

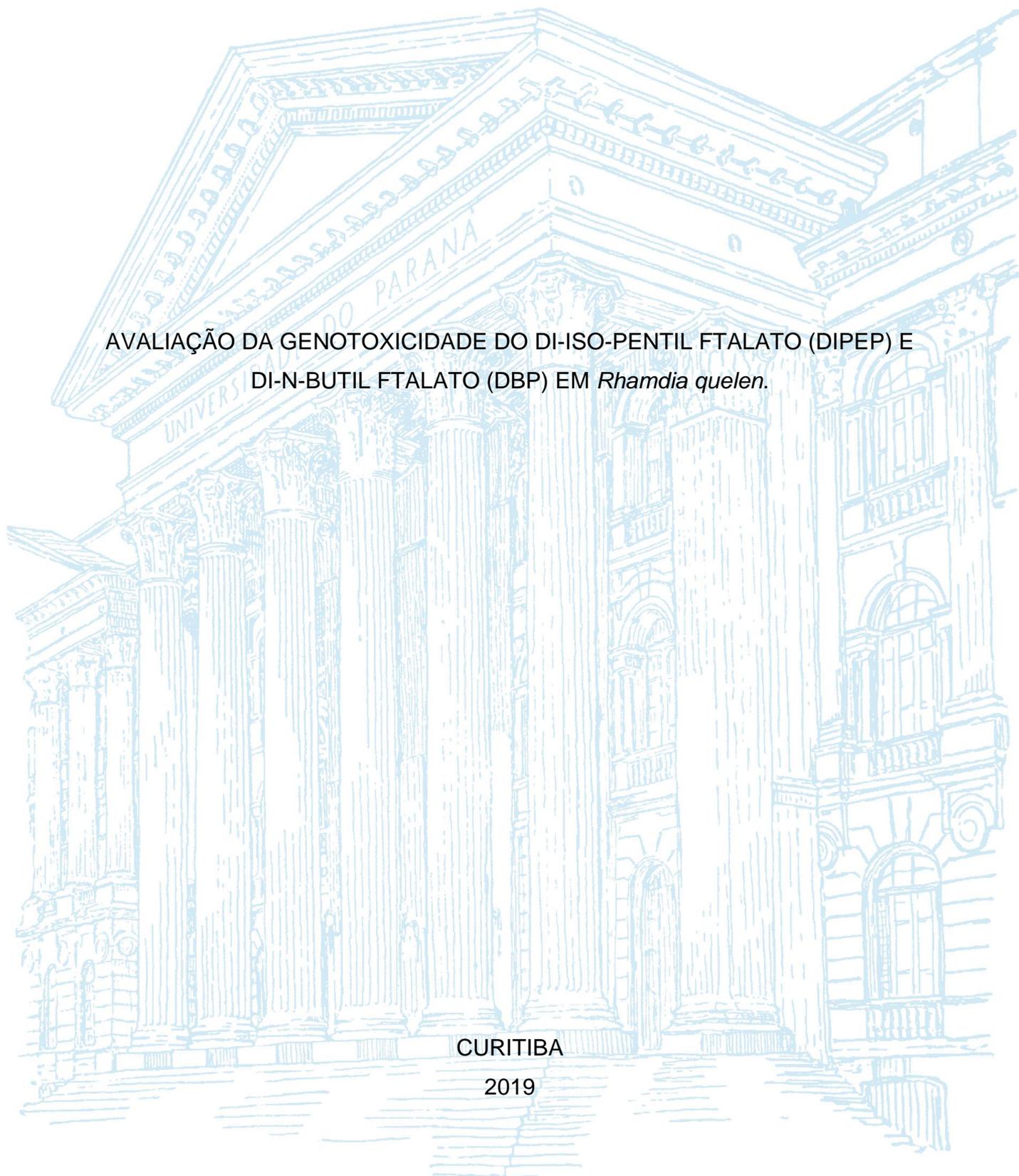
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA DEDA

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO DI-ISO-PENTIL FTALATO (DIPEP) E
DI-N-BUTIL FTALATO (DBP) EM *Rhamdia quelen*.

CURITIBA

2019



BRUNA DEDA

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO DI-ISO-PENTIL FTALATO (DIPEP) E
DI-N-BUTIL FTALATO (DBP) EM *Rhamdia quelen*.

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari.

Co-orientadora: Msc. Laís Fernanda Oya Silva.

CURITIBA

2019

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Claudio, que sempre priorizou a minha educação, propiciando as condições ideais para minha formação.

À professora Dra. Marta Margarete Cestari, que me deu minha primeira oportunidade na iniciação científica e possibilitou a continuação do meu trabalho no Laboratório de Citogenética Ambiental e Mutagênese Ambiental e conclusão da minha monografia.

À Mestre Laís Fernanda Oya, que confiou em mim para fazer parte do seu projeto de doutorado, co-orientou minha monografia, sanou as minhas diversas dúvidas e ensinou-me as partes práticas do experimento.

À Dra. Izonete Cristina Guiloski, que me ajudou em diversos momentos corrigindo meus relatórios e monografia, cuidando dos nossos peixes e durante diversas outras partes práticas e teóricas.

Aos estagiários do laboratório, que ajudaram nas atividades práticas, em especial no cuidado dos peixes que foi muito trabalhoso.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, que auxiliaram tanto em etapas do experimento quanto me ensinando a rotina do laboratório.

RESUMO

Ftalatos são compostos orgânicos muito utilizados como aditivos plastificantes para conferir flexibilidade. Entretanto, não são quimicamente ligados ao plástico, portanto tornam-se facilmente biodisponíveis em corpos hídricos e alimentos. A exposição a esses xenobiontes é preocupante, pois diversos estudos associam os ftalatos a distúrbios endócrinos, como o efeito anti-androgênico. Entre esses compostos estão o Di-n-butil ftalato (DBP) e o Di-iso-pentil ftalato (DiPeP). O DBP é um dos mais utilizados, sendo seus efeitos endócrinos bem caracterizados, apesar de existirem poucas pesquisas realizadas com espécies aquáticas acerca de sua genotoxicidade. Existem poucas informações a respeito do DiPeP, sendo ainda pouco estudado quanto a sua toxicidade e efeitos sobre características reprodutivas. Apesar disso, já foram verificados metabólitos de DiPeP na urina de gestantes brasileiras. No Brasil, essa substância está relacionada ao etanol, pois a matéria prima para a produção desse ftalato é proveniente do processo de refino da cana-de-açúcar. Com isso, o objetivo deste trabalho é avaliar a genotoxicidade do Di-iso-pentil ftalato e Di-n-butil ftalato em peixes da espécie *Rhamdia quelen* por meio do Teste do Micronúcleo Píscico e Ensaio Cometa. Para tal, os espécimes foram subdivididos em grupos: controle negativo, controle ração, controle positivo, doses de 5 ng, 25 ng e 125 ng de um dos contaminantes por grama do peixe. O n amostral foi de 15 indivíduos por grupo. Foi realizado o bioensaio em triplicata com exposição a 15 doses com intervalos de 48 horas por 30 dias. Após o período de exposição, os peixes foram anestesiados e foi coletado o seu sangue para a realização do esfregaço sanguíneo e teste do Micronúcleo Píscico, no qual foram contabilizadas as alterações eritrocitárias nucleares (*blebbed, notched, lobed, vacuolated* e *binucleus*) e micronúcleos encontrados. Além disso, foram coletadas amostras do rim anterior para realização do Ensaio Cometa. Após análise do material, os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. Com relação ao Ensaio Cometa, foram verificadas diferenças significativas entre o controle negativo e as duas doses mais altas de DiPeP (25 ng/g do peixe e 125 ng/g do peixe) e entre o controle negativo e a dose de 125 ng de DBP/ g do peixe. Para o teste do Micronúcleo Píscico, apenas a alteração do tipo *notched* apresentou diferença significativa em sua frequência no grupo de exposição a 5 ng de DiPeP/g de peixe em comparação ao controle. Para as demais doses de exposição propostas, não foi constatada genotoxicidade e efeito mutagênico.

Palavras-chave: Ftalatos. Micronúcleo. Ensaio Cometa.

ABSTRACT

Phthalates are organic compounds used as plasticizing additives to provide flexibility to plastic. However, they are not chemically bound to these substrates, therefore they become bioavailable in aquatic environments and food. Exposure to these xenobiotics is alarming because several studies associate phthalates with endocrine disorders, such as antiandrogenic effects. Among these substances are Di-n-butyl phthalate (DBP) and Di-iso-pentyl phthalate (DiPeP). DBP is one of the most used phthalates and its effects on reproduction are well characterized, although there is little research about its genotoxicity on aquatic species. There is little information about DiPeP, and its toxicity and reproductive effects on animals are still poorly understood. Nevertheless, DiPeP metabolites have been found in urine samples obtained from pregnant Brazilian women. In Brazil, this substance is related to ethanol, as the raw material for the production of this phthalate comes from the sugarcane refining process. The present study aims to evaluate the genotoxicity of DBP and DiPeP in *Rhamdia quelen* specimens by the Piscine Micronucleus Test and Comet Assay. For this purpose, the specimens were subdivided into groups: negative control, ration control, positive control, concentrations of 5 ng, 25 ng and 125 ng of one of the contaminants per gram of fish. The sample size was 15 individuals per group. The bioassay was performed in triplicate with exposure to 15 doses with intervals of 48 hours for 30 days. After the exposure period, the fish were anesthetized and a sample of their blood was collected for the blood smear and posterior piscine micronucleus test, in which nuclear erythrocyte alterations (blebbed, lobed, vacuolated, notched and binucleus) and micronuclei were counted. Furthermore, samples of the kidney tissue were collected for the comet assay. After the analysis of the material, the data were submitted to statistical analysis. Regarding the comet assay, significant differences were found between the negative control and two of the DiPeP exposure doses (25 ng/g of fish and 125 ng/g of fish) and between negative control and the highest dose of DBP (125 ng/g of fish). Concerning the results of the piscine micronucleus test, only the notched alteration showed significant difference in its frequency between the exposure of 5 ng of DiPeP/g of fish and negative control. For the other proposed exposure doses, no genotoxicity or mutagenic effect was detected by the piscine micronucleus test.

Key-words: Phthalate. Micronuclei. Comet Assay.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	07
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO E PROBLEMÁTICA	07
1.2	OBJETIVOS	09
1.2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	09
2	REVISÃO DA LITERATURA	09
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS	16
3.2	DOSES DE EXPOSIÇÃO	16
3.3	DESENHO EXPERIMENTAL	16
3.4	TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO	17
3.5	ENSAIO COMETA	18
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
4	RESULTADOS	19
4.1	ANÁLISES DO MICRONÚCLEO PÍSCEO	19
4.2	ANÁLISES DO ENSAIO COMETA	20
5	DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÃO	25
7	REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E PROBLEMÁTICA

O ambiente recebe constantemente compostos orgânicos liberados por atividades industriais, pela agricultura e por comunidades urbanas, sendo que o meio aquático é um dos mais vulneráveis e, por vezes, o destino final desses xenobióticos. Muitas dessas substâncias e seus metabólitos ainda não foram identificados ou monitorados no ambiente aquático, logo permanecem desconhecidos também seus impactos para os organismos aquáticos e, possivelmente, aos seres humanos (VAN DER OOST et al., 2003).

Entre esses xenobióticos encontram-se os ftalatos, compostos amplamente utilizados para conferir flexibilidade na produção de plásticos (SELVARAJ et al., 2014) e que, devido a sua característica de não se ligarem quimicamente a esses substratos, são liberados facilmente para o ambiente. Sua presença é constatada por diversos estudos como o de Montuori et al. (2008) que demonstrou que águas comercializadas em garrafas plásticas apresentavam concentrações de ftalato até 20 vezes maiores do que aquelas comercializadas em garrafas de vidro. Além disso, concentrações de 0,3 µg/L até 30 µg/L do di-n-butil ftalato (DBP) já foram detectadas em corpos hídricos (NET et al., 2014; SERRANO et al., 2014; SANTANA et al., 2014).

O DBP e o di-iso-pentil ftalato (DiPeP) são dois ftalatos de amplo uso. O DBP é um ftalato de baixo peso molecular que é muito empregado em cosméticos, inseticidas, fármacos e como fixador de cor e odor (HEUDORF et al., 2007). Já o DiPeP tem sua produção favorecida no Brasil, pois uma das matérias primas para sua fabricação é proveniente do processo de refino da cana-de-açúcar para produção de etanol (SOUZA et al., 2018).

Dessa maneira, devido ao seu amplo uso e presença no ambiente, é importante o desenvolvimento de estudos acerca dos efeitos que a constante exposição a estes xenobióticos pode causar à saúde humana e ambiental. Alguns dos seus efeitos descritos por estudos prévios incluem distúrbios endócrinos, genotoxicidade e desenvolvimento de tumores em modelos animais (CASALS-

CASAS et al., 2011; ERKEKOGLU & KOCER-GUMUSEL, 2014; SERÔDIO et al., 2006). O DBP, por exemplo, apresentou consequências ligadas a efeitos anti-androgênicos relacionados ao atraso da gametogênese e alterações no desenvolvimento reprodutivo, além de danos ao rim em peixes da espécie *Danio rerio* (XU et al., 2014; ORTIZ-ZARRAGOITIA et al., 2006). Entretanto em relação ao DiPeP poucas são as informações disponíveis acerca dos seus efeitos (SOUZA et al., 2018).

Uma das formas de estudar os impactos desses xenobióticos em animais é por meio da utilização de biomarcadores, ferramentas importantes no monitoramento de respostas biológicas devido ao seu menor custo e relativa simplicidade (RAMSDORF et al., 2009). Entre eles estão o teste do Micronúcleo Písceo e o Ensaio Cometa.

No teste do Micronúcleo Písceo é possível detectar o dano genotóxico e mutagênico através de uma análise visual (HEDDLE et al., 1983). Nessa metodologia, são utilizados eritrócitos de peixe para avaliação da presença de micronúcleos. Essas estruturas são cromossomos ou fragmentos de cromossomos que não foram inseridos no núcleo principal durante a divisão celular devido à falta de centrômero, dano ao DNA ou falha durante a citocinese (HEDDLE et al., 1991). Ainda são consideradas para esta metodologia alterações na forma do núcleo celular definidas por Carrasco et al. (1990) que podem indicar citotoxicidade e/ou genotoxicidade.

O Ensaio Cometa avalia os danos ao material genético de células individuais utilizando como princípio a migração diferencial de fragmentos de DNA com diferentes tamanhos durante corrida de eletroforese (SINGH et al., 1988). Essa técnica considera que células com material sem danos irão migrar em conjunto, enquanto as células com danos terão fragmentos diferentes que migrarão em velocidades diferentes durante a corrida eletroforética. Com isso, ao final do processo ocorrerá a formação de uma cauda com os fragmentos, resultando na imagem de um cometa (BOMBAIL et al., 2001).

1.2 OBJETIVOS

Avaliar a genotoxicidade do di-iso-pentil ftalato (DiPeP) e di-n-butil ftalato (DBP) em peixes da espécie *Rhamdia quelen*.

1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar o Ensaio Cometa para verificação da genotoxicidade dos compostos em células do rim anterior da espécie de peixe *Rhamdia quelen*;
- Aplicar o teste do Micronúcleo Píscico para elucidação do potencial mutagênico dos compostos.

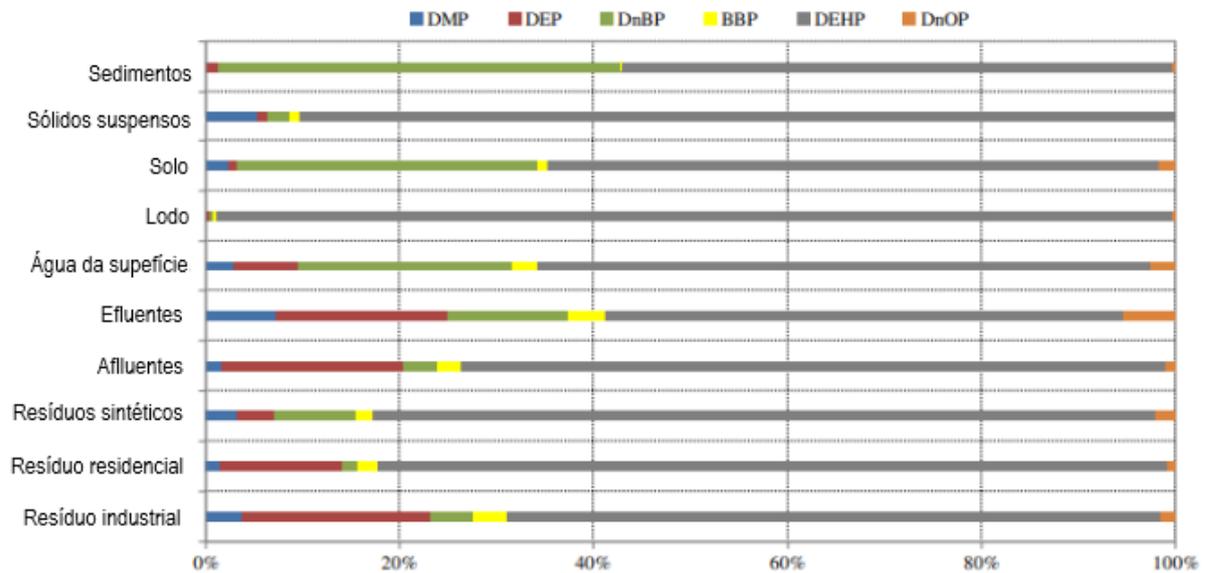
2. REVISÃO DA LITERATURA

Ftalatos, ou ésteres de ácidos ftálicos (PAEs), são compostos químicos utilizados como aditivos plastificantes para conferir flexibilidade ao plástico (LATINI, 2005). São utilizados principalmente na fabricação de PVC (GIAM et al., 1984), sendo que sua quantidade pode representar de 30% a 50% desse material, como reportado para o Di (2-etilexil) ftalato (DEHP) por Ranke (2005). Além disso, também são aplicados a agentes gelificantes, estabilizadores, dispersantes, lubrificantes e emulsificantes (USEPA, 2012). A utilização dos ftalatos depende do seu peso molecular, dessa forma aqueles de baixo peso molecular como o Dietil ftalato (DEP) e Dimetil ftalato (DMP) são usados em cosméticos, produtos de cuidado pessoal e como solventes. Já o Benzilbutil ftalato (BBP) e DEHP, que possuem alto peso molecular, são empregados na indústria farmacêutica, na fabricação de embalagens alimentícias e artigos de vestuário (BERGÉ et al., 2013).

Os ftalatos foram desenvolvidos no início do século XX para aplicação industrial. Em 2015, sua produção anual foi de aproximadamente 6 milhões de toneladas (BHATIA et al., 2015). Uma das características preocupantes acerca dos PAEs é o fato desses aditivos não se ligarem covalentemente aos seus substratos, com isso sua liberação e difusão para o ambiente são facilitadas (AUTIAN, 1973). Devido a essa característica e sua alta produção, essas substâncias são ubíquas no ambiente, já tendo sido detectadas no solo, atmosfera, sedimentos e diversos

corpos hídricos (BERGÉ et al., 2013). Na FIGURA 1 é apresentada a comparação entre a distribuição de alguns ftalatos em diferentes meios.

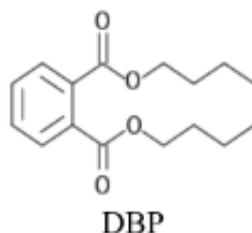
FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO DE FTALATOS



FONTE: BERGÉ et al. (2013).

Os ambientes aquáticos são especialmente vulneráveis à contaminação por esses xenobióticos, sendo eles uns dos contaminantes orgânicos predominantes (HUTZING, 1984). Desde a década de 70, diversos ftalatos já foram detectados no meio aquático, principalmente o Di-n-butil ftalato (DBP ou DnBP) e DEHP (HITES & BIEMANN, 1972; GIAM et al., 1978; FATOKI & VERNON, 1990). A água é o principal meio de transporte dessas substâncias (GIAM et al., 1984) e os ftalatos podem chegar a ambientes aquáticos via efluentes industriais, liberação a partir de plásticos e efluentes domésticos (PIERCE et al., 1980). Como exemplo, é possível citar o DBP (FIGURA 2) que já foi detectado em corpos hídricos em concentrações que variam de ng/L até mg/L (FATOKI & VERNON, 1990; FATOKI et al., 2010).

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DO DI-N-BUTIL FTALATO



FONTE: CHEN et al. (2014).

Todos os fatores já citados tornam a exposição de animais e seres humanos a essas substâncias inevitável. Estudos realizados com urina e sangue humanos revelam a exposição aos ftalatos, principalmente em países industrializados (FREDERIKSEN et al., 2012; FREDERIKSEN et al., 2014). Esse contato pode ocorrer já no período uterino devido à passagem pela placenta e também posteriormente por meio de inalação, ingestão e contato dérmico (LATINI, 2005). Essa exposição exacerbada demanda atenção, pois os ftalatos apresentam risco à saúde humana e ambiental, segundo estudos prévios que descrevem efeitos relacionados com distúrbios endócrinos e câncer (CASALS-CASAS & DESVERGNE, 2011; SERÔDIO & NOGUEIRA, 2006). A USEPA (United States Environmental Protection Agency) publicou em 2012 um plano de ação a respeito dos ftalatos em que classifica o DEHP como provável carcinogênico humano (Classe B2) e o BBP como possível carcinogênico (Classe C).

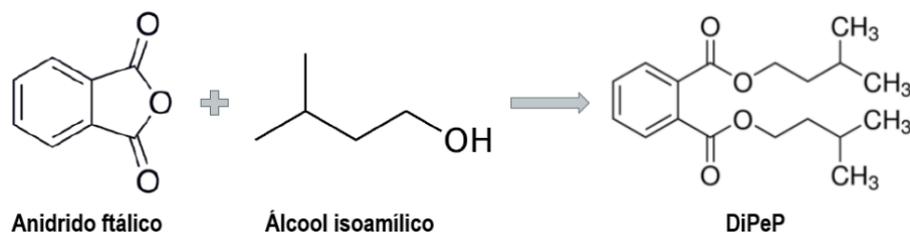
Os ácidos ftálicos têm a capacidade de gerar a proliferação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas moléculas apresentam um ou mais pares de elétrons não pareados, o que faz com que elas se tornem instáveis, podendo interagir com o DNA e RNA, resultando em genotoxicidade (FRANCO et al. 2008). Esses efeitos são uns dos fatores que fazem com que esses aditivos sejam carcinogênicos para alguns animais (ERKEKOGLU & KOCER-GUMUSEL, 2014). Roedores são organismos especialmente sensíveis, apresentando casos de desenvolvimento de tumores no fígado (CASALS-CASAS & DESVERGNE, 2011). Além disso, Xu et al. (2013) verificou que embriões de *Danio rerio* quando expostos a concentrações de 5 – 500 µg/L de DEP e DBP apresentaram respostas imunes e antioxidantes.

Outro efeito conhecido relacionado à exposição aos ftalatos é a desregulação endócrina (CASALS-CASAS & DESVERGNE, 2011). Diversas pesquisas *in vivo* já demonstraram alguns efeitos anti-androgênicos como, por exemplo, alterações na espermatogênese de machos de *Danio rerio* expostos a DEHP (UREN-WEBSTER et al., 2010) e redução na produção de glicoproteínas controladas por hormônios androgênicos em machos de *Gasterosteus aculeatus* observada por Aoki et al. (2011). Em roedores, ações anti-androgênicas, como alterações reprodutivas em machos e diminuição da distância anogenital, também foram observadas após a ação de ftalatos como o DBP e DEHP (WOLF et al., 1999; KIM et al. 2004; FOSTER, 2006).

Considerando todos os riscos apresentados por esses compostos, vários países tomaram medidas restritivas em relação ao seu uso. Em 2008, nos Estados Unidos, o uso de DEHP, BBP e DBP foi restringido ou banido da produção brinquedos e artigos de cuidado infantil (CPSIA, 2008), o mesmo ocorreu na União Europeia (diretiva 2005/84/EC) e Canadá (Hazardous Product Act, 2010). No Brasil existem projetos de lei (PL6388/2009, PL1197/2011, PL3222/2012, PL3221/2012) com o objetivo de restringir o uso de ftalatos em produtos como brinquedos, embalagens, garrafas descartáveis e medicamentos. Além disso, em resolução da ANVISA, de 17 de junho de 2016, foi proibido o uso de diversos ftalatos em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.

O Di-iso-pentil ftalato, ou di-iso-amil ftalato, é um composto sintetizado a partir da esterificação do anidrido ftálico com álcool isoamílico (FIGURA 3), que é um dos subprodutos do processo de refino da cana-de-açúcar. Dessa forma, no Brasil, existe uma alta disponibilidade de álcool isoamílico devido à grande produção de etanol proveniente da cana-de-açúcar (SOUZA et al., 2018). Com isso, a produção de DiPeP é favorecida e sua presença no ambiente é praticamente garantida. Esse ftalato já foi detectado em solos receptores de resíduos oriundos de uma fábrica de produção de plásticos (FERREIRA & MORITA, 2012) e também em amostras de resíduos lixiviados de aterros sanitários (NASCIMENTO FILHO et al., 2003). Além disso, Souza *et al* (2018) detectou o DiPeP e seus metabólitos em amostras de urina de todas as mulheres grávidas monitoradas para a realização de sua pesquisa. Nesse mesmo estudo, verificou-se a redução da produção de testosterona em roedores expostos ao ftalato em questão.

FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DO DI-ISO-PENTIL FTALATO



FONTE: A autora (2019).

Os peixes são uns dos organismos mais utilizados para o estudo dos efeitos de contaminantes (POWERS, 1989). Isso se deve ao fato desses animais apresentarem respostas a xenobióticos semelhantes àsquelas demonstradas por mamíferos (UDROIU, 2006). Ademais, eles são de ampla distribuição nos mais variados ambientes aquáticos, ocupam diversos níveis tróficos e têm papel importante nas cadeias alimentares transferindo energia de níveis tróficos baixos até níveis mais altos (BEYER, 1996). No caso de estudos *in vivo*, esses animais têm ainda como vantagem a fácil manutenção em laboratório e exposição a contaminantes (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

Nesse contexto, a utilização da espécie *Rhamdia quelen* (FIGURA 4) se torna muito interessante se considerarmos ainda o fato que a criação desses organismos está aumentando no Brasil, especialmente na região Sul (GOMES et al., 2000). O *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae), também conhecido como jundiá, é um peixe de distribuição neotropical que está presente em regiões desde o México até a Argentina (SILFVERGRIP, 1996). Essa espécie ocupa águas mais calmas e profundas de lagos e poços, preferindo fundos arenosos e com lama (GOMES et al., 2000). Estes organismos são onívoros e no período noturno saem de seus esconderijos em busca de alimentos (GOMES et al., 2000).

FIGURA 4 – EXEMPLAR DE *Rhamdia quelen*.

FONTE: Tatiane Klingelfus (2013).

Diversos estudos têm como foco o potencial de causar efeitos deletérios que alguns contaminantes possuem. No entanto, tais efeitos são de difícil observação, pois se manifestam apenas após longos períodos (VAN DER OOST et al., 2003). Somado a isso, quando efeitos tardios se tornam observáveis, poucas são as opções de remediação viáveis. Dessa forma, faz-se necessária a utilização de biomarcadores precoces que demonstrem respostas biológicas mais rápidas a substâncias liberadas no meio ambiente por ação antropogênica (BUCHELI & FENT, 1995). Biomarcadores são alterações em respostas bioquímicas, genéticas, celulares ou fisiológicas que demonstram a exposição ou efeito de um contaminante sobre sistemas biológicos (DEPLEDGE, 1994). Biomarcadores genéticos são importantes ferramentas na avaliação de dano ao material genético, aberrações cromossômicas e diversas outras anormalidades (BOMBAIL et al, 2001).

Vários biomarcadores podem ser aplicados na avaliação de efeitos genotóxicos de xenobióticos, como o teste do Micronúcleo Písceo (MN), teste de Ames e o Ensaio Cometa (ERKEKOGLU & KOCER-GUMUSEL, 2014). O teste do micronúcleo foi desenvolvido inicialmente para uso com ratos (SCHMID, 1975), no entanto sofreu alterações para a aplicação em estudos com peixes em laboratório (HOOFTMAN et al. 1982). Esse método determina a mutagenicidade de xenobióticos de maneira visual pela avaliação de células com micronúcleos (HEDDLE et al., 1983). Os micronúcleos são cromossomos, ou seus fragmentos,

que sofrem condensação e são excluídos do núcleo principal formado após a anáfase (AL-SABTI & METCALFE, 1995). Para a realização do teste MN, geralmente as células utilizadas são eritrócitos, visto que esses apresentam altas taxas de divisão mitótica, gerando uma resposta rápida aos xenobióticos, e neles o micronúcleo é conspícuo (CARRASCO et al., 1990).

Outras formas nucleares têm sido utilizadas para avaliar a genotoxicidade durante o teste do Micronúcleo Písceo. Essas formas são as alterações eritrocitárias nucleares (AEN) e podem ser pequenas como evaginações ou invaginações da membrana nuclear (*blebbed* e *notched*, respectivamente), lóbulos ao longo de todo o núcleo (*lobed*), vacúolos com membrana definida dentro do núcleo (*vacuolated*) ou presença de dois núcleos na célula sanguínea (*binucleus*) (CARRASCO et al., 1990).

O Ensaio Cometa é uma técnica utilizada para verificar o dano no DNA em células individuais sob condições alcalinas (SINGH et al., 1988). A técnica inicialmente desenvolvida por Ostling et al. (1984) detectava apenas quebras na dupla fita de DNA e, somente após alterações no seu protocolo estabelecidas por Singh et al. (1988), passou a detectar quebras de fita simples e sítios de reparo tardio (TICE et al., 2000).

No ensaio cometa, células são lisadas e o nucleóide resultante é submetido a uma corrida de eletroforese. O princípio da técnica baseia-se no fato de o DNA íntegro, sem danos, migrar em conjunto, enquanto o DNA com danos, que apresenta fragmentos de tamanhos diferentes, migrar de maneira diferencial (velocidades diferentes), de acordo com o tamanho dos fragmentos (ERKEKOGLU & KOCER-GUMUSEL, 2014). Assim, o DNA sem danos poderá ser visualizado na forma de um círculo e os fragmentos de tamanhos diferentes irão formar uma cauda, gerando uma imagem semelhante a um cometa.

Algumas das vantagens do Ensaio Cometa são a detecção de mais de uma classe de dano ao DNA, conferindo maior sensibilidade em comparação ao teste do Micronúcleo Písceo, e a possibilidade de aplicação a diversos tecidos, pois não necessita as células passem por um processo de proliferação celular (HARTMANN et al., 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR) – Certificado nº 1180, recebemos 140 peixes da espécie *Rhamdia quelen*, provenientes do Laboratório do Professor Dr. Robbie Allan Bombardelli da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Toledo). Os peixes foram aclimatados em tanque de 2000 litros com aeração e circulação de água constantes, temperatura de 27°C, fotoperíodo natural e alimentação com ração comercial uma vez por dia. A limpeza desse tanque era realizada em dias alternados durante a semana com a troca de 2/3 de sua água.

3.2 DOSES DE EXPOSIÇÃO

Para a exposição dos animais aos contaminantes, foram empregadas cápsulas gelatinosas comerciais envoltas por blocos de ração misturados a gelatina incolor. Em seu interior, as cápsulas continham di-iso-pentil ftalato (DiPeP) ou di-n-butil ftalato (DBP) dissolvido em óleo de coco orgânico. As soluções de ftalatos foram feitas nas concentrações 0,005 g/L, 0,025 g/L e 0,125 g/L, que correspondem às doses de 5 ng do DiPeP/g do peixe, 25 ng do DiPeP/g do peixe e 125 ng do DiPeP/g do peixe ou 5 ng do DBP/g do peixe, 25 ng do DBP/g do peixe e 125 ng do DBP/g do peixe.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Após o período de aclimação, os espécimes foram divididos aleatoriamente em nove grupos: controle negativo (cápsula com óleo de coco), controle ração (ração comercial), controle positivo (dose única via intraperitoneal de 5 µg de Metilmetanosulfonato/ g de peixe), DiPeP I (5 ng do DiPeP/g do peixe), DiPeP II (25 ng do DiPeP/g do peixe), DiPeP III (125 ng do DiPeP/g do peixe), DBP I (5 ng do DBP/g do peixe), DBP II (25 ng do DBP/g do peixe) e DBP III (125 ng do

DBP/g do peixe). O n amostral de cada grupo foi de 15 indivíduos e o experimento foi realizado em triplicata.

No início de cada bioensaio, os peixes foram escolhidos aleatoriamente, pesados e transferidos para aquários individuais de 20 litros. Nesse ambiente, a temperatura (27°C) e aeração permaneceram em condições iguais aos tanques de aclimatação.

Logo após um período de treinamento, para que os animais aprendessem a aceitar imediatamente a alimentação ofertada, iniciou-se a contaminação por via trófica que ocorreu em dias alternados totalizando 15 doses, durante 30 dias. A limpeza dos aquários foi realizada nos dias sem a alimentação.

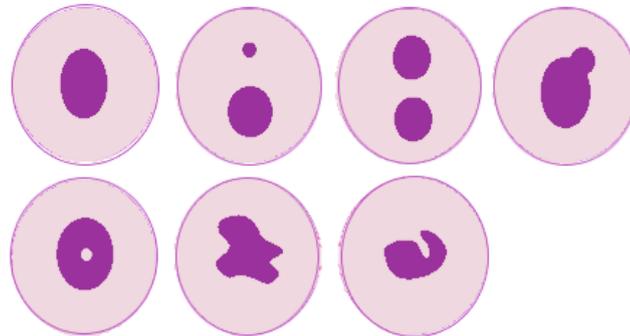
Após 30 dias de exposição, os animais foram anestesiados individualmente em benzocaína (10%) e, posteriormente, o sangue para o ensaio do Micronúcleo Písceo foi coletado com seringa heparinizada pela veia caudal. Em seguida, os peixes foram eutanasiados por meio da secção medular e foram coletadas amostras de rim anterior para a realização do Ensaio Cometa.

3.4 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO

O teste foi executado de acordo com a técnica descrita por Heddle (1973) e Schmid (1975), com algumas modificações. Uma gota do sangue coletado foi depositada em lâmina de microscopia identificada para a realização da técnica do esfregaço. Foi confeccionada uma lâmina por peixe, elas secaram *overnight* e, em seguida, foram fixadas em álcool 96% por um período de 30 minutos. Por fim, foram coradas com Giemsa 10% em tampão fosfato, pH 6.8, durante 12 minutos.

Durante a análise, foram observados 2000 eritrócitos por lâmina e contabilizadas as frequências de micronúcleos e alterações eritrocitárias nucleares (AEN) encontradas (FIGURA 5), segundo descrito por Carrasco et al. (1990). Apenas as células com membrana celular e citoplasma intactos foram consideradas para a análise.

FIGURA 5 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE ALTERAÇÕES ERITROCITÁRIAS



Desenho representando núcleo normal, micronúcleo, *binucleus*, *blebbed*, *vacuolated*, *lobed* e *notched*, respectivamente. Fonte: a autora (2019).

3.5 ENSAIO COMETA

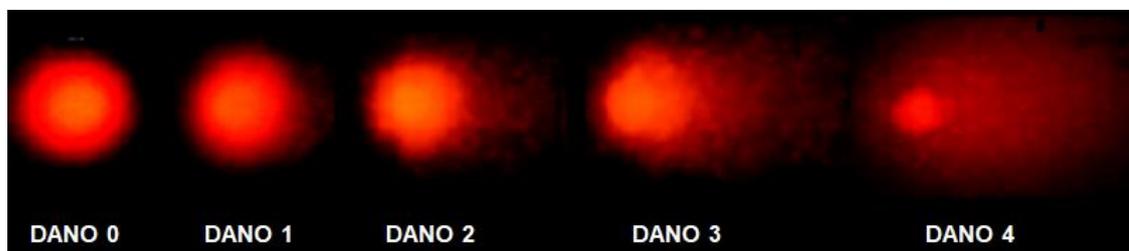
O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ramsdorf et al. (2009). As amostras de rim anterior coletadas foram desagregadas e homogeneizadas em 0,5 mL de soro bovino fetal (SBF) e 20 µL dessa suspensão foi adicionado a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (LMP). Dessa mistura, 120 µL foram depositados sobre lâmina anteriormente coberta com agarose 1,5%. As lâminas confeccionadas foram cobertas com lamínula, refrigeradas a 4°C e, após a solidificação e retirada da lamínula, mantidas em solução de lise (pH > 13) por 48 horas.

Posteriormente, foi iniciado o procedimento para a corrida de eletroforese. Inicialmente, as lâminas dispostas na cuba eletroforética ficaram imersas em solução tampão alcalina por 25 minutos para a desespiralização do DNA. Após essa etapa, foi realizada a eletroforese durante 25 minutos a 25V e 300 mA. Ao término desse período, as lâminas foram neutralizadas com tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos, processo que foi repetido três vezes. Após secarem, as lâminas foram fixadas em etanol 96% durante 5 minutos.

Por fim, foi realizada a coloração, depositando 50 µL de brometo de etídio sobre as lâminas e cobrindo-as com lamínula para a observação imediata dos nucleoides em microscópio de epifluorescência. Em cada lâmina, foram contabilizados 100 nucleoides e eles foram classificados conforme o dano (FIGURA

5) em seu DNA em uma das seguintes classes: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano extenso) e 4 (dano máximo).

FIGURA 6 – CLASSES DE DANOS NO ENSAIO COMETA



FONTE: A autora (2019).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a realização dos dois testes, foram aplicadas as mesmas análises estatísticas para ambos os conjuntos de dados gerados. Inicialmente foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para a verificação da distribuição dos dados. Nenhum grupo apresentou distribuição normal, logo foi utilizado numa segunda análise o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Student-Newman-Keuls. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISES DO TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO

Na TABELA 1 estão destacados os resultados obtidos para as análises estatísticas realizadas com o conjunto de dados dos grupos de exposição ao DiPeP. As linhas representam as alterações observadas e as colunas os grupos de tratamento. Os dados expostos representam a mediana, 1º e 3º quartil (respectivamente dentro do parêntese). Não são representados na tabela as alterações do tipo *lobed*, *binucleus* e o micronúcleo, pois estas não foram observadas durante as análises. Além disso, o grupo controle ração (CR) também não foi representado, pois não apresentou diferença significativa com o controle negativo (CN). Dessa forma, o controle negativo foi o único considerado.

A partir da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, foi possível verificar diferenças significativas entre o controle negativo e tratamento com DiPeP I para a

alteração do tipo *notched*. As demais alterações não apresentaram diferenças significativas em suas frequências entre os diferentes tratamentos.

TABELA 1 – TESTE DO MICRONÚCLEO PARA O DIPEP

	CN	CP	DIPEP I	DIPEP II	DIPEP III
Notched	0 (0-0)	0 (0-1,25)	1 (0-2) *	0 (0-1)	0 (0-1)
Blebbled	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Vacuolated	2 (1-6)	6,5 (2,75 –10)	7,5 (3,75-14)	3 (2-8)	4 (2-15)
AENT	3 (2-8)	7 (2,75-10,5)	9,5 (4-16)	6 (2-10)	5 (2-16)

Na TABELA 2 são destacados os resultados obtidos para as análises estatísticas realizadas com o conjunto de dados dos grupos de exposição ao DBP. Para esse contaminante não foram obtidos resultados significativos em relação a nenhuma das alterações entre os grupos de tratamento.

TABELA 2 – TESTE DO MICRONÚCLEO PARA O DBP

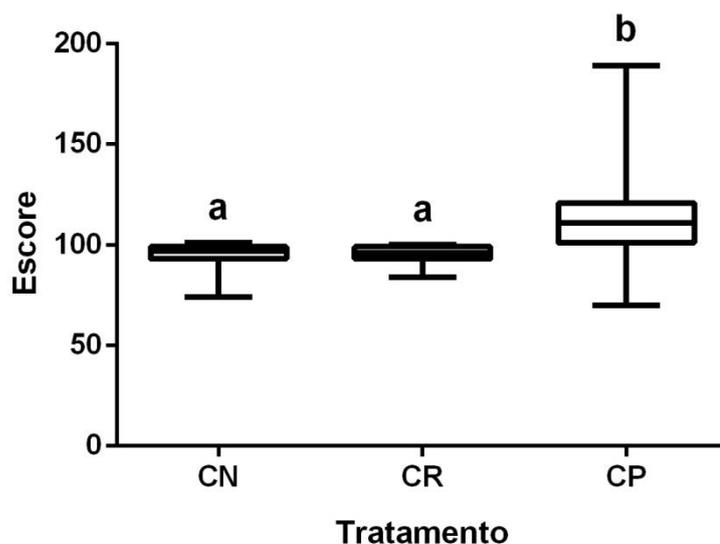
	CN	CP	DBP I	DBP II	DBP III
Notched	0 (0-0)	0 (0-1,25)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
Blebbled	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Vacuolated	2 (1-6)	6,5 (2,75 – 10,25)	5 (3-10)	3 (2-9)	4,5 (2-5,25)
AENT	3 (2-8)	7 (2,75-10,75)	5 (3-11)	4 (3-9)	5 (4-8)

4.2 ANÁLISES DO ENSAIO COMETA

Assim como para o teste do Micronúcleo Písceo, a análise estatística para o Ensaio Cometa foi realizada separadamente para os dois contaminantes. No GRÁFICO 1 é apresentada uma comparação entre os grupos controle. Após aplicação do teste de Kruskal-Wallis, foi verificada diferença significativa entre os

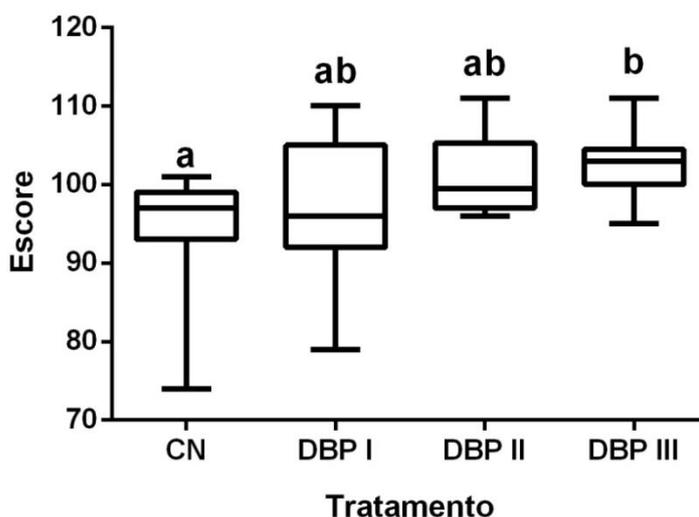
escores dos controles negativo (CN) e controle ração (CR) em relação ao controle positivo (CP). As letras diferentes acima das barras de cada tratamento demonstram diferença significativa ($p < 0,05$). Além disso, não foi observada diferença entre o controle negativo e controle ração, dessa forma para as demais análises estatísticas o controle negativo foi o único considerado.

GRÁFICO 1 – ENSAIO COMETA: CONTROLES



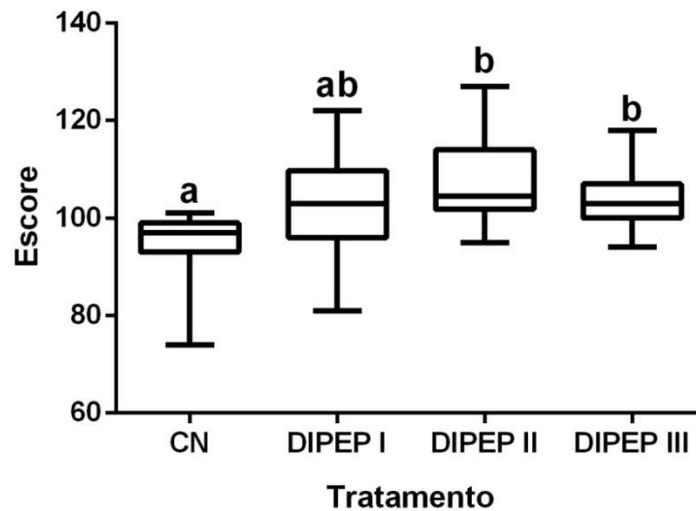
Em relação ao DBP, apenas na maior concentração do contaminante foi possível observar aumento significativo do escore em relação ao controle negativo ($p = 0,0412$), como demonstrado pelo GRÁFICO 2. Não foram observadas alterações significativas no escore entre as diferentes doses de exposição.

GRÁFICO 2 – ENSAIO COMETA: DBP



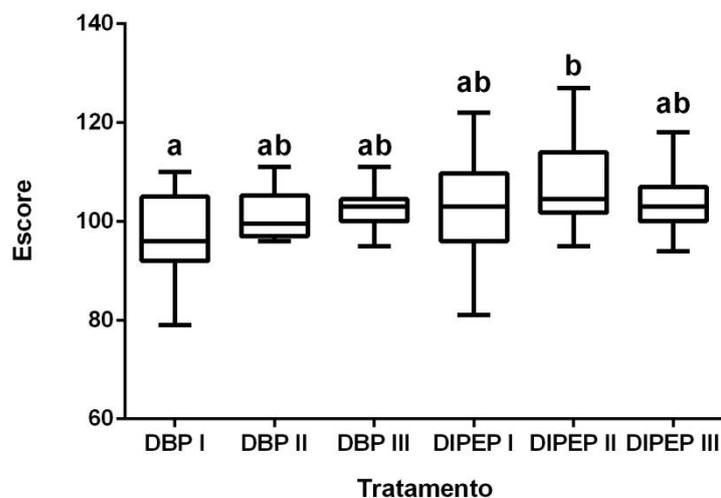
Na análise do DiPeP (GRÁFICO 3) foram demonstradas diferenças significativas entre o controle negativo e as duas maiores doses de exposição ao ftalato, com p de 0,0017 para o DiPeP II e p de 0,047 para o DiPeP III. . Assim como no caso do DBP, não foram verificadas diferenças entre os grupos de exposição ao contaminante.

GRÁFICO 3 – ENSAIO COMETA: DIPEP



Por fim, foi realizada a comparação entre os dois contaminantes, na qual foi possível verificar diferença significativa apenas entre o escore obtido para a exposição ao DiPeP II em relação ao DBP I (GRÁFICO 4).

GRÁFICO 4 – COMPARAÇÃO ENTRE CONTAMINANTES



5. DISCUSSÃO

Apesar das diversas leis e regulamentações visando à restrição dos ftalatos, sua produção e consumo anual ainda são mantidos, especialmente por países em desenvolvimento como o BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul) (BÉRGE et al., 2013). Esse fato é preocupante quando considerados estudos toxicológicos e ecotoxicológicos que demonstram efeitos importantes dessas substâncias em concentrações ambientais, principalmente em organismos aquáticos (OEHLMANN et al., 2009).

No presente estudo não foram detectadas diferenças significativas na frequência de micronúcleos e na maioria das alterações eritrocitárias entre os grupos controle e de exposição ao DiPeP e DBP. Em testes do micronúcleo píceo utilizando o tecido sanguíneo, os micronúcleos e alterações eritrocitárias observadas correspondem aos eventos que ocorreram durante o tempo de vida celular dos eritrócitos, considerando que em peixes o tecido hematopoiético é o rim anterior (UDROIU, 2006). Logo, os micronúcleos resultantes de danos causados pelo contaminante só podem ser observados após o primeiro ciclo celular depois de sua ocorrência. Com isso, seria necessário o conhecimento do tempo de vida dessas células, da proliferação de novas células e sua maturação, que são variáveis de acordo com a espécie do peixe e condições ambientais às quais o organismo está exposto (AL-SABTI, 1995).

Ademais, os resultados obtidos podem ser consequência de uma exposição subcrônica. Em ensaios crônicos, ou seja, em que o tempo de realização do experimento corresponde a cerca de 30% a 40% da vida do animal, seria mais recomendada a aplicação do teste do micronúcleo utilizando sangue circulante (UDROIU, 2006). Deve-se considerar ainda a sensibilidade do teste que não detecta erros ou danos ao DNA se esses não provocaram perda cromossômica na divisão celular ou aberrações causadas por rearranjo (METCALFE, 1989).

Outro fator a ser considerado na interpretação dos resultados é o fato de que alguns agentes genotóxicos, quando em determinadas concentrações, têm propriedades citotóxicas (UDROIU, 2006; GUILHERME et al., 2008). Portanto,

devido à inibição da divisão celular por estes xenobióticos, a hematopoiese pode ser reduzida, gerando um resultado falso negativo.

Por fim, deve-se ressaltar a presença de resultados significativos com relação à alteração eritrocitária do tipo *notched* no grupo de exposição ao contaminante DiPeP I em comparação ao controle negativo. As variações na forma do núcleo podem ser uma alternativa para o estudo da genotoxicidade, aumentando a sensibilidade do Teste do Micronúcleo (HOOFTMAN et al., 1982; VICARI et al., 2012). Além disso, apesar de seus mecanismos de formação ainda não serem explicados, existem indicativos de que as alterações nucleares sejam uma consequência do efeito de xenobióticos (FERRARO et al., 2004).

Em relação ao Ensaio Cometa, foi possível verificar resultados significativos de ambos os contaminantes quando comparados com o controle negativo. Em sua maior concentração, o DBP apresentou um aumento significativo do escore em relação ao controle, representando maior dano ao material genético induzido pelo contaminante. Esse resultado corrobora com estudos realizados por Du et al. (2015). Em sua pesquisa, espécimes de *Eisenia fetida* foram expostos ao contaminante e verificou-se que na maior concentração de DBP o dano provocado ao material genético foi máximo. Seu efeito genotóxico já foi demonstrado também para células humanas (KLEINSASSER et al., 2001), fator que é preocupante, pois, através de exames de urina com uma população de referência, BLOUNT et al. (2000) constatou a exposição a grandes quantidades de DBP em comparação com os demais ftalatos.

Para o DiPeP, a análise estatística demonstrou diferença significativa entre o controle negativo e as duas maiores concentrações do contaminante, evidenciando o dano ao material genético das células renais. Esse ftalato ainda não foi detectado em outros países (SOUZA et al., 2018), portanto poucas são as informações acerca de sua presença no ambiente e possíveis efeitos. No entanto, os resultados obtidos são um indicador importante de efeitos nocivos dessa substância ao DNA, apesar de não necessariamente indicarem a indução de mutagênese, visto que os danos verificados pelo Ensaio Cometa são passíveis de reparo (ANDERSON et al., 1999). Também é possível observar uma aparente relação dose-dependente entre a quantidade de dano ao DNA e concentração do contaminante.

Finalmente, deve-se considerar ainda que, apesar da ausência de resultados significativos nas concentrações mais baixas de ambos os contaminantes, não devem ser descartados efeitos prejudiciais desses xenobióticos tanto para animais quanto para seres humanos. No ambiente, organismos estão vulneráveis a uma ampla variedade de substâncias e, portanto, os efeitos cumulativos dessas devem ser considerados.

6. CONCLUSÃO

Por meio dos testes realizados nesta pesquisa foi possível constatar os efeitos genotóxicos do DBP já antes demonstrados por alguns estudos. Também foi verificado o potencial genotóxico do DiPeP de maneira inédita, visto que apenas pesquisas acerca dos seus efeitos reprodutivos haviam sido realizadas por Souza et al. (2018). Junto a isso, foi verificada novamente a alta sensibilidade do Ensaio Cometa para detectar quebras na fita de DNA. No entanto ainda são necessários estudos de quantificação acerca do nível de reparo dos danos causados por ftalatos.

A espécie *Rhamdia quelen* demonstrou certa sensibilidade para algumas das doses propostas, sendo um bom bioindicador, apesar de, por meio do teste do micronúcleo písceo, não terem sido obtidos resultados significativos.

Ainda assim, são necessários mais estudos, especialmente acerca do DiPeP, para sua melhor detecção no ambiente e investigação de seus possíveis efeitos não apenas sozinho, mas quando em interação com outras substâncias.

REFERÊNCIAS

- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Genetic Toxicology**, v. 343, p. 121–135, 1995.
- ANDERSON, D.; YU, TW.; HINÇAL, F. Effect of some phthalate esters in human cells in the Comet Assay. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 19 (4), p. 275-280, 1999.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 83, de 17 de junho de 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2859796/RDC_83_2016_.pdf/940b7b9d-9806-429e-ae11-f8ea0a375bd3> Acessado em: 23 jul. 2019.
- AOKI, K. A. A.; HARRIS, C. A.; KATSIADAKI, I.; SUMPTER, J. P. Evidence suggesting that di-n-butyl phthalate has antiandrogenic effects in fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, p. 1338–1345, 2011.
- AUTIAN, J. Toxicity and health threats of phthalate esters: review of the literature. **Environmental Health Perspectives**, v. 4, p. 3–26, 1973.
- BERGÉ, A.; CLADIÈRE, M.; GASPERI, J.; COURSIMAULT, A.; TASSIN, B.; MOILLERON, R. Meta-analysis of environmental contamination by phthalates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20(11), p. 8057–8076, 2013.
- BEYER, J. Fish biomarkers in marine pollution monitoring: evaluation and validation in laboratory and field studies. Academic thesis, University of Bergen, Norway, 1996.
- BHATIA, H.; KUMAR, A.; CHAPMAN, J. C.; McLAUGHLIN, M. J. Long-term exposure to di-n-butyl phthalate inhibit body growth and impair gonad development in juvenile Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). **Journal of applied Toxicology**, v. 35 (7), p. 806-816, 2015.
- BLOUNT, B. C.; SILVA, M. J.; CAUDILL, S. P.; NEEDHAM, L. L.; PIRKLE, J. L.; SAMPSON, E. J.; LUCIER, G. W.; JACKSON, R. J.; BROCK, J. W. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 979–982, 2000.
- BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholisgunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, p. 383-392, 2001.
- BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Criticals Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, p. 201-268, 1995.
- CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47 (3), p. 2123–2136, 1990.

CASALS-CASAS, C.; DESVERGNE, B. Endocrine Disruptors: from endocrine to metabolic disruption. **Annual Review of Physiology**, v. 73(1), p. 135–162, 2011.

CHEN, X.; XU, S.; TAN, T.; TING LEE, S.; CHENG, S. H.; LEE, F. W. F.; XU, S. J. L.; HO, K. C. Toxicity and Estrogenic Endocrine Disrupting Activity of Phthalates and Their Mixtures. **International journal of environmental research and public health**, v. 11 (3), p. 3156-68, 2014.

DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 3 (3), p. 161-172, 1994.

DU, L.; LI, G.; LIU, M.; LI, Y.; YIN, S.; ZHAO, J.; ZHANG, X. Evaluation of DNA and antioxidant system induced by di-n-butyl phthalates exposures in earthworms (*Eisenia fetida*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 115, p. 75-82, 2015.

ERKEKOGLU, P.; KOCER-GUMUSEL, B. Genotoxicity of phthalates. **Toxicology Mechanisms and Methods**, 2014.

EUROPEAN CHEMICAL BUREAU. Risk assessment report bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). v. 80, 2008.

FATOKI, O. S.; VERNON, F. Phthalate esters in rivers of the greater Manchester area, U.K. **The Science of the Total Environment**, v. 95, p. 227-232, 1990.

FATOKI, O. S.; BORNMAN, M.; RAVANDHALALA, L.; CHIMUKA, L.; GENTHE, B.; ADENIYI, A. Phthalate ester plasticizers in freshwater systems of Venda, South Africa and potential health effects. **Water SA**, v. 36, p. 117–125, 2010.

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

FERREIRA, I. D.; MORITA, D. M. Ex-situ bioremediation of Brazilian soil contaminated with plasticizers process wastes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 77–86, 2012.

FRANCO, R.; SCHONEVELD, O.; GEORGAKILAS, A. G.; PANAYIOTIDIS, M. I. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 266, p. 6-11, 2008.

FOSTER, P. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 140–147, 2006.

FREDERIKSEN, H.; JENSEN, T. K.; JØRGENSEN, N.; et al. Human urinary excretion of non-persistent environmental chemicals: an overview of Danish data collected between 2006 and 2012. **Reproduction**, v. 147, p. 555-565, 2014.

FREDERIKSEN, H.; SØRENSEN, K.; MOURITSEN, A.; et al. High urinary phthalate concentration associated with delayed pubarche in girls. **International Journal of Andrology**, v. 35, p. 216-226, 2012.

GIAM, C. S.; CHAN, H. S.; NEFF, G. S.; ATLAS, E. L. Phthalate ester plasticizers: a new class of marine pollutant. **Science**, v. 199, p. 419-421. 1978.

GIAM, C. S.; ATLAS, E.; POWERS, M. A.; LEONARD, J. E. Phthalic acid esters. **The handbook of environmental chemistry**, v. 3, part C. Berlin: Springer, 1984. p. 67-142.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biology of *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30 (1), 2000.

GUILHERME, S.; VÁLEGA, M.; PEREIRA, M. E.; SANTOS, M. A.; PACHECO, M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 411-421, 2008.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; et al. Fourth international comet assay workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet Assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURHIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. 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, p. 61-118, 1983.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18 (4), p. 277-291, 1991.

HEUDORF, U.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; ANGERER, J. Phthalates: toxicology and exposure. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210 (5), p. 623-34, 2007.

HITES, R. A.; BIEMANN, K. Water pollution: organic compounds in the Charles River, Boston. **Science**, v. 178, p. 158-160, 1972.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v. 104, p. 147-152, 1982.

HUTZING, O. Anthropogenic compounds. **The handbook of environmental chemistry**, v. 3, part C. Berlin: Springer, 1984. p. 66-100.

KIM, H. S.; KIM, T. S.; SHIN, J. H.; MOON, H. J.; KANG, I. H.; KIM, I. Y.; OH, J. Y.; HAN, S. Y. Neonatal exposure to di(n-butyl) phthalate (DBP) alters male reproductive-tract development. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 67, p. 2045–2060, 2004.

KLEINSASSER, N. H.; WALLNER, B. C.; KASTENBAUER, E. R.; WEISSACHER, H.; HARRÉUS, U. A. Genotoxicity of Di-Butyl-Phthalate and Di-Iso-Butyl- Phthalate in human lymphocytes and mucosal cells. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 31 (3), p. 189-196, 2001.

LATINI, G. Monitoring phthalate exposure in humans. **Clinica chimica acta: International Journal of Clinical Chemistry**, v. 361(1–2), p. 20–29, 2005.

MONTUORI, P.; JOVER, E.; MORGANTINI, M.; BAYONA, J. M.; TRIASSI, M. Assessing human exposure to phthalic acid and phthalate esters from mineral water stored in polyethylene terephthalate and glass bottles. **Food Additives & Contaminants : Part A**, v. 25 (4), p. 551–518, 2008.

NASCIMENTO FILHO, I. do.; VON MUHLEN, C.; SCHOSSLER, P.; CARAMAO, E. B. Identification of some plasticizers compounds in landfill leachate. **Chemosphere**, v. 50, p. 657–663, 2003.

NET, S.; DUMOULIN, D.; EL-OSMANI, R.; RABODONIRINA, S.; OUDDAN B. Case study of PAHs, Me-PAHs, PCBs, phthalates and pesticides contamination in the Somme River water, France. **International Journal of Environmental Research**, v. 8, p. 1159–1170, 2014.

ORTIZ-ZARRAGOITIA, M.; TRANT, J. M.; CAJARAVILLE, M. P. Effects of dibutylphthalate and ethynylestradiol on liver peroxisomes, reproduction, and development of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25 (9), p. 2394-2404, 2006.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation - induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 291–298, 1984.

PIERCE, R. C.; MATHUR, S. P.; WILLIAMS, D. T.; BODDINGTON, M. J. Phthalate esters in the aquatic environment. **National Research Council of Canada Reoirt**, n. 17583. National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario. 1980.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, v. 246, p. 352-358, 1989.

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 (1-4), p. 77-85, 2009.

RANKE, J. Classification and risk assessment of chemicals: the case of DEHP in the light of REACH. **The Journal of Transdisciplinary Environmental Studies**, v. 4 (3), p. 15, 2005.

SANTANA, J.; GIRAUDI, C.; MARENGO, E.; ROBOTTI, E.; PIRES, S.; NUNES, I.; GASPAR E. M. Preliminary toxicological assessment of phthalate esters from drinking water consumed in Portugal. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 21, p. 1380–1390, 2014.

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

SELVARAJ, K. K.; SUNDARAMOORTHY, G.; RAVICHANDRAN, P. K.; GIRIJAN, G. K.; SAMPATH, S.; RAMASWAMY, B. R. Phthalate esters in water and sediments of the Kaveri River, India: environmental levels and ecotoxicological evaluations. **Environmental Geochemistry and Health**: v. 37(1), 2014.

SERRANO, S. E.; BRAUN, J.; TRASANDE, L.; DILLS, R.; SATHYANARAYANA, S. Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data. **Environmental Health Global**, v. 13, p. 43, 2014.

SERÔDIO, P.; NOGUEIRA, J. M. F. Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water. **Water Research**, v. 40 (13), p. 2572–2582, 2006.

SILFVERGRIP, A. M. C. A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). 156p. PhD Thesis - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden, 1996.

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

SOUZA, M. B.; PASSONI, M. T.; PÄLMKE, C.; MEYER, K. B.; VENTURELLI, A. C.; ARAÚJO, G.; CASTILHOS, B. S.; MORAIS, R. N.; DALSENTER, P. R.; SWAN, S. H.; KOCH, H. M.; MARTINO-ANDRADE, A. J. Unexpected, ubiquitous exposure of pregnant Brazilian women to diisopentyl phthalate, one of the most potent antiandrogenic phthalates. **Environment International**, v. 119, p. 447-454, 2018.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206–221, 2000.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 79 (2), p. 201-4, 2006.

UREN-WEBSTER, T. M.; LEWIS, C.; FILBY, A. L.; PAULL, G. C.; SANTOS, E. M. Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 99 (3), p. 360–369, 2010.

USEPA. Phthalates action plan. 2012. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/phthalates_actionplan_revised_2012-03-14.pdf>. Acesso em: 28 de fev. 2019.

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, p. 57-149, 2003.

VICARI, T.; FERRARO, M. V.; RAMSDORF, W. A.; MELA, M.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; CESTARI, M. M. Genotoxic evaluation of different doses of methylmercury (CH₃Hg⁺) in *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 82, p. 47-55, 2012.

WOLF, C. Jr; LAMBRIGHT, C.; MANN, P.; PRICE, M.; COOPER, R. L.; OSTBY, J.; GRAY, L. E. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 94–118, 1999.

XU, H.; SHAO, X.; ZHANG, Z.; ZOU, Y.; WU, X.; YANG, L. Oxidative stress and immune related gene expression following exposure to di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate in zebrafish embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 39–44, 2013.

XU, N.; CHEN, P.; LIU, L.; ZENG, Y.; ZHOU, H; LI, S. Effects of combined exposure to 17 alpha-ethynylestradiol and dibutyl phthalate on the growth and reproduction of adult male zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 61–70, 2014.