa metabólica, a eliminação do naftaleno seria facilitada, explicando escores menores do que no próprio controle com etanol (Figura 4 e 8) . Porém, nessa linha de raciocínio, este mecanismo funcionaria apenas quando o etanol estivesse associado a um outro reagente, tendo em vista que quando sozinho os danos podem ser mais elevados.

Em relação ao controle negativo com etanol, os escores foram semelhantes ao do controle negativo puro (Figura 4 e 10), ou até mesmo maiores, como no caso de eritrócitos de *G. brasiliensis* (Figura 8). Algumas informações sobre o comportamento do etanol quando presente em um ambiente experimental pode explicar os resultados aqui observados. O etanol contribui, principalmente, para a geração de radicais livres, o que faz com que ocorra um aumento na peroxidação lipídica, e isso, por sua vez, poderia contribuir no aumento de danos ao DNA (FELTES et al., 2008). Ainda, existe a hipótese de que o etanol contribua com o aumento da hemólise de eritrócitos, expondo os nucleoides e acarretando maior dano ao DNA. No fígado, todos os grupos apresentaram uma faixa de dano semelhante. Cerca de 90% do etanol é processado no fígado, e neste torna-se efetivamente tóxico, porém não se pode afirmar com certeza que 96 horas, tempo do experimento, foi suficiente para completa metabolização e visualização dos danos por meio de compostos secundários.

O dano alto no controle com etanol, principalmente em eritrócitos de *G. brasiliensis* pode ser explicado, ainda por Santos et al. (2006), como decorrente de um aumento na taxa de amônia provocado pelo etanol. Assim, os danos observados podem ser devido a efeitos secundários. O etanol aumenta a taxa de excreção de amônia, esta, presente na água em maiores quantidades, acaba por provocar maiores quebras no DNA de células expostas. O mesmo estudo aponta que o naftaleno possui efeito contrário, ou seja, diminui a excreção da amônia, o que corroboraria os escores menores que no respectivo controle negativo.

A diminuição dos danos observada em diversos dos grupos contaminados em relação aos controles pode ser devido ao tipo de organismos utilizados no estudo. Peixes rapidamente capturam contaminantes orgânicos lipofílicos, como o naftaleno, do ambiente e possuem uma variedade de mecanismos para proteção contra efeitos deletérios (PETER, 1997 apud SANTOS,

2006). Tais efeitos podem incluir a eliminação antes mesmo da metabolização, que parece ser responsável por ocasionar maiores danos. Além disso, o tempo de exposição também parece ser altamente informativo no experimento, para análise de danos decorrente de metabolitos, acreditamos que um maior tempo de exposição deve ser aplicado. Isto foi demonstrado por Ramsdorf (2011) para as espécies de peixes *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp*, onde a concentração de 3,0 mg/L apresentou mais danos ao DNA no teste do micronúcleo písceo e no ensaio cometa dos eritrócitos após 28 dias de contaminação.

A bile representa a principal rota de excreção para metabolitos biotransformados de HPAs. Assim, a concentração biliar desses compostos e seus metabólitos podem ser usados como um marcador na avaliação de exposição seja contínua ou recente, em amostras oriundas de peixes. O fígado nos peixes é o principal local para biotransformação de HPAs, e os produtos metabólicos são subsequentemente estocados na vesícula biliar (BEYER et al., 2010). Krahn et al. (1986) sugerem o uso de metabolitos presentes na bile a fim de determinar a exposição de peixes aos HPAs. No presente trabalho a presença de compostos com dois anéis aromáticos foi investigada na bile. A partir dos resultados pode-se observar que no lambari houve a acumulação de HPA na bile (Figura 6), havendo diferença em quase todas as concentrações testadas, exceto na menor delas (0,005 mg/L) na comparação com grupos controle. Melancon e Lech (1978) relataram após exposição hídrica aguda ao naftaleno, que a bile dos peixes continha centenas de vezes mais naftaleno e metabolitos que a água. Entretanto, no acará não foi verificada diferença em relação ao controle em nenhuma das concentrações testadas (Figura 11). Foi demonstrado por Roubal, Collier e Malins (1977) em estudo com naftaleno que a maior porcentagem dos compostos acumulados na vesícula biliar são metabolitos. É possível que devido ao curto período de exposição, o tempo de metabolização tenha sido insuficiente para que quantidades representativas de metabolitos fossem encontradas na bile de *G. brasiliensis*, sugerindo diferença entre a sensibilidade ou capacidade de eliminação e metabolização desta espécie em comparação com os *A. altiparanae*. Por observação comportamental entre as duas espécies, uma da família Characidae (*A. altiparanae*) e outra da família Cichlidae (*G. brasiliensis*), esta última possui menor natação e deslocamento no aquário, próprio aos ciclídeos, ao contrário dos lambaris que são mais ágeis, o que pode nos sugerir que nestes a metabolização foi mais rápida acumulando assim maior concentração de poluente no fígado no curto espaço de tempo de contaminação.

O aumento na atividade hepática da GST em peixes após exposição a contaminantes é comum e já foi relatado em vários estudos, como, por exemplo, exposição a fração solúvel do óleo diesel (SIMONATO; ALBINATI; MARTINEZ, 2006), Butiltin (SANTOS et al., 2014),

Rondup® (MODESTO; MARTINEZ, 2010) e exposição a sedimento coletado em locais poluídos (ALMEIDA; MELETTI; MARTINEZ, 2005).

O aumento da atividade da GST tem sido associado com uma adaptação defensiva do organismo contra uma variedade de compostos orgânicos presentes no ambiente (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A GST está envolvida na desintoxicação de xenobióticos e excreção desses e de seus metabólitos (MONTEIRO et al., 2006). Pode ser induzida por pró-oxidantes e/ou compostos eletrofílicos através de uma resposta antioxidante (FERRARI; VENTURINO; D'ANGELO, 2007).

Os resultados, em ambas as espécies, mostram aumento da atividade da GST em organismos expostos ao naftaleno. Isso é mais um indício de que os indivíduos estão metabolizando e buscando deixar o composto mais hidrofílico possível a fim de ser eliminado. Além disso, a atividade pronunciada da enzima não deixa dúvidas de que o contaminante foi biodisponibilizado aos peixes. Se comparada a atividade da GST no fígado com os escores obtidos no ensaio cometa deste tecido, pode-se verificar que existe um padrão de diferença na atividade de GST em relação ao controle, tendo, na maioria dos casos, ocorrido aumento da atividade. Porém, tal diferença não é observada nos dados de genotoxicidade no fígado em relação a seus controles (Figuras 5 e 9). Desse modo, é possível sugerir a ação protetora antioxidante da enzima hepática como a responsável pelo menor dano no material genético de células do fígado, especificamente.

Quando apenas o grupo com etanol misturado a água é levado em consideração, pode-se verificar aumento da atividade da GST. Assim, o etanol também parece ser o provável responsável pela ativação das enzimas de detoxificação. O etanol em contato com os peixes se torna também um composto estranho e suas propriedades químicas propiciam sua entrada nas células, justificando a elevação da atividade tal qual foi observada. No caso do lambari apenas a maior concentração de naftaleno foi diferente do controle com etanol. Isso demonstra que se a concentração do contaminante for muito baixa, outros fatores podem interferir na análise, e não é possível saber com certeza qual dos compostos em associação que eleva a atividade de GST. Os biomarcadores bioquímicos tem resposta rápida e são os primeiros a sofrer alteração (RAMSDORF, 2011), além de serem biomarcadores generalistas, potencialmente sensível a qualquer substância estranha ao organismo.

CONCLUSÃO

Frente às condições experimentais utilizadas no presente trabalho, tanto *A. altiparanae* como *G. brasiliensis* apresentaram semelhança quanto à suscetibilidade à exposição ao naftaleno. Através da análise pelo teste cometa verificou-se que o naftaleno, nas condições testadas, não é genotóxico. Porém a toxicidade deve ser considerada devido à indução da atividade da enzima glutathione s-transferase. A atividade desta pode ter sido a responsável pelo menor dano ao tecido hepático em comparação aos demais tecidos analisados. A toxicidade também se fez notar pelo comportamento desorientado dos peixes nos aquários principalmente nas concentrações a partir de 0,3 mg/L.

Baixas concentrações de naftaleno presentes na água podem estimular benefícios aparentes, como menos danos ao DNA, sendo esta uma resposta compensatória a um desequilíbrio da homeostase. O naftaleno é absorvido por peixes quando presente e este, bem como seus metabolitos, podem acumular-se na bile dos peixes expostos. Foi verificada maior acumulação de HPA com dois anéis na espécie *A. altiparanae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABILHOA, V.; DA SILVA, P.A. A alimentação de duas espécies de Ciclídeos (Perciformes, Cichlidae) em um reservatório eutrofizado na região metropolitana de Curitiba e sua relação com o aparelho digestório. IV Seminário do Projeto Interdisciplinar sobre Eutrofização de Águas de Abastecimento Público na Bacia do Altíssimo Iguaçu (IV.:2003 : Curitiba - PR). **Anais do IV Seminário do Projeto Interdisciplinar de Pesquisa em Eutrofização de Águas de Abastecimento – Curitiba**, p.149, 2003.

AGOSTINHO, A.A. et al. Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. In:TUNDISI, J.G.; STRASKRABA, M. (Ed.). **Theoretica reservoir ecology and its applications**. São Carlos: International Institute of Ecology-IEE; Leiden: Backhuys Publishers, 1999. cap.11, p. 227-265.

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*. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 140: 356-363, 2005.

AL-SABTI, K. **Handbook of genotoxic effects and fish chromosomes**. J. Stefan Institute, P.O.Box 100, Jamova 39. Ljubljana, 1991.

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

AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. vol.6 (2): 158-170, 2003.

ASSUMPCÃO et al. Análise do conteúdo estomacal de *Cichla ocellaris* e *Pygocentrus nattereri* (espécies introduzidas) e *Geophagus brasiliensis* e *Astyanax bimaculatus* (espécies nativas) de lagos do Vale do Rio Doce-MG e suas implicações. In: ROCHA, O; ESPÍNDOLA, E. L. G.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R.; RIETZLER, A. C. (Orgs.). **Espécies invasoras em águas doces: estudos de caso e propostas de manejo**. 416 p, 2005.

BENNEMANN, S.T.; SHIBATTA, O.A. Dinâmica de uma assembléia de peixes do rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA, editors. **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina/PR: Edição dos Editores. 2002.

BEYER, J.; JONSSON, G.; PORTE, C.; KRAHN, M.M.; ARIESE, F. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.30: 224-244, 2010.

BÍCEGO, C.M.; TANIGUCHI, S.; YOGUI, G.T.; MONTONE, R.C.; SILVA, D.A.M.; LOURENÇO, R.A.; MARTINS, C.C.; SASAKI, S.T.; PELLIZARI, V.H. & WEBER, R.R. Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Santos and São Vicente Estuary System, São Paulo, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v.52 (12): 1804-1816, 2006.

BISCHOFF, N. Naphthalene. **Clinical veterinary toxicology**; Plumlee, K.H., ed. Mosby: St Louis, MO, p. 163-164, 2004.

BOGEN, K.T.; BENSON, J.M.; YOST, G.S.; MORRIS, J.B.; DAHL, A.R.; CLEWELL, H.J.; KRISHNAN, K.; OMIECINSKI, C.J. Naphthalene metabolism in relation to target tissue anatomy, physiology, cytotoxicity and tumorigenic mechanism of action. **Reg. toxicological pharmacology**, 51: 527-536, 2008.

BRITO, E.M.S.; VIEIRA, E.D.R.; TORRES, J.P.M. & MALM, O. Persistent organic pollutants in two reservoirs along the Paraíba do sul-Guandu river system, Rio de Janeiro, Brazil. **Química Nova**, v.28 (6): 941-942, 2005.

BRUSICK, D.; SMALL, M.S.; CAVALIERI, E.L.; CHAKRAVARTI, D.; DING, X.; LONGFELLOW, D.G.; NAKAMURA, J.; ROGAN, E.C.; SWENBERG, J.A. Possible genotoxic models of action for naphthalene. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 51: 43-50, 2008.

BUCHELI, T. B.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Sciences and Technology**, v. 5: 201-268, 1995.

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

BURATINI, S.V.; BANDELLI, A. Bioacumulação. Org. ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática**. Ed. RIMA- São Carlos/SP. p. 478, 2006.

CALABRESE, E.J. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.27 (7): 1451-1474, 2008.

CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A. Defining hormesis. **Human e Experimental Toxicology**, v. 21: 91-97, 2002.

CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A. Hormesis: The Dose-Response Revolution. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43: 175-197, 2003.

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

CAVALCANTI, A.D. Monitoramento da contaminação por elementos traço em ostras comercializadas em Recife, Pernambuco, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19 (5), 2003.

CESTARI, M.M.; LEMOS, P.M.M.; RIBEIRO, C.A.O.; COSTA, J.R.M.A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M.V.M.; MANTOVANI, M.S.; FENOCCHIO, A.S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v.27 (2): 270-274, 2004.

CETESB- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Ficha de Informação de Produto **Químico- NAFTALENO**. São Paulo: Relatórios/Secretária do Meio ambiente, 2010. Disponível em:

http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=NAFTALENO. Acesso: maio/2011

CHAPMAN, P.M. The implications of hormesis to ecotoxicology and ecological risk assessment. **Human and Experimental Toxicology**, v. 20: 499-505, 2001.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31 (7): 1820-1830, 2008.

DeGRAEVE, G.M.; ELDER, R.G.; WOODS, D.C.; BERGMAN, H.L. Effect of naphthalene and benzene on Fathed Minnows and Rainbow Trout. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 11: 487-490, 1982.

DISNER, G.R.; ROCHA, M.V.; MIRANDA, G.B. Avaliação da atividade mutagênica do Roundup em *Astyanax altiparanae* (Chordata, Actinopterygii). **Evidência**, Joaçaba, v.11 (1): 33-42, 2011.

DUNBAR, J.C.; LIN, C.; VERGUCHT, I.; WONG, J.; DURANT, J.L. Estimating the contributions of mobile sources of PAH to urban air using real-time PAH monitoring. **Science of the Total Environment**, v. 279: 1-19, 2001.

EISELE, G.R. Naphthalene distribution in tissues of laying pullets, swine, and dairy cattle. **Bull Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34: 549-556, 1985.

FELTES, P.K.; PILOTO, L.A.; RICO, E.P.; ROSEMBERG, D.B.; DIAS, R.D.; BOGO, M.R.; BONAN, C.D. Padronização do ensaio da atividade da Na⁺K⁺-ATPase em membranas cerebrais de zebrafish (*Danio rerio*) e influência da exposição ao etanol. **IX Salão de Iniciação Científica**, PUCRS, 2008. Disponível em: http://www.pucrs.br/research/salao/2008-IXSalaoIC/index_files/main_files/trabalhos_sic/ciencias_biologicas/bioquimica/61659.pdf. Acesso em: setembro de 2013.

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

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; D'ANGELO, A.M.P. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 88: 134-142, 2007.

FERRARO, M.V.M; FENOCCHIO, A.S.; MANTOVANI, M.S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C; CESTARI, M.M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**. v. 27 (1): 103-107, 2004.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B.P. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v. 681: 80-92, 2009.

GALVAN, G.L. Avaliação genotóxica de efluentes químicos de laboratórios de instituição de ensino e pesquisa utilizando como biomarcador o peixe *Astyanax altiparanae* (CHARACIDAE). Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal do Paraná, 2011.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicação Museu de Ciência e Tecnologia PUCRS- Série Zoologia**. n.13: 65-88, 2000.

GERVAIS, J.; LUUKINEN, B.; BUHL, K.; STONE, D. **Naphthalene Technical Fact Sheet**. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. Date reviewed: 2010. Disponível em: <http://npic.orst.edu/factsheets/naphtech.pdf>. Acesso em: Ago. 2013.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. P. A.; RAMOS, M. L. L. C. **Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos**, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB): São Paulo, 1990.

GONTIJO, Á.M.M.C., BARRETO, R.E., SPEIT, G., REYES, V.A.V., VOLPATO, G.L., SALVADORI, D.M.F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research: Genetical Toxicology and Environmental. Mutagenesis**, v. 534: 165-172, 2003.

GORBI, S.; REGOLI, F. Induction of cytochrome P4501A and biliary PAH metabolites in European eel *Anguilla anguilla*: Seasonal, dose- and time-response variability in field and laboratory conditions. **Marine Environmental Research**, vol. 58: 511-515, 2004.

GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**. Ano 2, n. 1, 2003. Disponível em: <http://apostilas.cena.usp.br/Valdemar/CEN0413%20-%20Agrot%C3%B3xicos%20-%20Intera%C3%A7%C3%B5es%20no%20Ambiente/bioindicadores%2019.10.2010.pdf>. Acesso em: Set. 2013.

HANSON, N.; PERSSON, S.; LARSSON, A. Analyses of perch (*Perca fluviatilis*) bile suggest increasing exposure to PAHs and other pollutants in a reference area on the Swedish Baltic coast. **Journal Environmental Monitoring**. V.11: 389-393, 2009.

HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, v. 18: 187-190, 1973.

HERRICKS, E. Princípios gerais de toxicologia. In. MATSUI, S.; BARRETT, B.F.D.; BANERJEE, J. **Gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios**. (Série Diretrizes para o gerenciamento de lagos). São Carlos: ILEC- IIE, 4, 9-30, 2002.

HUBER, P.; ALMEIDA, W.P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, 31, n. 5: 1170-1179, 2008.

HWANG, S; CUTRIGHT, T.J. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in natural soil. **Chemosphere**, 47: 891-899, 2002.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human**; International Agency for Research on Cancer, World Health Organization: Lyon, France, p. 367-435, 2002.

KAYAL, S. I., CONNELL, D. W. Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments and water from the Brisbane river estuary. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 29: 473-487, 1989.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferase. **Journal Biological Chemistry**, v. 251: 6183-6188, 1976.

KRAHN, M.M.; RHODES, L.D.; MYERS, M.S.; MOORE, L.K.; MACLEOD, W.D.; MALINS, D.C. Associations between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.15: 61-67, 1986.

LANGMAN, L.J.; KAPUR, B.M. Toxicology: Then and now. **Clinical Biochemistry**, v. 39: 498-510, 2006.

LINS, J.A.P.N.; KIRSCHNIK, P.G.; QUEIROZ, V.S.; CIRIO, S.M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8 (4): 469-484, 2010.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 120: 43-49, 1998.

MACKAY, A.P.; HODGKINSON, M. Assessment of the impact of naphthalene contamination on mangrove fauna using behavior bioassays. **Environmental Contamination Toxicology**, v. 56: 279-286, 1996.

MARQUES, ANTÔNIO ERNESTO MEISTER LUZ. **Comparação entre contagem de eritrócitos periféricos pelo teste do micronúcleo písceo em *Astyanax fasciatus* submetida à contaminação por sulfato de cobre**. Monografia apresentada ao Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, 2011.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11 (2): 188-201, 2007.

MELANCON, M.J.; LECH, J.J. Distribution and elimination of naphthalene and 2-methylnaphthalene in rainbow trout during short and long-term exposures. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 7: 207-220, 1978.

MENICONI, M.F.G.; GABARDO, I.T.; CARNEIRO, M.E.R.; BARBANTI, S.M.; SILVA, G.C. & MASSONE, C.G. Brazilian Oil Spills Chemical Characterization—Case Studies. **Environmental Forensics**, v.3 (3-4): 303-321, 2002.

MESCHIATTI, A. J. Alimentação da Comunidade de peixes de uma lagoa marginal do rio Mogi-Guaçu, SP. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.3: 115-137, 1995.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78: 294-299, 2010.

MONTEIRO, D.A.; ALMEIDA, J.A., RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 143C: 141-149, 2006.

NAVAS, J.M.; SEGNER, H. Antiestrogenicity of B-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. **Aquatic Toxicology**, v. 51: 79-92, 2000.

NETTO, A.D.P.; DIAS, J.C.M.; ARBILLA, G.; OLIVEIRA, L.F.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica. **Química Nova**, v.23 (6): 765-773, 2000.

ORSI, M.L.; SHIBATTA, O.A.; SILVA-SOUZA, A.T. Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertanópolis. In: MEDRI, M. E., BIANCHINI, E., SHIBATTA, O. A., PIMENTA, J. A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M.E., 2002.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformação, endocrine and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum destillate products and environmental contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49 (1): 64-75, 2001.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Naphthalene and B-naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. **Environment International**, v. 28: 285-293, 2002.

POLAKIEWICZ, L. **Estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nos estuários de Santos e São Vicente/SP utilizando diatomito como material adsorvente**. Dissertação. Tecnologia nuclear. Comissão Nacional de Energia Nuclear/SP-IPEN. São Paulo, 2008. Disponível em: < http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompletoLilian%20Polakiewicz_M.pdf >

POTIN, O.; RAFIN, C.; VEIGNIE, E. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v. 54 (1): 45-52, 2004.

PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JÚLIO, H.F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**. v.25: 421-430, 2002.

PUBLIC HEALTH SERVICE. **Toxicological profile for naphthalene, 1-methylnaphthalene, and 2-methylnaphthalene**; U.S Department of health and human services. Agency for toxic substances and diseases registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=240&tid=43>, updated sept 2010.

RAMSDORF, W.A. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, 2011

RAMSDORF, W.A.; FERRARO, M.V.M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; COSTA, J.R.M.; CESTARI, M.M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.158: 77-85, 2009.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In. RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese ambiental**. Ed. ULBRA, 1ª ed. 2003.

RIOL, M.J.M.; VALIÑAS, M.C.N.; FRENÁNDEZ, M.A.G.; LÓPEZ, M.P. Glutathione S-transferases from rainbow liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 227-235, 2000.

RIVERO, C.L.G. **Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes do Lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil**. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, 2007.

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

ROUBAL, W.T.; COLLIER, T.K.; MALINS, D.C. Accumulation and metabolism of carbon-14 labeled benzene, naphthalene, and anthracene by young Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 5: 513-529, 1977.

SABINO, J.; CASTRO, R.M.C. Alimentação, período de atividade e distribuição espacial dos peixes de um riacho da floresta Atlântica (Sudeste do Brasil). **Revista Brasileira de Biologia**. v.50: 23-36, 1990.

SANTOS, D.M.; SANTOS, G.S.; CESTARI, M.M.; RIBEIRO, C.A.O.; ASSIS, H.C.S.; YAMAMOTO, F.; GUILOSKI, I.C.; MARCHI, M.R.R.; MONTONE, R.C. Bioaccumulation of butyltins and liver damage in the demersal fish *Cathorops spixii* (Siluriformes, Ariidae). **Environmental Science Pollution Research**, v. 21: 3166-3174, 2014.

SANTOS, T.C.A.; NGAN, P.V.; PASSOS, M.J.A.C.R.; GOMES, V. Effects of naphthalene on metabolic rate and ammonia excretion of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 335: 82-90, 2006.

SCHMID, W. The micronúcleos test. **Mutation Research**, v. 31: 9-15, 1975.

SCHULZ, U.H.; MARTINS-JÚNIOR, H. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. **Brasilian Journal of Biology**, v.61 (4): 615-622, 2001.

SCHWANTES, A.R.; BARTLETTI, G.R.; SCHWANTES, M.L.B. The hemoglobin of *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.998: 157-160, 1991.

SILVA, J. M.; SANTOS, J.R. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. v. 11 (4): 565-573, 2007.

SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C. L.; 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**, v. 76: 505-511, 2006.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175: 184-191, 1988.

SIROKÁ, Z.; DRASTICHOVÁ, J. Biochemical Markers of Aquatic Environment Contamination- Cytochrome P450 in Fish: A review. **Acta Veterinaria Brno**, v. 73: 123-132, 2004.

SMITH, J. D., BAGG, J., WRIGLEY, I. Extractable polycyclic hydrocarbons in water from rivers in southeastern Australia. **Water Research**, v. 25: 1145-1150, 1991.

SOUTHWORTH, G.R. The role of volatilization in removing polycyclic aromatic hydrocarbons from aquatic environments. **Bull Environmental Contamination and Toxicology**, v. 21: 507-514, 1979.

STEFANI, P.M.; REIS, S.A.; ROCHA, O. Caracterização alimentar do acará (*Geophagus brasiliensis*) na lagoa dos tropeiros, Minas Gerais. **Anais: II Simpósio de ecologia do PPGERN**. Universidade Federal de São Carlos, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 144 p. il.; 2004.

TELES, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and B-naphthoflavone. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55: 98-107, 2003.

TRUSCOTT, B.; IDLER, D.; FLETCHER, G. Alteration of reproductive steroids of male winter flounder (*Pleuronectes americanus*) chronically exposed to low levels of crude oil in sediments. **Canadian Journal of Aquatic Science**, v. 49: 2190-2195, 1992.

TUCCI, C.E.M. Águas urbanas. **Estudos avançados**, v. 22 (63): 97-112, 2008.

UEDA, T.; HAYASHI, M.; OHTSUKA, Y.; NAKAMURA, T.; KOBAYASHI, J.; SOFUNI, T.; Preliminary study of the micronucleus test by acridine Orange fluorescent staining compared with chromosomal aberrations test using fish erythropoietic and embryonic cells. **Water Science Technology**, 25, 235-240, 1992.

UIEDA, V. S. **Comunidade de peixes de um rio litorâneo**: Composição, Habitat e Hábitos. 1995. Tese (doutorado), Unicamp, Campinas (SP).

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

VARANASI, U.; UHLER, M.; STRANAHAN, S.I. Uptake and release of naphthalene and its metabolites in skin and epidermal mucus of salmonids. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 44: 277-289, 1978.

VIEIRA, D.B.; SHIBATTA, O.A. Peixes como indicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil. **Biota Neotropical**, v. 7 (1), 2007.

VIJAYAVEL, K.; GOMATHI, R.D.; DURGABHAVANI, K.; BALASUBRAMANIAN, M.P. Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible marine crab *Scylla serrata*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48: 429-433, 2004.

VILCHES, M. **Análise genotóxica do Rio Cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental do Centro Universitário FEEVALE. Novo Hamburgo, 2009.

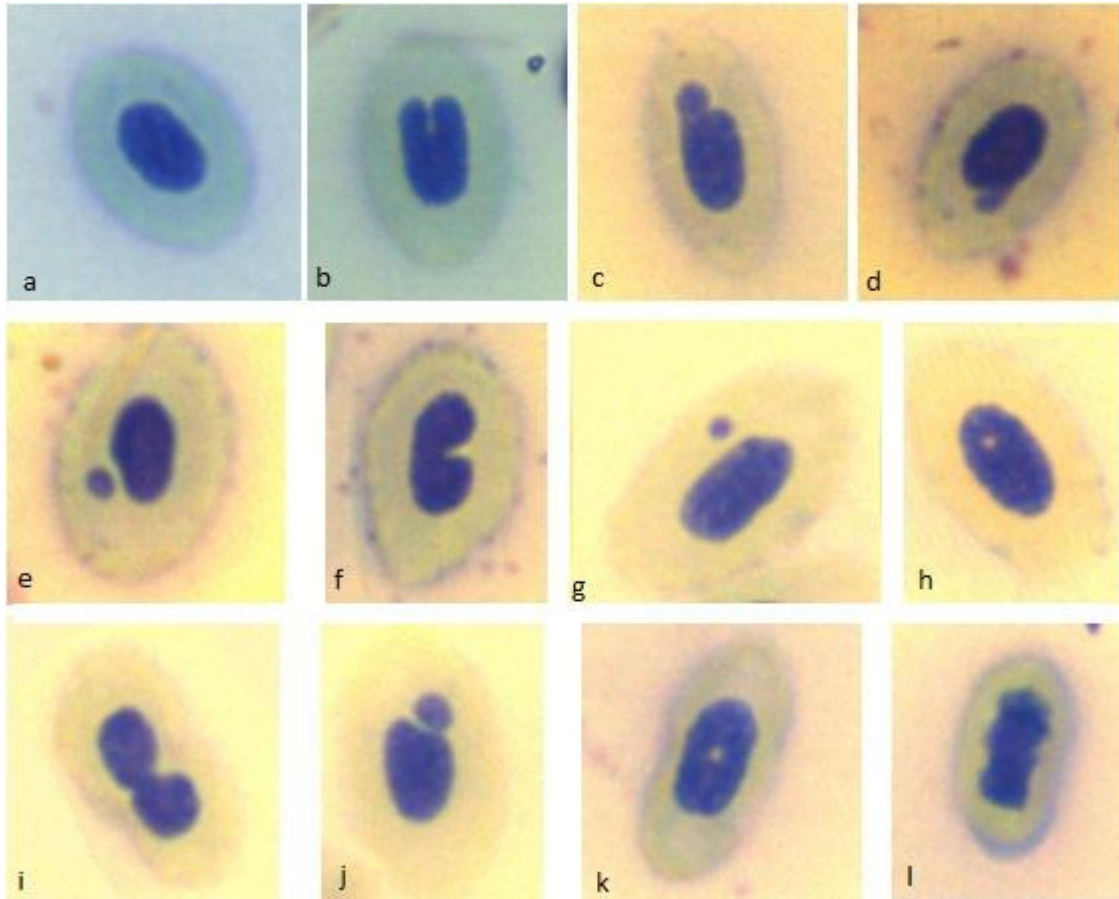
WINTER, M.J.; ELLIS, L.C.J.; HUTCHINSON, T.H. Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide. **Mutation Research- Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.629 (2): 89-99, 2007.

WRIGHT, D.A.; WELBOURN, P. **Environmental Toxicology**. New York, N.Y.: Cambridge University Press, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1

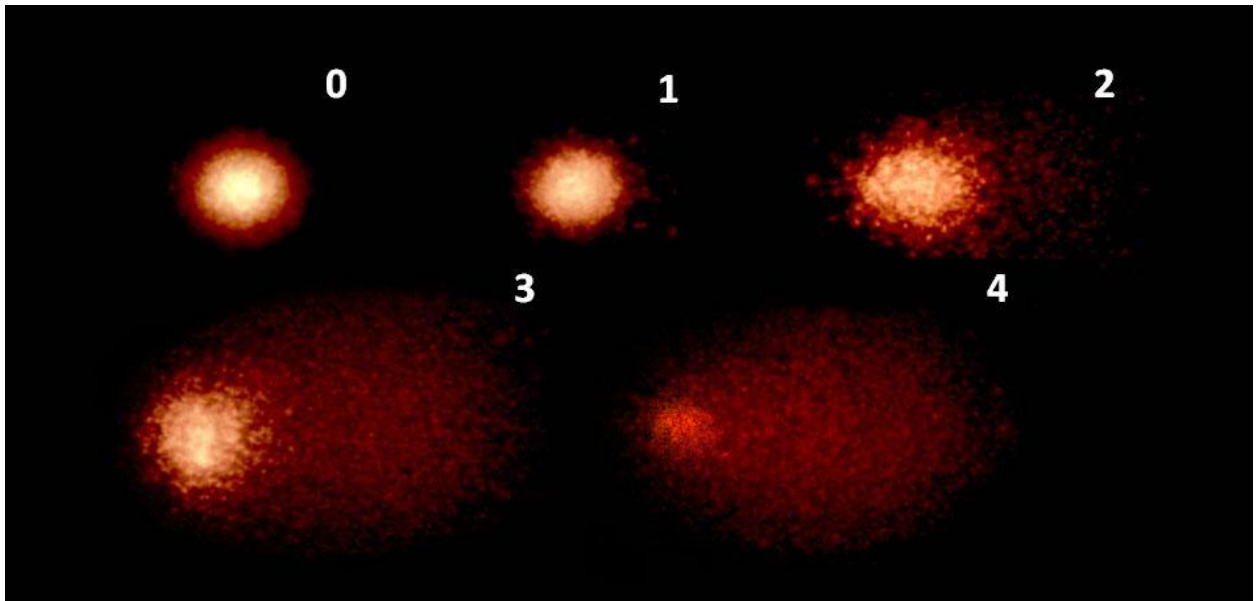
Alterações Morfológicas Nucleares em Peixes



Célula normal (a), *blebbed* (c, d), micronúcleo (e, g, j), *vacuolated* (h, k), *notched* (b, f, i) e *lobed* (l).
Fonte: Antônio Ernesto Meister Luz Marques, 2011

ANEXO 2

Ensaio cometa em eritrócitos de peixe



Classificação visual das classes de dano de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa: (0) sem dano; (1) pouco dano; (2) dano moderado; (3) dano elevado; (4) dano máximo. Aumento de 400x em microscopia de epifluorescência.

FONTE: Gabrieli Limberger Galvan, 2011