

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANTONIO ERNESTO MEISTER LUZ MARQUES

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO GLICEROL BRUTO E DO ÓXIDO DE
CROMO III NOS BIOINDICADORES *Rhamdia quelen* E *Piaractus
mesopotamicus***

CURITIBA

2014

ANTONIO ERNESTO MEISTER LUZ MARQUES

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO GLICEROL BRUTO E DO ÓXIDO DE
CROMO III NOS BIOINDICADORES *Rhamdia quelen* e *Piaractus
mesopotamicus***

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Genética, no Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari.

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Marques, Antonio Ernesto Meister Luz

Avaliação da genotoxicidade do glicerol bruto e do óxido de cromo III nos bioindicadores *Rhamdia quelen* e *Piaractus mesopotamicus*. / Antonio Ernesto Meister Luz Marques. – Curitiba, 2014.

48 f. ; 30cm.

Orientador: Marta Margarente Cestari

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Glicerina 2. Cromo 3. Genotoxicidade 3. Biocombustível 4. Peixe - Criação 5. Nutrição I. Título II. Cestari, Marta Margarente III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 591.152



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 **ANTONIO ERNESTO MEISTER LUZ MARQUES**, 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

Wanessa Ramsdorf
Doutora Wanessa Algarte Ramsdorf
UTFPR – Membro Titular

Marcos Vinicius Mocellin Ferraro
Doutor Marcos Vinicius Mocellin Ferraro
UFSC – Membro Titular

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

Visto

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Prof. 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

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Dra. Marta Margarete Cestari, por toda a orientação, ajuda e apoio durante todos esses anos de vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Fábio Meurer do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos da Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, pela parceria realizada e por todos os esforços empregados.

Ao doutorando Rafael Ernesto Balen, por toda a sua amizade, ajuda, paciência, empenho e inúmeros meses de trabalho que foram imprescindíveis para a realização desta dissertação.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Marcos Vinícius Mocellin Ferraro, por toda a ajuda empregada durante esse mestrado e a Prof^a. Dr^a. Wanessa Algarte Ramsdorf, que, para mim, sempre foi um exemplo de dedicação e competência em suas atividades de pesquisa, além de me ensinar e ajudar desde o início das minhas atividades no laboratório de mutagênese.

Aos meus colegas e amigos de laboratório do passado e do presente, Taynah, Laercio, Manu, Gabi, Flávio, Gus, Rodrigo (Gê), Laís, Ana Carol, Jú, Nati, Aurea, ..., que fazem do laboratório uma grande família! Sempre alegrando os momentos mais difíceis e tornando essa dessa etapa das nossas vidas um grande prazer!

À minha querida, amada e admirável Camila da Costa Senkiv, que a cada ano passado, faz com que eu fique ainda mais apaixonado! Obrigado por todos esses anos de amor, carinho, companheirismo e, principalmente, por todos os dias que você ilumina a minha vida.

Aos meus queridos amigos de graduação Fábio, Diego, Tiago, Samuel, Luis, Karin, Lu, Van e todos que tornaram esse mestrado muito mais divertido e engraçado.

Em especial ao Vini pela amizade, sugestões e cafés!

Aos meus queridos amigos de infância, que sempre estão presentes quando precisamos!

À minha família, em especial, aos meus pais Paulo e Regina, por todo o amor, carinho, dedicação e apoio durante toda uma vida.

“Time flies like an arrow; fruit flies like a banana.”

Groucho Marx

RESUMO

Os combustíveis fósseis e seus derivados possuem alta demanda mundial. Devido à ausência de destinação eficaz dos seus resíduos, impactos ambientais são gerados. Entretanto, existem alternativas como os Biocombustíveis. No Brasil, o biodiesel é uma nova opção, sendo misturado ao óleo diesel tradicional. Na produção de biodiesel, 10% é obtido como o subproduto Glicerol Bruto (GB), produto de baixo valor agregado. O cromo é um elemento essencial à nutrição, sua deficiência na alimentação pode provocar distúrbios relacionados ao metabolismo da glicose. É muito utilizado na forma de Óxido de Cromo III (Cr_2O_3), marcador em testes de digestibilidade. Houve interesse em testar o GB e o Cr_2O_3 em peixes cultivados em pisciculturas, como o *Rhamdia quelen* (Jundiá) e *Piaractus mesopotamicus* (Pacu). Estas espécies apresentam uma grande aceitação no mercado. Para testar o GB e o Cr_2O_3 , foram elaboradas quatro formulações de ração: ração comum, ração comum com adição de 30% de GB + 0,1% de Cr_2O_3 , ração comum com adição 30% de GB e ração comum com adição de 0,1% de Cr_2O_3 . Cinco grupos foram criados a partir dessas formulações, sendo os grupos controle negativo e positivo alimentados com ração comum. No grupo controle positivo foi aplicada uma injeção intraperitoneal de MMS 24h antes da coleta de material. Foram utilizados 15 animais em cada grupo para cada uma das espécies. Os biomarcadores utilizados foram o Ensaio Cometa (eritrócitos e fígado) e o Teste do Micronúcleo Písceo. Os resultados indicam que o GB adicionado a ração comum não apresenta toxicidade para as duas espécies nos biomarcadores utilizados. O Cr_2O_3 foi tóxico para o Jundiá no ensaio cometa de eritrócito e hepatócito nos dois grupos em que foi testado. No Pacu, apenas o grupo com ração comum e 0,1% de Cr_2O_3 apresentou toxicidade no ensaio cometa de eritrócito. Não foi observado aumento do número de micronúcleos em nenhum dos grupos testados. Porém, houve diminuição do total de alterações morfológicas nucleares na espécie *Rhamdia quelen* nos grupos que continham Óxido de Cromo III, efeito que pode estar relacionado a fatores hemolíticos desta substância. A utilização do GB como um ingrediente na formulação de rações mostrou-se uma alternativa viável e econômica como fonte alternativa de energia na constituição de rações para pisciculturas.

Palavras-chave: Glicerina. Óxido de Cromo III. Piscicultura. Nutrição. Pacu. Jundiá.

ABSTRACT

Fossil fuels and their derivatives have high global demand. Due to the absence of effective disposal of its waste, environmental impact are generated. However, there are alternatives, like biofuels. In Brazil, biodiesel is a new biofuel option, being mixed with traditional diesel. Crude glycerol (CG) is a byproduct generated in the biodiesel production. Approximately 10 % of biodiesel production is CG, a product of low commercial value. Chromium is an essential element to nutrition, and its deficiency can cause glucose metabolism-related disorders. The chromium III oxide (Cr_2O_3) is an inert marker, used in digestibility tests. There was interest in testing CG and Cr_2O_3 in animals that are commonly grown in fish farms, as *Rhamdia quelen* (Jundiá) e *Piaractus mesopotamicus* (Pacu). These species have a wide market acceptance. To test CG and Cr_2O_3 , four feed formulations were prepared: regular feed, regular feed with addition of 30% CG + 0.1% Cr_2O_3 , regular feed with 30% CG addition and regular feed with addition of 0,1% Cr_2O_3 . Five groups were created from these formulations, the negative and positive control groups being fed with regular feed. An intraperitoneal injection of MMS was applied in the positive control group 24h prior to material collection. Fifteen animals were used in each group for each species. The biomarkers used were the comet assay (erythrocytes and liver) and the piscine micronucleus test. The results for these biomarkers indicate that CG has no toxicity for both species. Cr_2O_3 was toxic to Jundiá in the erythrocyte and hepatocyte comet assay in the two groups in which it was tested. For Pacu, only the group with regular feed and 0.1% of Cr_2O_3 showed toxicity in the erythrocyte comet assay. No increase in the number of micronuclei was observed in any of the groups tested. However, there was a decrease in total nuclear morphological changes in the *Rhamdia quelen* species in the groups containing Chromium III Oxide, an effect that may be related to hemolytic factors of this substance. The use of GB as an ingredient in feed formulation was shown to be a viable and economical alternative as an alternative energy source in the constitution of feed for fish farms.

Key Words: Glycerine. Chromium III Oxide. Pisciculture. Nutrition. Pacu. Jundiá.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 9 |
| 1.1 GLICEROL..... | 9 |
| 1.2 GLICEROL BRUTO | 11 |
| 1.2 CROMO | 14 |
| 1.3 BIOINDICADORES | 16 |
| 1.3.1 JUNDIÁ..... | 17 |
| 1.3.2 PACU | 17 |
| 1.4 BIOMARCADORES GENÉTICOS..... | 18 |
| 1.4.1 MICRONÚCLEO..... | 19 |
| 1.4.2 ENSAIO COMETA..... | 21 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 23 |
| 3 OBJETIVOS: | 23 |
| 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 23 |
| CAPÍTULO 1 | 25 |
| INTRODUÇÃO | 26 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| ORGANISMOS UTILIZADOS | 27 |
| RAÇÃO..... | 28 |
| COLETA DOS TECIDOS..... | 29 |
| ENSAIO COMETA..... | 30 |
| MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS | 31 |
| CONTROLE POSITIVO | 31 |
| ANÁLISE ESTATÍSTICA | 31 |
| RESULTADOS | 31 |
| GLICEROL | 31 |
| <i>RHAMDIS QUELEN</i> (JUNDIÁ) | 32 |
| MICRONÚCLEO | 33 |
| <i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i> (PACU) | 34 |
| DISCUSSÃO | 36 |
| CONCLUSÃO | 40 |
| REFERÊNCIAS | 42 |
| APÊNDICE 1 - CERTIFICAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (CEUA) | 48 |

1 INTRODUÇÃO

O petróleo, muito antes da revolução industrial, foi utilizado por vários séculos para iluminação, aquecimento, construção de estradas e edificações em países como China, Egito, Irã e Iraque. Na atualidade, as refinarias do mundo são capazes de produzir mais de 2.500 produtos, incluindo naftas, combustíveis, asfalto, parafinas, óleos lubrificantes, entre outras variedades de produtos refinados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000).

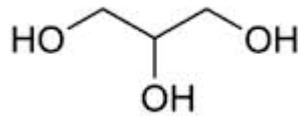
Os combustíveis fósseis causam um grande impacto ambiental devido a vários tipos de atividades antrópicas. Fazendo com que a matriz energética seja discutida sobre alternativas menos poluidoras. Para os combustíveis derivados de petróleo, existem os biocombustíveis como alternativa. O Brasil tem grande destaque por ser um pioneiro na utilização de Álcool Hidratado (1979) em veículos automotores e atualmente por introduzir o biodiesel no óleo diesel derivado de petróleo (MEURER et al., 2011).

O biodiesel é um produto da transesterificação do óleo vegetal comum ou gordura animal que ocorre por adição de álcool (metanol ou etanol) na presença de um catalisador alcalino (NaOH ou KOH). O produto dessa reação é uma massa dividida em duas fases, que podem ser separadas por decantação ou centrifugação. A fase com maior densidade é o Glicerol Bruto (GB), que apresenta cerca de 50% de glicerol e várias impurezas. A fase de menor densidade é o Biodiesel, igualmente impregnado de impurezas (OLIVEIRA et al., 2013).

1.1 Glicerol

O glicerol (FIGURA 1) é a mais antiga molécula orgânica isolada pelo homem (2.800 AC), obtida pelo aquecimento de gorduras na presença de cinzas para a produção de sabão. É uma molécula com características (TABELA 1) que são base para todas as formas de armazenamento energético em animais e vegetais. Constitui aproximadamente 10% do total de matéria gordurosa e é considerada nutricionalmente como um carboidrato. Nos organismos, quando é necessária a utilização das reservas energéticas, o glicerol e ácidos graxos são liberados na corrente sanguínea. No fígado o glicerol é convertido em glicose e fornece energia para o metabolismo celular (PAGLIARO et al., 2008).

FIGURA 1: ESTRUTURA BIDIMENSIONAL DO GLICEROL



Fonte: Mota et al., (2009).

TABELA 1: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO GLICEROL A 20°C.

| | |
|-----------------------------|--|
| Fórmula Química | C ₃ H ₈ O ₃ |
| Massa Molecular | 92.09382 g mol ⁻¹ |
| Densidade | 1.261 g cm ⁻³ |
| Viscosidade | 1.5 Pa.s |
| Ponto de Fusão | 18.2 °C |
| Ponto de Ebulição | 290 °C |
| Rendimento Energético | 4.32 kcal g ⁻¹ |
| Ponto de Fulgor | 160 °C (câmara fechada) |
| Tensão Superficial | 64.00mNm ⁻¹ |
| Coefficiente de Temperatura | -0.0598mN (mK) ⁻¹ |

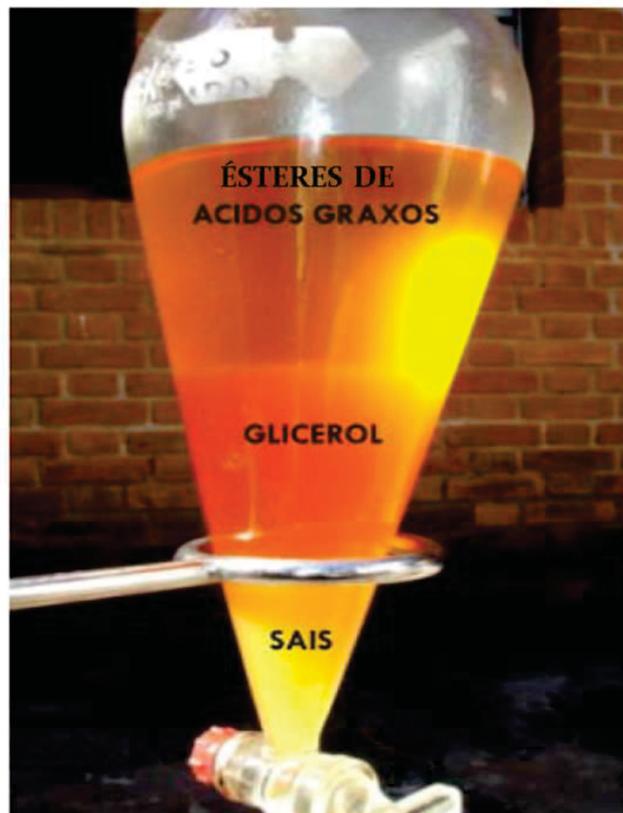
FONTE: PAGLIARO ET AL. (2008)

O glicerol já foi questão de segurança nacional durante o período pré segunda guerra mundial, pois a produção de sabão era insuficiente para atender a demanda de guerra para a produção de nitroglicerina, utilizada na produção da dinamite, explosivo desenvolvido por Alfred Nobel. Mesmo na primeira guerra mundial, o suprimento de glicerina era prioridade para a produção da pólvora sem fumaça, usada em armas de repetição e semiautomáticas. Desta forma, para atender a demanda de glicerol, foi utilizada uma reação de auto rendimento, utilizando a matéria prima do petróleo (epiclorohidrina). Porém, atualmente, a indústria do glicerol está alterando a sua fonte como resultado do excesso de glicerol produzido como subproduto da produção do biodiesel pelo processo de transesterificação de óleos vegetais com álcoois e catalisadores básicos (Pagliaro et al., 2008), e denominado de Glicerol Bruto (GB).

1.2 Glicerol Bruto

O glicerol bruto (GB), tem inúmeras aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica após um processo de purificação de alto custo (LIN, 1977; MOTA ; PESTANA, 2011). É chamado de glicerina os produtos comerciais com mais de 95% de pureza. Quando obtido da produção de biodiesel (FIGURA 2), ao conter 80% de pureza, o produto é normalmente denominada GB (MOTA; PESTANA, 2011).

FIGURA 2: FASES DE SEPARAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BODIESEL (SUPERIOR), GLICEROL BRUTO (INTERMEDIÁRIA) E SAIS COM GLICEROL (INFERIOR) SEPARADOS PELA DENSIDADE.



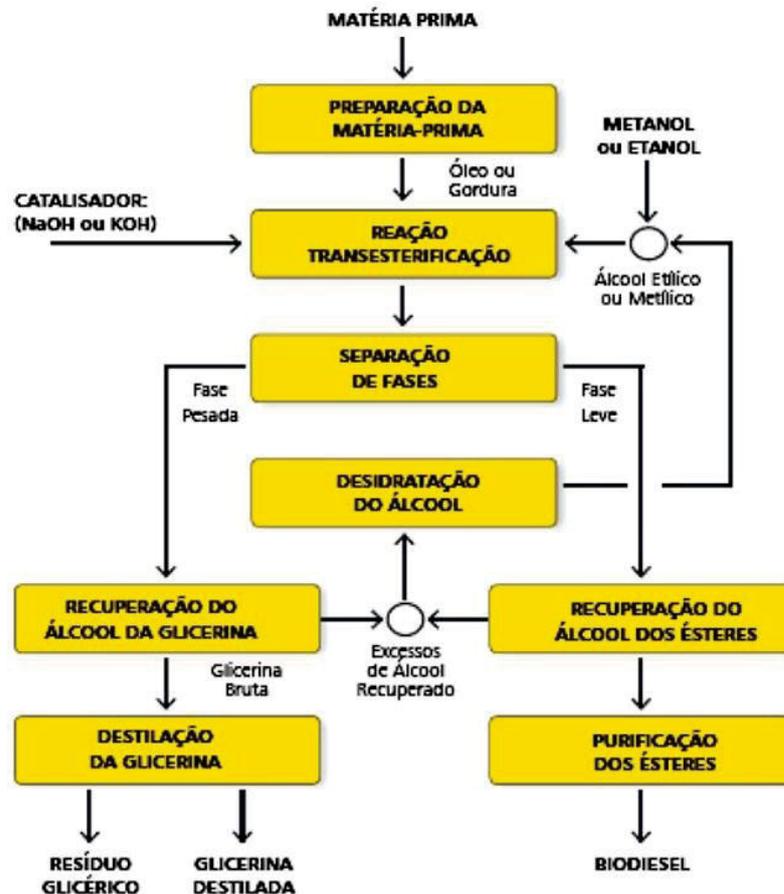
FONTE: BIOTECNOLOGIA CIÊNCIA & DESENVOLVIMENTO Nº 37.

O glicerol é nomeado pela IUPAC como 1,2,3-propanotriol, sendo um líquido à temperatura ambiente, higroscópico, viscoso, inodoro e apresentando um sabor levemente adocicado (MCGRAW-HILL, 2005).

Durante a reação de produção do biodiesel (FIGURA 3), em média, a cada 90m³ produzidos por transesterificação de óleos vegetais, são gerados em torno de

10m³ de GB, com impurezas como água, catalisador alcalino, ácidos graxos (MOTA; PESTANA, 2011), sais de neutralização, ésteres metílicos e metanol (DASARI, 2007).

FIGURA 3: FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BODIESEL.



FONTE: MANUAL DO BODIESEL/SEBRAE

A reação de produção do glicerol é balanceada da seguinte maneira: 100 kg de óleo + 10,5 kg MeOH = 100 kg ésteres de ácidos graxos (biodiesel) + 10,5 kg glicerol (Pagliaro et al., 2008). Resumidamente a produção do glicerol é: gordura + catalisador (NaOH) + metanol/etanol = ésteres de ácidos graxos + glicerol bruto + sais. Não há separação total do glicerol e dos sais.

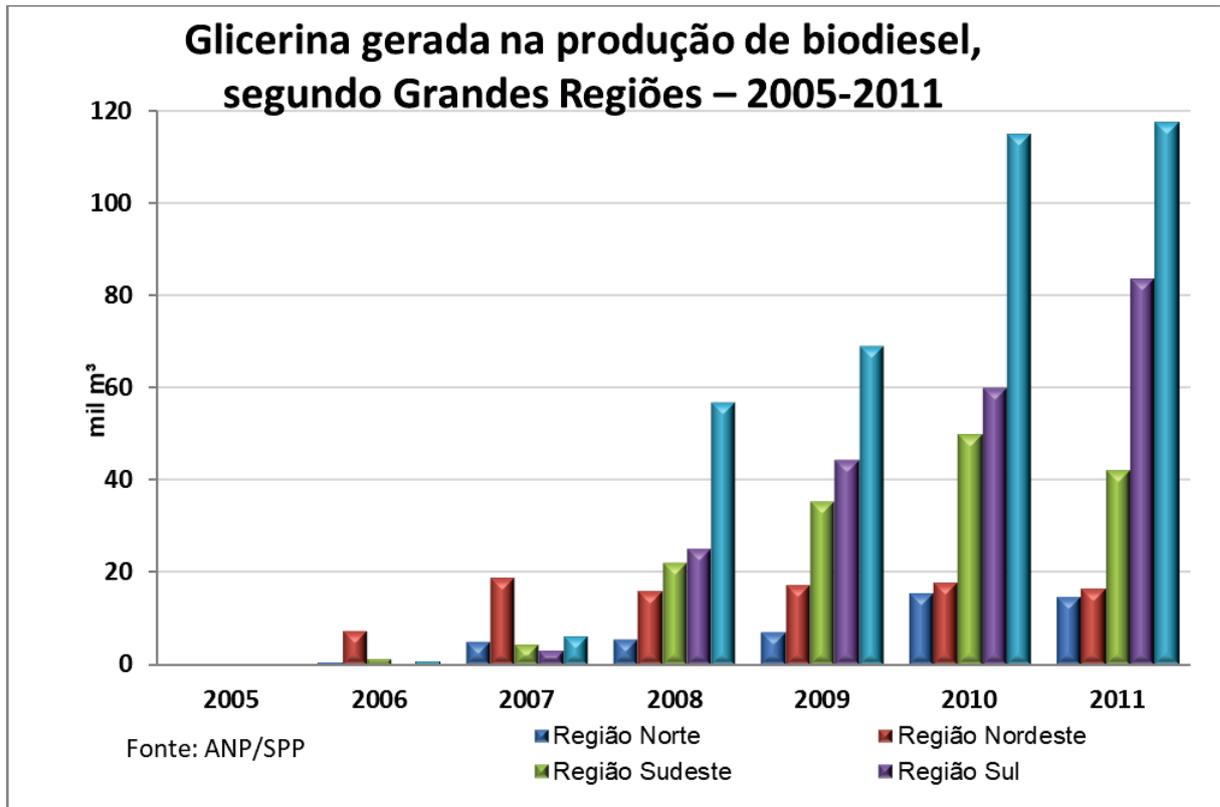
Ao final do processo de produção do Biodiesel, o glicerol em estado bruto pode passar por processos de purificação de baixo custo que deixam o produto com uma pureza média de 80 a 95%. A maior parte do glicerol utilizado hoje (97%) é de alta pureza (99,5% - 99,7%) e para este nível de pureza o custo de purificação é muito alto, fazendo com que pequenas usinas descartem o produto (BOURNAY et al., 2005).

Atualmente, existe um foco voltado para a utilização do GB como fonte de carboidrato na alimentação animal e também existe uma série de perguntas que continuam sem respostas concretas, como a sua utilização e eficácia na alimentação, é necessário que exista uma cuidadosa avaliação para que se possam determinar os prós e contras da complementação do GB na alimentação (DASARI, 2007; OLIVEIRA et al., 2013).

O glicerol no Brasil tem o seu uso regulamentado pela ANVISA Resolução nº 386, de 5 de agosto de 1999. O glicerol é intermediário de vários processos metabólicos em numerosos organismos onde sua importância é fundamental (ARRUDA et al., 2007). Considerado como um carboidrato, é recomendado que a sua utilização na ração animal deva ser monitorada em relação a qualidade do GB (DASARI, 2007). No Brasil, ainda não existe uma política alternativa para absorver esse elevado volume excedente da produção do biodiesel, além disso, os mercados tradicionais de glicerol tem uma capacidade de absorção limitada (GONÇALVES et al., 2009).

A produção brasileira de glicerina está aumentando a cada ano, devido à incorporação de biodiesel ao óleo diesel tradicional. Segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP), as regiões brasileiras apresentaram crescimento entre 2005 e 2011 conforme o gráfico da Figura 4.

FIGURA 4: GRÁFICO MOSTRANDO O CRESCIMENTO DA PRODUÇÃO DE GLICERINA ORIUNDA DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.



FONTE: ANP/SPP, RESOLUÇÃO ANP Nº 17/2004.

1.2 Cromo

O Cromo (Cr) é um elemento metálico que pertence à primeira série de elementos de transição da tabela periódica. É encontrado no ambiente em duas formas: Cr^0 (metal e ligas) e Cr^{+3} (cromo trivalente), no estado Cr^{+3} é principalmente encontrado formando complexos orgânicos e inorgânicos. Também existe na forma Cr^{+6} (cromo hexavalente), que são formas oxidadas (COTTON; WILKINSON, 1980; GREVATT, 1998).

Compostos de cromo são de grande importância para a saúde, sendo encontrado em adultos, recém-nascidos e o órgão que mais concentra Cr é o pulmão. Na forma trivalente, pode agir como suplementação nutricional, porque atua no metabolismo da glicose aumentando a captação de glicose e aminoácidos (LANGARD; COSTA, 2007). É encontrado na crosta terrestre em uma quantidade de 100 ppm e geralmente na forma de Chromita (FeOCr_2O_3) (LEONARD; LAUWERYS, 1980).

O cromo trivalente é absorvido lentamente pela inalação. Também pode ser levado para a circulação sistêmica e transferido para o trato gastrointestinal através de uma ação muco-ciliar ou manter-se no próprio pulmão. Grande quantidade do cromo absorvido é levada para os ossos, fígado, rim e baço. O cromo hexavalente é reconhecidamente uma substância carcinogênica capaz de atravessar, rapidamente, as membranas celulares, diferente do cromo trivalente, que tem uma baixa capacidade em transpor membranas e apresenta grande estabilidade (GREVATT, 1998).

Elemento essencial à nutrição de mamíferos, a sua deficiência na ingestão provoca distúrbios relacionados ao metabolismo da glicose, pois o cromo atua como potencializador da insulina, ligando-se a ela e seus receptores amplificando a sinalização intracelular o que aumenta o ganho de eficiência na utilização de proteínas e carboidratos (HERTZ et al., 1989; BARROS; SOUSA-AGUIAR, 1991).

O Óxido de Cromo III (Cr_2O_3) (Figura 5) é um importante marcador indireto utilizado em ensaios de digestibilidade, sendo incorporado ao alimento durante os ensaios. A absorção do cromo ocorre se estiver na forma solúvel (cloretos, sulfatos, nitratos), na forma insolúvel (Cr_2O_3) ele estável. Dessa forma, ele pode ser utilizado como marcador fornecido em quantidade muito superior à natural, pois atravessa o sistema digestório sem reagir, solubilizar, ou sofrer absorção, devendo ser totalmente recuperado através das fezes, inclusive sem sofrer a interferência do cromo natural, que apresenta um teor praticamente desprezível (NETO et al., 2003).

FIGURA 5: ÓXIDO DE CROMO III.



FONTE: QUIMLAB.

O óxido de cromo (III) hidratado, $\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, é obtido de um precipitado verde a partir da adição de íons OH^- a soluções de sais de Cr^{3+} . O precipitado tem um teor

variável de água e é denominado de hidróxido de cromo (III) e apresenta baixa solubilidade em água. O Cr(III) somente se apresenta na forma solúvel a valores de pH menores do que aqueles normalmente encontrados em sistemas biológicos. Os estados de oxidação podem variar de -2 a $+6$. Os estados $+3$ e $+6$ são os mais estáveis no ambiente. Sais de Cr^{3+} , ordinariamente hidratados, se assemelham muito aos do alumínio, produzindo íon na forma de sulfatos duplos com caráter alúmen. Os sais de cromo hidrolisam em solução aquosa da mesma forma que os de alumínio. O composto Cr_2O_3 é isomorfo do Al_2O_3 (BARROS; SOUSA-AGUIAR, 1991).

1.3 Bioindicadores

Estudos sobre a toxicidade de substâncias e elementos químicos apresentam grande importância, pois permitem determinar as respostas de um dado organismo a esta contaminação, permitindo avaliar o impacto e o efeito sobre células, tecidos e órgãos bem como inferir sobre possíveis perturbações metabólicas (PANDRANGI et al., 1995). Os padrões de acumulação de xenobióticos são diferentes para distintos organismos e dependem do balanço entre a taxa de assimilação e as taxas de metabolização e eliminação dos compostos químicos.

Existem diferenças nas formas de metabolizar os xenobióticos, havendo uma necessidade de se detectar e avaliar o impacto de poluentes nos organismos expostos, e não somente determinar a quantidade de poluentes presentes no ambiente. Um bom método para se estudar os efeitos tóxicos no ambiente é através de um bioindicador. Este é definido como um organismo que fornece informações sobre condições do seu habitat, que pode ser tanto pela sua presença, ausência, comportamento, fisiologia e metabolismo (VAN DER OOST et al., 2003).

Os Peixes são bioindicadores que podem ser amplamente utilizados por apresentar respostas a agentes xenobióticos muito similares ao dos grandes vertebrados. Peixes são também um dos maiores vetores de contaminantes para seres humanos, pois estão intimamente relacionados aos nossos hábitos alimentares (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

A utilização de peixes como bioindicadores para efeitos da poluição é cada vez mais importante e pode permitir a detecção de problemas de forma precoce (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Os bioindicadores também podem ser usados nas avaliações de risco, porque apresentam vantagem de possibilitar a detecção de

exposições potencialmente tóxicas bem antes que efeitos adversos maiores ocorram (NASCIMENTO; PEREIRA; LEITE, 2008; PROSPÉRI; NASCIMENTO, 2008).

1.3.1 Jundiá

O *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE), conhecido como jundiá (Figura 6), é um peixe de rápido crescimento, mesmo em temperaturas consideradas baixas, apresenta período reprodutivo amplo, não se reproduzindo apenas nos meses de inverno (junho a agosto). No sul do Brasil, sua criação vem aumentando devido a sua boa aceitação pelo mercado consumidor, tanto na pesca esportiva quanto na alimentação. O jundiá tem hábito alimentar onívoro e aproveita fontes protéicas de origem animal e vegetal (FRACALOSSO et al., 2002).

FIGURA 6: *Rhamdia quelen* (JUNDIÁ).



FONTE: O AUTOR

É encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México. Seu cultivo está se intensificando no sul do Brasil, pois sua reprodução induzida apresenta bons resultados e altas taxas de fecundação (CARVALHO et al., 2000). A espécie *Rhamdia quelen* é muito utilizada para ensaios de toxicologia (CORREA et al., 2008; KOCHHANN et al., 2009; GHISI et al., 2011). É amplamente distribuída pela América do Sul e de grande importância econômica por apresentar uma carne saborosa e com poucos espinhos (CANTON et al., 2007).

1.3.2 Pacu

O *Piaractus mesopotamicus* (CHARACIFORMES, SERRASALMINAE) também conhecido popularmente como Pacu (figura 7), é uma espécie com hábito

alimentar onívoro (TESSER et al., 2006), que apresenta facilidade de adaptação ao cultivo em tanque ou viveiro (BATISTA et al., 2000).

FIGURA 7: *Piaractus mesopotamicus* (PACU).



FONTE: O AUTOR

A quantidade de espécies tropicais nativas utilizadas em pisciculturas está aumentando no Brasil. O Pacu é uma das espécies que tem grande potencial para a piscicultura intensa e apresenta um bom índice de crescimento quando alimentado com proteína de origem vegetal (BATISTA et al., 2000).

Esta espécie é utilizada para avaliações referentes a tóxicos ambientais, por apresentar uma grande importância comercial, suportar uma considerável variação ambiental e por ser uma espécie amplamente distribuída pela América do Sul (SAMPAIO et al., 2008 e 2010; DITTMAR et al., 2010).

1.4 Biomarcadores Genéticos

Os biomarcadores são respostas biológicas de xenobióticos que podem ser mensurados indicando a presença, efeitos e, em alguns casos, o grau de contaminação (WALKER et al., 1996). Os biomarcadores genéticos como o teste do

micronúcleo, são muito utilizados para avaliar a toxicidade de xenobióticos e químicos estudados tanto no ambiente quanto em laboratório (JERBI et al., 2011). Outro teste frequentemente utilizado é o ensaio cometa, biomarcador sensível, barato e rápido, que avalia quebras não específicas ao material genético e tem sido usado em diversos tipos de estudos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

1.4.1 Micronúcleo

Heddle (1973) e Schmid (1975) propuseram independentemente um tipo de ensaio que permite a avaliação do dano ao DNA pela análise e quantificação da estrutura citoplasmática conhecida como corpúsculo de Howell-Jolly. Eles são encontrados em populações celulares em divisão e acabaram sendo denominadas como micronúcleos.

Este teste foi desenvolvido inicialmente para estudos *in vivo* dos efeitos de produtos químicos. Nas análises eram utilizadas células eritrocitárias policromáticas obtidas da medula óssea femoral de camundongos. Posteriormente começaram a se utilizar eritrócitos circulantes. Os testes são geralmente realizados com animais criados em laboratório e sob condições bem controladas (SCHMID, 1975).

O princípio do teste está baseado no fato de que, durante a anáfase, as cromátides e fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas fibras do fuso para os polos. Após a telófase, os cromossomos sem dano são incluídos no núcleo de cada uma das células filhas. Aqueles que não foram transportados pelo fuso também podem ser englobados pelos núcleos recém formados. No entanto, alguns destes fragmentos, normalmente muito pequenos, não são incluídos nestes núcleos e permanecem no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como micronúcleos (SCHMID, 1975). Assim, podemos dizer que a presença do micronúcleo na célula é diretamente relacionada às aberrações que ocorrem durante a mitose (CAVAŞ; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005).

O teste do Micronúcleo Písceo serve como passo inicial para estudar substâncias mutagênicas. Considerado um teste rápido e sensível para a detecção de quebras cromossômicas ou alterações numéricas (HEDDLE *et al.*, 1983).

São considerados micronúcleos aqueles fragmentos que são formados e estão visivelmente separados do núcleo principal da célula possuindo um tamanho correspondente de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo. Devem ainda possuir bordas e

a mesma refração do núcleo principal, porque são constituídos de material genético e devem estar corados na mesma intensidade. No caso específico de peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos cromossomos, esta proporção passa para até 1/30 do tamanho do núcleo (AL-SABTI; METCALFE, 1995; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; GUSTAVINO et al., 2001).

Como todas as técnicas laboratoriais, existem fatores que devem ser considerados na aplicação do ensaio com micronúcleos. O ensaio não é capaz de detectar as não disjunções mitóticas se estas não levarem à perda de cromossomos na anáfase, assim como não será possível detectar aberrações cromossômicas causadas por rearranjos, tais como translocações ou inversões, se estas não originarem fragmentos acêntricos. Desta forma o teste, nestes casos, apresenta uma subestimativa e falta de sensibilidade (METCALFE, 1989).

No teste do Micronúcleo Písceo (Figura 8), foram quantificados os micronúcleos encontrados, assim como as alterações morfológicas nucleares. Estas alterações foram descritas e classificadas segundo Carrasco et al., (1990), como:

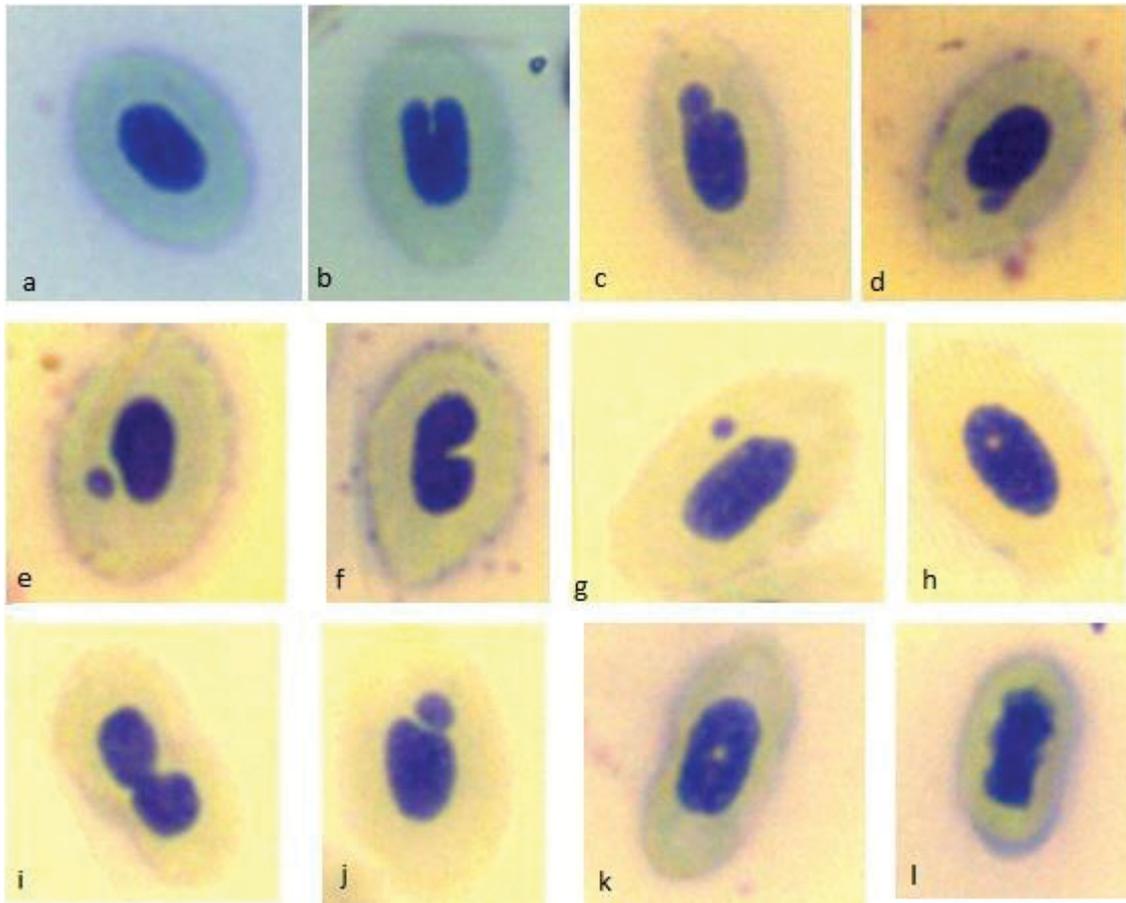
a) *Blebbbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). Os tamanhos destas evaginações situam-se na faixa de pequenas protuberâncias até estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.

b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *Blebbbed*. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.

c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.

d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Estes cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e aparentam ser delimitados pelo envelope nuclear.

FIGURA 8: FOTO MONTAGEM MOSTRANDO UMA CÉLULA NORMAL (a), BLEBBED (c, d, j), MICRONÚCLEO (e, g), VACUOLATED (h, k), NOTCHED (b, f, i) E LOBED (l).

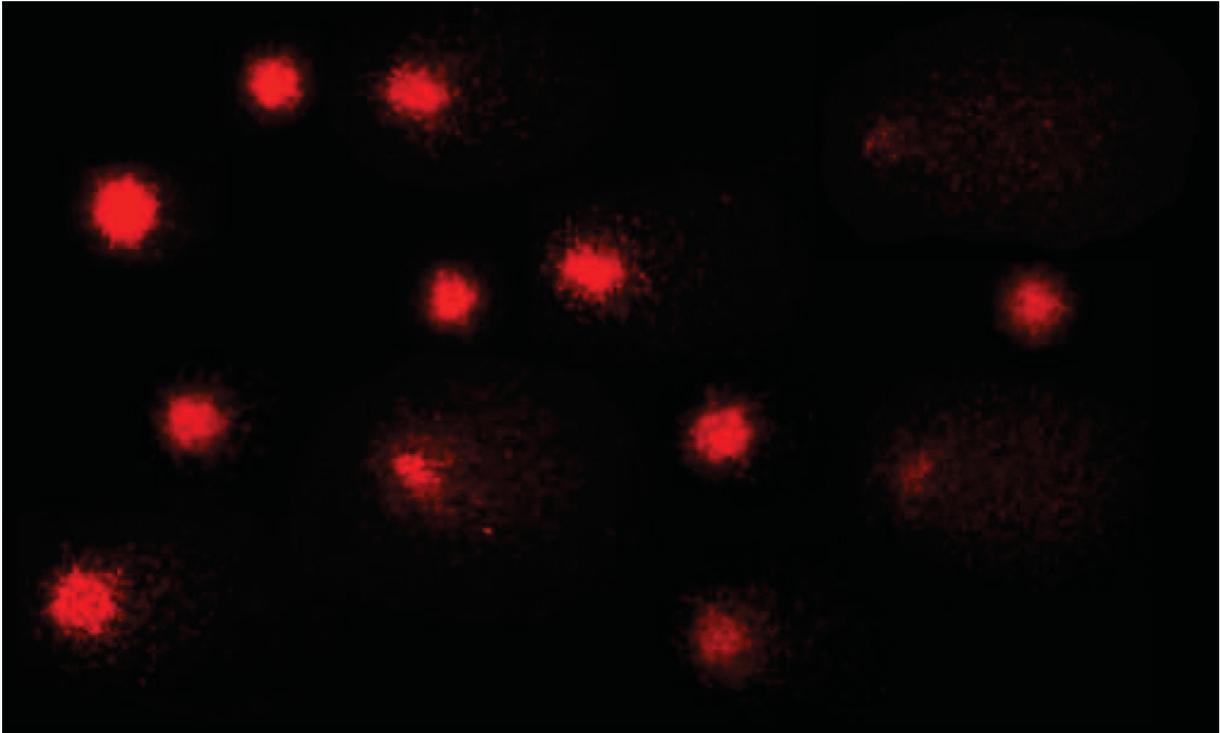


FONTE: O AUTOR.

1.4.2 Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa (Figura 9), também conhecido por SCGE (*Single-Cell Gel Electrophoresis*), é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA em células individualizadas, através de uma corrida eletroforética do material genético (SPEIT; HARTMANN, 1999).

FIGURA 9: FOTO MONTAGEM DE NUCLEÓIDES COM DIVERSOS DANOS.



FONTE: O AUTOR.

O princípio desta técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não tiver dano migrará em conjunto formando um círculo (os aspectos descritos só são visíveis após a coloração adequada). Caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores. Ocorrendo um dano muito intenso, em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então a figura típica de um cometa (OLIVE et al., 1990).

As metodologias empregadas para avaliar a extensão do dano ocasionado ao DNA são várias. Uma das medidas utilizadas na avaliação deste dano é feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão das “caudas” formadas pelo DNA em migração (classificados como Classe 0 – nenhum dano, até Classe 4 – máximo dano) e esta análise pode ser feita visualmente ou como auxílio de softwares (FERRARO, 2003).

Ao contrário de outros tipos de ensaio como o dos micronúcleos (MN), de aberrações cromossômicas (AC) ou de trocas de cromátides irmãs (SCE) que necessitam de células em proliferação para sua viabilidade, o Ensaio Cometa não

necessita desta condição podendo ser utilizado em qualquer célula nucleada (PANDRANGI et al., 1995; ROJAS et al., 1999).

Substâncias genotóxicas frequentemente são caracterizadas como tecido específicas. Por este motivo ficam evidentes as vantagens do uso do Ensaio Cometa. Como já citado anteriormente, este ensaio não depende da proliferação celular. Portanto, o tecido alvo do agente genotóxico pode ser analisado diretamente, sendo que as células danificadas podem ser analisadas individualmente (PANDRANGI et al., 1995).

2 JUSTIFICATIVA

Uma quantidade enorme de perguntas surgem sobre a utilização do GB como fonte alimentar em diversos organismos. Dentre elas: “Qual será o efeito do glicerol no metabolismo e na saúde dos animais? Qual o efeito das impurezas presentes neste produto?” (DASARI, 2007).

3 OBJETIVOS:

Avaliar a genotoxicidade do óxido de cromo III (Cr_2O_3) e do glicerol bruto (GB), isolados e em mistura, nas espécies *Rhamdia quelen* e *Piaractus mesopotamicus* submetidos a uma exposição trófica por 41 dias.

3.1 Objetivos Específicos

Avaliar a genotoxicidade do GB em cada uma das espécies (*Rhamdia quelen* e *Piaractus mesopotamicus*) utilizando os biomarcadores Ensaio Cometa (eritrócitos e hepatócitos) e o Teste do Micronúcleo Písceo.

Evidenciar os efeitos do Óxido de Cromo III ao utilizá-lo como marcador na preparação de rações para estudo de rendimento nutricional, quanto a sua genotoxicidade para cada uma das espécies (*Rhamdia quelen* e *Piaractus mesopotamicus*) utilizando os biomarcadores Ensaio Cometa (eritrócitos e hepatócitos) e o Teste do Micronúcleo Písceo.

Verificar os efeitos genotóxicos do glicerol associado ao óxido de cromo III em cada uma das espécies utilizando os biomarcadores, Ensaio Cometa (eritrócitos e hepatócitos) e o Teste do Micronúcleo Písceo.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO GLICEROL BRUTO E Cr_2O_3 ISOLADOS E EM MISTURA EM PEIXES BRASILEIROS DE INTERESSE COMERCIAL

Autores: Marques, A. E. M. L; Balen, R. E; Meurer, F; Cestari M. M.

Curitiba

2014

Introdução

Devido ao grande impacto ambiental causado pela queima dos combustíveis fósseis, a matriz energética sempre é discutida. Contudo, essa fonte energética, pode ser substituída pelos biocombustíveis. O Brasil apresenta-se como um destaque por utilizar álcool hidratado desde 1979 em veículos automotores e por introduzir o biodiesel no óleo diesel derivado de petróleo (MEURER et al., 2011). O biodiesel é um produto da transesterificação do óleo vegetal ou gordura animal que ocorre por adição de álcool (metanol ou etanol) na presença de um catalisador alcalino (NaOH ou KOH). O Glicerol Bruto (GB) é um subproduto dessa reação, gerado com várias impurezas. Dentre essas, a fase de menor densidade é onde está presente o Biodiesel, também contendo impurezas (OLIVEIRA et al., 2013).

Em média, a cada 90m³ da produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais, são gerados em torno de 10m³ de GB que é obtido apresentando impurezas como água, sais de neutralização, ésteres metílicos e metanol (DASARI, 2007). Atualmente existe um foco voltado para a utilização do GB como fonte de carboidrato na alimentação animal. Também existe uma série de perguntas que continuam sem respostas concretas, em relação a essa utilização. É necessário que exista uma cuidadosa avaliação para que seja possível determinar as vantagens e desvantagens da alimentação complementada com o GB (DASARI, 2007; OLIVEIRA et al., 2013).

O cromo é um elemento essencial à nutrição para mamíferos. A deficiência de ingestão deste elemento provoca distúrbios relacionados ao metabolismo da glicose já que este age como potencializador da insulina (HERTZ et al., 1989; BARROS; SOUSA-AGUIAR, 1991). O Óxido de Cromo III (Cr₂O₃) é um importante marcador indireto utilizado em ensaios de digestibilidade, por ser insolúvel. O Cr₂O₃ atravessa o sistema digestório sem reagir, solubilizar, ou sofrer absorção, devendo ser totalmente recuperado através das fezes, sem sofrer interferência do cromo natural (NETO et al., 2003).

Como os organismos apresentam diferenças na forma de metabolizar xenobióticos, existe a necessidade de avaliar as respostas de diferentes substâncias em organismos expostos. Um bom método para se estudar os efeitos tóxicos no ambiente é através de um bioindicador, organismo que informa sobre as condições

do seu habitat, que pode ser tanto pela sua presença, ausência e ou pelo seus comportamentos (VAN DER OOST et al., 2003). Os Peixes são bioindicadores, podendo ser utilizados amplamente por apresentar uma resposta a agentes xenobióticos muito similar ao dos grandes vertebrados. Peixes são um dos maiores vetores de contaminantes para seres humanos, pois estão intimamente relacionados aos nossos hábitos alimentares, assim, podem ser indicadores do potencial de exposição a tóxicos químicos (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Os objetivos deste trabalho foi verificar se o Glicerol Bruto e o Óxido de Cromo III, isolados e em mistura, apresentam genotoxicidade quando incorporado a dieta de peixes das espécies *Rhamdia quelen* (Jundiá) e *Piaractus mesopotamicus* (Pacu).

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram separados em duas etapas para respeitar a capacidade máxima de estocagem dos animais. Foram testados três grupos em cada etapa, sendo que a primeira consistiu dos grupos Controle Negativo 1 (CN1), Óxido de Cromo III (Cr_2O_3) com Glicerol Bruto 30% (GB) e Óxido de cromo III. A segunda etapa consistiu dos grupos Controle Negativo 2 (CN2), Glicerol Bruto 30% e Controle Positivo ($5\mu\text{g/g}$ de MMS).

- Etapa 1: CN1 + Cr_2O_3 e GB 30% + Cr_2O_3
- Etapa 2: CN2 + GB 30% + MMS

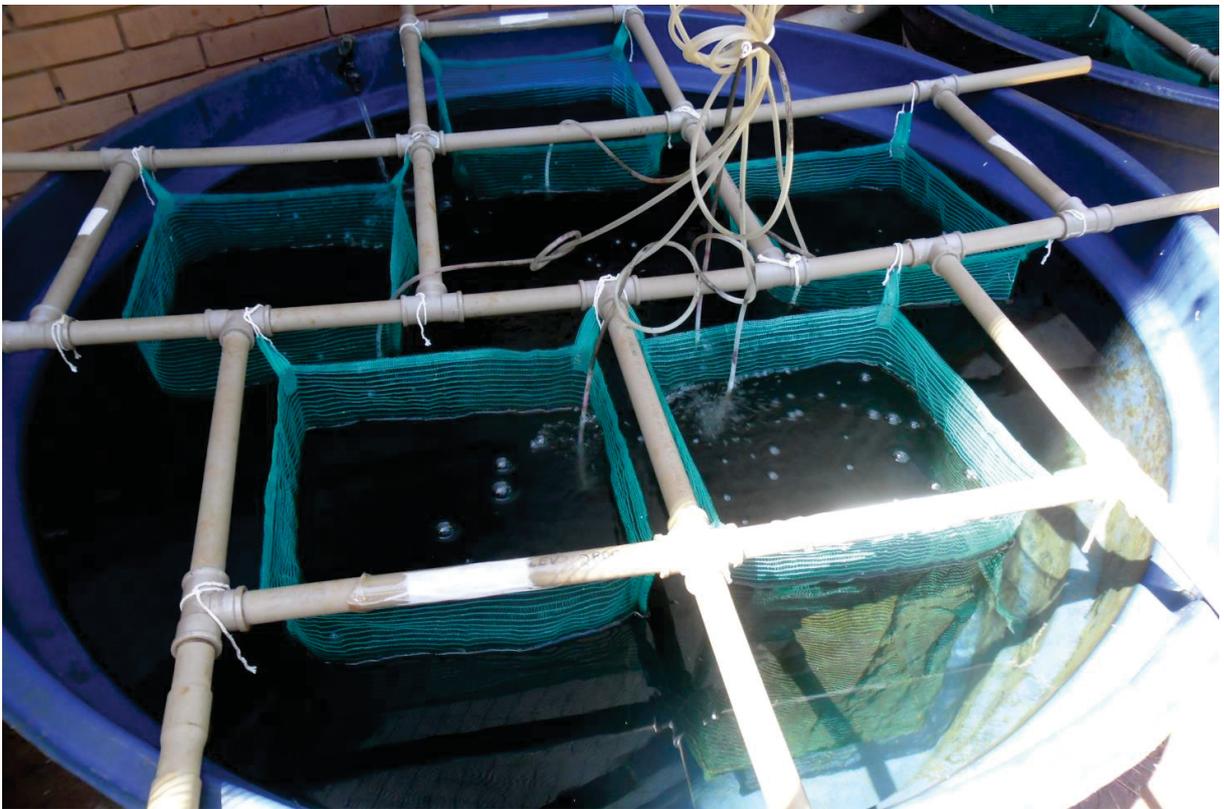
Organismos Utilizados

Foram utilizadas duas espécies de peixes: *Rhamdia quelen* (Siluriforme), popularmente conhecido como jundiá, com tamanho médio de $66,66\text{g} \pm 14,59\text{g}$ e *Piaractus mesopotamicus* (Characiforme), popularmente conhecido como Pacu, com peso médio de $114,07\text{g} \pm 21,71\text{g}$. Estes peixes foram adquiridos de duas pisciculturas no Paraná: Dall'Bosco (Toledo) e Vendrame (Palotina). Os animais foram deixados em tanques de 10.000 litros por 30 dias para aclimação e, durante este período, a

alimentação consistiu de ração comercial. Para cada grupo testado foram utilizados 15 peixes de cada espécie.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOAq) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Campus Palotina. Após o período de aclimação os animais foram remanejados para tanques de 1000 litros, sendo que cada tanque continha no máximo 30 peixes (Figura 10). Os experimentos foram realizados com duração de 41 dias onde a alimentação era disponibilizada três vezes ao dia. Todos os experimentos foram realizados no período entre os meses de novembro e março de 2011, 2012 e 2013.

FIGURA 10: UM DOS TANQUES DE MIL LITROS (1000L) ONDE FORAM REALIZADOS OS EXPERIMENTOS.



FONTE: O AUTOR.

Ração

As rações deste experimento foram feitas com base em uma “Ração Referência”, que é constituída de farelo de soja, milho, óleo de soja, fosfato bicálcico,

calcário calcítico, premix vitamínico-mineral e sal comum. Para a elaboração das rações, os ingredientes foram triturados, utilizando-se peneira de 1,0mm, posteriormente foi feita a mistura.

Foram preparadas 3 rações diferentes para testar as substâncias isoladas e em mistura, além de grupos controle negativo e positivo.

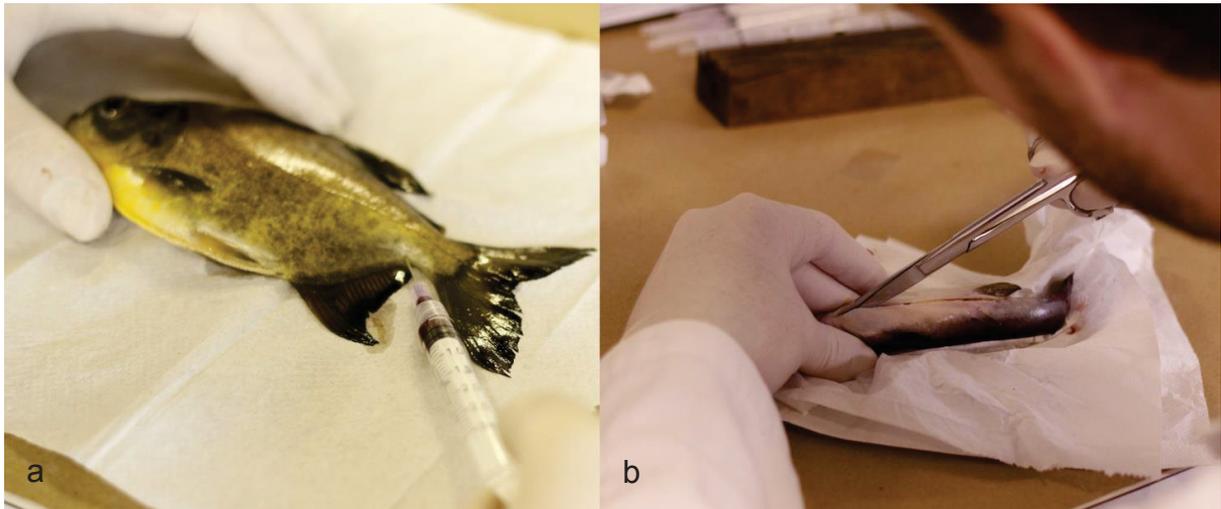
1. Ração referência (grupos controle negativo 1 e 2).
2. Ração referência complementada com 0,1% de óxido crômico (Cr_2O_3).
3. Ração referência complementada com 30% de glicerol.
4. Ração referência complementada com 0,1% de óxido crômico (Cr_2O_3) e 30% de glicerol.
5. Ração referência e injeção intraperitoneal de MMS (controle positivo).

A utilização de 30% de GB na constituição da ração é baseada na capacidade de saturação dos elementos ministrados. Nesta concentração, a estrutura física da ração não fica comprometida juntamente com o processo de peletização.

Coleta dos Tecidos.

Os animais (Figura 11) foram anestesiados com Benzocaína (100mg/L) devido ao fato deste anestésico não provocar danos ao material genético (Gontijo et al., 2003). A administração foi efetuada com uma seringa heparinizada, o sangue periférico da veia caudal foi coletado e posteriormente os animais foram sacrificados por secção medular para a retirada do fígado.

FIGURA 11: RETIRADA DO SANGUE NO PACU (a), CORTE VENTRAL PARA RETIRADA DO FÍGADO NO JUNDIÁ (b).



FONTE: O AUTOR.

Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi feito seguindo o protocolo de Speit e Hartmann (1999), com modificações segundo Cestari et al. (2004); Ferraro et al. (2004) e Ramsdorf et al. (2009). As amostras de sangue foram retiradas através de punção caudal e o tecido hepático usado foi homogeneizado com um homogeneizador Potter portátil (TECNAL, 15.000 rpm).

As lâminas, previamente cobertas com agarose NMP 1,5%, foram preparadas com 10µl de suspensão celular adicionadas a 120 µl de agarose LMP 0,5%, a 37°C. As lâminas foram deixadas, em refrigeração, em solução de lise por 7 dias. Após a lise as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal e imersas em tampão pH>13 a 4°C para deslicoidização por 30 min e posterior eletroforese a 300 mA e 25V (1V/cm) por 25min. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas 3x por 5min em tampão Tris 0.4M, pH 7.5 e fixadas em Etanol 95% por 5min.

Na coloração das lâminas, foi utilizada uma solução aquosa de Brometo de Etídio (10 µl/ml) e analisadas utilizando um microscópio de epifluorescência (Leica DMLS2) com magnificação de 400x. Para cada peixe foram analisados 100 nucleóides, que foram classificados utilizando a classificação visual segundo Collins et al., (1997), onde o escore atribuído variou entre: 0, 1, 2, 3 e 4 (0 significando sem dano e 4 significando dano máximo).

Micronúcleo Písceo e Alterações Morfológicas

Para verificar a frequência de micronúcleos em hemácias periféricas, foi empregada a técnica descrita por Heddle (1973) e Schmid (1975), com modificações segundo FERRARO et al., (2004).

Foi confeccionada uma lâmina por animal com o esfregaço do sangue periférico, que após a secagem foram fixadas em etanol 95% por 30 min. As lâminas foram coradas com Giemsa 6% em tampão fosfato pH 6,8 por 12min. Para cada exemplar foram analisadas 2.000 células em microscopia de luz, com magnificação de 1.000x. Os micronúcleos e alterações foram contados segundo (Carrasco et al., 1990).

Controle Positivo

O grupo controle positivo foi feito segundo Mouchet et al., (2005), utilizando MMS (Metanossulfonato de metila) para indução de danos ao DNA. A dose foi adequada para a utilização em peixes por via intraperitoneal (5 µg/g) e a aplicação ocorreu 24h antes da coleta do material.

Análise Estatística

O teste de Kruskal Wallis para dados não paramétricos foi empregado para verificar diferenças entre os grupos analisados, o nível de significância considerado foi $p < 0,05$. O programa BioEstat 5.0 foi utilizado para as análises estatísticas.

RESULTADOS

Glicerol

O Glicerol Bruto (GB), foi analisado pela empresa BSBIOS (Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A). Segundo a empresa o GB apresenta de 82% a

85% de pureza, 5,5% em cloretos, de 5% a 5,5% de cinzas e de 10% a 13% de umidade.

Rhamdia quelen (Jundiá)

No ensaio cometa, eritrócitos (Figura 12) e hepatócitos (Figura 13), foram obtidos resultados semelhantes para a espécie *Rhamdia quelen*. Observou-se, na primeira etapa (Figura 12a e 13a), que o grupo controle 1 apresentou menores danos que os grupos compostos por óxido de cromo e glicerol + óxido de cromo. Na segunda etapa (Figura 12b e 13b), os grupos controle 2 e exposto ao glicerol não apresentaram diferenças entre si, apenas o grupo controle positivo com MMS, apresentou diferença devido ao seu escore mais elevado. Foram utilizados dois grupos controle devido as etapas ocorrerem em tempos distintos.

FIGURA 12: ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE *Rhamdia quelen* (a) PRIMEIRA ETAPA e (b) SEGUNDA ETAPA. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS.

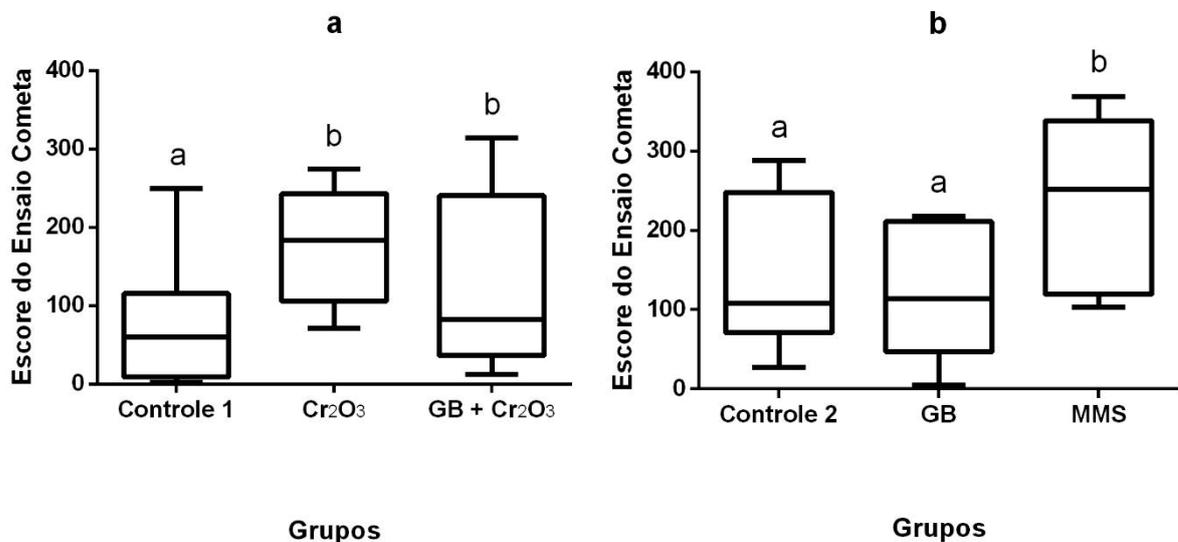
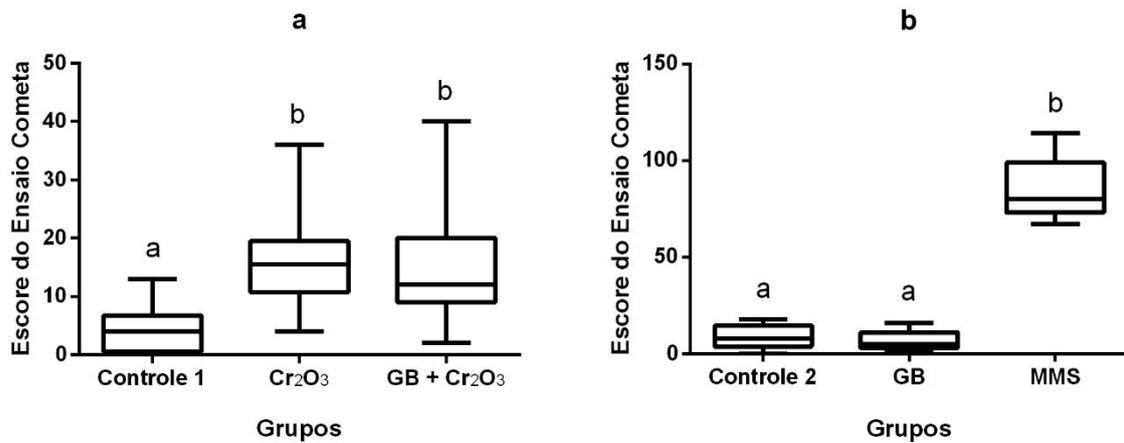


FIGURA 13: ENSAIO COMETA EM HEPATÓCITOS DE *Rhamdia quelen* (a) PRIMEIRA ETAPA e (b) SEGUNDA ETAPA. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS.



Micronúcleo

No teste do micronúcleo písceo (Figura 14 e Tabela 2), foram analisadas 2000 células eritrocitárias por indivíduo, contabilizando micronúcleos e alterações morfológicas nucleares. Na primeira etapa o grupo controle 1 apresentou diferença em relação aos demais grupos (óxido de cromo e óxido de cromo + glicerol), devido ao maior número de alterações encontradas. Na segunda etapa os grupos não apresentaram diferença.

FIGURA 14: MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM *Rhamdia quelen* (a) PRIMEIRA ETAPA e (b) SEGUNDA ETAPA. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS

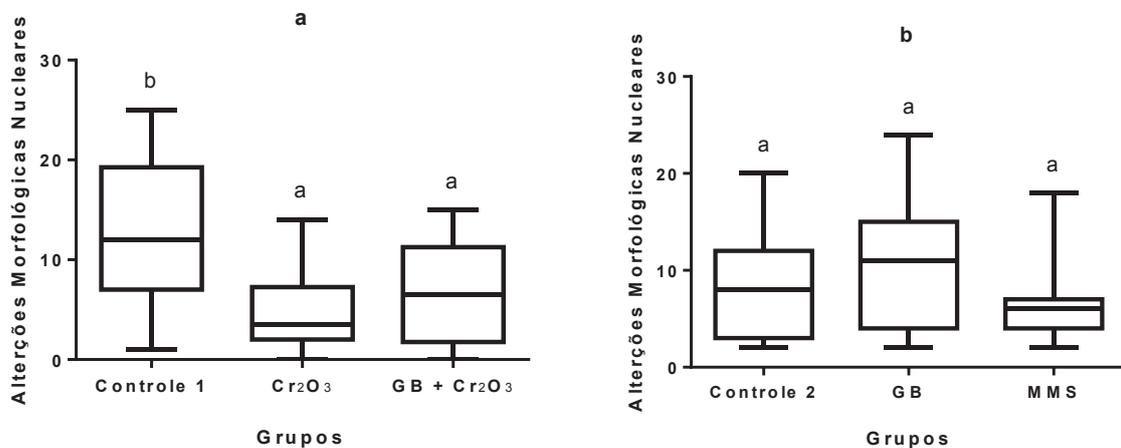


TABELA 2: RESULTADO DA ANÁLISE ENTRE ALTERAÇÕES DE CADA GRUPO E COMPARADAS ENTRE ELES.

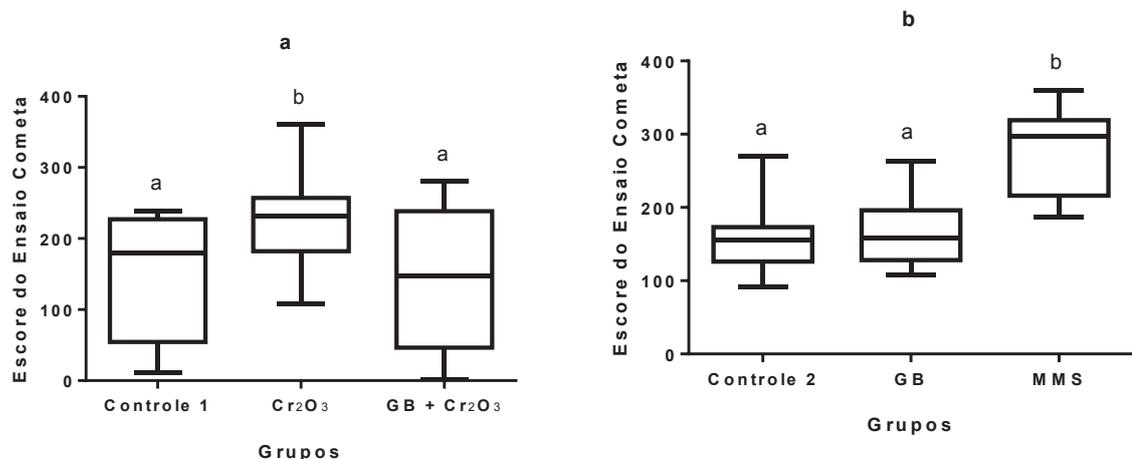
| Rhamdia quelen | Etapa | Grupos | MN | Blebbed | Lobed | Notched | Binucleus | Vacuolated |
|------------------|--------------|------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|
| | 1 | Controle 1 | | 0 (0-0) ^a | 1 (0-1) ^{ab} | 0 (0-0) ^a | 1 (0-3) ^b | 0 (0-0) ^a |
| Óxido de Cromo | | | 0 (0-0) ^a | 0 (0-1) ^a | 0 (0-1) ^a | 0 (0-1) ^a | 0 (0-0) ^a | 2 (1-5) ^{b D} |
| Glicerol + Cr2O3 | | | 0 (0-0) ^a | 0 (0-1) ^{ab} | 0 (0-0) ^a | 1 (0-2) ^{bc} | 0 (0-0) ^a | 5 (1-7) ^{c D} |
| | | | MN | Blebbed | Lobed | Notched | Binucleus | Vacuolated |
| 2 | Controle 2 | | 0 (0-0) ^a | 0 (0-0) ^a | 0 (0-0) ^a | 0 (0-2) ^a | 0 (0-0) ^a | 6 (3-11) ^b |
| | Glicerol 30% | | 0 (0-0) ^a | 0 (0-0) ^a | 0 (0-0) ^a | 0 (0-1) ^a | 0 (0-0) ^a | 9 (4-14) ^b |
| | MMS | | 0 (0-0) ^a | 0 (0-0) ^a | 0 (0-0) ^a | 0 (0-1) ^a | 0 (0-0) ^a | 5 (4-6) ^b |

Resultados mostrando: mediana (1° e 3° Quartis). Letras diferentes indicam diferença entre Linhas (Alfabeto Latino) e entre colunas (Alfabeto Grego).

Piaractus mesopotamicus (Pacu)

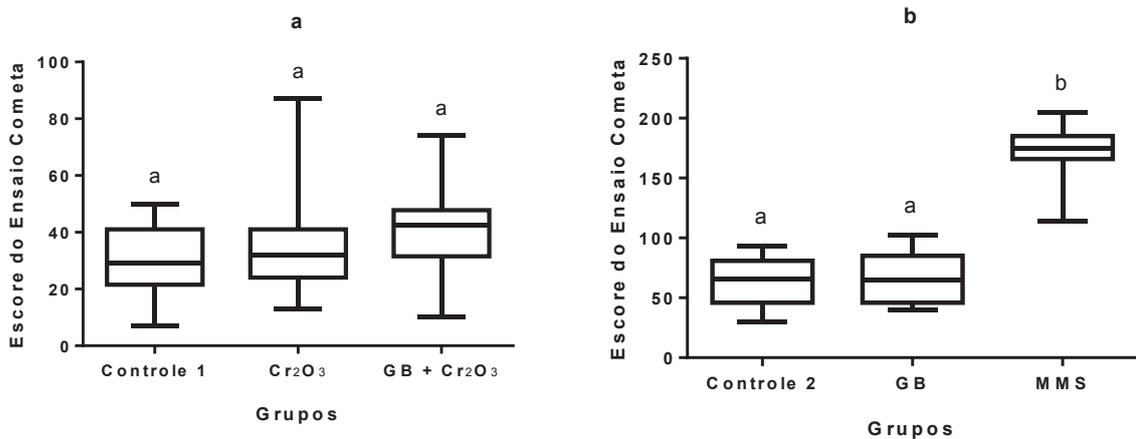
No ensaio cometa com eritrócitos (Figura 15a), na primeira etapa, o grupo tratado com óxido de cromo (isolado) apresentou mais danos que o grupo controle 1 e o grupo com óxido de cromo + glicerol; na segunda etapa (Figura 15b), o grupo controle 2 e o grupo glicerol (isolado) não apresentaram diferença entre si, havendo diferença apenas quando os grupos foram comparados com o controle positivo com MMS, que apresentou maior escore de danos.

FIGURA 15: ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITO DE *Piaractus mesopotamicus* (a) PRIMEIRA ETAPA e (b) SEGUNDA ETAPA. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS.



No ensaio cometa para células hepáticas (Figura 16), na primeira etapa (a) não houve diferença entre os grupos testados; na segunda etapa (b) o grupo controle 2 não apresentou diferença em relação ao grupo com glicerol e o controle positivo com MMS foi diferente dos demais porque apresentou um escore mais elevado.

FIGURA 16: ENSAIO COMETA DE HEPATÓCITOS EM *Piaractus mesopotamicus* (a) PRIMEIRA ETAPA e (b) SEGUNDA ETAPA. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS.



No teste do micronúcleo píficeo (Figura 17 e Tabela 3), foram analisadas 2000 células eritrocitárias por indivíduo, contabilizando micronúcleos e alterações morfológicas nucleares. Na primeira e segunda etapa, não foram observadas diferenças entre os grupos. O grupo controle positivo com MMS, não apresentou um aumento significativo na frequência de micronúcleos e das alterações morfológicas nucleares.

FIGURA 17: MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM PACU (*Piaractus mesopotamicus*) (a) PRIMEIRA ETAPA e (b) SEGUNDA ETAPA.

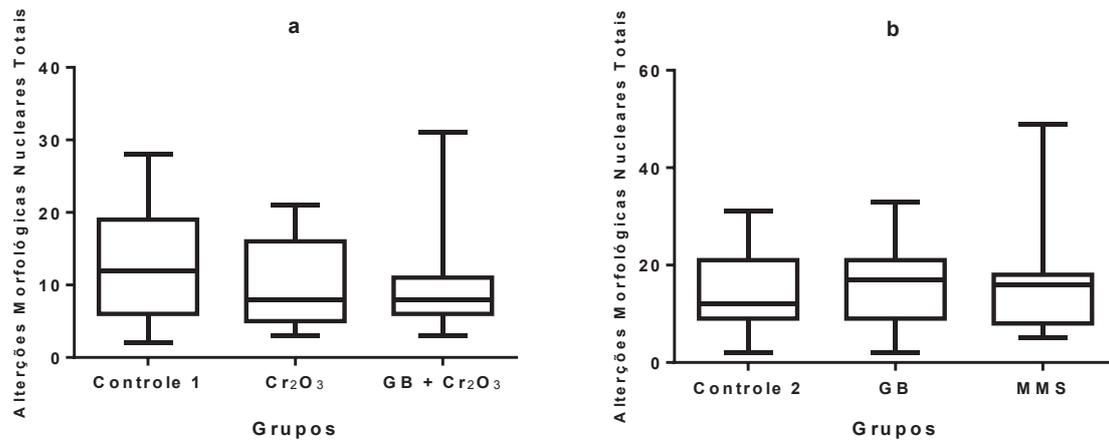


TABELA 3: ANÁLISE ENTRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES E MICRONÚCLEO (MN) DE CADA GRUPO E COMPARAÇÃO ENTRE ELES.

| <i>Piaractus mesopotamicus</i> | Etapa | Grupos | MN | Blebbbed | Lobed | Notched | Binucleus | Vacuolated |
|--------------------------------|--------------|------------|-----------------------|----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| | 1 | Controle 1 | | 0 (0-0) ^a | 0 (0-1) ^a | 0 (0-0) ^a | 8 (4-11) ^c | 0 (0-0) ^a |
| Óxido de Cromo | | | 0 (0-1) ^{ab} | 1 (0-2) ^b | 0 (0-0) ^a | 6 (3-11) ^c | 0 (0-0) ^a | 0 (0-2) ^{ab} |
| Glicerol + Cr2O3 | | | 0 (0-0) ^a | 1 (0-2) ^b | 0 (0-0) ^a | 5 (3-7) ^c | 0 (0-0) ^a | 1 (0-2) ^b |
| | | | MN | Blebbbed | Lobed | Notched | Binucleus | Vacuolated |
| 2 | Controle 2 | | 0 (0-0) ^a | 1 (0-2) ^b | 0 (0-0) ^a | 11 (5-17) ^c | 0 (0-0) ^a | 1 (0-2) ^b α |
| | Glicerol 30% | | 0 (0-0) ^a | 0 (0-1) ^a | 0 (0-0) ^a | 14 (7-18) ^c | 0 (0-1) ^a | 1 (1-3) ^b α β |
| | MMS | | 0 (0-1) ^a | 0 (0-1) ^a | 0 (0-0) ^a | 8 (2-11) ^b | 0 (0-0) ^a | 4 (1-9) ^b β |

Resultados mostrando: mediana (1º e 3º Quartis). Letras diferentes indicam diferença entre Linhas (Alfabeto Latino) e entre colunas (Alfabeto Grego).

DISCUSSÃO

Schröder e Südekum (1999), estudando três tipos de glicerol, classificaram-nos em três categorias de pureza (baixa, média e alta), com variações nas concentrações de água, fósforo, metanol e glicerina em sua composição (Tabela 5). A classificação principal é dada pelo teor de glicerina encontrada na amostra.

TABELA 4: COMPOSIÇÕES QUÍMICAS DO GLICEROL.

| Pureza da Glicerina | | | |
|---|--------|--------|-------------------|
| Água % | Baixa | Média | Alta |
| | | 26.8 | 1.1 |
| Composição da matéria seca ¹ % | | | |
| Glicerina | 63.3 | 85.3 | 99.8 |
| Extrato estéreo | 0.71 | 0.44 | n.a. ² |
| P | 1.05 | 2.36 | n.a. |
| N | 2.2 | 2.33 | n.a. |
| Na | 0.11 | 0.09 | n.a. |
| Pb | 0.0003 | 0.0002 | n.a. |
| Metanol | 26.7 | 0.04 | n.a. |

Fonte: Adaptado de Schröder & Südekum (1999).

¹Concentrações de cádmio, mercúrio e arsênico ficaram abaixo do nível de detecção.

²Não analisado.

O Glicerol Bruto (GB), utilizado no presente trabalho, ficou enquadrado dentro do grau de pureza média (Schröder; Südekum, 1999), por possuir concentração média de 82% à 85% de glicerina, sendo o restante do produto fracionado em H₂O (~10%) e catalisador NaOH (~5,5%). As cinzas deste material são obtidas pela queima total da matéria orgânica (mufla a 550°C/4h) (Tabela 4).

O GB da empresa BSBIOS foi analisado por Meurer et al. (2011), como fonte de energia para Tilápia do Nilo, concluindo que existe um bom potencial para a sua utilização como complementação alimentar devido a sua alta digestibilidade (89%) e pelo seu rendimento energético de 13,09 MJ Kg⁻¹.

No presente trabalho, as espécies *Rhamdia quelen* e *Piaractus mesopotamicus*, foram alimentadas com ração complementada com 30% de GB 3x ao dia *Ad libitum*, durante 41 dias.

Os resultados obtidos indicam que a ração preparada com 30% de Glicerol Bruto (GB) não apresenta genotoxicidade aparente para nenhuma das espécies estudadas. A absorção do glicerol é realizada diretamente do intestino para a corrente sanguínea e consecutivamente metabolizado no fígado para a síntese de glicose (LIN, 1977).

Em diversos trabalhos o GB está sendo utilizado como fonte alternativa para composição de rações (ABDALLA et al., 2008; BERENCHTEIN et al., 2010; FERNANDO et al., 2006; LI et al., 2010; SILVA et al., 2013). Nestas pesquisas, a

recomendação média de GB na constituição das rações fica em torno de 10%, sem prejudicar o crescimento e consequente ganho de peso do animal.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de etanol, este pode ser um substituto do metanol (álcool preferencialmente usado na reação de transesterificação) na produção do biodiesel (RENATO et al., 2007). A substituição do metanol por etanol seria uma vantagem por diminuir a toxicidade do GB. Na forma de produção atual são obtidos subprodutos com catalisadores (hidróxido de sódio ou potássio) e resquícios de metanol que, durante o processo térmico da produção da ração, sofre evaporação (LI et al., 2010). Porém, para a utilização onde o GB não passe por um processamento térmico, a reação utilizando o álcool etílico seria mais recomendada.

Na espécie *Rhamdia quelen* observamos que na primeira etapa dos ensaios o grupo controle apresentou uma quantidade maior de alterações morfológicas nucleares em relação os demais grupos analisados. Essa espécie é conhecida por apresentar um nível basal de alterações elevado (FERRARO, 2009; PIANCINI, 2011). Pode-se notar que a espécie apresenta um número basal de alterações morfológicas nucleares do tipo *vacuolated* muito elevado, demonstrando ser esta a alteração mais recorrente.

A incorporação de GB na complementação de rações para pisciculturas é uma alternativa viável para redução dos custos na alimentação. No presente trabalho, as espécies analisadas não apresentaram alteração para o máximo suportado pela estrutura física da ração. Trabalhos recentes (SILVA et al., 2013; LI et al., 2010), recomendam que 10% de GB seja o máximo adicionado a ração, desta forma, aumentando a margem de segurança na utilização deste produto.

Em estudo sobre a biodisponibilidade e toxicidade de vários compostos de cromo, o autor, Hedberg et al. (2010) constatou que o Cr_2O_3 provocou hemólise. O mecanismo causador desse efeito não é conhecido. Entretanto, esta pode ser relacionada a uma das causas da frequência reduzida de alterações morfológicas nucleares (AMN) encontradas nos grupos tratados com esse elemento em nosso trabalho. Essa redução foi significativa para a espécie *Rhamdia quelen* (Jundiá).

Na espécie, *Piaractus mesopotamicus* (Pacu), a primeira etapa de ensaios não mostrou diferença significativa entre o grupo controle e os dois grupos contendo óxido de cromo, porém é possível notar uma clara tendência de redução das

frequências de AMN nos dois grupos. Nesta espécie os níveis basais de AMN mostrou uma incidência maior do tipo *notched*. Na segunda etapa, do presente trabalho, o teste do micronúcleo não mostrou diferença entre nenhum dos três grupos analisados nas duas espécies, mas pudemos notar que houve um aumento significativo de alteração *vacuolated* no grupo controle positivo, provavelmente provocada pela ação do agente alquilante MMS. Em estudo com *Danio rerio*, Faßbender e Braunbeck (2013), os expuseram por duas semanas, em diversas concentrações de MMS e observaram que independente da concentração houve aumento do número de micronúcleos nos tecidos analisados. Em razão do curto tempo e para somente uma injeção não houve diferença entre os grupos no teste do Micronúcleo Písceo.

Os autores Shiau e Shy (1998), testaram duas concentrações de Cr_2O_3 (0,5% e 2%) baseando-se nos níveis mais utilizados na literatura e obtiveram diferentes respostas quando compararam as doses aplicadas na alimentação de tilápias. A menor concentração (0,5%) proporciona aumento no ganho de peso e na deposição de proteínas, já a maior concentração mostra-se prejudicial ao rendimento nutricional em todos os aspectos analisados, além de causar um grande acúmulo de Cromo nos órgãos como fígado, intestino e rim. A concentração de 2% também mostrou interferência na eficiência da absorção de nutrientes.

O óxido de cromo III é caracterizado pela sua insolubilidade em pH fisiológico, porém esse óxido apresenta uma boa solubilidade em pH ácido (SILVA; PEDROZO, 2001). Essa característica pode ser levada em consideração com o tipo de sistema digestório de cada espécie. Portanto entre as diferentes espécies de peixes pode haver uma grande variação de pH estomacal devido aos diferentes hábitos alimentares. Essa característica pode influenciar na dissociação do cromo no organismo o que poderia provocar diferentes respostas para as diferentes espécies.

O Piavuçu (Characiforme), apresenta hábito herbívoro com estruturas de mastigação especializadas e obtém uma máxima nutrição através da trituração completa dos alimentos (ROTTA, 2003), hábito muito semelhante ao do Pacu. No trabalho de Neto et al. (2003) onde o Piavuçu é utilizado para verificar a marcação com o Cr_2O_3 , o autor conclui que não há interferência nos valores do coeficiente de digestibilidade aparente da fração proteica para a espécie e conclui que esse óxido não é absorvido pelo animal. Essa resposta pode estar ligada ao tipo de pH estomacal

da espécie, pois a facilidade de absorção de metais está diretamente ligada a um baixo pH estomacal (LI et al., 2009).

O Bagre-de-canal (Siluriforme) apresenta hábito alimentar onívoro e pH estomacal podendo chegar a 2 (ROTTA, 2003). Esta espécie pode ser comparado ao Jundiá que, conseqüentemente, apresentaria um pH estomacal baixo, fazendo o nível de dissociação do óxido de cromo aumentar juntamente com a sua absorção, para esta espécie. Esse pH baixo corrobora com os resultados do ensaio cometa para esta espécie.

Na primeira etapa, a espécie *Rhamdia quelen* (Siluriforme) apresentou aumento de danos para os dois grupos onde a ração foi implementada com o cromo, tanto para o sangue quanto para hepatócitos.

Dietas com carboidratos podem favorecer um significativo aumento da quantidade de cromo em órgãos como fígado e rim (SEABORN; STOECKER, 1989). Esse aumento da quantidade de cromo no fígado pode estar relacionado com o aumento de danos neste mesmo órgão para a espécie *Rhamdia quelen*.

Para a espécie *Piaractus mesopotamicus* (Characiforme), não houve aumento nos danos dos hepatócitos para nenhuma das rações implementadas com o Cr_2O_3 , na primeira etapa. Esta espécie só apresentou danos elevados no ensaio cometa de eritrócitos para o grupo alimentado com Cr_2O_3 isolado. Essa resposta pode demonstrar que, mesmo para essa espécie, existe uma pequena absorção do Cr_2O_3 .

CONCLUSÃO

A utilização de 30% de Glicerol Bruto na constituição da ração não apresentou genotoxicidade para as espécies *Rhamdia quelen* e *Piaractus mesopotamicus*. O GB demonstra ter um grande potencial para a sua utilização como fonte alternativa de energia na constituição de rações para pisciculturas.

O Óxido de Cromo III, apresentou toxicidade para a espécie *Rhamdia quelen* no ensaio cometa com sangue periférico e células do fígado, nos dois grupos em que estava presente.

A espécie *Piaractus mesopotamicus*, só apresentou diferença na quantidade de danos no ensaio cometa com eritrócitos no grupo com o Cr_2O_3 isolado, indicando

uma possível diferença na metabolização do óxido de cromo III dentro das duas espécie analisadas.

As respostas entre as duas espécies, mostra que os metabolismos podem apresentar diferentes níveis de tolerância. Isso demonstra a importância da utilização de outras espécies para análises toxicológicas, pois respostas diferenciadas podem auxiliar na compreensão da ação dos agentes xenobióticos.

Em trabalhos futuros com o Glicerol Bruto, devemos analisar, também, a toxicidade com diferentes tipos de biomarcadores e bioindicadores. Apesar dos resultados positivos para a utilização do Glicerol Bruto na alimentação em pisciculturas, não podemos deixar de investigar todas as possibilidades de interação com os organismos.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. L.; CLETO, J.; ANTONIO, F.; et al. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, 2008.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation research**, v. 343, n. 2-3, p. 121–35, 1995.
- ARRUDA, P.; RODRIGUES, R.; FELIPE, M. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, v. 26, n. 3, p. 56–62, 2007.
- AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation research**, v. 467, n. 2, p. 177–86, 2000.
- BARROS, MARIA ANGÉLICA SIMÕES DORNELLAS DE; FALABELLA SOUSA-AGUIAR, E. O Elemento Cromo e Suas Características. **CAPÍTULO I**. p.3–7, 1991.
- BATISTA, J.; FERNANDES, K.; CARNEIRO, D. J.; SAKOMURA, N. K. Sources and Levels of Crude Protein in Diets for Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Fingerlings. **Rev. bras. zootec.**, v. 29, n. 3, p. 646–653, 2000.
- BERENCHTEIN, B.; COSTA, L. B.; BRAZ, D. B.; et al. Revista Brasileira de Zootecnia Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento e terminação. p. 1491–1496, 2010.
- BOURNAY, L.; CASANAVE, D.; DELFORT, B.; HILLION, G.; CHODORGE, J. A. New heterogeneous process for biodiesel production: A way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants. **Catalysis Today**, v. 106, n. 1-4, p. 190–192, 2005.
- CANTON, R.; WEINGARTNER, M.; FRACALOSSO, D. M.; FILHO, E. Z. Revista Brasileira de Zootecnia Influência da frequência alimentar no desempenho de juvenis de jundiá Effect of feeding frequency on performance of jundiá juveniles, 2007.
- 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, n. 11, p. 2123–2136, 1990.
- CARVALHO, L. DE; JAQUELINE, G.; GOLOMBIESKI, I.; et al. BIOLOGIA DO JUNDIÁ *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). , p. 179–185, 2000.
- CAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 74, n. 3, p. 264–71, 2005.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; ALBERTO, C.; et al. 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. 274, p. 270–274, 2004.

CORREA, L. M.; KOCHHANN, D.; BECKER, A. G.; et al. Biochemistry, cytogenetics and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 88, n. 4, p. 250–6, 2008.

COTTON, F. A.; WILKINSON, G. **ADVANCED INORGANIC CHEMISTRY**. Fourth Edi ed. John Wiley & Sons, 1980.

DANTE, L.; PIANCINI, S. **Utilização De Biomarcadores Genéticos Na Avaliação Aguda Do Efeito Mutagenico Dos Contaminantes Atrazina E Cloreto De Cobre Em *Rhamdia quelen* (Siluriformes , Heptapteridae).** Universidade Federal do Paraná, 2011.

DASARI, M. Crude glycerol potential described. **Feedstuffs Reprint**, v. 79, n. 43, p. 1–3, 2007.

DITTMAR, É.; SILVA, H.; FILHO, R. C. Associação entre o desenvolvimento gonadal ea frequência de micronúcleos em eritrócitos de pacus (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Agrarian**, p. 152–161, 2010.

FAßBENDER, C.; BRAUNBECK, T. Assessment of genotoxicity in gonads, liver and gills of zebrafish (*Danio rerio*) by use of the comet assay and micronucleus test after in vivo exposure to methyl methanesulfonate. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 91, n. 1, p. 89–95, 2013.

FERNANDO, J.; MENTEN, M.; MIYADA, V. S.; BERENCHTEIN, B. **GLICEROL NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL**. ESALQ/USP ,2006.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação Do Efeito Mutagênico Do Tributilestanho (Tbt) E Do Chumbo Inorgânico (Pb II) Em *Hoplias malabaricus* (Pisces) Através Dos Ensaio: Cometa, Micronúcleo E De Aberrações Cromossômicas**, Universidade Federal do Paraná, 2003.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação De Três Espécies De Peixes *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, Como Potenciais Bioindicadores Em Sistemas Hídricos Através Dos Ensaio: Cometa E Dos Micronúcleos**, Universidade Federal do Paraná, 2009.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. D. O.; 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. 107, p. 103–107, 2004.

FRACALOSSO, D.; FILHO, E. Z.; MEURER, S. No rastro das espécies nativas. **Panorama da Aqüicultura**, p. 43–49, 2002.

GARCIA SAMPAIO, F.; DE LIMA BOIJINK, C.; TIE OBA, E.; et al. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 147, n. 1, p. 43–51, 2008.

GHISI, N. D. C.; RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; et al. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 180, n. 1-4, p. 589–99, 2011.

GONÇALVES, B. R. L.; PEREZ, L.; ÂNGELO, A. C. D. Glicerol : Uma Inovadora Fonte de Energia Proveniente da Produção de Biodiesel. , p. 1–6, 2009.

GREVATT, P. Toxicological Review of Trivalent Chromium. **U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC**, , n. 16065, p. 1–44, 1998.

GUSTAVINO, B.; SCORNAJENGHI, K. A; MINISSI, S.; CICCOTTI, E. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicine. **Mutation research**, v. 494, n. 1-2, p. 151–9, 2001.

HEDBERG, Y.; GUSTAFSSON, J.; KARLSSON, H. L.; MÖLLER, L.; ODNEVALL WALLINDER, I. Bioaccessibility, bioavailability and toxicity of commercially relevant iron- and chromium-based particles: in vitro studies with an inhalation perspective. **Particle and fibre toxicology**, v. 7, p. 23, 2010.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation research**, v. 18, n. 2, p. 187–90, 1973.

HEDDLE, J. A; HITE, M.; KIRKHART, B.; et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation research**, v. 123, n. 1, p. 61–118, 1983.

HERTZ, Y.; MADAR, Z.; HEPHER, B.; GERTLER, A. Glucose metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio*): the effects of cobalt and chromium. **Aquaculture**, v. 76, n. 3-4, p. 255–267, 1989.

JERBI, M. A.; OUANES, Z.; BESBES, R.; ACHOUR, L.; KACEM, A. Single and combined genotoxic and cytotoxic effects of two xenobiotics widely used in intensive aquaculture. **Mutation research**, v. 724, n. 1-2, p. 22–7, 2011.

KOCHHANN, D.; PAVANATO, M. A; LLESUY, S. F.; et al. Bioaccumulation and oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. **Chemosphere**, v. 77, n. 3, p. 384–91, 2009.

LANGARD, S.; COSTA, M. Chapter 24 - Chromium. In: G. F. Nordberg; B. A. Fowler; M. Nordberg; L. T. Friberg (Eds.); **Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)**. Third Edit ed., p.487–510, 2007.

LEONARD, A.; LAUWERYS, R. Carcinogenicity and mutagenicity of chromium. **Mutation research**, v. 76, p. 227–239, 1980.

LI, J. S.; LI, J. L.; WU, T. T. Effects of non-starch polysaccharides enzyme, phytase and citric acid on activities of endogenous digestive enzymes of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 415–420, 2009.

LI, M. H.; MINCHEW, C. D.; OBERLE, D. F.; ROBINSON, E. H. Evaluation of Glycerol from Biodiesel Production as a Feed Ingredient for Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. 1, p. 130–136, 2010.

LIN, E. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual review of biochemistry**, v. 46, p. 765–795, 1977.

MCGRAW-HILL. **Glycerol**. **McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology**. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2005.

METCALFE, C. D. Testes for Predicting Carcinogenicity in Fish. **CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences**, v. 1, p. 111–129, 1989.

MEURER, F.; FRANZEN, A.; PIOVESAN, P.; ROSSATO, K. A.; SANTOS, L. D. DOS. Apparent energy digestibility of glycerol from biodiesel production for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). **Aquaculture Research**, p. 1–4, 2011.

DE MIRANDA CABRAL GONTIJO, A. M.; BARRETO, R. E.; SPEIT, G.; et al. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation research**, v. 534, n. 1-2, p. 165–72, 2003.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation research**, v. 399, n. 2, p. 135–47, 1998.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A. DA; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639–648, 2009.

MOTA, C.; PESTANA, C. Co-produtos da Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 416–425, 2011.

MOUCHET, F.; GAUTHIER, L.; MAILHES, C.; FERRIER, V.; DEVAUX, A. Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. **Environmental toxicology**, v. 20, n. 1, p. 74–84, 2005.

NETO, H. B.; AUGUSTO, C.; GRANER, F.; et al. Diminuição do teor de óxido de cromo (III) usado como marcador externo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 700, p. 249–255, 2003.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E.; BANATH, J. P. Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the “Comet” Assay. **Radiation Research**, v. 122, n. 1, p. 86, 1990.

OLIVEIRA, J. S. E.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. C. DE; MÜLLER, M. D. Composição química da glicerina produzida por usinas de biodiesel no Brasil e potencial de uso na alimentação animal. **Ciência Rural**, v. 43, n. 3, p. 509–512, 2013.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Substâncias químicas perigosas à saúde e ao ambiente**. Cultura Acadêmica, 2000.

PAGLIARO, B. M.; ROSSI, M.; PAGLIARO, M. Glycerol : Properties and Production. **The Future of Glycerol**. 8th ed., p.170, 2008. Royal Society of Chemistry.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, n. 4, p. 345–356, 1995.

RAMSDORF, W. A.; GUIMARÃES, F. D. S. F.; FERRARO, M. V. M.; et al. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation research**, v. 673, n. 1, p. 78–81, 2009.

RENATO, J.; LIMA, D. O.; BRANDÃO, R.; et al. BIODIESEL DE BABAÇU (*Orbignya sp.*) OBTIDO POR VIA ETANÓLICA. , v. 30, n. 3, p. 600–603, 2007.

Resolução ANVISA nº 389, de 5 de agosto de 1999.

Resolução Conama nº 357, de 17 de março de 2005.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v. 722, n. 1-2, p. 225–54, 1999.

ROTTA, M. A. **Aspectos Gerais da Fisiologia e Estrutura do Sistema Digestivo dos Peixes Relacionados à Piscicultura**. Embrapa, 2003.

SAMPAIO, F. G.; DE LIMA BOIJINK, C.; DOS SANTOS, L. R. B.; et al. The combined effect of copper and low pH on antioxidant defenses and biochemical parameters in neotropical fish pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Ecotoxicology (London, England)**, v. 19, n. 5, p. 963–76, 2010.

- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, n. 1, p. 9–15, 1975.
- SEABORN, C. D.; STOECKER, B. J. Effects of Starch, Sucrose, Fructose and Glucose on Chromium Absorption and Tissue Concentrations in Obese and Lean Mice. **J. Nutr.**, v. 119, n. 10, p. 1444–1451, 1989.
- SHIAU, S.-Y.; SHY, S.-M. Dietary chromic oxide inclusion level required to maximize glucose utilization in hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. **Aquaculture**, v. 161, n. 1-4, p. 357–364, 1998.
- SILVA, C. S.; PEDROZO, M. DE F. M. **Ecotoxicologia do cromo e seus compostos**. Salvador, 2001.
- SILVA, S. C. C. DA; GASPARINO, E.; VOLTOLINI, D. M.; MARCATO, S. M.; TANAMATI, F. Expressão do mRNA de genes mitocondriais e desempenho produtivo de codornas alimentadas com glicerol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 2, p. 228–233, 2013.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 113, p. 203–12, 1999.
- TESSER, M. B.; FLORES-QUINTANA, C. I.; CARNEIRO, D. J.; JUNIOR, M. P.; PORTELLA, M. C. Exogenous enzyme supplementation on microdiet for pacu larviculture. **R. Bras. Zootec.**, v.35, n.6, p.2211-2218, 2006.

APÊNDICE 1 - Certificação do Comitê de Ética (CEUA)



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 702

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.201292/2013-51

APROVADO: 20/06/2013 – R.O. 05/2013

TÍTULO: Avaliação da genotoxicidade do glicerol bruto e do óxido de Cromo III nos bioindicadores *Rhamdia quelen* e *Piaractus mesopotamicus*

AUTORES: Marta Margarete Cestari, Antonio Ernesto Meister Luz Marques, Rafael Ernesto Balen

DEPARTAMENTO: Genética


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA