



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS PRESENTES EM ÁGUAS DE RIOS
IMPACTADOS POR EFLUENTE DE INDÚSTRIA PETROQUÍMICA**

MARIA TEREZA PAMPLONA SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)

RIO CLARO –SP
ABRIL/2013

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS PRESENTES EM ÁGUAS DE RIOS
IMPACTADOS POR EFLUENTE DE INDÚSTRIA PETROQUÍMICA**

MARIA TEREZA PAMPLONA SILVA

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Aparecida Marin Morales

Dissertação apresentada ao I
de Biociências da Univer
Estadual Paulista, Campus
Claro, como parte dos req
para obtenção do título de
em Ciências Biológicas, ár
Biologia Celular e Molecular

**RIO CLARO –SP
ABRIL/2013**

*Dedico esse trabalho
a Deus, meus pais Odenil e
Iraní e meu irmão Bruno*

*“Posso, tudo posso
Naquele que me fortalece.
Nada e ninguém no
mundo vai me fazer
desistir.” (Celina Borges).*

AGRADECIMENTOS

À Deus, Aquele que permitiu que eu vencesse mais essa etapa, que me levantou quando eu caí, e foi a minha força quando eu não tinha mais forças, agradeço principalmente por Ele ter me fortalecido quando tive medo, e por colocar no meu caminho novos amigos ou anjos, tão especiais. Sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais, Odenil e Irani, que me deram a vida e todo o amor e a base, que me ensinaram a lutar pelos meus sonhos e fizeram o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui. Agradeço a vocês por todos os sacrifícios feitos por vocês para que eu realizasse esse sonho. Vocês são meus alicerces, o amor maior que existe.

Ao meu irmão, Bruno, que mesmo distante sempre torceu por mim e sempre acreditou que eu fosse capaz.

A toda minha família, tios, tias e primos que torceram, acreditaram e sempre demonstraram amor, carinho e confiança em mim. Também agradeço pelos momentos de descontração em família, sempre tão importantes para o descanso da mente e o conforto do coração.

Às minhas irmãs de alma, Ana Carolina, Érika e Adna, que foram minhas amigas, no sentido mais puro da palavra, estavam comigo sempre, mesmo a distância. Obrigada por me apoiarem, por me acalmarem, por me aconselharem e por me manterem com os pés no chão e a mente no céu, sempre.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Aparecida Marin Morales, por ter me acolhido e me “adotado” (hehehe...). Obrigada por me acolher nesse grupo de pesquisa maravilhoso, onde aprendi muito. Obrigada por toda a PACIÊNCIA (e que paciência!), pela dedicação, pela orientação e principalmente por ter me dado a oportunidade de aprender tanto com você.

A minha “irmã gêmea ou prima” Raquel, que foi pra mim a minha família em Rio Claro, a amiga que me acalmou e que me ajudou em tudo desde o início. Obrigada, pelo incentivo, por ter me acolhido aqui e por todas as risadas que você sempre proporciona. Agradeço também pela ajuda nos artigos, eu sei que deu trabalho, mas agradeço a paciência!

A minha outra “irmã gêmea ou prima” Marcia, por ser também a nossa segunda família, por sempre me aconselhar com toda a sua experiência (não me mata!), por ter paciência comigo, mesmo com as minhas distrações, e por estar sempre do meu lado seja para dar aquela mãozinha ou para dar broncas. Ah,

obrigada também pela parceria no artigo e nos experimentos de cultura! E lógico, por quebrar um galhão com os abstract, você é demais (hehehe...)!

Aos meus amigos-irmãos, Rê e Preto, que me ouviram, me aguentaram e me aconselharam em vários momentos em que eu surtei, e principalmente, nesses momentos me fizeram rir.

Às amigas “sogras”, Vane, Mayra, Camis, Miri, Silbi e Tabs, agradeço imensamente por todas as orações, pela torcida e, lógico, por todos os momentos de diversão e risadas.

Às amigas da biomed, Jú, Lê, Mary, May, Rê e Tata que mesmo nos encontrando poucas vezes fizeram parte dessa conquista.

Aos amigos mutagênicos, Michele, Lais, Cris, Livia, Leo, Nádia, Jaque Pira, Raquel, Matheus, Dânia, Jaque Bianchi, Marcia e Bruna, por todas as risadas, brincadeiras durante todos os momentos, principalmente durante os intermináveis cometas, em que todo o cansaço se transformava em baboseiras. Obrigada por toda a ajuda nos experimentos de cultura, discussões (sobre assuntos sérios ou não), por todo o carinho (mesmo que este fosse demonstrado por porrada e zoação), por me acolherem aqui e acima de tudo isso, obrigada a todos por essa amizade louca que surgiu tão rapidamente. Valeu galera!

Ao Matheus, que mesmo tão atarefado, dispensou um tempinho nos mapas desse trabalho. Valeu, Chefe!

Aos agregados, Du e Hélio (irmão Tchô), pelos momentos de descontração e diversão, que fazem tanta diferença no processo.

Às amigas, Dânia e Jaque Bianchi, pela parceria no artigo de revisão. Obrigada Dânia, pela paciência em corrigir e tirar todas as minhas dúvidas, valeu por aceitar entrar nesse barco tão “na louca”. Obrigada de coração, meninas!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa concedida.

À CAPES pelos sete meses de bolsa concedida.

À Refinaria de Paulínia (REPLAN) por permitir a realização das coletas.

À Prof^a Dejanira de Franceschi de Angelis, Dilza Nalim e ao Zito por toda ajuda e incentivo para a realização desse trabalho, todos sempre dispostos a ajudar.

A todos os professores do departamento de biologia, da biologia celular e molecular, pela transmissão de conhecimento durante o mestrado.

À Profª Drª Dejanira de Franceschi de Angelis, por aceitar fazer parte da minha banca.

À Profª Drª Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, por aceitar, novamente, fazer parte da minha banca.

À técnica Roberta, pela ajuda nesse trabalho e pelas risadas também.

Ao técnico Ger, pela ajuda, disponibilidade em ajudar sempre e por todo o bom humor que fazem toda a diferença.

À secretária do departamento, Lu que sempre se mostrou muito solícita em me ajudar em tudo que estivesse ao seu alcance.

A todos os colegas do departamento de biologia pelo convívio agradável de todos os dias.

Espero não ter deixado ninguém de fora! Enfim, agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram direta ou indiretamente para que eu alcançasse esse sonho... OBRIGADA A TODOS!

Resumo

A industrialização apresenta inúmeros benefícios, mas também está associada à emissão constante de substâncias tóxicas no meio ambiente. As atividades industriais lançam diversos produtos químicos que contaminam os vários meios físicos como o solo, o ar e a água. A indústria de refino de petróleo representa um importante setor da economia, mas, em contra partida, produz efluentes que podem ser ricos em metais pesados e outros compostos inorgânicos perigosos, além de uma infinidade de substâncias orgânicas com potencialidade de interagir com os organismos vivos. Dentre os contaminantes orgânicos derivados do petróleo, os mais importantes são os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA). Os HPAs são reconhecidamente estrogênicos, ou seja, possuem potenciais de ação no sistema endócrino. Dentre os efeitos causados pelas substâncias com ação semelhante à endócrina estão a diminuição da capacidade reprodutiva, inversão sexual, problemas no desenvolvimento embrionário e câncer. Devido a estes fatores, tem havido um incentivo ao desenvolvimento e aplicação de novas técnicas que possam avaliar, de maneira eficiente, os contaminantes ambientais, decorrentes das atividades humanas. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a genotoxicidade, mutagenicidade de amostras de águas dos rios Jaquari, Atibaia e Piracicaba, que estão em uma região sob a influência da atividade da refinaria de Paulínia – SP. Para a avaliação das águas destes rios (realizadas com os extratos obtidos por extração de fase sólida - EFS), foram aplicadas técnicas desenvolvidas células de hepatoma humano (HepG2) mantidas em cultura. Foram desenvolvidos com este sistema teste o ensaio do cometa e o teste de micronúcleo. As análises químicas realizadas por HPLC indicaram a presença de naftaleno nas amostras de águas destes rios, bem como de outros compostos capazes de induzir danos, mesmo quando em baixas concentrações. Foi possível observar também, uma relação direta entre sazonalidade e indução de danos no DNA, influenciada pelas diferenças dos padrões de pluviosidade e temperatura. A avaliação das amostras foi realizada com o extrato bruto e diluído (obtido por meio de extração de fase sólida), por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo com cultura de células de hepatoma humano (HepG2). Para os extratos brutos das coletas de novembro de 2011, foi observada, pelo ensaio do cometa, uma alta genotoxicidade das águas do rio Jaguari e das águas do efluente lançado pela refinaria, mas uma diminuição gradativa da genotoxicidade para os pontos abaixo do lançamento do efluente. Para o extrato diluído, foi observado uma redução dos danos, quando estes resultados foram comparados com os resultados registrados para os extratos brutos. Na coleta de março de 2012, extrato bruto, foi observada uma maior genotoxicidade para as águas do rio Atibaia. Estes efeitos foram diminuídos, nos extratos diluídos. Para o mês de maio de 2012 (extrato bruto), os resultados observados indicaram maior genotoxicidade da água de captação, em relação ao efluente tratado. O rio Piracicaba apresentou uma genotoxicidade menor que a do controle negativo (CN). Já para as análises do extrato diluído, não foi observada genotoxicidade. O teste de micronúcleo, realizado com o extrato bruto de águas coletadas em novembro de 2011, indicou mutagenicidade apenas para P4. Na coleta de maio de 2012 houve um aumento na frequência de micronúcleos apenas em P1 e P2. Os extratos diluídos de maio de 2012 apresentaram uma diminuição do número de

micronúcleos em relação ao extrato bruto. Pelos bioensaios realizados, pode-se observar que existe uma correlação direta entre as mudanças sazonais e a indução de danos no DNA. Pelas análises químicas, foi possível inferir um baixo comprometimento dessas águas por HPA. Assim sugerimos que seja realizada, nestes rios, uma avaliação mais detalhada, dos seus prováveis contaminantes e, assim, estimar os reais interferentes na qualidade de suas águas.

Palavras-chave: ecotoxicologia aquática; extração de fase sólida; disruptores endócrinos; cultura de células; ensaio do cometa; micronúcleo.

ABSTRACT

Industrialization presents countless benefits, but is also associated to the constant emission of toxic substances into the environment. Industrial activities release several chemical products that contaminate the several physical media such as soil, air and water. Petroleum refinery industry represents an important sector of the economy, however, in counterpart, produces effluents that can be rich in heavy metals and other hazardous inorganic compounds, besides infinitude of organic substances with the potential to interact with living organisms. Among the organic contaminants derived from petroleum, the most important are the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PHA). PHAs are known to be estrogenic, i.e., have the potential to act in the endocrine systems. Among the effects caused by endocrine substances are the decrease in the reproductive capacity, sex inversion, problems in the embryonic development and cancer. Due to these factors, there has been an incentive to the development and application of new techniques that can evaluate, efficiently, the environmental components resulted from human activities. Thus, the present study aimed to assess the genotoxicity and mutagenicity of water samples from Jaguari, Atibaia and Piracicaba rivers, which are in a region under the influence of the activity of a refinery of Paulínia – SP. For the evaluation of the waters of these rivers (performed with extracts obtained by solid phase extractions – SPE), it was applied techniques with human hepatoma cells (HepG2) maintained in culture. The comet assay and micronucleus test were developed with this test system. The chemical analyses showed the presence of naphthalene in the water samples of these rivers, as well as other compounds capable of inducing damages, even when at low concentrations. It was also possible to observe a direct relationship between seasonality and induction of damages in the DNA, influenced by the differences in the patterns of rainfall and temperature. The evaluation of the samples was performed with the raw and diluted extract (obtained by solid phase extraction) with the comet assay and micronucleus test with cultured human hepatoma cells (HepG2). For the raw extractions collection of November 2011, it was observed, by the comet assay, a high genotoxicity of the waters from Jaguari River and the effluent discharged by the refinery, but a gradual decrease of the genotoxicity for the sites below the effluent discharge. For the diluted extract, it was observed a reduction of the damages, when these results were compared to those registered for the raw extracts. In the collection of March 2012, raw extract, it was observed a higher genotoxicity for the Atibaia River waters. In the collection of March 2012, raw extract, it was observed a higher genotoxicity for the Atibaia River waters. These effects decreased in the diluted extracts. For May 2012 (raw extract), the results showed a higher genotoxicity for the uptake water in relation to the treated effluent. The Piracicaba River presented a genotoxicity lower than the negative control (NC). For the analyses of the diluted water, it was not observed genotoxicity. The micronucleus test, performed with the raw

extract of the waters collected in November 2011, showed mutagenicity only for P4. In the collection of May 2012 there was an increase in the frequency of micronuclei only in P1 and P2. The diluted extracts of May 2012 presented a decrease in the number of micronuclei in relation to the raw extract. From the bioassays used, it could be observed a direct correlation between the seasonal changes and induction of damages in the DNA. According to the chemical analyses, it was possible to infer a low impairment of these waters by PAH. Therefore, we suggest the fulfilment, in these rivers, of a more detailed assessment of their probable contaminants and, thus, estimate the real interfering in the quality of their waters.

Key-words: aquatic ecotoxicology; solid phase extraction; endocrine disruptors; cell culture; micronucleus.

Lista de abreviaturas

- OH	Hidroxila
17βE2	17 β estradiol
APEO	Alquilfenóis etoxilados
APs	Alquilfenóis
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BLYES	Bioluminescent yeast estrogen assay
BPA	Bisfenol A
CBMN	Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese
CEAPLA	Centro de Análise e Planejamento Ambiental da Unesp de Rio Claro
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CHO	Células de Ovário de Hamster Chinês
CN	Controle Negativo
CONAMA	Conselho nacional do meio ambiente
CP	Controle positivo
DBP	Dibutil ftalato
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DE	Disruptor endócrino
DEHP	Di-(2-etil-exil) ftalato
DES	Dietilestilbestrol
DIBP	Diisobutilftalato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético

EE2	Etinilestradiol
EEQ	Equivalente estradiol
EFS	Extração de fase sólida
ER	Estrogen receptor (Receptor de estrógeno)
ETEs	Estações de tratamento de esgoto
FG	Células de brânquias
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GST	Glutathione S-transferase
H	Hidrogênio
HepG2	Célula de hepatoma humano
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta performance)
HTC	Células de Fígado de Rato
LE	Lagoa de estabilização
LH	Hormônio Luteinizante
MCF-7	Células de câncer de mama
MEHP	Mono- (2- etil-exil) ftalato
MELN	Células MCF-7 com transfecção de regulador de estrógeno
MEM	Meio mínimo essencial
MMS	Metilmetano sulfonato
MN	Micronúcleo
MVLN	Célula MCF-7 com transcrição de estrógeno específico
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NP	Nonilfenóis
OP	Octilfenóis
P.A	Para análise
PBB	Polibromobifenilo
PBS	Solução Salina tamponada com Fosfato
PCB	Bifenilas policloradas
PCJ	Bacia do Piracicaba, Capivari e Jundiá

pH	Potencial Hidrogeniônico
PVC	Cloreto de polivinila
qRT-PCR	PCR de transcriptase reversa em Tempo Real
Replan	Refinaria do Planalto Paulista
RNA	Ácido ribonucleico
RYA	Teste da levedura recombinante
S	Latitude
USEPA	United States Environmental Protection Agency
VTG	Vitelogenina
W	Longitude
YES	Yeast estrogen assay

Sumário

1 Introdução	14
2 Objetivos.....	16
3 Revisão de Literatura.....	17
3.1 Poluição ambiental.....	17
3.2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs).....	18
3.3 Atividade biológica dos HPAs.....	19
3.4 Bioensaios.....	20
3.4.1 Cultura de células	20
3.4.2 Ensaio do Cometa.....	21
3.4.3 Teste do micronúcleo.....	22
3.5 Classificação das águas.....	23
4 Material e Métodos.....	25
4.1 Materiais	25
4.1.1 Material de estudo.....	25
4.1.2 Localização da área de estudo e coleta das amostras de água	25
4.1.3 Material biológico usado no bioensaio	27
4.2 Métodos	27
4.2.1 Extração de fase sólida	27
4.2.2 Eluição das amostras.....	29
4.2.3 Bioensaios.....	30
5 Resultados	35
ARTIGO I: Compostos estrogênicos : características químicas, métodos de detecção, efeitos biológicos e ambientais.....	35
ARTIGO II: Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade das águas dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba na região de influência da refinaria de Paulínia.....	35
6 Considerações Finais.....	102
7 Referências Bibliográficas	108

1 Introdução

As atividades humanas têm gerado uma grande quantidade de resíduos que, por descaracterizarem o ambiente, são chamadas de poluentes ambientais. Por esta razão, atualmente tem sido dado um destaque especial às consequências desta poluição, que afeta tanto o ar, como a água e o solo. As principais atividades responsáveis pela poluição ambiental, por gerarem grande quantidade de resíduos lançados no ambiente, são decorrentes da urbanização, agricultura e do setor industrial. O aumento da produção das indústrias levou também ao aumento da quantidade de efluentes lançados no ambiente. Por esta razão, existe hoje a necessidade de constante monitoramento dos locais onde seus efluentes são lançados.

Dentre as indústrias com maior potencial poluidor, está a indústria do petróleo. O processo de refino de petróleo utiliza grande quantidade de água que, após a sua utilização contém resíduos que acabam sendo lançados no ambiente. Assim, grande quantidade de substâncias tóxicas geradas por este setor acaba alcançando, principalmente, os recursos hídricos, podendo então comprometer toda a biota associada a este sistema. Esse comprometimento pode acontecer mesmo após o tratamento dos resíduos de uma determinada empresa, quando esta não faz o tratamento adequado do seu efluente, levando assim a persistência de algumas substâncias tóxicas, próprias das atividades desenvolvidas. Muitas das substâncias presentes no efluente podem apresentar efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos, mesmo quando em baixas concentrações, colocando em risco os ecossistemas aquáticos e terrestres associados ao seu despejo.

Entre as substâncias presentes no efluente da indústria do petróleo, destacam-se os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), que são compostos capazes de causar danos celulares, por interagirem com as macromoléculas da célula. Diante disso, há uma necessidade eminente de estudos, geralmente desenvolvidos pela aplicação de bioensaios, que possam avaliar a presença e os efeitos desses contaminantes sob os organismos expostos. Dentre os bioensaios considerados eficientes para uma avaliação dos potenciais genotóxico e mutagênicos, estão os ensaios do cometa e o do micronúcleo (BARBEE et. al., 2008; SANCHÉZ-GUERRA et. al., 2012). Porém,

ainda torna-se necessário buscar novos testes e organismos sensíveis, que possam ampliar o conhecimento sobre o próprio poluente e também avaliar os possíveis impactos que este possa causar no meio e nos organismos a ele expostos.

Os testes com cultura de células *in vitro* têm ganhado maior popularidade, principalmente por serem alternativas aos testes *in vivo*, mas também por serem simples e fáceis de reproduzir. Dentre os testes realizados com cultura celular, destaca-se o ensaio do cometa, por ser um teste rápido, sensível, por necessitar de pequeno número de células e por ser capaz de detectar baixos níveis de danos no DNA.

Outro teste muito utilizado em cultura de células é o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese, modelo este muito utilizado pela facilidade de se observar micronúcleo em células binucleadas. O micronúcleo observado é decorrente da indução de quebras ou perdas cromossômicas que aconteceram em células expostas a um agente mutagênico, durante o evento de divisão celular.

O Rio Jaguari, localizado na região de Paulínia – SP é fonte de captação de água da maior Refinaria de Petróleo do Brasil e pertencente ao sistema PETROBRÁS. Esta atividade industrial produz efluentes que são lançados no Rio Atibaia, que, cerca de 1 Km após o recebimento do efluente se junta com o Rio Jaguari, formando o Rio Piracicaba. O Rio Piracicaba, por sua vez, possui grande importância para a região.

Assim, no presente estudo, foram realizados os testes do cometa, do micronúcleo, aplicados em cultura de células de hepatoma humano, para se avaliar o potencial genotóxico e/ou mutagênico de extratos puros e diluídos das águas dos rios do entorno da refinaria de Paulínia – SP (Atibaia, Jaguari e Piracicaba), bem como do efluente gerado pela própria refinaria de petróleo.

2 Objetivos

Diante do exposto acima, existe uma necessidade de se estabelecer metodologias que possam melhor avaliar os impactos sofridos por rios que recebem efluentes de atividades relacionadas com a indústria do petróleo. Desta forma, o presente projeto tem com o objetivo:

- Isolar, por meio da Extração de Fase Sólida (EFS), os HPAs presentes em amostras coletadas nos Rios Jaguari, Atibaia, Piracicaba e no efluente da refinaria de Paulínia, durante 3 diferentes períodos sazonais distribuídos entre os anos de 2011 e 2012;

- Analisar, por métodos químicos, a presença de HPAs nos extratos obtidos por meio da ESF das amostras coletadas nos Rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba, e no efluente da refinaria;

- Avaliar os efeitos genotóxico dos extratos brutos e diluídos das amostras de água dos Rios Atibaia, Jaguari, Piracicaba e no efluente da refinaria, por meio do ensaio do cometa e do teste de anormalidades nucleares em células HepG2;

- Avaliar os efeitos mutagênicos dos extratos brutos e diluídos de amostras de água dos Rios Atibaia, Jaguari, Piracicaba e do efluente da refinaria, por meio do teste do micronúcleo, realizados em células HepG2;

- Avaliar os efeitos sinérgicos e aditivos de contaminantes presentes nos Rios Atibaia, Jaguari e Piracicaba, quando associados com os poluentes do efluente da refinaria de Paulínia;

- Avaliar o comprometimento causado pela associação dos contaminantes presentes nos Rios Atibaia e Jaguari por meio de ensaios realizados com amostras de água coletadas no início do curso do rio Piracicaba.

3 Revisão de Literatura

3.1 Poluição ambiental

O termo poluição é, muitas vezes, utilizado de forma incorreta, por considerar poluição qualquer descarte de resíduo no ambiente. Porém, poluição é uma alteração ecológica provocada pelo homem, que induz um prejuízo, direto ou indireto, sob o bem-estar dos seres vivos, como, os danos nos sistemas naturais relacionados à água, ao solo e ao ar, e/ou ainda por comprometer as atividades econômicas, como a pesca e a agricultura (NASS, 2002). Segundo Fellenberg (1980), só é considerada poluição ambiental fatores que comprometam a saúde ou a sobrevivência humana.

De acordo com a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB (2001), um local ou área que esteja comprovadamente impactada pela introdução, acidental ou natural, de qualquer substância ou resíduo, pode ser considerada como uma área contaminada. Os poluentes ou contaminantes podem agir alterando as características naturais do local e causando impactos negativos sobre os organismos expostos. Por isso, os poluentes ambientais têm sido muito investigados quanto à sua ação, sob seres humanos e sob outras espécies, por meio de diversas avaliações, como as de teratogenicidade e carcinogenicidade (FONTENELE et al., 2010).

Historicamente, sempre houve a preocupação com a poluição aquática. Inicialmente, havia apenas uma preocupação com a estética da água utilizada no consumo humano (MORITA, 2010), mas hoje existe uma preocupação maior com relação à presença de substâncias tóxicas em recursos hídricos, até mesmo quando estes apresentam águas aparentemente limpas.

O descarte indiscriminado ou a liberação acidental de compostos químicos nocivos para o meio aquático podem levar a uma perturbação tanto na estrutura como no funcionamento dos ecossistemas (VANZELLA et al., 2007). Os ambientes aquáticos vêm recebendo uma grande variedade de químicos tóxicos provenientes de escoamento de aterros sanitários, efluentes domésticos, atividades agrícolas e industriais. Segundo Deguchi et al. (2007) e Alexandre et al. (2012), como a água é extremamente importante para o desenvolvimento das atividades humanas, a presença destes químicos em ambientes aquáticos pode interferir, diretamente, na vida do homem. Como

grande parte dos contaminantes aquáticos são substâncias potencialmente genotóxicas e carcinogênicas, a poluição da água pode se caracterizar em um grave problema para a saúde pública (OHE et al., 2004; VANZELLA et al., 2007). Os agentes carcinogênicos encontrados em ambientes aquáticos são classificados em dois grupos: os compostos persistentes, que incluem metais e HPAs, e os compostos voláteis (NAKAGAWA, 2003).

As atividades industriais são as grandes responsáveis pela poluição ambiental, principalmente porque alguns processos deste setor produzem grande quantidade de efluentes ou utilizam grandes quantidades de recursos naturais durante as suas atividades. No Brasil, existem estudos que demonstram que alguns setores industriais são mais poluentes que outros, como, por exemplo, as indústrias de ferro e aço; de celulose e papel; e do setor de petróleo e gás (DASGUPTA et al., 1998; SANTOS, 2005).

As atividades das refinarias de petróleo são consideradas altamente poluidoras, por exigirem uma grande quantidade de água para seu processamento e por seus efluentes possuírem diversos poluentes perigosos, como metais, fenóis, óleos e gorduras, amônia e HPAs (HOSHINA et al., 2008). Segundo Wake (2005), os efluentes das refinarias têm menos hidrocarbonetos leves do que o óleo bruto, mas possuem hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em maior quantidade. Estes HPAs apresentam maior toxicidade e persistência no ambiente. Mesmo que haja um tratamento desses efluentes, uma grande quantidade de compostos tóxicos pode persistir no efluente e, assim, comprometer o sistema receptor (AVCI et al., 2005).

3.2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Os hidrocarbonetos são compostos de carbono e hidrogênio que, quando submetidos a altas temperaturas, podem sofrer processos pirolíticos e de combustão incompleta (ZANDER, 1980; LIMA, 2006). São considerados como um dos componentes mais abundantes do ambiente aquático, decorrentes da presença de material orgânico nestes ambientes (MAIOLI et al., 2010). Os HPAs são contaminantes ambientais persistentes, presentes em misturas complexas e introduzidos no ambiente por processos naturais ou por atividades antropogênicas (RAMDINE, 2012). Porém, segundo Maioli et al.

(2010), os HPAs são originados, principalmente, de fontes antrópicas, oriundas do processo de refino do petróleo, de combustões incompletas de combustíveis e de queimadas de cana-de-açúcar e de capim. Apesar das fontes antropogênicas citadas, os HPAs também têm várias fontes naturais, como, combustão de biomassa e de transformação diagenética de rochas sedimentares.

O número de anéis dos HPAs, a presença de grupos ligados ao anel e o arranjo espacial destes anéis dependem da temperatura envolvida no processo de sua formação, do tempo de reação e da matéria orgânica original. De acordo com Blumer (1976), processos lentos e desenvolvidos em baixas temperaturas, como a formação de petróleo (100 a 150°C), favorecem a formação de alquilderivados de HPAs. Já os processos decorrentes de temperaturas muito elevadas, como o coqueamento do carvão (2000°C), levam à quebra das cadeias alifáticas e favorecem à formação de HPAs não-alquilados. Em temperaturas intermediárias, como na queima de lenha (400 a 800°C), pode ocorrer a formação de ambas as espécies químicas citadas acima.

Entre os HPAs, alguns deles, bem como os seus derivados, representam grande risco à saúde dos seres humanos. Este risco está vinculado à sua capacidade de interagir com o DNA e poder induzir, por exemplo, vários tipos de cânceres (BLUMER, 1976; ZANDER, 1980; BAIRD, 1995; FINLAYSON-PITTS; PITTS JR. 1997; PERERA, 1997; PEREIRA NETTO et al., 2000; DING et al., 2005).

3.3 Atividade biológica dos HPAs

Os HPAs podem entrar em contato com os seres vivos por inalação, contato ou ingestão. Estes compostos são, como a maioria dos poluentes orgânicos, lipofílicos. Como as membranas biológicas são principalmente compostas por lípidos, a taxa de absorção destes poluentes pelas células torna-se ainda mais facilitada. Após o contato com essas substâncias, grande parte dos seres vivos pode metabolizá-las, pelo processo de biotransformação. Esse processo consiste em uma sequência de reações enzimáticas, responsáveis pela conversão das substâncias lipossolúveis em hidrossolúveis, facilitando o processo de excreção (TUVIKENE, 1995; LOPES & ANDRADE,

1996; MARIN-MORALES et al., 2009). Entretanto, apesar do resultado esperado na biotransformação ser a desintoxicação, nem sempre o metabólito gerado é igual ou menos tóxico que o composto original. Assim, o metabólito pode apresentar uma toxicidade aumentada, por ser mais eletrolítico e mais reativo com as macromoléculas (DNA, RNA e proteínas) (TUVIKENE, 1995; MARIN-MORALES et al., 2009).

Os HPAs não são, de maneira geral, agentes carcinogênicos diretos. Sua ação é atribuída às substâncias geradas pelo metabolismo, que leva a formação de compostos polares e hidrofílicos, que depois de permanecer por um período no organismo são facilmente excretados pela urina (PEREIRA-NETTO, 2000; LIMA, 2006; MAZZEO, 2009). Após a entrada do HPA no organismo ocorre a formação de um anel epóxido sobre uma ligação dupla de carbono (C=C), que, em seguida, sofre uma reação com uma molécula de água, produzindo dois grupos hidroxila, formando assim compostos poli-hidroxilados. Uma ligação dupla, que contém o grupo -OH, sofre nova epoxidação, produzindo a molécula que realmente possui potencial carcinogênico. Esta molécula pode interagir com um H⁺, tornando-se estável e capaz de se ligar com o DNA, induzindo mutações (LOPES E ANDRADE, 1996; LIMA, 2006; MAZZEO, 2009).

3.4 Bioensaios

3.4.1 Cultura de células

Diante do controle mais rígido do uso de animais de laboratório em experimentos biológicos, tem sido cada vez mais incentivados o desenvolvimento e padronização de testes *in vitro* (ROGERO et al., 2003). Vários métodos *in vitro*, que são capazes de detectar e avaliar a toxicidade de materiais biológicos, foram padronizados com células mantidas em cultura. Os ensaios *in vitro* podem ser desenvolvidos com várias linhagens celulares, dentre elas as células de roedores (CHO) e humanas (metabolizadoras como HTC e HepG2). A linhagem das células HepG2 (Human Hepatocellular Carcinoma), muito utilizada em bioensaios de avaliação ambiental, foi obtida de um hepatoblastoma humano de um menino argentino de 11 anos (VALENTIN-SEVERIN, 2003; TSUBOY, 2007; MOORE, 2009).

Durante anos, a grande limitação em se realizar testes para avaliar efeitos de drogas em cultura células ou de bactérias, foi a falta de enzimas metabolizadoras destes sistemas. Por isso, foi necessário introduzir nestas células enzimas metabolizadoras. As células HepG2, são células que já possuem a capacidade de metabolismo por enzimas, por serem hepatócitos. Essa função tem papel chave na biotransformação de xenobióticos, sendo úteis para avaliar o efeito de químicos que tem tanto ação direta (do próprio agente estudado) como indireta (de seus metabolitos) (KNASMÜLLER et. al. 1998; OLIVEIRA, 2010). Como estas células possuem essa capacidade de metabolização, acredita-se ser uma boa opção para serem usadas em testes de mutagenicidade e genotoxicidade de drogas ou de amostras ambientais contaminadas (KNASMÜLLER et al.; 2004; JIANG et al, 2007; OLIVEIRA, 2010).

3.4.2 Ensaio do Cometa

Ostling e Johanson (1978) desenvolveram, na década de 80, um método de análise de danos no DNA, realizado com células únicas dispostas em gel e submetida a eletroforese. Este método passou a ser chamado de ensaio do cometa, ensaio de eletroforese em gel de célula única ou eletroforese de microgel (LIAO, 2009). Nestes ensaios, as células dispostas em lâminas cobertas de agarose, são lisadas e tratadas com sal. Após esses processos, obtem-se nucleóides, que são núcleos sem envoltórios nuclear mas com proteínas que mantêm a sua forma. Assim, o DNA é submetido a uma corrida eletroforética em condições neutras e corado com gel red (OSTLING & JOHANSON, 1984). Depois de alguns estudos, Singh e colaboradores (1988) modificaram esta técnica, utilizando-se um tampão alcalino na corrida eletroforética, sendo esta a forma mais utilizada hoje para este ensaio. Esta técnica, considerada um “endpoint” de genotoxicidade, permite detectar os danos ao DNA em células individuais, e quantificar quebras na fita desta macromolécula, tanto induzidas por agentes físicos como químicos (BELPAEME, 1998; Di PAOLO, 2006; LIAO et al., 2009). O teste se baseia na quantificação de fragmentos de DNA, que migram para fora do nucleóide, durante a corrida de eletroforese, decorrentes tanto de danos ao DNA, como de

processo de reparo celular feito por excisão de bases (FRENZILLI et al., 2009; LIAO et al., 2009). Por esta razão, tem crescido o interesse científico em utilizar o teste do cometa para avaliar as possíveis quebras no DNA induzidas por contaminantes e, portanto, para a realização de biomonitoramento ambiental e avaliação de genotoxicidade de substâncias, tanto em testes *in vivo* quanto *in vitro* (FRENZILLI et al., 2009; HARA, 2012; AZQUETA et al., 2013).

O ensaio do cometa ganhou popularidade por detectar baixos níveis de danos e de reparos no DNA, além de também possuir vantagens de poder ser aplicado em diversos tecidos e diferentes tipos celulares. Esta técnica requer um pequeno número de células e não necessita que estas estejam em divisão, podendo ser aplicada em qualquer fase do ciclo celular (PAVLICA et al., 2001; SPEIT et al., 2009; BERTHELOT-RICOU et al., 2011; HASPLOVÁ et al., 2012). De acordo com He et al. (2000), parte dos danos que ocorrem nas células pode ser reparada, dependendo do estágio do ciclo celular ou do tipo do mutágeno indutor do dano pois apenas uma pequena parte dos danos não são passíveis de reparo, e portanto, podendo levar a eventos de transformação do DNA e conseqüentemente a uma mutação.

3.4.3 Teste do micronúcleo

Micronúcleos (MN) são massas de cromatina com aparência de um pequeno núcleo, que se originam a partir de fragmentos de cromossomos ou de cromossomos inteiros que se perdem durante o processo de divisão e, portanto, não se incorporam ao núcleo principal das células-filhas, durante a divisão celular (SCHMIDT, 1976; AL-SABTI; METCALFE, 1995; FENECH, 2007). Estas perdas de material nuclear podem acontecer ou pela ausência de centrômero nas porções cromossômicas, por danos no aparelho mitótico ou por defeito na citocinese (BOLOGNESI et al., 2004; ERGENE et al., 2007). Os MN clássicos são estruturas circulares, de mesma refração do núcleo e não ligadas a ele, que apresentam tamanhos variando de 1/3 a 1/16 do diâmetro do núcleo principal (FENECH et al., 2003).

O teste do MN realizado *in vitro*, que se utiliza da citocalasina B (inibidor de polimerização da actina, que impede a citocinese, mas não impede a cariocinese), também é conhecido como teste micronúcleo com bloqueio de

citocinese (CBMN). Neste teste as células passam por apenas um ciclo de divisão, ficando com dois núcleos. Só são contabilizadas as células binucleadas, o que garante que este MN apareceu em decorrência da exposição dessas células ao agente mutagênico (FENECH; KIRSCH-VOLDERS, 1997; FENECH, 2000; FENECH, 2007; ÇAVAS et. al., 2012). Diante disso, essa técnica tem sido frequentemente utilizada para detectar a potencialidade genotóxica e mutagênica de agentes diversos, pela sua capacidade de promover quebras cromossômicas (ação clastogênica) ou perdas de cromossomos inteiros (ação aneugênica) (FENECH, 2000; TILMANT et al., 2013).

O teste do MN é uma das técnicas mais populares e promissoras usadas no monitoramento ambiental, por avaliar a potencialidade mutagênica de contaminantes ambientais, funcionando assim como um bom bioindicador de mutagenicidade (FENECH et al., 2003; BARSIENE et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006).

Alguns trabalhos demonstram ainda a aplicabilidade do teste em avaliar a extensão da poluição aquática, testando a genotoxicidade de poluentes, por meio de testes *in vivo* (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; BOETTCHER et al., 2010).

Estudos recentes demonstram também que esta técnica pode ser aplicada para avaliar, a presença de brotos e pontes nucleares estabelecidas entre os núcleos das células binucleadas. As pontes nucleoplasmáticas, provavelmente, são decorrentes de cromossomos dicêntricos, cujos centrômeros são tensionados para os polos opostos da célula, resultando em uma estrutura semelhante a ponte, que acaba sendo revestida pela membrana nuclear. Assim, a presença dessas pontes em células binucleadas são “endpoints” de genotoxicidade, que devem ser considerados conjuntamente com o teste de MN (FENECH, 2000; FENECH, 2007; DONMEZ-ALTUNTAS; BITGEN, 2012).

3.5 Classificação das águas

Os rios Atibaia e Jaguari pertencem à bacia do rio Piracicaba, bacia esta que possui uma área total de 8.852,97 Km². Os rios Atibaia e Jaguari

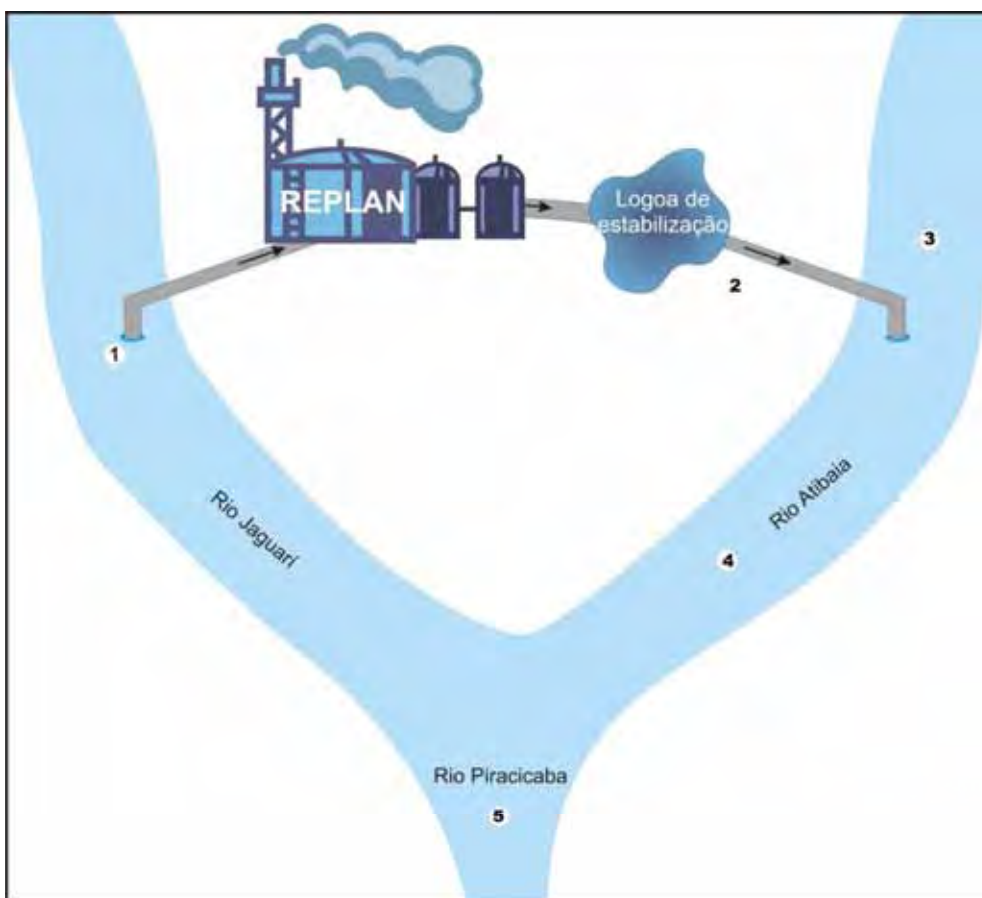
passam pelo município de Paulínia-SP, cidade esta que abriga 107 indústrias, entre elas a Refinaria de Petróleo de Paulínia. O Rio Jaguari é utilizado como fonte de captação de água destinada às atividades desta Refinaria que gera, após tratamento, efluentes que são lançados no Rio Atibaia.

O comitê das Bacias Hidrográficas do Piracicaba, Capivari e Jundiá (comitê PCJ), em um relatório da situação dos recursos hídricos descreveu a situação atual do rio Jaguari como rio de Classe 2 e do rio Atibaia como rio de classe 4. Esses dois rios se unem para formar o rio Piracicaba que, segundo o mesmo comitê, é caracterizado como pior que classe 4. A classificação das águas doce segue a resolução do CONAMA Nº 357/Cap II- Seção I/ Artigo 4º (2005), conforme descrito na tabela abaixo (Tabela 1):

Tabela 1. Classificação dos rios de água doce (CONAMA, 2005)

CLASSE DO RIO	CARACTERIZAÇÃO DA CLASSE
Classe especial	Águas que podem ser utilizadas para consumo humano, com desinfecção.
Classe 1	Águas que podem ser utilizadas para consumo humano após tratamento simplificado, para recreação, natação, mergulho, irrigação de hortaliças de consumo cruas ou com casca.
Classe 2	Águas que podem ser utilizadas para consumo humano após tratamento convencional, para recreação de contato, natação, mergulho, pesca e para irrigação de hortaliças e arvores frutíferas.
Classe 3	Podem ser utilizadas para consumo humano após tratamento convencional ou avançado, e para a irrigação de pastos, arvores e cereais, para recreação de contato secundário e para pesca amadora.
Classe 4	Águas que podem ser utilizadas apenas para navegação e harmonia paisagística.

Figura 2. Esquema representativo dos cinco pontos de coleta na área de influência da Refinaria de Paulínia - SP



1. P1: Água de capacitação pela refinaria – Rio Jaguari;
2. P2: Saída da lagoa de estabilização – LE, (água destinada aos despejos no Rio Atibaia, município de Paulínia-SP), efluente propriamente dito;
3. P3: Água do Rio Atibaia – montante, 200 metros acima do descarte do efluente industrial tratado, proveniente da LE;
4. P4: Água do Rio Atibaia – jusante, cerca de 500 metros abaixo da descarga do efluente industrial tratado, proveniente da LE;
5. P5: Rio Piracicaba – cerca de 1500m após a confluência dos rios Jaguari e Atibaia.

Tabela 2. Coordenadas geográficas dos pontos de coleta.

Ponto	Latitude (S)	Longitude (W)
P1	22° 41' 48"	47° 08' 59"
P2	22° 44' 22"	47° 07' 03"
P3	22° 41' 28"	47° 07' 22"
P4	22° 44' 22,3"	47° 07' 40,8"
P5	22° 45' 30"	47° 18' 54"

Fonte: Elaborado por Hara, 2012.

As coletas foram realizadas em três períodos sazonais distintos, nos anos de 2011 e 2012, para contemplar as diferentes condições climáticas típicas da nossa região: novembro de 2011, março de 2012 e maio de 2012.

Neste estudo, utilizou-se extratos, obtidos por extração de fase sólida, das amostras dos pontos de coleta acima citados. Estes extratos foram analisados com relação à presença e níveis de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA).

4.1.3 Material biológico usado no bioensaio

Para os teste de genotoxicidade e mutagenicidade, foram utilizadas células de hepatoma humano (HepG2 – Human-derived hepatoma cell line), mantidas em cultura e adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

4.2 Métodos

4.2.1 Extração de fase sólida

O processo de extração de HPAs exige preparo das amostras, desde antes do momento das coletas até o processamento das mesmas. Sendo assim, antes da realização da coleta foi feita a lavagem dos frascos de vidro (4L), como segue: os galões foram deixados com água destilada e

Extran® “overnight”. Posteriormente, foram lavados em água corrente, até que não houvesse mais nenhum resíduo do detergente. Os galões foram secos e, após a secagem, foi feita uma nova lavagem com água destilada. Secos novamente e submetidos a uma desinfecção com etanol. Após nova secagem, foram passados por um banho em água destilada e, depois de estarem totalmente secos, passado acetona P.A. Após todo procedimento, os galões foram levados para estufa para secagem e destinados à coleta.

No momento da coleta das amostras de água, foi adicionado nos galões 8 mL de ácido acético glacial P.A., para fixação das condições da amostra e para evitar a proliferação de microorganismos.

Depois de realizada a coleta, as amostras foram filtradas três vezes em sistema de filtração a vácuo, com filtro de fibra de vidro (Glass-microfibre Discs MGA 47mm – Sartorius Stedim Biotech®). Após o processo de filtração, as amostras foram subdivididas em alíquotas de 1L. Essas alíquotas passaram pelo processo de extração de fase sólida, que consiste em passar a água por cartuchos poliméricos que retém, em resinas apropriadas, apenas os HPAs presentes nas amostras.

O procedimento de extração foi iniciado com o condicionamento dos cartuchos Strata-X 200mg/3mL (Phenomenex®). Esses cartuchos foram acoplados a um aparelho de Manifold (Chromabond® - Macherey Nagel), onde foi adicionado 6 mL de metanol, em cada cartucho, para a abertura das cadeias poliméricas dos mesmos. Após a passagem do metanol foi adicionado 6 mL de água milli-Q, para retirar resíduos do metanol.

Após o condicionamento, os cartuchos, foram acoplados às colunas de vidro, que fazem parte de um sistema de filtração, conforme a figura 3.

Figura 3. Sistema de filtração constituído de colunas de vidro acopladas a um Manifold associado a uma bomba a vácuo.



1. Colunas de vidro onde coloca-se as amostras
2. Cartuchos de Strata-X acoplados as colunas de vidro e ao Manifold
3. Mangueira de silicone que liga o cartucho ao Manifold
4. Manifold
5. Bomba hidrovácuo

Alíquotas de 1L de cada amostra foram acondicionadas em colunas de vidro (1), para serem passadas pelos cartuchos Strata-X (2). Esta passagem foi facilitada pela ação de uma bomba à vácuo (5), que permitiu que os HPAs presentes na amostra ficassem retidos nas resinas dos cartuchos. As águas isentas destes contaminantes foram levadas até o Manifold (4), por mangueiras de silicone (3) para serem descartados.

Após esse procedimento, os cartuchos foram acoplados ao Manifold, para secagem e posterior armazenamento em freezer (-20 °C).

4.2.2 Eluição das amostras

Para a eluição das amostras, os cartuchos foram retirados do congelador e acoplados ao Manifold, para a retirada do excesso de água. Uma vez secos, os cartuchos foram presos a um vidro de aproximadamente 15 mL, onde foram passados 10 mL de metanol, em seqüências de 2 em 2 mL. Depois

de passados os 10 mL de metanol, as amostras foram secas com nitrogênio gasoso, até restar apenas um pequeno resíduo no fundo do frasco. Esse resíduo foi retirado pela lavagem realizada com 1,5 mL de metanol, para ser transferido para um “vial” de 2 mL. O conteúdo do vial (1,5 mL) onde foi seco até alcançar um volume de 1 mL. Este extrato foi mantido em geladeira, para posterior uso nos experimentos. Para os experimentos com cultura de células, foi utilizado o extrato bruto* (para a verificação dos efeitos potenciais dos HPAs presentes nas amostras) e o extrato diluído** (diluição de 1000 vezes com água destilada, para simular a concentração destes compostos nas águas amostradas).

4.2.3 Bioensaios

4.2.3.1 Cultura de células HepG2

As células HepG2 são armazenadas em tubos criogênicos contendo solução de congelamento [DMSO (Dimetilsulfóxido) + soro bovino fetal] e mantidas congeladas em nitrogênio líquido.

Para o início dos experimentos, as células foram descongeladas. O conteúdo do tubo criogênico foi vertido em um tubo Falcon® estéril contendo 10 mL de meio MEM (EARLE), preparado com antibiótico/antimicótico suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab) a 37 °C. As células foram ressuspensas no meio de cultura e, posteriormente, levadas para centrifuga, por 10 minutos a 1500 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o pellet ressuspensado em 1 mL de meio de cultura. O material foi, então, transferido para um frasco de cultura com 9 mL de meio MEM suplementado com soro bovino fetal (meio completo). O frasco foi levado para a estufa com CO₂ (5%), onde foi mantido a 37 °C até que as células atingissem 80% de confluência. Nestas condições, o ciclo celular desta linhagem é de aproximadamente 24 horas.

*Extrato bruto: o extrato obtido pelo carreamento dos compostos adsorvidos na resina do cartucho StractaX por metanol P.A (99,9% de pureza).

** Extrato diluído: diluição do extrato bruto (ou eluído), para se obter compostos nas concentrações encontradas nas amostras de água dos diversos pontos coletados (diluição de 1:1000mL de extrato bruto em água destilada)

4.2.3.2 Repique e preparo de pré-frascos

Após atingir 80% de confluência, os frascos de cultura foram retirados da estufa, o meio foi descartado, e os frascos lavados com PBS (Phosphate Buffered Saline – Tampão Fosfato-salino) por 2 vezes. Na sequência, foi removido o excesso de PBS e adicionado ao frasco 500 µL de tripsina 0,5%. Esses frascos foram levados para a estufa a 37 °C por 5 minutos. Após esse período a tripsina foi inativada com 4,5 mL de meio MEM completo e o conteúdo do frasco, passado por uma seringa de 1 mL, para obtenção de células isoladas. Foi retirada uma alíquota 20 µL da suspensão celular, para ser realizada a contagem das células em câmara de Neubauer. Após a contagem, foram realizados cálculos para que a quantidade de 5×10^5 células fosse semeada em cada frasco. Os frascos de cultura, contendo 5 mL de meio completo, foram então levados para estufa de CO₂ por 24 horas, para estabilização.

4.2.3.3 Exposição aos tratamentos

Para expor as células aos tratamentos, os extratos eluídos (extrato bruto) foram retirados da geladeira, para alcançarem a temperatura ambiente.

O experimento realizado com o extrato diluído foi feito após diluição do extrato bruto: 50 µL em água destilada em 50 mL H₂O milli-Q.

Passado o período de estabilização das células mantidas em cultura, foram transferidos 50 µL da amostra (extrato bruto ou diluído) para os frascos de cultura. Estes foram levados para estufa de CO₂ por um período de 3h. Após esse período de tratamento, foram realizados o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo. Como controle positivo (CP) foi utilizado Metilmetano sulfonato (MMS), na concentração de 4×10^{-2} M. Para o controle negativo (CN) foi utilizado o

PBS.

***Tripsina: é uma enzima proteolítica inespecífica mais utilizada na cultura celular, que hidrolisa cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginil formando terminações de clivagem, éster e amida. Essa reação desestrutura a matriz, impossibilitando a ligação dos receptores da superfície celular, ligados ao citoesqueleto e à matriz, obrigando as células a rearrajarem seu citoesqueleto. É utilizada para se obter células individualizadas.

4.2.3.4 Teste de viabilidade com Azul de Trypan

Para o ensaio de viabilidade celular com azul de trypan foi, primeiramente, realizado a colheita das células, desprezando-se o meio dos frascos e lavando-os com PBS por duas vezes. Foi retirado o excesso de PBS, então, colocado 500 µL de tripsina*** 0,5%, por 5 minutos sob condições de estufa a 37°C. Após este tempo, os frascos foram retirados da estufa, submetidos a leves batidas para soltar as células. A seguir, a tripsina foi inativada com 5 mL de meio MEM completo e o conteúdo passado por seringa, para ser transferido pra tubos Falcon® centrifugado por 5 minutos a 1500rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado, deixando no frasco 0,5 mL, de onde as células foram ressuspendidas, obtendo-se, assim, a suspensão celular. Antes da realização do teste do cometa, foi necessário verificar se a viabilidade celular era de pelo menos 80%. A avaliação da viabilidade celular foi realizado pelo teste do Azul de Trypan. Esse teste consistiu em retirar 5 µL da suspensão celular e homogeneizar com 5 µL do azul de Trypan, para análise em lâmina de vidro de 100 células por lâmina, para a identificação das células brancas (células viáveis) e das azuis (não viáveis).

4.2.3.5 Teste do cometa

Para o ensaio do cometa, foram montadas lâminas previamente cobertas com agarose comum, com 20 µL da suspensão celular + 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão, a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8g de NaOH sólido para 1 L), pH 10, no escuro, em geladeira a 6° C, por 1 hora. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese, contendo o tampão de corrida eletroforética (NaOH 300mM + EDTA 1mM, com pH>13), por 20 minutos, para a denaturação do DNA. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 39 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas, com 3 banhos de 5 minutos cada, em tampão de neutralização (pH 7,2). Após neutralização, as lâminas foram fixadas, por 10 min, em etanol absoluto.

As lâminas foram coradas com 50 µL de solução de GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada) e analisadas imediatamente após a sua coloração. Foram analisados em microscopia de epifluorescência Leica, objetiva de 40x, filtro B - 34 (excitação: $\lambda = 420$ nm - 490 nm, barreira: $\lambda = 520$ nm) 100 nucleóides por lâmina, totalizando 300 nucleóides por tratamento. Os nucleóides foram classificados, visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos em classe 0 – nucleóide sem danos e que não apresenta cauda; classe 1: nucleóide com cauda menor que o seu diâmetro; classe 2: nucleóide com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes do seu diâmetro; classe 3: nucleóide com cauda 2 vezes maior que o seu diâmetro (SPEIT et al., 1996). Os escores de cada tratamento foram submetidos ao teste estatístico ANOVA, critério/Dunnett ($p < 0,05$), para comparação dos resultados dos tratamentos com o do controle negativo.

4.2.3.6 Ensaio do micronúcleo

Após a exposição das células aos tratamentos, o meio de cultura foi trocado por um novo meio e neste foi adicionado 3 µg/mL de citocalasina B por frasco, onde as culturas permaneceram, por 28 horas, para obtenção de células binucleadas. Passado este tempo de exposição à citocalasina, foi realizada a coleta das células. O meio de cultura foi reservado em tubos Falcon® e os frascos foram lavados 2x com 5 mL de PBS e tripsinizados. Para inativar a tripsina, foram utilizados os mesmos meios de cultura anteriormente reservados. Após o desprendimento das células, todo o conteúdo do frasco foi transferido, novamente, para os tubos Falcon®, onde foi adicionada 1 gota de formol 40%. Os tubos foram homogeneizados suavemente e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. Em seguida, foi retirado o sobrenadante, adicionado 5 mL de solução hipotônica de citrato de sódio 1%, seguido de homogeneização. Novamente, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Por fim, o material foi fixado com solução fixadora Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético) e armazenado em geladeira.

Para a confecção das lâminas, o material foi centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm, e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 0,5 mL de fixador

novo ao tubo. Em seguida, essa suspensão celular foi gotejada em uma lâmina pré-lavada e coberta com um filme de água destilada a 4°C. As lâminas foram coradas com *Giemsa* 5% por, aproximadamente, 10 minutos.

Foram contadas 1.000 células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração, por réplica, totalizando 3.000 células por tratamento. Foram contabilizadas células binucleadas normais e células binucleadas portadoras de micronúcleos, ponte nucleoplasmáticas e/ou brotos nucleares (FENECH et al., 2003).

A análise de significância dos resultados foi feita pelo teste estatístico ANOVA: critério/*Dunnnett* ($p < 0,05$).

5 Resultados

ARTIGO I: Compostos estrogênicos : características químicas, métodos de detecção, efeitos biológicos e ambientais.

Maria Tereza Pamplona Silva, Dânia Elisa Mazzeo, Jaqueline Bianchi, Maria Aparecida Marin-Morales

ARTIGO II: Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade das águas dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba na região de influência da refinaria de Paulínia.

Maria Tereza Pamplona Silva, Marcia Miyuki Hoshina, Raquel Vaz Hara, Maria Aparecida Marin-Morales

**COMPOSTOS ESTROGÊNICOS: CARACTERÍSTICAS
QUÍMICAS, MÉTODOS DE DETECÇÃO, EFEITOS BIOLÓGICOS
E AMBIENTAIS**

Maria Tereza Pamplona Silva¹, Dânia Elisa Mazzeo¹, Jaqueline
Bianchi¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade
Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, 13.506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

Muitos compostos químicos, utilizados em atividades humanas, vêm sendo estudados quanto suas capacidades de causarem desequilíbrios nos mais diversos sistemas. Alguns desses compostos são capazes de afetar o sistema endócrino, sendo conhecidos como disruptores endócrinos. Dentre estas substâncias, destacam-se os ftalatos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bisfenol A, agrotóxicos, alquilfenóis, além dos hormônios estrogênicos sintéticos e naturais. Muitos efeitos negativos podem ser induzidos nos organismos, por ação desses químicos, destacando-se a capacidade de causar diminuição na taxa de fecundidade, inversão sexual, problemas de desenvolvimento embrionário e até câncer em humanos. Esses efeitos são decorrentes da ação destes agentes químicos, pela capacidade de agir por mimetização, bloqueio, estimulação, aceleração endócrina, ação enzimática e destruição. Esses contaminantes podem ser encontrados nos mais diversos ambientes, nas águas subterrâneas, nos sedimentos, nas águas residuais, em lodos e até mesmo na água potável. Desse modo, muitos estudos têm sido desenvolvidos para verificar a presença e a ação destes contaminantes, nos organismos. Diversos ensaios vêm sendo desenvolvidos para esse fim, entre eles, técnicas com leveduras recombinantes, com células geneticamente modificadas e técnicas de dosagem de vitelogenina em peixes. Os estudos apresentados nessa revisão demonstram a eficácia destas técnicas no monitoramento ambiental. Diante dos dados encontrados, observa-se a necessidade de desenvolver mais estudos e aprimorar técnicas para que se possa conhecer, efetivamente, os mecanismos de ação desses contaminantes e, assim, estabelecer estratégias apropriadas para a sua remoção do ambiente e diminuição das suas ações sobre os seres vivos.

Palavras-chave: estrogenicidade ambiental; ensaio com levedura recombinante; disruptores endócrinos; hormônios estrogênicos.

ABSTRACT

Several chemical compounds, used in human activities, are being studied for their capacities of causing imbalances in several systems. Some of these compounds are able to affect the endocrine system and are known as endocrine disruptors. Among these substances, it is highlighted the phthalates, polycyclic aromatic hydrocarbons, bisphenol A, agrochemicals, alkylphenols, besides the synthetic and natural estrogenic hormones. Many negative effects can be induced in the organisms, by the action of these chemicals, highlighting the capacity of causing decrease in the fertility rate, sex inversion, problems in the embryonic development and even cancer in humans. These effects are resulted from the action of these chemical agents, due to the capacity of acting by mimicking, blocking, stimulation, endocrine acceleration, enzymatic action and destruction. These contaminants can be found in many different environments, in groundwaters, sediments, residual waters, sludges and even in drinking water. Thus, several studies have been conducted to verify the presence and the action of these contaminants in the organisms. Several assays have been developed with this purpose, among them, techniques with recombinant yeasts, genetically modified cells and techniques of dosing vitellogenin in fishes. The studies presented in this review show the efficiency of these techniques in the environmental monitoring. According to the data found, it is observed a need to develop more studies and improve the techniques in order to know, effectively, the mechanism of action of these contaminants and, thus, establish appropriate strategies for their removal from the environment and reduction of their actions on living beings.

Key-words: environmental estrogenicity; recombinant yeast assay; endocrine disruptors; estrogenic hormones

1. INTRODUÇÃO

A grande variedade de compostos químicos encontrados no ambiente, além de poderem induzir diversos problemas de caráter genético e até mesmo herdáveis nos organismos vivos em decorrência de sua interação com o DNA, podem também causar a indução de respostas hormonais, semelhantes às aquelas produzidas naturalmente pelo organismo.

Muitos compostos naturais e sintéticos possuem a capacidade de se ligar a receptores estrogênicos, interferir no sistema endócrino, bem como causar alterações hormonais (RAISER et al., 2006). Diversos poluentes ambientais como as drogas farmacêuticas, os agrotóxicos, misturas complexas derivadas de efluentes, alguns compostos industriais, além de diversos metais, são conhecidos por sua capacidade de desregular o sistema endócrino dos organismos (GIESY et al., 2002). Nestes casos, os poluentes não estão interagindo diretamente com o DNA dos animais expostos, mas interferindo na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais, prejudicando a homeostase celular, os processos reprodutivos, comportamentais e de desenvolvimento. Estes compostos são denominados de disruptores endócrinos (DEs) (USEPA, 1997).

Em um trabalho de revisão realizado por Campbell et al. (2006), os autores compilaram diversos trabalhos que exemplificam alguns compostos naturais e sintéticos que atuam como DEs, entre eles os agrotóxicos (atrazina, dieldrin e toxafeno), surfactantes (alquilfenóis etoxilados - APEO), hormônios naturais (17β -estradiol – 17β E2, estrona – E1 e estriol – E3), hormônios sintéticos (17α -etinilestradiol – 17α EE2, dietilestilbestrol - DES) e fitoestrógenos (isoflavonóides e coumestrol). Além destes, compostos industriais como bisfenol A (BPA), dioxina (2,3,7,8-TCDD), nonilfenóis (NP), octilfenóis (OP), ftalatos, estirenos, polibromobifenilo (PBB), bifenilas policloradas (PCB) (COLBORN et al., 1993) e metais como cádmio, lítio, bário, cromo e antimônio também são indutores de alterações no sistema endócrino (CHOE et al., 2003).

Segundo Snyder et al. (2003), os DEs podem ser separados em três classes: a dos compostos estrogênicos, que mimetizam ou bloqueiam o estrógeno natural; a dos compostos androgênicos, que mimetizam ou

bloqueiam a testosterona natural e os compostos tireoidais, que causam efeitos diretos ou indiretos na glândula tireóide.

Nesta revisão, serão abordados apenas os DEs estrogênicos. As substâncias estrogênicas são aquelas que se comportam como hormônios, se ligando ao receptor de estrogênio. Estes compostos, apesar de nem sempre possuírem estrutura química semelhante a do $17\beta\text{E}_2$ (principal estrógeno natural produzido pelos ovários), causam respostas agônicas e antagônicas, possivelmente, por meio de mecanismos que ocorrem via receptores hormonais. A identificação destas substâncias se dá por sua capacidade de se ligar ao receptor de estrogênio e induzir ou atenuar uma resposta hormonal (ZACHAREWSKI, 1997).

2. PRINCIPAIS AGENTES ESTROGÊNICOS

2.1. Ftalatos

Os ftalatos são diésteres do ácido ftálico muito utilizados na produção de materiais poliméricos como, por exemplo, o cloreto de polivinila (PVC), por conceder flexibilidade e facilitar a manipulação do material desde o processo de produção até o produto final. Este químico também tem sido utilizado, em menor escala, em tintas, cosméticos e repelentes (FATOKI; VERNON, 1990; HARRIS et al. 1997).

Não existem restrições quanto à presença de ftalatos em efluentes industriais e, por isso, grandes quantidades deles são lançadas no ambiente, causando efeitos prejudiciais significativos aos ecossistemas (AUTIAN, 1973).

Dentre os ftalatos, o DEHP (di-(2-etil-exil) ftalato) é um dos mais encontrados no ambiente, em especial na água e no ar, podendo também estar presente nos alimentos. Dessa forma, os organismos podem entrar em contato com esse contaminante a partir de diferentes fontes.

Após exposição oral, o processo de metabolização deste composto, inicia-se no intestino, onde é hidrolisado pelas lipases intestinais, sendo absorvido, em sua maior parte, na forma de MEHP (mono- (2- etil-exil) ftalato), que é o seu metabólito ativo (ALBRO; MOORE, 1974; ALBRO et al.,1973; WHITE, et al. 1980).

Segundo Harris et al. (1997), embora os ftalatos sejam considerados um grupo único, eles podem atuar de formas diferentes, sendo que alguns já são considerados estrogênicos e outros ainda não têm essa ação comprovada. De acordo com os mesmos autores, a ação estrogênica dos ftalatos parece estar diretamente ligada com a sua massa molecular, onde quanto maior for a massa molecular maior a sua atividade estrogênica, porém o caminho metabólico seguido por este contaminante não é totalmente conhecido.

2.2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Os HPAs são compostos gerados a partir de atividades antrópicas decorrentes da combustão incompleta de combustíveis e de algumas atividades industriais ou ainda a partir de fontes naturais, como por exemplo, a formação de rochas sedimentares (HARVEY, 1981; LOPES; ANDRADE, 1996).

Estes compostos são considerados altamente tóxicos, principalmente devido às suas características físico-químicas. São compostos lipofílicos que, para serem eliminados do corpo humano, necessitam ser metabolizados em metabólitos hidrofílicos. Porém, o metabólito gerado geralmente é mais tóxico que o próprio componente (BAEK et al., 1991; TUVIKENE; 1995; LOPES; ANDRADE, 1996).

De um modo geral, as atividades estrogênicas ocorrem por meio da ativação do fator de transcrição, o receptor de estrógeno (ER – estrogen receptor), que interage com genes de resposta sensíveis a hormônios. Apenas alguns HPAs e seus derivados hidróxidos foram estudados, quanto à capacidade de interagir com o ER, por possuírem estruturas semelhantes ao estrogênio (NESARETNAM; DARBRE, 1997; FONTENELLE et al., 2010).

Existem discussões sobre algumas possibilidades da forma como os HPAs agem como substâncias estrogênicas: agem da mesma maneira que os hormônios estrogênicos, duplicando o efeito fisiológico; agem competindo com os hormônios, inibindo assim os seus efeitos e atuam indiretamente modificando a disponibilidade do estrogênio em tecidos alvos (SANTODONATO, 1997).

2.3. Bisfenol A (BPA)

O BPA possui uma estrutura química de difenil alcano hidroxilado, que contém dois anéis aromáticos unidos por uma ligação de carbono. Em

temperatura ambiente, caracteriza-se por ser um composto sólido em forma de flocos, cristais ou pérolas. Sua ação desreguladora endócrina é observada até mesmo em concentrações muito baixas (KRISCHNAN et al., 1993; STAPLES et al., 1998).

Esta substância é gerada pela condensação do fenol com a acetona, em pH ácido e em alta temperatura. Na presença de catalisadores, é destilado e, após ser filtrado e seco, utilizado como monômero na produção de plásticos e policarbonatos, usados na fabricação de garrafas plásticas, os CDs e DVDs (STAPLES et al., 1998; KAWAHATA, 2004; VOGEL, 2009; CHEN et al., 2010).

Diversos estudos constataram a capacidade do BPA em reduzir a esteroideogênese, ou seja, a síntese dos hormônios esteroides (progesterona, testosterona e E2) pelo córtex da glândula adrenal (MANDICH et al., 2007).

O BPA age principalmente interagindo com os receptores de estrogênio, mimetizando e impedindo a atividade dos hormônios estrogênicos naturais da célula (BERGERON et al., 1999; LEVY et al., 2004; LETCHER et al., 2005).

2.4. Agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser subdivididos quimicamente em dois grupos principais, orgânicos e inorgânicos. Estes últimos, que têm como base o chumbo, arsênio e mercúrio, foram muito utilizados no passado, porém substituídos pelos orgânicos, por estes serem biodegradáveis. Dentre os orgânicos, estão: os de origem animal com base de óleos animais; os de origem petrolífera, que compreendem os óleos mineirais; os de origem vegetal (óleos vegetais, nicotina, piretrinas); e os organo-sintéticos (clorados, fosforados, piretróides, etc.), os quais são muito persistentes no ambiente e causam danos severos à saúde humana (ETO, 1974).

Embora os agrotóxicos sejam amplamente utilizados no controle de pragas agrícolas ou domésticas, muitos deles possuem uma comprovada atividade estrogênica. Como este grupo abrange uma grande variedade de compostos químicos, os mecanismos de ação de interferência endócrina são bastante diversos (WALTERS et al., 1993; OSTBY, 1999; ANDERSEN et al., 2002; CHEN et al., 2002). Alguns agrotóxicos podem atuar interagindo com os receptores hormonais, outros podem inibir a atividade das enzimas

responsáveis pela síntese de hormônios esteroides ou ainda induzir as enzimas responsáveis por este processo, causando aumentos ou diminuição dos níveis de hormônios. Essas interações podem levar também à formação de produtos metabólicos interferentes endócrinos mais potentes que os compostos originais (ANDERSEN et al. 1999; ANDERSEN et al. 2002).

2.5. Alquilfenóis (APs)

Os APs são compostos de origem antropogênica constituintes dos antioxidantes, poliestireno modificado, surfactantes e cloreto de polivinila (PVC), estando geralmente presentes em lançamentos de efluentes. Essas substâncias são formadas por grupos alquilas de diferentes tamanhos, ligados a um anel aromático que contém uma ligação hidroxila. Quanto maior a parte lipofílica deste composto, maior o seu efeito tóxico. Já a estrogenicidade dessas substâncias está ligada a diminuição do tamanho da cadeia alquílica, ou seja, quanto menor a cadeia, maior a estrogenicidade. Sendo assim, o composto que apresenta maior estrogenicidade é o Nonil fenol (NP), que é formado por um fenol e uma cadeia de nove carbonos (WHITE, et al., 1994; SERVOS, 1999; OLIVEIRA et al., 2007; USEPA, 2010)

Devido a sua reconhecida atividade estrogênica, os APs e seus derivados, como os APEO, são capazes de afetar a reprodução pela sua capacidade de mimetizar os hormônios estrogênicos responsáveis pelo desenvolvimento e comportamentos sexuais. Essa capacidade de imitar os estrogênios leva a ligação dessas substâncias aos receptores de estrógenos, diminuindo a atividade dos hormônios e causando a perturbação do sistema hormonal (COX, 1996; SONNENSCHNEIN; SOTO, 1998).

2.6. Hormônios estrogênicos naturais e sintéticos

Os hormônios são definidos como substâncias químicas sintetizadas pelas glândulas endócrinas, os quais, ao serem lançados na corrente sanguínea, mantém um equilíbrio no funcionamento de todo o organismo (SHIMADA et al., 2001; DÍAZ-CRUZ et al., 2003; BILA; DEZZOTI, 2007; GHISELI; JARDIM, 2007). Dentre os hormônios, os androgênios, corticóides, progestagênios e estrogênios compõem um grupo conhecido como hormônios esteroides (GHISELI; JARDIM, 2007). Os principais hormônios estrogênicos naturais são o $17\alpha E_2$, E_1 , E_3 e o $17\beta E_2$. Estes hormônios apresentam em sua

estrutura um grupo fenólico e, em alguns casos, um grupo hidroxila alifático. Entre os sintéticos destacam-se, principalmente, o levonorgestrel e o 17 α EE2, que correspondem ao hormônios sintéticos frequentemente presente em pílulas contraceptivas. Os estrógenos não naturais são sintetizados a partir de reações de metilação e etilação ou por esterificação dos hormônios naturais (SHIMADA et al., 2001; LINTELMANN et al., 2003; GHISELI; JARDIM, 2007).

Dentre os efeitos ocasionados pela exposição a esses compostos destacam-se as alterações na saúde reprodutiva, como infertilidade, irregularidades menstruais, abortos espontâneos e câncer de mama. Nos ecossistemas, podem causar reversão sexual em peixes e em outros animais (BHATT, 2000).

Os hormônios naturais e sintéticos sofrem biotransformação antes de serem excretados pelo organismo pelas fezes ou urina. O hormônio sintético 17 α EE2 forma, por meio de hidrólise aromática, uma grande variedade de metabólitos metilados e hidroxilados. Sabe-se que cerca de 60% desses fármacos são excretados pela urina por meio de conjugados e por vários metabólitos polares. As vias de disseminação mais comuns desses hormônios são os efluentes domésticos descartados em rios e mares, pela deficiência na infraestrutura de saneamento ou pela ineficiência do tratamento destes efluentes, acarretando em uma grande contaminação ambiental por estes hormônios (ERICKSON, 2002; GILMAN et al. 2003).

3. EFEITOS INDUZIDOS PELOS AGENTES ESTROGÊNICOS E MECANISMO DE AÇÃO

Os compostos estrogênicos podem se acumular nos organismos por serem bioativos e persistentes no solo e nos recursos hídricos. Por esta razão podem interferir nos ecossistemas aquático e terrestre e, assim, afetar toda a cadeia trófica (HALLING-SORENSEN et al., 1998; MEYER et al., 1999). De acordo com Guillette Jr. et al. (1994), a exposição aos compostos estrogênicos pode causar alterações sexuais no desenvolvimento embrionário e, conseqüentemente, insucesso reprodutivo, tanto em decorrência da mortalidade dos indivíduos quanto pela modificação da capacidade estrogênica das gônadas. Além disso, quando estas substâncias entram em contato com o organismo das fêmeas, as conseqüências podem ser ainda piores, uma vez

que tais substâncias podem ser transmitidas aos descendentes por meio dos ovos, placenta ou leite materno, podendo causar problemas no seu desenvolvimento (BILA; DEZOTTI, 2007).

Muitos autores (FRY; TOONE, 1981; BERGERON et al., 1994; GUILLETTE Jr. et al., 1999; KNORR; BRAUNBECK, 2002; BLAISE et al., 2003) têm demonstrado que os DEs causam uma redução nas taxas de fecundidade, mudanças de sexo, problemas no desenvolvimento de embriões humanos e não-humanos, além de induzir processos carcinogênicos em humanos (COLBORN et al., 1993; GIWERCMAN et al., 1993; SHAPE; SKAKKEBAEK, 1993; TOPPARI et al., 1996).

Segundo Snyder et al. (2003), os efeitos dos estrógenos presentes na água sobre os organismos dependem do seu tempo de exposição. Os peixes, por exemplo, são mais afetados por estes hormônios do que os seres humanos, porque são organismos que estão constantemente em contato com a água. No entanto, segundo Bila e Dezotti (2007), a exposição aos DEs em baixos níveis pode afetar também os organismos que se encontram no topo da cadeia alimentar, em decorrência do caráter bioacumulativo destas substâncias. Em peixes fêmeas, a presença de estrogênio na água pode ser identificada por meio da vitelogênese prematura (JONES et al., 2000) ou por meio de alteração dos níveis plasmáticos de vitelogenina (proteína precursora do vitelo, cuja produção no fígado é estimulada pelo estrógeno). Tanto os peixes machos quanto as fêmeas e os indivíduos jovens possuem receptores estrogênicos, mas, somente as fêmeas estão normalmente expostas ao estrógeno natural. Desta forma, quando são encontrados peixes machos e peixes fêmeas não vitelogênicas que produzem vitelogenina, há indícios da presença de estrógenos no meio ambiente (KIME et al., 1999). A indução de vitelogenina em peixes machos está relacionada com o decréscimo da testosterona plasmática, anormalidades gonadais (HASHIMOTO et al., 2000; MILLS et al., 2001), patologia renal e gonadal e presença de folículos ovarianos nos testículos (SIMPSON et al., 2000). Segundo Okoumassoun et al. (2002) e Anderson et al. (2003), estas alterações, decorrentes da presença de vitelogenina em peixes machos, podem levar a problemas reprodutivos como redução da fertilidade e interferência na população de peixes dos rios.

Outro parâmetro indicativo da existência de compostos com atividade estrogênica no ambiente é a presença de animais que apresentam intersexualidade (LINEY et al., 2006), ou seja, indivíduos dióicos que apresentam características sexuais de macho e de fêmea simultaneamente (KELLY et al., 2004). De acordo com Jobling et al. (2002), a ocorrência de intersexo pode diminuir a fertilidade de peixes machos da espécie *Rutilus rutilus* e interferir na sua reprodução, por apresentarem gametas com baixa motilidade e, conseqüentemente, baixa habilidade de fertilização e de produção de descendentes viáveis.

Carpas (*Cyprinus carpio*) coletadas em rios da Espanha, poluídos com compostos estrogênicos, apresentaram distúrbios hormonais de estrógeno e testosterona e, conseqüente aumento de vitelogenina no plasma. Como não foram observados aumentos significativos de estrógeno plasmático em peixes machos, a produção de vitelogenina foi atribuída aos efeitos de contaminantes que mimetizam o estrógeno ou causam diminuição dos níveis de testosterona. Além disso, os efeitos da poluição também induziram o aparecimento de oócitos nos testículos de peixes machos. No entanto, estas alterações, aparentemente, não afetaram a espermatogênese (SOLÉ et al., 2003).

Exemplares de salmoneite-da-vasa (*Mullus barbatus*) expostos às águas do noroeste do Mediterrâneo, impactadas por efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETEs), apresentaram altas concentrações de NP (média de 0,34 a 28,31 ug/g) e OP (0,03 a 0,25 ug/g) na bile. Estes indivíduos também apresentaram alterações gonadais como hipertrofia do tecido conectivo, fibrose, necrose, intersexualidade e atraso nos processos de maturação de gametas (MARTIN-SKILTON et al., 2006). Vários autores tem relacionado a presença de altos níveis de NP na água com a intersexualidade e a indução de vitelogenina em peixes machos (JOBBLING et al., 1998; LAVADO et al., 2004). No entanto, algumas alterações gonadais observadas por Martin-Skilton et al. (2006) não eram decorrentes apenas da presença dos polifenóis, mas provavelmente de uma mistura de contaminantes urbanos e industriais, incluindo os PCB, que segundo Jansen et al. (1993) e Krishnan e Safe (1993), possuem a capacidade de se ligar a receptores de estrógeno e produzir efeitos estrogênicos e antiestrogênicos.

Peixes de várias espécies, incluindo *Cyprinus carpio*, *Micropterus* spp. e *Ictalurus punctatus*, que foram coletados em diferentes pontos do rio Colorado, nos EUA, apresentaram desordens reprodutivas como intersexo (machos com oócitos testiculares e fêmeas com espermatozóides nos ovários), alterações de vitelogenina plasmática em machos e fêmeas e gônadas pouco desenvolvidas em machos. Em uma região do rio Colorado, a porcentagem de machos apresentando intersexualidade chegou a 70% (HINCK et al., 2007). De acordo com os autores, vários trabalhos têm relatado a presença de elevadas concentrações de metais e pesticidas organoclorados, como o DDT e seus metabólitos, na água, no sedimento e na biota associada à bacia do rio Colorado. A estrogenicidade de agrotóxicos organoclorados, como o lindano, o dieldrin e o heptacloro, foi confirmada por Okoumassoun et al. (2002), que verificaram a produção de vitelogenina em peixes machos da espécie *Sarotherodon melanotheron* que vivem no rio Ouémé, na República de Benin, na África, contaminado com estes poluentes.

Em regiões do Mar Mediterrâneo nas proximidades da Espanha e do Golfo de Taranto (Mar Jônico), onde há intensa atividade comercial, De Metrio et al. (2003) coletaram espécimes de peixe-espada (*Xiphias gladius*) e verificaram que 25% dos indivíduos analisados apresentavam intersexualidade, com presença de oócitos nos testículos. Além disso, a análise do fígado revelou ainda a produção de vitelogenina, tanto nos peixes machos quanto nos intersexo.

Estudos realizados por Guillette Jr. et al. (1994), registraram uma diminuição populacional de jacarés em um lago na Flórida, entre os anos 1980 e 1987. Este declínio populacional, segundo os autores, ocorreu, provavelmente, em decorrência dos efeitos estrogênicos de poluentes como o dicofol, o DDT e de despejos domésticos da cidade de Winter Garden realizados ao redor do lago. De acordo com McLachlan et al. (1992), o dicofol, o DDT e seus metabólitos possuem a capacidade de induzir efeitos estrogênicos, por meio da sua ligação com os receptores de estrógeno. Alterações gonadais, como presença de folículos poliovulares e oócitos polinucleados em fêmeas e túbulos seminíferos pobremente organizados em machos, provavelmente estão ligadas a alterações nas concentrações dos hormônios testosterona e E2, como visto nos jacarés estudados por Guillette jr.

et al. (1994). De acordo com Reeder et al. (2005), substâncias como os PCB e o inseticida DDT também podem ter sido os responsáveis pelo desenvolvimento de gônadas intersexo em sapos *Acris crepitans* e seu consequente declínio populacional. O desenvolvimento de leiomiomas e a diminuição da atividade reprodutiva de animais como a foca cinza, por exemplo, podem também estar relacionados à presença de pesticidas organoclorados nas águas do mar (BÄCKLIN et al., 2003).

A relação entre a saúde humana e os DEs presentes no meio ambiente se dá, principalmente, por meio do consumo de animais aquáticos que podem ter bioacumulado os DEs, bem como pela ingestão de água potável proveniente de rios que recebem resíduos químicos que mimetizam os efeitos do estrógeno (MAURICIO et al., 2006).

Embora o homem ocupe o topo da cadeia alimentar, podendo ingerir grandes quantidades de compostos estrogênicos que se bioacumulam nos organismos, os efeitos estrogênicos a que estão sujeitos dependem das propriedades toxicológicas dos contaminantes, de seus efeitos sinérgicos ou antagonísticos *in vivo*, da sua concentração e da taxa de consumo de organismos diretamente expostos, como por exemplo, os peixes (PINTO et al., 2008).

Nos seres humanos, os principais efeitos dos compostos estrogênicos incluem a redução da quantidade de esperma, o aumento da incidência de câncer de mama, testículo e próstata e a endometriose (BILA; DEZOTTI, 2007). De acordo com Müller (2004), receptores de estrógeno no corpo humano podem ser expressos no sistema reprodutor, nas glândulas mamárias, nos rins, fígado, ossos, tecido adiposo, sistema imune, cardiovascular, cérebro e nos pulmões.

Embora a exposição humana aos estrógenos sintéticos geralmente ocorra em baixos níveis, estes compostos tendem a se acumular no tecido adiposo do organismo, em decorrência de seu caráter lipofílico e de sua não metabolização imediata. Dessa forma, células da mama, que estão localizadas em região gordurosa, tornam-se alvos para o desenvolvimento de câncer (DARBRE, 1998).

Apesar de muitos estudos terem detectado a presença de estrógenos sintéticos em tecido adiposo de células mamárias e no leite

humano (HOLFORD et al., 2000; MUSCAT et al., 2003; PETREAS et al., 2003; PETREAS et al., 2004; IBARLUZEA et al., 2004; SONAWANE, 1995), ainda não há dados consistentes que relacionem a presença destes compostos e a incidência de câncer de mama.

Segundo Rasier et al. (2006), a extrapolação de dados obtidos em laboratório sobre os efeitos de substâncias químicas nos seres humanos tem sido bastante controversa. Tais resultados geralmente não apresentam as doses e o tempo de exposição reais a que o homem se expõe durante sua vida. No entanto, quando populações humanas estão expostas às mesmas substâncias testadas, o risco potencial de desenvolvimento de certas doenças, como evidenciado em estudos laboratoriais, como a dosagem de FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e LH (Hormônio Luteinizante) em mulheres, deve ser levado em consideração.

Embora seja conhecido que os efeitos induzidos pelos compostos estrogênicos ocorram por meio da sua ligação direta com os receptores hormonais (ZACHAREWSKI, 1997), os mecanismos específicos pelos quais a desregulação endócrina ocorre ainda são desconhecidos (CRAIN et al., 1997).

A ação dos DEs por xenobióticos pode ser mediada por meio de receptores. Estes receptores estrogênicos são grandes moléculas de proteínas que possuem sítios de ligação específicos para estrógenos. Quando esse receptor interage com o estrogênio, um sinal é enviado para o núcleo da célula, que estimula a síntese de proteínas específicas (HARVEY; JOHNSON, 2002; SHAW; MCCULLY, 2002). Esses sítios podem ser ocupados por xenobióticos que possuem características químicas semelhantes a dos estrógenos, agindo assim por mimetização ou bloqueio dos hormônios naturais, ligando-se aos sítios específicos causando respostas indevidas, como o excesso ou a falta de certas proteínas (JACOBS, 2001; SHAW; MCCULLY, 2002). Outra forma de ação dos DE é a interferência na sequência enzimática, que leva a eliminação prematura dos hormônios, desativação de enzimas de degradação ou incapacitação (por destruição ou inativação) da execução das funções das atividades hormonais (HARVEY; JOHNSON, 2002; SHAW; MCCULLY, 2002; JANOSEK et al., 2006).

4. ESTUDOS PARA DETECÇÃO DE ESTROGENICIDADE EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Assim como muitos contaminantes químicos, os compostos estrogênicos muitas vezes alcançam o meio ambiente, podendo ser encontrados nas águas superficiais (PENG et al., 2008; MIÈGE et al., 2009), nas águas subterrâneas (BENNIE, 1999; CAMPBELL et al., 2006), nos sedimentos (MURK et al., 2002; FENET et al., 2003; LEGER et al., 2003), nas águas residuais (MA et al., 2007, MIÈGE et al., 2009), em lodos (LORENZEN et al., 2004; GIUDICE; YOUNG, 2011) e até mesmo na água potável (KUCH; BALLSCHMITER, 2001).

Os rios, e conseqüentemente seus sedimentos, são um dos principais reservatórios dos interferentes endócrinos, sendo responsáveis por muitas alterações nos ecossistemas aquáticos, pois agem desestabilizando as funções normais dos organismos. Diversos estudos comprovam que esses contaminantes têm sido amplamente encontrados nas águas superficiais de rios, nas águas subterrâneas e em sedimentos (MEYBECK; HELMER, 1992; PETERS; MEYBECK, 2000; MEYBECK, 2003; WANG et al., 2011; ZHAO et al., 2011). Diante disso, muitas pesquisas vêm sendo realizadas para identificar e avaliar a presença desses interferentes.

Amostras de águas superficiais e subterrâneas de dois aquíferos na Espanha, localizados em áreas de produção agrícola e de alta atividade industrial, foram analisadas por Latorre et al. (2003). Os autores encontraram altos índices de NP, seguidos de índices menores de OP e BPA em todas as amostras, indicando que as águas subterrâneas podem constituir grandes reservatórios de poluentes orgânicos e, devido à alta persistência de tais poluentes, eles representarem um perigo para a qualidade das águas. Os APEO e seus derivados NP e OP podem alcançar as águas subterrâneas por meio da lixiviação ou pela sua difusão e transporte ao longo do aquífero. A presença de APEO, NP e OP no ambiente está relacionada ao seu intenso uso como ingredientes inertes de pesticidas (LABEL REVIEW MANUAL, 1996), enquanto que o BPA é usado como intermediário na produção industrial de resinas epóxi e plásticos do tipo policarbonato (FÜRHACKER et al., 2000).

Em Guangzhou, na China, Peng et al. (2008) verificaram que as águas superficiais do rio Major Pearl, localizado em área urbanizada, estão contaminadas com compostos estrogênicos provavelmente originados de

despejos esporádicos de efluentes domésticos e industriais. De acordo com os autores, em 60% das amostras de água analisadas havia presença de E1 em concentrações que variaram de 8 a 65 ng/L, além de NP, BPA, triclosan, 2-fenilfenol, metilparabeno e propilparabeno em altas concentrações. Segundo Krishnan et al. (1993), apesar do BPA possuir capacidade de se ligar ao receptor de estrógeno, sua afinidade a este receptor é mais fraca que a do estrógeno natural (KWON et al., 2000). Além da presença de compostos estrogênicos na água, alguns lagos de regiões subtropicais da China apresentaram também APs nos sedimentos (WU et al., 2007).

Mais recentemente, Zhao et al. (2011) relataram múltiplas atividades hormonais, dentre elas a atividade estrogênica para água de superfície e para sedimentos da bacia do rio Pearl (rios Liuxi, Zhujiang e Shijing) no sul da China. Os autores encontraram níveis de atividade estrogênica que variaram entre 0,23 a 324 ng/L EEQ em águas superficiais e 0 a 101 ng/g EEQ em sedimentos. O rio Shijing apresentou níveis mais altos de atividades hormonais que os rios Zhujiang e Liuxi, indicando que aquele rio tem recebido grande influência de produtos químicos com ação de DEs. As concentrações de EEQ observadas neste estudo são maiores que as observadas na literatura e que são consideradas responsáveis por efeitos adversos sobre organismos aquáticos.

Compostos como NP, OP, E1, E2 e BPA também foram encontrados no rio Tama, em Tóquio. Este rio recebe efluentes de ETEs que recebe predominantemente compostos de origem doméstica. A estrogenicidade destes compostos foi medida pelo ensaio de MVLN com transcrição estrógeno-específico, que utiliza a linhagem de célula MVLN (derivada da célula MCF-7), como gene repórter, produzindo luciferase na presença de estrógeno. As quantidades detectadas de NP (51,6 a 147 ng/L) e OP (6,9 a 81,9 ng/L) foram muito baixas para induzir estrogenicidade nas células testadas. Por outro lado, as quantidades de E1 (6,4 a 85,6 ng/L), E2 (0,5 a 12,3 ng/L) e BPA (4,8 a 76,3 ng/L) foram suficientes para induzir resposta estrogênica nos ensaios realizados (FURUICHI et al., 2004). De acordo com Fenet et al. (2003), baixas concentrações de APs em amostras de água não excluem seu potencial estrogênico, uma vez que estes compostos podem se bioacumular em organismos aquáticos, mesmo em baixas concentrações.

As águas superficiais e os sedimentos do rio Amarelo, na China, foram coletadas em 15 pontos e analisadas por Wang et al. (2011) quanto à estrogenicidade por meio do teste *in vitro* com levedura recombinante (YES). Os resultados encontrados pelos autores indicam os maiores índices de estrogenicidade nas águas superficiais do ponto Y4 (ponto referente à coleta realizada no rio Amarelo – Yellow) na estação seca (EEQ = 9,44 ng/L) e em sedimento no ponto Y7 na estação úmida (EEQ = 1,29 ng/g). Em uma visão geral, os compostos estrogênicos das águas e dos sedimentos do rio Amarelo apresentaram-se em baixos níveis, mostrando assim baixo potencial estrogênico, exceto para o ponto ao leste de Lanzhou, que apresentaram com altos níveis estrogênicos.

Gagné et al. (2012) avaliaram a estrogenicidade dos extratos das águas de rio, lago e de areias betuminosas encontradas na região do rio Atabasca em cultura primária de hepatócitos de truta arco-íris. Os autores investigaram as alterações causadas na expressão dos genes receptor de estradiol $\beta 2$ (ER) e vitelogenina (VTG). Eles observaram que a exposição às amostras de rio e lago ocasionou a maior expressão de ambos os genes, sendo que o que apresentou maior expressão foi o VTG.

Garcia-Reyero et al. (2005) avaliaram extratos de amostras de sedimentos de 83 lagos de montanhas europeias, quanto à atividade estrogênica. Os autores utilizaram o ensaio de levedura recombinante com *Saccharomyces cerevisiae* (RYA – Recombinant Yeast Assay). Dentre todas as amostras avaliadas pelos autores, vinte e seis não apresentaram potencial estrogênico, pois estiveram abaixo do limite de detecção do teste (1 pg/g EEQ), enquanto 13 amostras apresentaram níveis muito elevados de estrogenicidade, alcançando 350 ng/g EEQ. A análise química realizada pelos autores revelou uma grande correlação entre a atividade estrogênica e a presença de contaminantes de origem antropogênica.

A análise dos sedimentos da bacia de Tokyo, que recebe despejos de efluentes de ETE, revelou a presença de elevados níveis de NP nas amostras (142 a 20.700 ng/g peso seco). Além de apresentar atividade estrogênica, como constatada pelo bioensaio com sistema de duplo-híbrido em levedura (*Saccharomyces cerevisiae* Y190 com receptor de estrógeno humano - ER α e um coativador - TIF2), o NP também foi o principal responsável (mais de 90%)

pela indução de vitelogenina plasmática em peixes machos da espécie *Fundulus heteroclitus* (KURIHARA et al., 2007).

Louiz et al. (2008) coletaram amostras dos sedimentos da lagoa Bezerta, lagoa na Tunísia e da lagoa Ghar el Melh, mas foram nas estações de verão e inverno. Os extratos desses sedimentos foram avaliados quanto ao potencial estrogênico utilizando-se a linhagem celular MELN (células MCF-7 com transfecção do plasmídeo ERE- β Glob-Luc-SVNeo), modificadas com gene da enzima luciferase regulador de estrogênio. Este ensaio permite a detecção da atividade estrogênica em relação a todos os poluentes, por meio da detecção da atividade da luciferase, verificada com auxílio de um luminômetro. Os autores encontraram atividade estrogênica apenas na amostra do ponto MB (Menzel Bourguiba, área de influência urbana, de atividades metalúrgicas, construção naval e aterros de resíduos sólidos) tanto no inverno quanto no verão (0,22 e 0,29 ng EEQ/g, respectivamente). Todas as outras amostras apresentaram valores abaixo do nível de detecção. O ponto MB foi o mais contaminado por HPAs, por isso esses compostos também foram considerados como contribuintes para a estrogenicidade observada, já que os HPAs, produzidos por biotransformação de fase I, podem induzir a ligação ao sítio receptor de estrógeno da linhagem celular empregada. A presença destes contaminantes é explicada por MB receber resíduos de grandes zonas urbanas e industriais. Assim, as atividades estrogênicas eram esperadas devido à presença de hormônios naturais e sintéticos, liberados a partir de efluentes antropogênicos, além da presença de outros DEs, como por exemplo, os HPAs.

Locais que abrigam espécies ameaçadas de extinção, como é o caso dos peixes *Girardinichthys viviparus*, merecem atenção especial com relação ao despejo de contaminantes que possam dificultar a reprodução das espécies e, conseqüentemente, contribuir para a sua extinção. Os lagos mexicanos Texcoco e Zumpango, que recebem efluentes oriundos de ETE, são os únicos locais onde estes peixes são encontrados (VEGA-LOPÉZ et al., 2007). Por meio de testes *in vitro*, realizados com células de mama MCF-7, os autores constataram a presença de estrogenicidade nas águas desses lagos e, por meio de testes *in vivo*, constataram indução de vitelogenina em ambos os sexos de descendentes de peixes *G. viviparus* reproduzidos em laboratório,

sendo que a vitelogenina produzida em machos alcançou níveis superiores à produzida nas fêmeas. O aumento de vitelogenina plasmática em peixes machos é um dos biomarcadores mais comuns para detecção de compostos estrogênicos em ambientes aquáticos (SNYDER et al., 2003).

A estrogenicidade verificada nas águas e nos sedimentos dos sistemas aquáticos está relacionada, em grande parte, aos despejos de efluentes originários de atividade doméstica, industrial, agrícola e pecuária (LI et al., 2008). Os efluentes domésticos, por exemplo, são compostos por uma grande diversidade de substâncias químicas presente em produtos de limpeza e fármacos, bem como por hormônios naturais que são liberados ou excretados diretamente no meio ambiente (HALLING-SORENSEN et al., 1998). Nos EUA, muitas drogas farmacêuticas, incluindo os hormônios presentes nos contraceptivos orais, têm sido encontradas em praticamente todos os rios analisados (KOLPIN et al., 2002) , cujas concentrações são suficientes (normalmente em ng/L) para causar respostas estrogênicas em animais expostos (PETROVIC et al., 2001). Isto ocorre porque uma grande parte dos hormônios sintéticos utilizados não é totalmente absorvida pelo corpo humano. Cerca de 30 a 90% do 17 α EE2 ingerido, por exemplo, são excretados do organismo (RANNEY, 1977).

Além disso, o potencial estrogênico dos efluentes domésticos de um determinado local pode ser variável, de acordo com as flutuações populacionais em diferentes períodos, principalmente com relação à presença de estrógenos sintéticos como o EE2. Além disso, fatores como temperatura e atividade microbiana também podem alterar a atividade estrogênica de um ambiente (HEMMING et al., 2004), uma vez que compostos como estrógeno e NP podem ser degradados por microrganismos em rios, sedimentos e solo (YING et al., 2002a, b; HSEU, 2006).

As águas residuárias decorrentes do tratamento de água e esgoto constituem uma grande preocupação em relação à introdução de contaminantes estrogênicos no ambiente, principalmente porque os métodos tradicionais convencionalmente utilizados pelas Estações de Tratamento, como a dragagem (remoção de flutuantes e sólidos de maiores dimensões), adsorção e decantação (remoção do lodo primário resultante) e degradação aeróbia e/ou anaeróbia (LESTER; EDGE, 2001; ROSA, 2008), são ineficientes e precisam

ser reavaliados (ROSA, 2008). Além disso, nas ETEs, a transformação de substâncias presentes nos efluentes, muitas vezes origina compostos mais reativos do que o original e, ao serem descartados no ambiente aquático, são capazes de induzir respostas estrogênicas em muitos animais (FOLMAR et al., 2002). Surfactantes não iônicos, como os alquifenóis polietoxilatos, por exemplo, ao serem degradados por processos metabólicos em ETEs, transformam-se em NP e OP (MAGUIRE, 1999; ARUKWE; GOKSØYR, 2000) que, segundo Schwaiger et al. (2000) e Jobling et al. (1996), induzem a produção de vitelogenina em indivíduos machos de diversas espécies de peixes.

No entanto, novas técnicas adicionais, como os processos oxidativos e de ozonização, tem mostrado resultados promissores na remoção dos DEs da água (ESPLUGAS et al., 2007; GUEDES MANIERO et al., 2008).

Reungoat et al. (2012) demonstraram que o uso de ozonização seguido por filtração biológica com carbono ativado em uma ETE na Austrália possibilitou a remoção de mais de 95% da estrogenicidade do efluente, segundo o ensaio de E-screen, o qual quantifica a proliferação de células cancerosas de mama MCF7 induzidas por DEs. Esse estudo concluiu que esse tipo de tratamento foi eficiente na diminuição de estrógenos e xenoestrógenos do efluente, devendo ser incorporado aos sistemas tradicionais de tratamento, para garantir a preservação dos recursos hídricos em relação a esse tipo de efeito. Além disso, os autores afirmaram que a incorporação de ensaios biológicos pode complementar as informações fornecidas pelas análises químicas, permitindo uma avaliação mais satisfatória da eficiência do tratamento. Entretanto, embora mais eficiente, esses tipos de tratamentos apresenta maior custo quando comparado com os métodos tradicionais comumente presentes nas plantas das ETEs e por isso dificilmente são utilizados, como podem ser observado nos trabalhos abaixo, onde a eficiência da remoção é bastante inferior.

Efluentes de esgoto doméstico, provenientes de duas ETES, foram testados quanto à sua atividade estrogênica em diferentes estações do ano (TILTON et al., 2002). Dentre os bioensaios realizados, o ensaio YES revelou um valor máximo de 147 ng/L de EEQ, sendo o E2 o principal agente indutor de estrogenicidade presente nesses efluentes. Os níveis de vitelogenina em

bagres machos sexualmente maduros (*Ictalurus punctatus*) apresentaram-se muito acima dos valores de referência, durante o outono de 1996 e a primavera de 1997 para a ETE-A (220% e 480%, respectivamente) e, durante a primavera e outono de 1997 para o efluente da ETE-B (370% e 480%, respectivamente). De acordo com os autores, esses resultados indicaram a presença de compostos de ação estrogênica em quantidades suficientes para interferir negativamente na reprodução da espécie. Outro parâmetro avaliado pelos autores, sobre os peixes expostos aos efluentes, indicou um aumento significativo nos níveis séricos de E2 no outono de 1997 e verão de 1998, para o efluente da ETE-A, e no outono de 1997, para o efluente da ETE-B. Dessa forma, os autores concluíram que a atividade estrogênica de efluentes domésticos é variável e que esta pode sofrer interferência das condições ambientais relativas a cada estação do ano.

Ao analisarem sete diferentes efluentes de ETEs industriais da cidade de Madri (Espanha), Aguayo et al. (2004) identificaram os compostos estrogênicos BPA, OP, DEHP, DBP, DIBP, E1, E2 e EE2, sendo que os 4 primeiros foram os mais frequentemente presentes entre os cerca de 50 compostos orgânicos encontrados. A atividade estrogênica das amostras, avaliada por meio de ensaios com levedura recombinante (*Sacharomyces cerevisiae*), revelou-se bastante alta para 5 efluentes, os quais apresentaram concentrações elevadas de hormônios naturais e sintéticos (E2 e EE2). Embora as demais substâncias detectadas nos efluentes induziram uma resposta cerca de mil vezes menor, os autores alertam que os efeitos estrogênicos dessas substâncias também devem ser considerados, pois pode acontecer, no ambiente, um possível efeito sinérgico entre os contaminantes presentes.

Salste et al. (2007) verificaram a presença de estrógenos e a atividade estrogênica de um efluente doméstico da cidade de Turku/Åbo (Finlândia), por meio de análises químicas e pelo ensaio com levedura bioluminescente (contendo receptor de estrógeno α – *ER α* ; e o gene constitutivo luciferase – *Fluc*). Os resultados indicaram valores de estrogenicidade de 4 a 7 ng/L de EEQ. Esse efeito foi atribuído, principalmente, à presença de E1, já que este foi o estrógeno mais abundante encontrado nas amostras estudadas.

Bicchi et al. (2009) também avaliaram a influência do descarte de efluentes em um rio localizado no norte da Itália, sobre as possíveis alterações na atividade estrogênica deste corpo receptor. Os autores realizaram análises químicas e biológicas para monitorar a estrogenicidade em amostras de um efluente de ETE urbano e em águas superficiais do rio que recebe este efluente, antes e após o descarte. As principais substâncias presentes nas três diferentes amostras estudadas foram BPA, DEP, DBP, DEHP, E1 e 4-t-BP. Em relação à atividade estrogênica, avaliada por meio do ensaio E-screen, os valores encontrados foram cerca de 57% e 60% menores na montante e jusante do rio, respectivamente, do que nas amostras do efluente. Esses resultados sugerem que o efluente não contribuiu para um aumento significativo da estrogenicidade no recurso hídrico estudado, possivelmente pela capacidade de autodepuração do rio e pela diluição do efluente ao longo de seu curso. No entanto, os autores alertam que embora o efluente contribua para um pequeno aumento na estrogenicidade das águas do rio, a atividade estrogênica presente nessas águas indicam que o processo de depuração não é suficiente para remover completamente os DEs, podendo prejudicar a biota associada a esse ambiente.

Os influentes e efluentes de 4 diferentes ETEs doméstico e o efluente de uma indústria de branqueamento de celulose foram avaliados por Fernandez et al. (2007), quanto as suas composições químicas e atividade estrogênica. Dentre as substâncias encontradas, o 19-Noretindrona foi o hormônio sintético mais abundante presente nas amostras dos influentes, enquanto que o 17 α EE2 foi o hormônio sintético mais frequente nos efluentes estudados. Os compostos sintéticos não-esteroides NP e o DEHP estavam presentes em altas concentrações tanto nas águas residuárias tratadas (efluentes) como nas não-tratadas (influentes). Os efluentes domésticos apresentaram quantidades superiores de estrógenos esteroides, quando comparados com o efluente industrial, no qual foi detectado, principalmente, o esteroide vegetal stigmasterol. A variação nos DEs encontrados nas amostras, refere-se às diferenças nas substâncias que estão sendo lançadas para o tratamento. No caso das ETEs doméstico, o 19-Noretindrona estava presente porque é o hormônio sintético de controle de natalidade mais utilizado no Canadá e, no caso do efluente da indústria de branqueamento da celulose, foram

encontrados esteroides vegetais porque estes são liberados durante o processamento da madeira. Pelo teste com leveduras recombinantes para detecção de EEQ, foram observados valores semelhantes para os efluentes domésticos e industriais e valores mais altos para os influentes. Os autores concluíram que embora a atividade estrogênica, principalmente de efluentes domésticos, esteja relacionada com a presença de estrógenos esteroides, os altos níveis de ésteres de ftalatos e esteroides naturais também podem contribuir para esse efeito.

A análise dos efluentes de uma indústria de produtos provenientes de combustíveis fósseis (como o plástico) em Taiwan, também indicou a presença de compostos com atividade estrogênica, por meio do ensaio de MVLN. Os valores de atividade estrogênica encontrados variaram de 0,54 a 47,86 ng EEQ/L, sendo que os mais elevados, provavelmente, estavam relacionados à presença de fenóis (CHEN et al., 2004). De acordo com os autores, a quantidade relativa de estrogenicidade encontrada nos efluentes industriais analisados pode sinalizar risco ambiental se estes efluentes forem descartados em ambientes aquáticos sem tratamento eficiente prévio.

A estrogenicidade dos efluentes de duas ETEs municipais, bem como as águas superficiais do rio Rhine na cidade de Worms (Alemanha), coletadas após o despejo desses efluentes, foi avaliada por Pawlowski et al. (2004) em um estudo utilizando o ensaio de YES. A atividade estrogênica dos extratos de fase sólida, expressa em EEQ, foi cerca de 2 vezes maior ($65,96 \pm 10,4$ ng/L) para o efluente da ETE 1, em relação ao efluente da ETE 2 ($34,1 \pm 7,18$ ng/L) e cerca de 3 a 5 vezes maior que a água do rio ($11,97 \pm 0,7$ ng/L na margem esquerda e $19,42 \pm 2,8$ ng/L na margem direita). Dessa forma, os autores afirmam que, devido às altas quantidades de estrógenos esteroides (principalmente o E2 e o EE2), assim como a alta atividade biológica detectada pelo YES, os efluentes estudados podem potencializar a concentração de DEs das águas desse rio, induzindo efeitos estrogênicos sobre os organismos aquáticos expostos.

A avaliação da estrogenicidade foi realizada em amostras de influente e efluente tratado de ETES na região de Paris, França. Cargouët et al. (2004) realizaram a avaliação da atividade estrogênica das amostras utilizando o bioensaio *in vitro* com células MELN. Neste estudo, os autores realizaram duas

formas de concentração dos poluentes, uma com afinidade para substâncias polares e outra para substâncias apolares. Eles observaram atividade estrogênica apenas para as amostras concentradas apolares, indicando que a maioria dos contaminantes com atividade estrogênica é de característica apolar.

Jugan et al. (2009) utilizaram a linhagem celular MELN, com a qual é possível monitorar a atividade transcricional do receptor de estrogênio, para verificar a estrogenicidade induzida por influentes e efluentes de duas ETEs, bem como pelas águas superficiais do rio Sena (Paris – França), o qual recebe esses efluentes. Foi observada eficiência superior a 90% para as duas ETEs estudadas em relação à diminuição da atividade estrogênica após tratamento dos influentes. No entanto, um aumento da estrogenicidade nas águas do rio foi detectado após o descarte dos efluentes, sendo de 2,5 ng/L de EEQ para a ETE-A e de 2 ng/L para a ETE B. Estes valores observados constituem um risco para os ecossistemas, em especial, o aquático, pois, nessas concentrações ou até mesmo em concentrações mais baixas, podem comprometer as funções endócrinas de organismos expostos.

Céspedes et al. (2005) analisaram amostras de água do rio Llobregat (Catalúnia, Espanha) e dos efluentes e influentes de diferentes ETEs, com relação a presença de OP, NP, NP mono- e di-etoxilatos, BPA, ftalatos e hormônios naturais e sintéticos e sua atividade estrogênica. De maneira geral, os resultados do teste de estrogenicidade, realizado pelo ensaio com levedura recombinante indicaram alta estrogenicidade nos influentes das ETEs e fraca estrogenicidade nas amostras de água do rio, exceto para dois locais de coleta onde as concentrações de NP (13,9 e 37,3 mg/L) e OP (2,57 e 21,9 mg/L) foram elevadas. De acordo com os autores, os níveis de NP presentes contribuíram, em mais de 90%, para a estrogenicidade observada na maioria das amostras analisadas. Análises anteriores, realizados por Petrovic et al. (2002), neste mesmo rio, também detectaram presença de NP, APEO, nonilfenoxi-carboxilato, E1 e E3 nas águas e nos sedimentos. A estrogenicidade destes compostos foi detectada pela produção de vitelogenina em peixes machos da espécie *Cyprinus carpio*.

Schilirò et al. (2009) quantificaram a atividade estrogênica do efluente de uma ETE e no rio que recebe este efluente, na região do noroeste da Itália.

Estas amostras foram coletadas durante o período de setembro de 2006 a maio de 2007. Estes autores realizaram testes com uma linhagem da célula MCF-7 (BUS) com gene receptor de estrógeno, para realizar a técnica de proliferação celular ou E-screen. O ensaio foi realizado com extratos das amostras pré-concentradas e com as suas diluições. A proliferação celular foi dependente da dose da amostra, sendo que as diluições de 1:10 e 1:100 estimularam a proliferação máxima. O teste utilizado se mostrou muito apropriado para determinação da atividade estrogênica em extrato ambiental.

Águas brutas com vários graus de poluição e após serem tratadas, foram coletadas em quatro pontos distribuídos em rios do Estado de São Paulo – Brasil. Estas águas foram avaliadas quanto à atividade estrogênica por Bergamasco et al. (2011), que realizaram a avaliação por meio do teste *in vitro* de bioluminescência com levedura recombinante (BLYES - bioluminescent yeast estrogen assay). Eles utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* constitutivamente bioluminescente. Os maiores índices de atividade estrogênica foram encontrados nos pontos com maior poluição. As águas tratadas não apresentaram potenciais estrogênicos ou compostos estrogênicos. O teste BLYES apresentou alta sensibilidade e bom limite de detecção, mostrando ser um instrumento adequado para a avaliação e monitoramento de amostras de água.

A poluição do ambiente por compostos estrogênicos não se deve somente aos efluentes resultantes dos processos de tratamento, mas também das descargas diretas de compostos com ação estrogênica ao longo dos rios, principalmente em decorrência de atividades domésticas (MA et al., 2007). Por outro lado, quando não há outras descargas de efluentes ao longo do rio, estes compostos tendem a ser diluídos, ao longo de seu percurso, diminuindo, conseqüentemente, sua disponibilidade de absorção pelos organismos aquáticos (MAURICIO et al., 2006) e seus efeitos estrogênicos (HEMMING et al., 2004).

Águas residuárias *in natura*, decorrentes de atividades urbanas e industriais da cidade de Zagreb (Croácia), foram estudadas quanto ao seu potencial estrogênico, utilizando a indução de vitelogenina em cultura de hepatócitos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (GRUNG et al., 2007). Dentre as 30 frações testadas, obtidas por meio de extração de fase sólida, 9

apresentaram aumento na quantidade de vitelogenina. Os autores atribuíram o efeito observado à presença de E2 e de E3, além de diferentes APs, benzofenonas e metilparabenos.

A análise de uma amostra de efluente na região de Apúlia, na Itália, antes de seu tratamento em ETE, revelou a presença de E1, 17 β E2, 17 α EE2, BPA e 4-tert-octilfenol. Dentre estes compostos, o BPA (103,4 ng/L) e o 4-tert-octilfenol (35,2 ng/L) foram os que apresentaram, em média, as maiores concentrações seguidos de E1 (32 ng/L), do 17 β E2 (23,6 ng/L) e do 17 α EE2 (17,6 ng/L). De acordo com os autores (BALEST et al., 2008), embora a atividade estrogênica de compostos derivados de atividade industrial seja menor do que a dos esteróides naturais, eles podem induzir efeitos comparáveis aos estrógenos naturais, devido às altas concentrações em que são encontrados no meio ambiente (geralmente ng/L para os estrógenos e acima de ug/L para compostos industriais). Em comparação aos demais hormônios (17 β E2 e 17 α EE2), a maior concentração de E1, deve-se, segundo Johnson et al. (2000), ao fato de que este é o estrógeno mais excretado através da urina, pelas mulheres durante a gravidez ou ciclo menstrual.

Os lodos derivados de Estações de Tratamento de Água (ETAs) e ETEs, bem como os biossólidos resultantes de processos de estabilização desses lodos, podem constituir outra fonte de introdução de DEs no ambiente. Como o lodo e o biossólido são compostos ricos em matéria orgânica, seu uso como fertilizantes agrícolas vem sendo sugerido. No entanto, podem acarretar em um risco potencial na contaminação de solos e águas subterrâneas com substâncias com ações estrogênicas, já que, segundo Yamamoto et al. (2003), devido aos coeficientes de hidrofobicidade e partição de carbono orgânico moderadamente altos dos compostos estrogênicos, é possível que grande parte desses fiquem aderidos na fase sólida durante o processo de tratamento das ETAs e ETEs.

Diferentes amostras de biossólidos, provenientes de ETEs municipais da província de Ontário – Canadá, foram testadas quanto ao seu potencial estrogênico, por meio de testes com levedura recombinante BJ3505 e com a linhagem celular BG1Luc4E₂ de carcinoma de ovário humano (LORENZEN et al., 2004). Os autores observaram que as amostras derivadas de lodos aeróbios apresentaram valores inferiores aos apresentados pelos derivados de

digestão anaeróbia, para ambos os biensaios utilizados, indicando que o processo de digestão do lodo empregado pelas ETEs pode ter relação direta com a remoção dos compostos estrogênicos. Além disso, o ensaio com levedura se mostrou cerca de 25 vezes mais sensível do que o ensaio com linhagem celular. Assim, este artigo alerta sobre o risco do uso dos biossólidos na agricultura.

Giudice e Young (2011) estudaram, em escala piloto, a estroginicidade de lixiviados e de águas de escoamento superficial derivados de solos fertilizados com biossólidos. Entre os DEs, seis diferentes compostos foram avaliados. Neste estudo, não foram detectados, para nenhuma amostra, o 17 α EE2 e o BPA não foram detectados. O n-NP e o triclosan estavam presentes apenas nas águas de escoamento. Apesar das substâncias triclocarban e 4-t-octilfenol serem encontradas em ambas as amostras (águas de escoamento e lixiviados), suas concentrações foram superiores nas águas de escoamento. O bioensaio ER-CALUX realizado, também indicou uma maior atividade estrogênica para as amostras correspondentes às águas de escoamento (43 a 55% nM E2), em relação às referentes aos lixiviados (15 a 42% nM E2).

Tabela 1. Resumo dos estudos ambientais recentes realizados para avaliar a estrogenicidade nos diversos ecossistemas.

Amostra ambiental	Sistemas teste	Técnica	Referências
Água superficial	Levedura	YES	Latorre et al. 2003 Peng et al. 2008 Zhao et al. 2011
	Linhagem celular (MCF-7 modificada)	MVLN	Furuichi et al. 2004
	Levedura	YES	Wang et al. 2011
	Linhagem celular (hepatócitos de tuta arco-íris)	Expressão gênica	Gagné et al. 2012
	Linhagem celular (MCF-7) e peixes (<i>Girardinichthys viviparus</i>)	Proliferação celular e dosagem de vitelogenina	Veja-López et al. 2007
		E- screen	Bicchi et al. 2009
	Levedura (<i>Saccharocyces cerevisiae</i> constitutivamente bioluminescente)	BLYES	Bergamasco et al. 2011
Água subterrânea			Latorre et al. 2003
Areia betuminosa	Linhagem celular (hepatócitos de tuta arco-íris)	Expressão gênica	Gagné et al. 2012
Estação de tratamento de esgoto (ETE)	Linhagem celular (MCF-7)	E-screen	Reungoat et al. 2012
	Levedura e peixes (<i>Ictalurus punctatus</i>)	YES e dosage de vitelogenina	Tilton et al. 2002
	Levedura (<i>Saccharocyces cerevisiae</i>)	RYA	Aguayo et al. 2004
	Levedura bioluminescente (com receptor de estrógeno α)	Ensaio com levedura bioluminescente	Salste et al. 2007

Estação de tratamento de esgoto (ETE)	Linhagem celular (MCF-7 modificada)	MELN	Cargouët et al. 2004
	Linhagem celular (MCF-7 modificada)	MELN (monitoramento da atividade transcricional do receptor de estrogênio)	Jugan et al. 2009
	Levedura	Ensaio da levedura recombinante	Céspedes et al. 2005
	Peixe (<i>Cyprinus carpio</i>) Linhagem celular (MCF-7 com receptor de estrógeno- BUS)	Produção de vitelogenina Proliferação celular	Petrovic et al. 2002 Schilirò et al. 2009
Efluente industrial e/ou urbano	Linhagem celular (MCF-7 modificada)	MVLN	Balest et al. 2008 Chen et al. 2004
	Linhagem celular (hepatócitos de truta arco-íris)	Indução de vitelogenina	Grung et al. 2007
Lodo	Levedura recombinante (BJ3505) e Linhagem celular (BG1Luc4E2)		Lorenzen et al. 2004
Sedimentos	Levedura	YES	Zhao et al. 2011
	Levedura	YES	Wang et al. 2011
	Levedura (<i>Saccharocycles cerevisiae</i>)	RYA	Garcia-Reyero et al. 2005
	Levedura (<i>Saccharocycles cerevisiae</i> Y190 com receptor ER α)	Bioensaio com sistema de duplo-híbrido em levedura	Kurihara et al. 2007
Solo	Linhagem celular (MCF-7 modificada)	MELN (atividade da luciferase)	Louiz et al. 2008
		ER-CALUX	Giudice e Young 2011

5. CONCLUSÃO

A partir da presente revisão, é possível concluir que uma grande variedade de compostos químicos pode atuar como DEs, mesmo em pequenas concentrações, causando problemas reprodutivos e distúrbios hormonais em diversos organismos, inclusive o homem. Entre os efeitos mais comuns ocasionados por esses químicos, encontram-se a inversão sexual e o déficit reprodutivo das populações naturais, principalmente de organismos aquáticos como os peixes.

A existência desses poluentes no ambiente chama a atenção para a eficiência do tratamento de efluentes. Geralmente, os tratamentos comumente utilizados são ineficazes na remoção de substâncias que possuem a capacidade de interferir no sistema endócrino, servindo como fonte desses contaminantes para o ambiente. Dessa forma, novos métodos devem ser desenvolvidos e aprimorados para tornar os tratamentos mais satisfatórios e, assim, possibilitar uma melhor forma de retirar esses poluentes das águas residuárias.

O desenvolvimento de técnicas que permitem uma rápida detecção da presença de DEs em amostras ambientais tornou-se de extrema importância, pela frequência com que esses contaminantes vêm sendo encontrados nos ecossistemas. Na presente revisão foram apresentadas diversas técnicas desenvolvidas para esse fim, as quais foram aplicadas em amostras de águas superficiais e subterrâneas, efluentes industriais e domésticos, sedimentos e lodo de esgoto, e os resultados encontrados por meio destas técnicas. Entre estes ensaios encontram-se os ensaios com leveduras recombinantes (YES, RYA e BLYES), testes com células geneticamente modificadas com receptor de estrogênio (MELN e MVLN), testes de expressão gênica (qRT-PCR) e dosagem de vitelogenina em peixes. Estes bioensaios se apresentaram como importantes instrumentos a serem aplicados em estudos de avaliação da estrogenicidade ambiental, pois, além de contribuírem para a identificação da presença de compostos com atividade estrogênicas em amostras ambientais, também permitem detectar o seu efeito biológico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUAYO, S.; MUÑOZ, M. J.; DE LA TORRE, A.; ROSET, J.; DE LA PEÑA, E.; CARBALLO, M. Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. **The Science of the total environment**, v. 328, n. 1-3, p. 69-81, 2004.

ALBRO, P. W.; THOMAS, R.; FISHBEIN, L. Metabolism of diethylhexyl phthalate by rats isolation and characterization of the urinary metabolites. **Jornal of Chromatography**. v.70, p.321-330, 1973.

ALBRO, P.W.; MOORE, B. Identification of the metabolites of simple phthalate diesters in rat urine. **Jornal of Chromatography**, v.94, p.209-218, 1974.

ANDERSEN, H. R.;ANDERSSON, A. M.; ARNOLD, S.F.; AUTRUP, H.; BARFOED, M.; BERESFORD, N. A.; BJERREGAARD, P.; CHRISTIANSEN, L.B.; GISSEL, B.; HUMMEL, R.; JORGENSEN, E. B.;KORSGAARD,B.; GUEVEL, R. L.; LEFFERS, H.;MCLACHLAN J.; MOLLER, A.; NIELSEN,J.B.; OLEA,N.; OLES-KARASKO, A.;PAKDEL,F.;PEDERSEN, K. L.;PEREZ,P.;SKAKKEBCEK,N. E.;SONNENSCHHEIN, C.; SOTO, A.M.; SUMPTER, J. P.; THORPE,S.P; GRANDJEAN, P. Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals. **Environmental Health Perspectives**. v.107, 1999.

ANDERSEN, H. R.; VINGGAARD, A. M.; RASMUSSEN, T. H.; GJERMANDSEN, I. M.; BONEFELD-JØRGENSEN, E. C. Effects of Currently Used Pesticides in Assays for Estrogenicity, Androgenicity, and Aromatase Activity *in Vitro*. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.179, p.1–12 ,2002.

ANDERSON, M.J.; CACELA, D.; BELTMAN, D.; TEH, S.J.; OKIHIRO, M.S.; HINTON, D.E.; DENSLOW, N.; ZELIKOFF, J.T. Biochemical and toxicopathic biomarkers assessed in smallmouth bass recovered from a polychlorinated biphenyl contaminated river. **Biomarkers**, v. 8, p. 371–39, 2003.

ARUKWE, A.; GOKSØYR, A. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. **Comparative Hepatology**, 2:4, 2003.

AUTIAN,J. Toxicity and Health Threats of Phthalate Esters: Review of the Literature. **Environmental Health Perspectives**. p.3-26,1973.

BÄCKLIN, B.-M.; ERIKSSON, L.; OLOVSSON, M. Histology of uterine leiomyoma and occurrence in relation to reproductive activity in the Baltic Gray Seal (*Halichoerus grypus*). **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 175-180, 2003.

BAEK, S. O. ; FIELD, R. A.; GOLDSTONE, M. E.; KIRK, P. W.; LESTER, J. N. POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS: SOURCES, FATE AND BEHAVIOR. **Water, Air, and Soil Pollution**. v. 60, p. 279-300, 1991.

BALEST, L.; LOPEZ, A.; MASCOLO, G.; DI IACONI, C. Removal of endocrine disrupter compounds from municipal wastewater using an aerobic granular biomass reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 288–294, 2008.

BENNIE, D.T. Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. **Water Quality Research Journal of Canada**, v. 34, p. 79–122, 1999.

BERGAMASCO, A. M. D. D.; ELDRIDGE, M.; SANSEVERINO, J.; SODRE, F.F.; MONTAGNER, C. C.; PESCARA, I. C.; JARDIM, W. F.; UMBUZEIRO, G.A. Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity. **J. Environ. Monit.** v.13, p.3288, 2011.

BERGERON, J.M.; CREWS, D.; McLACHLAN, J.A. PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 780-781, 1994.

BERGERON, R. M.; THOMPSON, T.B.; LEONARD, L. S.; PLUTA, L.; GAIDO, K. W. Estrogenicity of bisphenol A in a human endometrial carcinoma cell line. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.150, p.179–187, 1999.

BHATT, R. V. Environmental influence on reproductive health. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**. v.70, p. 69-75, 2000.

BICCHI, C.; SCHILIRÒ, T.; PIGNATA, C.; FEA, E.; CORDERO, C.; CANALE, F.; GILLI, G. Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. **The Science of the total environment**, v. 407, n. 6, p. 1842-51, 2009.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Quim. Nova**, v.30, No. 3, p.651-666, 2007.

BLAISE, C.; GAGNÉ, F.; SALAZAR, M.; SALAZAR, S.; TROTTIER, S.; HANSEN, P.-D. Experimentally-induced feminisation of freshwater mussels after longterm exposure to a municipal effluent. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 12, p. 865-870, 2003.

CAMPBELL, C.G.; BORGLIN, S.E.; GREEN, F. B.; GRAYSON, A.; WOZEI, E.; STRINGFELLOW, W.T. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. **Chemosphere**, v. 65, p. 1265–1280, 2006.

CARGOUET, M.; PERDIZ, D.; MOUATASSIM-SOUALI, A.; TAMISIER-KAROLAK, S.; LEVI, Y. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). **Science of the Total Environment**. v.324, p 55–66, 2004.

CÉSPEDES, R.; LACORTE, S.; RALDUÁ, D.; GINEBREDA, A.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). **Chemosphere**, v. 61, p. 1710-1719, 2005.

CITULSKI, J.; FARAHBAKHS, K. Overcoming the toxicity effects of municipal wastewater sludge and biosolid extracts in the Yeast Estrogen Screen (YES) assay. **Chemosphere**, v. 87, n. 5, p. 498-503, 2012.

CHEN, H. ; XIAO, J.; HU, G.; ZHOU, J.; XIAO, H.; WANG, X. Estrogenicity of Organophosphorus and Pyrethroid Pesticides. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.65, p.1419-1435, 2002.

CHEN, F-A.; SHUE, M-F.; CHEN, T-C. Evaluation on estrogenicity and oxidative hepatotoxicity of fossil fuel industrial wastewater before and after the powdered activated carbon treatment. **Chemosphere**, v. 55, p.1377–1385, 2004.

CHEN,T.C.; SHUE,M.S.; YEH,Y.L.; KAO,T.J. Bisphenol A occurred in Kao-Pin River and its tributaries in Taiean. **Environmental Monitoring and Assessment**. v.161,p.135-145,2010.

CHOE, S.Y.; KIM, S.J.; KIM, H.G.; LEE, J.H.; CHOI, Y.; LEE, H.; KIM, Y. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. **The Science of the Total Environment**, v.312, n. 1-3, p.15-21, 2003.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p.378-384, 1993.

COX, C. Nonyl phenol and related chemicals. **Journal of Pesticide Reform**. V.19, p. 15-20, 1996.

CRAIN, D.A.; GUILLETTE JR, L.J.; ROONEY, A.A.; PICKFORD, D.B. Alterations in steroidogenesis in Alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p 528-533. 1997.

DARBRE, P.D. Environmental contaminants in milk: the problem of organochlorine xenobiotics. **Biochemical Society Transactions**, v.26, p. 106-112, 1998.

DEMETRIO, G.; CORRIERO, A.; DESANTIS, S.; ZUBANI, D.; CIRILLO, F.; DEFLORIO, M.; BRIDGES, C.R.; EICKER, J.; DE LA SERNA, J.M.; MEGALOFONOU, P.; KIME, D.E. Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* L.). **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 358-361, 2003.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; ALDA, M. J. L.; LÓPEZ, R.; BARCELO, D. Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). **J. Mass Spectrom.**v. 38 ,p. 917–923, 2003.

ERICKSON, B. E. Analyzing the ignored environmental contaminants. **Environmental science & technology**. p.141-145,2002.

ESPLUGAS, S.; BILA, D.; KRAUSE, L.; DEZOTTI, M. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, p. 631-642, 2007.

ETO, M. **Organophosphorus pesticides**: organic and biological chemistry, Cleveland, Ohio: CRC, p.387, 1974.

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.

FENET, H.; GOMEZ, E.; PILLON, A.; ROSAIN, D.; NICOLAS, J.-C.; CASELLAS, C.; BALAGUER P. Estrogenic activity in water and sediments of a French River: Contribution of alkylphenols. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, p.1–6, 2003.

FERNANDEZ, M. P.; IKONOMOU, M. G.; BUCHANAN, I. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. **The Science of the total environment**, v. 373, n. 1, p. 250-69, 2007.

FOLMAR, L. C.; HEMMER, M. J.; DENSLOW, N. D.; KROLL, K.; CHEN, J.; CHEEK, A.; RICHMAN, H.; MEREDITH, H.; GRAU, E. G. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor *in vivo* and *in vitro*. **Aquatic Toxicology**, v. 60, n. 1-2, p. 101-110, 2002.

FONTENELE, E.G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; JÚNIOR, R. M. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.54, 2010.

FRY, D.M.; TOONE, C.K. DDT-induced feminization of gull embryos. **Science**, v. 231, p. 919–924, 1981.

FÜRHACKER, M.; SCHARF, S.; WEBER, H. Bisphenol A: emissions from point sources. **Chemosphere**, v. 41, p. 751-756, 2000.

FURUICHI, T.; KANNAN, K.; GIESY, J.P.; MASUNAG. S. Contribution of known endocrine disrupting substances to the estrogenic activity in Tama River water samples from Japan using instrumental analysis and *in vitro* reporter gene assay. **Water Research**, v. 38, p. 4491–4501, 2004.

GAGNÉ, F.; DOUVILLE, M.; ANDRÉ, C.; DEBENEST, T.; TALBOT, A.; SHERRY, J.; HEWITT, L. M.;FRANK, R. A.; MCMASTER, M. E.; PARROTT, J.; BICKERTON, G. Differential changes in gene expression in rainbow trout hepatocytes exposed to extracts of oil sands process-affected water and the Athabasca River. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2012.

GARCÍA-REYERO, N.; GRAU, E.; CASTILLO, M.; LÓPEZ DE ALDA, M.J.; BARCELÓ, D.; PÍNA, B. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 1152-1158, 2001.

GARCIA - REYERO, N.; PIÑA, B. Estrogenic Activity in Sediments from European Mountain Lakes. **Environ. Sci. Technol.** v.39, p.1427-1435,2005.

GHISELLI, G.;JARDIM, W. F.; Interferentes endócrinos no ambiente. **Quim. Nova**, v.30, p.695-706, 2007.

GIESY, J.P.; HILSCHEROVA, K.; JONES, P.D.; KANNAN, K.; MACHALA, M. Cell bioassays for detections of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p.3-16, 2002.

GILMAN, A., G.; HARDMAN, J. E.; LIMBIRD, L. E. As bases farmacológicas da terapêutica. 10.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, P.8153,2003.

GIUDICE, B. D.; YOUNG, T. M. Mobilization of endocrine-disrupting chemicals and estrogenic activity in simulated rainfall runoff from land-applied biosolids. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 30, n. 10, p. 2220-8, 2011.

GIWERCMAN, A.; CARLSEN, E.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N.E. Evidence for increasing incidence of abnormalities of the human testis: a review. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 65-72. 1993.

GRUNG, M.; LICHTENTHALER, R.; AHEL, M.; TOLLEFSEN, K.-E.; LANGFORD, K.; THOMAS, K. V. Effects-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia. **Chemosphere**, v. 67, n. 1, p. 108-20, 2007.

GUEDES MANIERO, M.; BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Degradation and estrogenic activity removal of 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol by ozonation and O3/H2O2. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 105-115, 2008.

GUILLETTE JR, L.J; GROSS, T.S.; MASSON, G.R.; MATTER, J.M.; PERCIVAL, H.F.; WOODWARD, A.R. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. **Environmental Health Perspectives**, v.102, p. 680-688, 1994.

HALLING-SORENSEN, B.; NIELSEN, S.N.; LANSKY, P.F.; INGERSLEV, F.; HOLTEN LUTZHOFT, H.C.; JORGENSEN, S.E. Occurrence, fate, and effects

of pharmaceutical substances in the environment - a Review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357-393, 1998.

HARRIS,C.A.; HENTTU,P.; PARKER,M.G.; SUMPTER, J.P. The Estrogenic Activity of Phthalate Esters In Vitro The Estrogenic Activity of Phthalate Esters In Vitro. **Environmental Health Perspectives**. v.5, n.8, 1997.

HARVEY, R. G. Activated Metabolites of Carcinogenic Hydrocarbons. **Acc. Chem. Res.** v.14, p.218-226, 1981.

HARVEY, P.W.; JOHNSON, I. 2002. Approaches to the assessment of toxicity data with endpoints related with endocrine disruption. **J. Appl. Toxicol.**, v.22, p.241- 247.

HASHIMOTO, S.; BESSHO, H.; HARA, A.; NAKAMURA, M.; IGUCHI, T.; FUJITA, K. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. **Environmental Research**, v. 49, p. 37-53, 2000.

HEMMING, J.M.; ALLEN, H.J.; THUESEN, K.A.; TURNER, P.K.; WALLER,T.; LAZORCHAK, J.M.; LATTIER, D.; CHOW, M.; DENSLOW, N.; VENABLESE, B. Temporal and spatial variability in the estrogenicity of a municipal wastewater effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 303–310, 2004.

HINCK, J.E.; BLAZER, V.S.; DENSLOW, N.D.; ECHOLS, K.R.; GROSS, T.S.; MAY, T.W.; ANDERSON, P.J.; COYLE, J.J.; TILLITT, D.E. Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from the Colorado River and its tributaries. **Science of the Total Environment**, v. 378, p. 376-402, 2007.

HOLFORD, T.R.; ZHENG, T.; MAYNE, S.T.; ZAHM, S.H.; TESSARI, J.D., BOYLE, P. Joint effects of nine polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on breast cancer risk. **International Journal of Epidemiology**, v.29, p. 975–982, 2000.

HSEU, Z.Y. Response of microbial activities in two contrasting soils to 4-nonylphenol treated with biosolids. **Chemosphere**, v. 64, p. 1769-1776, 2006.

IBARLUZEA, J.M.; FERNANDEZ, M.F.; SANTA-MARINA, L.; OLEA-SERRANO, M.F.; RIVAS, A.M.; AURREKOETXEA, J.J.; EXPÓSITO, J.; LORENZO, M.; TORNÉ, P.; VILLALOBOS, M.; PEDRAZA, V.; SASCO, A.J.;

OLEA, N. Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. **Cancer Causes and Control**, v. 15, p. 591–600, 2004.

JACOBS, M. Unsafe sex: How endocrine disruptors work. Pesticide Action Network (PAN). **Briefing** v 4, p.14, 2001.

JANOŠECK, J., HILSCHEOVÁ, K., BLÁHA, L., HOLOUBEK, I. Environmental xenobiotics and nuclear receptors- Interactions, effects and in vitro assessment. **Toxicology in Vitro**, v.20, p.18-37, 2006.

JANSEN, H.T.; COOK, P.S.; PORCELLI, J.; LIU, T.C.; HANSEN, L.G. Estrogenic and antiestrogenic actions of PCBs in the female rat: *in vitro* and *in vivo* studies. **Reproductive Toxicology**, v.7, p. 237–248, 1993.

JOBLING, S.; SHEAHAN, D.; OSBORNE, J.A.; MATTHIESSEN, P.; SUMPTER, J.P. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p.194–202, 1996.

JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C.R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J.P. Widespread sexual disruption in wild fish. **Environmental Science & Technology**, v. 32, p. 2498-2506, 1998.

JOBLING, S.; COEY, S.; WHITMORE, J.G.; KIME, D.E.; VAN LOOK, K.J.W.; MCALLISTER, B.G.; BERESFORD, N.; HENSHAW, A.C.; BRIGHTY, G.; TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P. Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 515–524, 2002.

JOHNSON, A.C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating estrogen input to activated sludge treatment works and observations on their removal from effluent, **Science of The Total Environment**, v. 256, p. 163–173, 2000.

JONES, P.D.; DECOEN, W.M.; TREMBLAY, L.; GIESY, J.P. Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. **Water Science and Technology**, v. 42, p. 1-14, 2000.

JUGAN, M. L.; OZIOL, L.; BIMBOT, M.; HUTEAU, V.; TAMISIER-KAROLAK, S.; BLONDEAU, J. P.; LÉVI, Y. *In vitro* assessment of thyroid and estrogenic endocrine disruptors in wastewater treatment plants, rivers and drinking water supplies in the greater Paris area (France). **The Science of the total environment**, v. 407, n. 11, p. 3579-87, 15 maio. 2009.

KAWAHATA, H.; OHTA, H.; INOUE, M.; SUSUKI, A. Endocrine disrupter Nonylphenol and bisphenol A contamination on Okinawa and Ishigaki Islands, Japans—within coral reefs and adjacent river mouths. **Chemosphere**, v.55, p.1519-1527, 2004.

KELLY, A.; HATCHER, M.; DUNN, A. Intersexuality in the amphipod *Gammarus duebeni* results from incomplete feminisation by the vertically transmitted parasitic sex ratio distorter *Nosema granulosis*. **Evolutionary Ecology**, v. 18, p. 121–132, 2004.

KIME, D.E.; NASH, J.P.; SCOTT, A.P. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. **Aquaculture**, v. 177, p. 345-352, 1999.

KNÖRR, S.; BRAUNBECK, T. Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) after continuous exposure to octylphenol. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, p. 187-196, 2002.

KRISHNAN, A.; STATHIS, P.; PERMUTH, S.; TOKES, L.; FELDMAN, D. Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. **Endocrinology**, v.132, p.2279-2286, 1993.

KRISHNAN, V.; SAFE, S. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 120, p. 55-61, 1993.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. **Environmental science & technology**, 36(6), 1202-1211, 2002.

KUCH, H.M.; BALLSCHMITER, K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. **Environmental Science & Technology**, v. 35, p. 3201-3206, 2001.

KURIHARA, R.; WATANABE, E.; UEDA, Y.; KAKUNO, A.; FUJII, K.; SHIRAISHI, F.; HASHIMOTO, S. Estrogenic activity in sediments contaminated by nonylphenol in Tokyo Bay (Japan) evaluated by vitellogenin induction in male mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 1315-1320, 2007.

KWON, A.; STEDMAN, D.B.; ELSWICK, B.A.; CATTLEY, R.C.; WELSCH, F. Pubertal development and reproductive functions of Crl: CDBR Sprague–Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development. **Toxicological Sciences**, v. 55, p. 399-406, 2000.

EPA - Environmental Protection Agency- Label Review Manual; EPA 737-B-96-001; U.S. Environmental Protection Agency, National Technical Information Service: Springfield, VA, 1996, pp 6-1 to 6 -15.

LATORRE, A.; LACORTE, S.; BARCELÓ, D. Presence of nonylphenol, octylphenol and bisphenol A in two aquifers close to agricultural, industrial and urban areas. **Chromatographia**, v. 57, No. 1/2, p. 111-116, 2003.

LAVADO, R.; THIBAUT, R.; RALDUA, D.; MARTIN, R.; PORTE, C. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.196, p. 247-257, 2004.

LEGER, J.; LEONARDS, P.; SPENKELINK, A.; MURK, A.J. In vitro biomonitoring in polar extracts of solid phase matrices reveals the presence of unknown compounds with estrogenic activity. **Ecotoxicology**, v.12, p.239-249, 2003.

LESTER, J N.; EDGE, D. Sewage and sewage sludge treatment. In: HARRISON, R.M. (Org). **Pollution: Causes, Effects and Control**, 4th ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2001, p. 113-144

LETCHER, R.J.; SANDERSON, J. T.; BOKKERS, A.; GIESY, J. P.; VAN DEN BERG, M. Effects of bisphenol A-related diphenylalkanes on vitellogenin production in male carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes and aromatase (CYP19) activity in human H295R adrenocortical carcinoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.209, p.95 – 104, 2005.

LEVY,G.;LUTZ, I.; KRÜGER,A.; KLOAS,W. Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. **Environmental Research**. v.94, p.102–111, 2004.

LI, X-M.; LUO, F-N.; LIU, G-X.; ZHU, P-T. Bioassay of estrogenic activity of effluent and influent in a Farm Wastewater Treatment Plant using an *in vitro* recombinant Assay with yeast Cells. **Biomedical And Environmental Sciences**, v. 21, p. 381-388, 2008.

LINEY, K.E.; HAGGER, J.A.; TYLER, C.R.; DEPLEDGE, M.H.; GALLOWAY, T.S.; JOBLING, S. Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works. **Environmental Health Perspectives**, v.114, p. 81-89, 2006.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.** v.75, p. 631–681, 2003.

LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Química Nova**. v.19, p. 497-516, 1996.

LORENZEN, A.; HENDEL, J.G.; CONN, K. L.; BITTMAN, S.; KWABIAH, A. B.; LAZAROVITZ, G.; MASSÉ, D.; McAllister, T.A.; Topp, E. Survey of hormone activities in municipal biosolids and animal manures. **Environmental toxicology**, v. 19, n. 3, p. 216-25, 2004.

LOUIZ, I.; KINANI, S.; GOUZE, M. E.; BEN-ATTIA, M.; MENIF, D.; BOUCHONNET, S.; PORCHER, J. M.; BEN-HASSINE, O.K.; AÏT-AÏSSA, S. Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). **Science of the total environment** . v.402, p.318 – 329, 2008.

MA, M.; RAO, K.; WANG, Z. Occurrence of estrogenic effects in sewage and industrial wastewaters in Beijing, China. **Environmental Pollution**, v. 147, p.331-336, 2007.

MAGUIRE, R.J. Review of the persistence of nonylphenol and ethoxylates in aquatic environments. **Water Quality Research Journal of Canada**, v. 34, p. 37-78, 1999.

MANDICH A, BOTTERO S, BENFENATI E, CEVASCO A, ERRATICO C, MAGGIONI S, MASSARI, A.; PEDEMONTE, F.; VINGANÒ, L. In vivo exposure of carp to graded concentrations of bisphenol A. **Gen. and Comp. Endocrinology**. v.153, p.15–24, 2007.

MARTIN-SKILTON, R.; LAVADO, R.; THIBAUT, R.; MINIER, C.; PORTE, C. Evidence of endocrine alteration in the red mullet, *Mullus barbatus* from the NW Mediterranean. **Environmental Pollution**, v. 141, p. 60-68, 2006.

MAURÍCIO, R.; DINIZ, M.; PETROVIC, M.; AMARAL, L.; PERES, I.; BARCELÓ, D.; SANTANA, F. A characterization of selected endocrine disruptor

compounds in a portuguese wastewater treatment plant. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 118, p. 75–87, 2006.

McLACHLAN, J.A.; NEWBOLD, R.R.; TENG, C.T.; KORACH, K.S. Environmental estrogens: Orphan receptors and genetic imprinting. In: COLBORN, T.; CLEMENT, C. (Org.). **Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection**. Princeton: Princeton Scie.jpgic Publishing Co., Inc., 1992, p. 17-84.

MEYBECK, M.; HELMER, R. An introduction to water quality. Em **Water Quality Assessments - A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitorin**. 2ª edição, 1992.

MEYBECK, M. Global analysis of river systems: from Earth system controls to Anthropocene syndromes. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**. v. 358, p.1935–1955, 2003.

MEYER, A.; SARCINELLI, P.N.; MOREIRA, J.C. Are some Brazilian population groups subject to endocrine disrupters? **Cadernos da Saúde Pública**, v.15, n.4, p. 845-850, 1999.

MIÈGE, C.; KAROLAK, S.; GABET, V.; JUGAN, M.-L.; OZIOL, L.; CHEVREUIL, M.; LEVI, Y.; COQUERY, M. Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 186-195, 2009.

MILLS, L.J.; GUTJAHR-GOBELL, R.E.; HAEBLER, R.A.; HOROWITZ, D.J.; JAYARAMAN, S.; PRUELL, R.J.; MCKINNEY, R.A.; GARDNER, G.R.; ZAROOGIAN, G.E. Effects of estrogenic (*o,p*9-DDT; octylphenol) and anti-androgenic (*p,p*9-DDE) chemicals on indicators of endocrine status in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). **Aquatic Toxicology**, v.52, p.157-176, 2001.

MÜLLER, S.O. Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 38, p. 582-587, 2004.

MURK, A.J.; LEGLER, J.; VAN LIPZIG, M.M.H.; MEERMAN, J.H.N.; BELFROID, A.C.; SPENKELINK, A.; VAN DER BURG, B.; RIJS, G.B.J.; VETHAAK, D. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, p. 16–23, 2002.

MUSCAT, J.E.; BRITTON, J.A.; DJORDJEVIC, M.V.; CITRON, M.L.; KEMENY, M.; BUSCH-DEVEREAUX, E.; PITTMAN, B.; STELLMAN, S.D. Adipose concentrations of organochlorine compounds and breast cancer recurrence in Long Island, New York. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v.12, p.1474-1478, 2003.

NESARETNAM, K.; DARBRE, P. 3,5,3',5'-Tetrachlorobiphenyl is a Weak Oestrogen Agonist *in Vitro* and *in Vivo*. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.** v. 62, p. 409-418, 1997.

NISHIKAWA, J.; SAITO, K.; GOTO, J.; DAKEYAMA, F.; MATSUO, M.; NISHIHARA, T. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear receptor with coactivator. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 154, p. 76-83, 1999.

OKOUMASSOUN, L-E.; BROCHU, C.; DEBLOIS, C.; AKPONAN, S.; MARION, M.; AVERILL-BATES, D.; DENIZEAU, F. Vitellogenin in tilapia male fishes exposed to organochlorine pesticides in Ouémé River in Republic of Benin. **The Science of the Total Environment**, v. 299, p. 163–172, 2002.

OLIVEIRA, D.P.; SILVA, F.V.; RODRIGUES, J.L.; BATISTA, B.L. Alquilfenóis e Alquilfenóis etoxilados: uma visão ambiental. **Revista Brasileira de Toxicologia**. v. 20, p.1-12, 2007.

OSTBY, J.; COOPER, R.L.;KELCE, W. R.; GRAY JR, L.E. The estrogenic and antiandrogenic pesticide methoxychlor alters the reproductive tract and behavior without affecting pituitary size or LH and prolactin secretion in male rats. **Toxicology and Industrial Health**. v. 15, p. 37–47, 1999.

PAWLOWSKI, S.; TERNES, T.A.; BONERZ, M.; RASTALL, A.C.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 1, p. 129-138, 2004.

PENG, X.; YUA, Y.; TANGA, C.; TANA, J.; HUANGA, Q.; WANG, Z. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. **Science of the Total Environment**, v. 397, p. 158-166, 2008.

PETERS, N. E.; MEYBECK, M. Water Quality Degradation Effects on Freshwater Availability: Impacts of Human Activities. **Water International**, 25:2, p.185-193, 2000.

PETREAS, M.; SHE, J.; BROWN, F.R.; WINKLER, J.; WINDHAM, G.; ROGERS, E.; ZHAO, G.; BHATIA, R.; CHARLES, M.J. High body burden of 2,20,4,40-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in California women. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p.1175–1179, 2003.

PETREAS, M.; SMITH, D.; HURLEY, S.; JEFFREY, S.S.; GILLISS, D.; REYNOLDS, P. Distribution of persistent, lipid-soluble chemicals in breast and abdominal adipose tissues: lessons learned from a breast cancer study. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v. 13, p. 416–424, 2004.

PETROVIC, M.; DIAZ, A.; VENTURA, F.; BARCELÓ, D. Simultaneous determination of halogenated derivatives of alkylphenol ethoxylates and their metabolites in sludges, river sediments, and surface, drinking, and wastewaters by liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 5886–5895, 2001.

PETROVIC, M.; SOLÉ, M.; LÓPEZ DE ALDA, M.J.; BARCELÓ, D. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n.10, p. 2146-2156, 2002.

PINTO, B.; GARRITANO, S.L.; CRISTOFANI, R.; ORTAGGI, G.; GIULIANO, A.; AMODIO-COCCHIERI, R.; CIRILLO, T.; DE GIUSTI, M.; BOCCIA, A.; REALI, D. Monitoring of polychlorinated biphenyl contamination and estrogenic activity in water, commercial feed and farmed seafood. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 144, p. 445-453, 2008.

RANNEY, R.E. Comparative metabolism of 17 ethynyl steroids used in oral contraceptives. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 3, p. 139–166, 1977.

RASIER, G.; TOPPARI, J.; PARENT, A.-S.; BOURGUIGNON, J.-P. Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: A review of rodent and human data. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 254–255, p. 187–201, 2006.

REEDER, A.L.; RUIZ, M.O.; PESSIER, A.; BROWN, L.E.; LEVENGOOD, J.M.; PHILLIPS, C.A.; WHEELER, M.B.; WARNER, R.E.; BEASLEY, V.R. Intersexuality and the cricket frog decline: historic and geographic trends. **Environmental Health Perspectives**, v.113, p. 261-265, 2005.

REUNGOAT, J.; ESCHER, B. I.; MACOVA, M.; ARGAUD, F. X.; GERNJAK, W.; KELLER, J. Ozonation and biological activated carbon filtration of

wastewater treatment plant effluents. **Water research**, v. 46, n. 3, p. 863-72, 2012.

ROSA, R.M.R. Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente – Perfil Engenharia Sanitária, 2008. Contribuição para o estudo de compostos desreguladores endócrinos (EDC) em estações de tratamento de águas residuais (ETAR): estudo da remoção de EDC'S numa ETAR com tratamento terciário.

SALSTE, L.; LESKINEN, P.; VIRTA, M.; KRONBERG, L. Determination of estrogens and estrogenic activity in wastewater effluent by chemical analysis and the bioluminescent yeast assay. **The Science of the total environment**, v. 378, n. 3, p. 343-51, 2007.

SANTODONATO, J. Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. **Chemosphere**, v. 34, p. 835-848, 1997.

SCHILIRÒ, T.; PIGNATA, C.; ROVERE, R.; FEA, E.; GILLI, G. The endocrine disrupting activity of surface waters and of wastewater treatment plant effluents in relation to chlorination. **Chemosphere**. v.75, p.335–340, 2009.

SCHWAIGER, J.; SPIESER, O.H.; BAUER, C.; FERLING, H.; MALLOW, U.; KALBFUS, W.; NEGELE, R.D. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquatic Toxicology**, v.51, p. 69-78, 2000.

SERVOS, M. R. Review of the Aquatic Toxicity, Estrogenic Responses and Bioaccumulation of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates. **Water Qual. Res.** v.34, p.123-177, 1999.

SHAPE, R.M.; SKAKKEBAEK, N.E. Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **Lancet**, v. 341, p. 1392-1395, 1993.

SHAW, I.; McCULLY, S. A review of the potential impact of dietary endocrine disrupters on the consumer. **International Journal of Food Science and Technol.**, v.37, p.471-476, 2002.

SHIMADA, K.; MITAMURA, K.; HIGASHI, T. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. **Journal of Chromatography A**, v.935 p.141–172, 2001.

SIMPSON, M.G.; PARRY, M.; KLEINKAUF, A.; SWARBRECK, D.; WALKER, P.; LEAH, R.T. Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from a UK estuary impacted by endocrine-disrupting chemicals. **Environmental Research**, v. 50, p. 283-297, 2000.

SNYDER, S.A.; WESTERHOFF, P.; YOON, Y.; SEDLAK, D.L. Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: Implications for the water industry. **Environmental Engineering Science**, v.20, p. 449-469, 2003.

SOLÉ, M.; RALDUA, D.; PIFERRER, F.; BARCELÓ, D.; PORTE, C. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 136, p. 145-156, 2003.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. An Updated Review of Environmental Estrogen and Androgen Mimics and Antagonists. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.** v.65, pp. 143-150, 1998.

SONAWANE, B.R. Chemical contaminants in human milk: an overview. **Environmental Health Perspectives**, v.103, p. 197-205, 1995.

STAPLES, C.A.; DORN, P.B.; KLECKA, G.M.; O'BLOCK, S.T.; HARRIS, L.R.A.A. Review of the environmental fate, effects and exposure of bisphenol A. **Chemosphere**, v.36, n.10, p.2149-2173, 1998.

TILTON, F.; BENSON, W. H.; SCHLENK, D. Evaluation of estrogenic activity from a municipal wastewater treatment plant with predominantly domestic input. **Aquatic toxicology**, v. 61, n. 3-4, p. 211-24, 2002.

TOPPARI, J.; LARSEN, J.C.; CHRISTIANSEN, P.; GIWERCMAN, A.; GRANDJEAN, P.; GUILLETTE JR. L.J.; JEGOU, B.; JENSEN, T.K.; JOUANNET, P.; KEIDING, N.; LEFFERS, H.; MCLACHLAN, J.A.; MEYER, O.; MÜLLER, J.; RAJPERT-DE-MEYTS, E.; SCHEIKE, T.; SHARPE, R.; SUMPTER, J.; SKAKKEBAEK, N.E. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, p. 741-803, 1996.

TUVIKENE, A. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Ann. Zool. Fennici.** v.32, 295-309, 1995.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL AGENCY (USEPA). Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria–Nonylphenol. Disponible en: <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/aqlife/pollutants/nonylphenol/index.cfm>

USEPA - United States Environmental Protection Agency, 1997. Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Washington, DC: Office of Research and Development. EPA/630/R-96/012.

VEGA-LÓPEZ, A.; RAMÓN-GALLEGOS, E.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; JIMÉNEZ-OROZCO, F.A.; GARCÍA-LATORRE, E.; DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, M.L. Estrogenic, anti-estrogenic and cytotoxic effects elicited by water from the type localities of the endangered goodeid fish *Girardinichthys viviparus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 145, p. 394-403, 2007.

VOGEL, S. A. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a “safety”. **Journal Information**, v. 99, n. S3, 2009.

WALTERS, L. M.; ROURKE, A.W.; EROSCHENKO, V.P. Purified methoxychlor stimulates the reproductive tract in immature female mice. **Reproductive Toxicology**. v.7, p. 599-606, 1993.

WANG, L.; YING, G.; CHEN, F.; ZHANG, L., ZHAO, J.; LAI, H.; CHEN, Z.; TAO, R. Monitoring of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemical and biological tools. **Environmental Pollution**. 1-9, 2011.

WHITE, R. D.; CARTER, D.E.; EARNEST, D.; MULLER, J. Absorption and metabolism of three phthalate diesters by the rat small intestine. **Cosmet. Toxicol.** v.18, p. 383-386, 1980.

WHITE, R. ; JOBLING, S. ; HOARE, S. A.; SUMPTER, J. P.; PARKER, M. G. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. **Endocrinology**. v.135, 175-192, 1994.

WU, Z.; ZHANG, Z; CHEN, S.; HE, F.; FU, G.; LIANG, W. Nonylphenol and octylphenol in urban eutrophic lakes of the subtropical China. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 16, No. 3, p. 227-234, 2007.

YING, G.G.; KOOKANA, R.S.; RU, Y. J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v. 28, p. 545–551, 2002.

YING, G.G.; WILLIAMS, B.; KOOKANA, R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. **Environment International**, v. 28, p. 215–226, 2002.

ZACHAREWSKI, T. *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 613-623, 1997.

ZHAO, J.; YING, G.; YANG, B.; LIU, S.; ZHOU, L.; CHEN, Z.; LAI, H. Screening of multiple hormonal activities in surface water and sediment from the pearl river system, south China, using effect-directed *in vitro* bioassays. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.30, n.10, p. 2208–2215, 2011.

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DAS
ÁGUAS DOS RIOS JAGUARI, ATIBAIA E PIRACICABA NA
REGIÃO DE INFLUÊNCIA DA REFINARIA DE PAULÍNIA**

Maria Tereza Pamplona Silva¹, Márcia Miyuki Hoshina¹, Raquel Vaz
Hara¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade
Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, 13.506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

A indústria de refino de petróleo produz efluentes que podem conter diversas substâncias capazes de interagir com os organismos vivos, dentre estas podemos destacar os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). Para avaliar a extensão dos impactos que as indústrias petroquímicas promovem no ambiente, vem sendo cada vez mais incentivado o desenvolvimento de técnicas que sejam capazes de estimar os reais efeitos que os poluentes derivados deste setor industrial causam sobre os organismos a eles expostos. No presente trabalho, foram avaliadas a genotoxicidade e a mutagenicidade das águas de rios que estão em uma região sob a influência da atividade da refinaria de Paulínia – SP. Para isso, foram realizadas coletas em três diferentes estações sazonais (Novembro de 2011, Março e Maio de 2012), em cinco pontos distintos, como segue: P1, captação de água pela refinaria no rio Jaguari; P2, efluente tratado da refinaria; P3, montante do descarte do efluente no rio Atibaia; P4, jusante do descarte do efluente no rio Atibaia; P5, rio Piracicaba, a 1500 m da confluência dos rios Atibaia e Jaguari. A avaliação das amostras foi realizada com o extrato bruto e diluído (obtido por meio de extração de fase sólida), por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo com cultura de células de hepatoma humano (HepG2). Para os extratos brutos das coletas de novembro de 2011, foi observada, pelo ensaio do cometa, uma alta genotoxicidade das águas do rio Jaguari e das águas do efluente lançado pela refinaria, mas uma diminuição gradativa da genotoxicidade para os pontos abaixo do lançamento do efluente. Para o extrato diluído, foi observado uma redução dos danos, quando estes resultados foram comparados com os resultados registrados para os extratos brutos. Na coleta de março de 2012, extrato bruto, foi observada uma maior genotoxicidade para as águas do rio Atibaia. Estes efeitos foram diminuídos, nos extratos diluídos. Para o mês de maio de 2012 (extrato bruto), os resultados observados indicaram maior genotoxicidade da água de captação, em relação ao efluente tratado. O rio Piracicaba apresentou uma genotoxicidade menor que a do controle negativo (CN). Já para as análises do extrato diluído, não foi observada genotoxicidade. O teste de micronúcleo, realizado com o extrato bruto de águas coletadas em novembro de 2011, indicou mutagenicidade apenas para P4. Na coleta de maio de 2012 houve um aumento na frequência de micronúcleos apenas em P1 e P2. Os extratos diluídos de maio de 2012 apresentaram uma diminuição do número de micronúcleos em relação ao extrato bruto. Pelos bioensaios realizados, pode-se observar que existe uma correlação direta entre as mudanças sazonais e a indução de danos no DNA.

Palavras – chave: ecotoxicologia aquática; extração de fase sólida; cultura de células; células HepG2 ensaio do cometa; micronúcleo.

ABSTRACT

The petroleum refining industry produces effluents that can contain several substances that are capable of interacting with living organisms, among these substances we can highlight the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). To evaluate the extension of the impacts that petrochemical industries cause in the environment, it has been increasingly encouraged the development of techniques that can estimate the real effects of pollutants derived from this industrial sector cause on organisms exposed to them. In this study, it was assessed the genotoxicity and mutagenicity of river waters that are in a region under the influence of a refinery in Paulínia – SP. For this, it was performed collections in three different seasons (November 2011, March and May 2012), in five distinct sites, as follows: P1, water uptake by the refinery in Jaguari River; P2, effluent treated by the refinery; P3, upstream the effluent discharge in Atibaia River; P4, downstream the effluent discharge in the Atibaia River; P5, Piracicaba River, 1500 m from the confluence of the Atibaia and Jaguari rivers. The samples assessment was carried out with raw and diluted extract (obtained by solid phase extraction), using the comet assay and micronucleus test with cultured human hepatoma cells (HepG2). For the raw extractions collection of November 2011, it was observed, by the comet assay, a high genotoxicity of the waters from Jaguari River and the effluent discharged by the refinery, but a gradual decrease of the genotoxicity for the sites below the effluent discharge. For the diluted extract, it was observed a reduction of the damages, when these results were compared to those registered for the raw extracts. In the collection of March 2012, raw extract, it was observed a higher genotoxicity for the Atibaia River waters. These effects decreased in the diluted extracts. For May 2012 (raw extract), the results showed a higher genotoxicity for the uptake water in relation to the treated effluent. The Piracicaba River presented a genotoxicity lower than the negative control (NC). For the analyses of the diluted water, it was not observed genotoxicity. The micronucleus test, performed with the raw extract of the waters collected in November 2011, showed mutagenicity only for P4. In the collection of May 2012 there was an increase in the frequency of micronuclei only in P1 and P2. The diluted extracts of May 2012 presented a decrease in the number of micronuclei in relation to the raw extract. From the bioassays used, it could be observed a direct correlation between the seasonal changes and induction of damages in the DNA.

Key-words: aquatic ecotoxicology; solid phase extraction; cell culture; HepG2 cells, comet assay; micronucleus.

1. Introdução

As intensas atividades humanas desenvolvidas próximas às bacias hidrográficas vêm causando impactos severos nos recursos hídricos superficiais e subterrâneos, principalmente por estes ambientes servirem como receptores e reservatórios de elevada quantidade de poluentes. Os efluentes lançados no ambiente aquático constituem, hoje, a maior preocupação ambiental, pois este pode comprometer a manutenção da integridade do ambiente e, conseqüentemente, as propriedades da água biologicamente disponível (MEYBECK; HELMER, 1992; TUNDISI, 1999; KUBISCH et al., 2012). Os organismos aquáticos podem acumular os poluentes tanto pelo contato com a água como pela ingestão de material particulado ou de alimentos, o que os torna inclusive veículo da contaminação de outros níveis tróficos. A qualidade da água é um fator importante a ser considerado para a saúde pública, mas também pode afetar as atividades econômicas, como por exemplo, as relacionadas com os processos industriais e agropecuários. Somado a isso, a contaminação da água também pode conferir um significativo potencial mutagênico para os recursos hídricos (COONEY, 1995; RAND et al., 1995; DEGUCHI et al., 2007; SQUADRONE et al., 2012), comprometendo, inclusive, a saúde ambiental do local impactado.

De acordo com Stepnowski et al. (2002) e Hoshina et al. (2008), dentre os diversos setores que contribuem para a contaminação dos corpos hídricos, as refinarias de petróleo são consideradas as atividades industriais mais relevantes. O processo de refino do petróleo, além de exigir grande quantidade de água para o seu processamento, lançam no ambiente, efluentes complexos, compostos por diversos poluentes como metais, fenóis, óleos e gorduras, amônia e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), considerados extremamente detrimenais para o ambiente. Embora as águas servidas sejam tratadas e recuperadas para serem reutilizadas nas refinarias, uma grande quantidade de compostos tóxicos pode estar presente no efluente final da indústria e, conseqüentemente, ser introduzido no meio aquático (WAKE, 2005).

Os HPAs são parte de um grupo de compostos orgânicos que têm sua estrutura molecular formada basicamente por dois ou mais anéis aromáticos condensados (NEFF, 1979; BARROSO, 2010). Entre todos os hidrocarbonetos

conhecidos, os presentes no petróleo são considerados os de mais alta toxicidade, inclusive com efeitos mutagênicos e cancerígenos sobre os organismos expostos (PAGLIA; VALENTINE, 1967; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Existem algumas formas de se isolarem os poluentes presentes em amostras ambientais. Dentre elas, a extração de fase sólida (EFS) é um dos métodos mais utilizados. Esta técnica consiste na retenção dos analitos presentes em uma matriz aquosa, em um polímero específico contido dentro de um cartucho. As maiores vantagens deste método são a praticidade, a sua maior sensibilidade (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001) e a efetividade de armazenamento a longo prazo de amostras ambientais, sem que as mesmas percam os seus componentes ou sofra degradação microbiana. O uso da EFS permite também isolar os diferentes poluentes presentes na amostra, facilitando a análise da influência destes sobre organismos.

Os processos de carcinogênese, teratogênese e de uma série de outros distúrbios podem estar relacionados ao potencial genotóxico de poluentes ambientais. Em decorrência disto, torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de ensaios, realizados com organismos sensíveis, que sejam capazes de avaliar as potencialidades tóxicas dos químicos ambientais e também a ação destes químicos sobre o material genético dos organismos, mesmo quando estes componentes estejam presentes em baixas concentrações (KLOBUCAR et al., 2003; FRENZILLI et al., 2009).

Inúmeras linhagens de células mantidas em culturas vêm sendo utilizadas em ensaios de monitoramento ambiental, principalmente em avaliações aquáticas (DOWLING; MOTHERSILL, 2001). Estes sistemas *in vitro* possuem uma série de vantagens, como: facilidade na padronização das condições do ensaio (densidade populacional, pH, temperatura, composição do meio de cultivo); realização de tratamentos das células em várias fases do ciclo celular (RABELLO-GAY, 1991); são reprodutíveis, pela uniformidade de seu metabolismo e comportamento celular, além de permitirem testes rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis (ROGERO et al., 2003).

Muitos estudos de genotoxicidade e mutagenicidade são realizados com cultura celular, sendo a linhagem de HepG2 uma das mais utilizadas para

este fim (NATARAJAN; DARROUDI, 1991; KNASMULLER et al. 1998). Os de micronúcleo (MN) e do cometa são ensaios indicados para a detecção de genotoxicidade e mutagenicidade de químicos ambientais, pela sua eficácia e rapidez na obtenção de resultados.

O ensaio do cometa é considerado um teste capaz de detectar danos no DNA de células individuais induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (PAVLICA *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; MATSUMOTO *et al.*, 2006), e ainda detectar reparos de DNA (Speit et al., 2009). Este teste requer um pequeno número de células e não necessita que estas estejam em divisão, podendo, então, ser aplicada em qualquer fase do ciclo celular (PAVLICA *et al.*, 2001). O teste do MN é uma técnica muito importante usada no monitoramento ambiental, pois avalia a potencialidade mutagênica de agentes presentes no ambiente (SOUZA; FONTANETTI, 2006). O MN é uma pequena massa de cromatina delimitada por membrana e separada do núcleo principal, com aparência de um pequeno núcleo. São considerados MN clássicos, as estruturas circulares de mesma refração que o núcleo, desde que não estejam ligadas a este. Assim, a detecção de um MN em uma célula indica que houve uma perda de cromatina nuclear (FENECH, 2000; FENECH; CROTT, 2002; BONASSI et al., 2003; FENECH et al., 2003).

A refinaria de Paulínia capta água do rio Jaguari, para o desenvolvimento de suas atividades, e despeja os seus efluentes, após passagem por tratamentos (físico-químicos, biológicos e lagoa de estabilização), no rio Atibaia. A Replan possui uma área física de 9.125 milhões de m² e é a maior refinaria de petróleo do sistema PETROBRÁS, responsável pelo refino de cerca de 20% de todo petróleo brasileiro (FERRAZ et al., 2001).

Diante do exposto acima, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar, em células HepG2, a genotoxicidade (ensaio do cometa) e a mutagenicidade (MN) das águas dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba, rios estes que sofrem influência de uma refinaria de petróleo do estado de São Paulo. As análises aqui realizadas foram feitas por meio de extratos obtidos pela EFS das amostras de água.

2. Material e Métodos

2.1. Material

2.1.1. Material biológico

O organismo teste utilizado no presente estudo foi célula de hepatoma humano (HepG2) mantida em cultura, fornecidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

2.1.2. Área de estudo e localização

Os Rios Atibaia, Piracicaba e Jaguari pertencem a bacia hidrográfica do Rio Piracicaba, localizada na porção sudeste do Estado de São Paulo (Figura 1). Esta bacia recebe grande influência de efluentes industriais e domésticos de uma das mais importantes regiões urbanizadas e industrializadas do estado de São Paulo. Os Rios Atibaia e Jaguari passam pelo município de Paulínia-SP, região que abriga 51.242 habitantes e 107 indústrias, dentre elas a Refinaria de Petróleo de Paulínia (Replan). O Rio Piracicaba é originado pela confluência destes dois rios citados acima.

Para a avaliação dos impactos ambientais que os efluentes da refinaria de petróleo possam estar causando sobre estes rios, foram coletadas as amostras de água em cinco pontos distintos, como segue:

P1 - Rio Jaguari: local de captação de água da refinaria;

P2 - Efluente da refinaria a ser lançado no rio Atibaia;

P3 - Rio Atibaia – 200 metros a montante do descarte do efluente da refinaria;

P4 - Rio Atibaia – cerca de 500 metros a jusante da descarga do efluente da refinaria;

P5 - Rio Piracicaba – ponto localizado cerca de 1500 metros, da confluência dos rios Jaguari e Atibaia.

2.2. Metodologia

2.2.1. Extração de Fase Sólida

As coletas das amostras de água foram realizadas em frascos de vidro com volume de 4 litros, previamente lavados com detergente (Extran®) e, posteriormente, com acetona P.A., para a remoção de eventuais resíduos químicos presentes no frasco. No momento da coleta, foram acrescentados nos frascos 8 mL de ácido acético glacial P.A., para acidificação da amostra e, assim, impedir a proliferação de microrganismos que pudessem alterar as características das águas coletadas. Posteriormente, foram realizadas duas pré-filtragens em um sistema de filtração ligado a uma bomba hidrovácuo, com um filtro de microfibras de vidro (Glass-microfibre Discs MGA 47mm – Sartorius Stedim Biotech®), para a retirada de matéria orgânica e do material em suspensão. Nesta etapa, as amostras foram subdivididas em alíquotas de 1 litro. Em uma segunda etapa, foram acoplados a um aparelho manifold cartuchos poliméricos de fase reversa, Strata-X 200mg/3mL (Phenomenex®) previamente submetidos a um solvente de afinidade com a resina, para preparar a resina para a adsorção dos químicos presentes nas amostras das águas coletadas e, assim, permitir a adequada realização da extração de fase sólida.

2.2.2. Eluição dos cartuchos e obtenção dos extratos

Para a eluição, foram acoplados a um aparelho manifold cartuchos que adsorvem os compostos das amostras. Estes cartuchos foram então submetidos à bomba a vácuo, até que a resina presente neles estivesse totalmente seca. A seguir, os cartuchos foram submetidos à eluição em 10 mL de metanol. Este metanol, que contém então os compostos das amostras, foi colocado em um frasco de vidro de 10 mL para ser reduzido, em Nitrogênio gasoso ($N_{2(g)}$) para o volume de 1mL de extrato (extrato bruto).

Os extratos diluídos foram obtidos pela diluição de 50 μ L de extrato bruto em 50 mL de água (concentração de 0,001 do extrato bruto).

2.2.3. Análise de HPAs

Foi realizada a análise química com os extratos brutos, para a verificação da presença dos HPAs prioritários (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[123-cd]pireno, dibenzo[ah]antraceno, benzo[ghi]perileno). Esta análise foi feita pela empresa “Global Análise e Consultoria”, por meio do equipamento HPLC Agilent Technologies 1200 series, com detector de DAD.

2.2.4. Cultura de células

Para a realização dos ensaios de MN e cometa, as células HepG2 foram descongeladas e estabilizadas em meio MEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) e antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL), sendo mantidas em frascos de cultura descartáveis de 25 cm², em estufa incubadora a 37°C, com 5% de CO₂. Após a incubação, foram semeadas em frascos de cultura contendo meio MEM, 5x10⁵ células. Os frascos permaneceram em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ em atmosfera úmida, por um período de 24 horas para estabilização das células. Após este período, foram adicionados aos frascos de cultura os tratamentos realizados com os extratos brutos e diluídos, para a realização dos ensaios.

2.2.5. Tratamento

Os extratos obtidos na extração de fase sólida foram mantidos em geladeira, até 20 minutos antes do experimento. Quando atingiram a temperatura ambiente, foram utilizados nos experimentos (sempre em triplicata). Nossos ensaios foram desenvolvidos de duas maneiras: 1- células HepG2 expostas a 50 µL dos extratos brutos, durante 3 horas; 2- células expostas a 50 µL de extrato diluído, também por 3 horas. Os ensaios com os extratos brutos foram realizados para se avaliar a existência, nas águas dos rios, de alguns poluentes que tivessem qualquer potencialidade tóxica sobre as células. O segundo teste (com o extrato diluído), foi realizado na tentativa de

simular as concentrações reais dos poluentes encontrados nos rios, onde cada amostra foi coletada.

Para controle negativo (CN), tanto no ensaio do cometa quanto no teste do micronúcleo, foi utilizado o PBS (Solução de tampão de Fosfato) na quantidade de 50 μ L. Para o controle positivo (CP), foi usado Metilmetano Sulfonato (MMS) na concentração de 4×10^{-2} M, também quantidade de 50 μ L.

2.2.6. Ensaio com o Azul de Trypan

Previamente ao ensaio do cometa, foi realizado um teste de viabilidade celular com todas as amostras dos extratos (brutos e diluídos), para se avaliar a citotoxicidade das mesmas e para a obtenção de suspensões celulares que apresentem uma viabilidade celular superior a 80%. Um dos métodos utilizados para esta avaliação é o ensaio com Azul de Trypan, onde as células viáveis (vivas) não incorporam o corante, apresentando ausência de coloração, enquanto que as células inviáveis (mortas) incorporam o corante e apresentam a coloração azul.

Para a realização do ensaio de viabilidade celular, foram utilizados 5 μ L da suspensão celular mais 5 μ L de Azul de Trypan. A contagem das células foi realizada em uma lâmina de vidro comum, onde se quantificaram, percentualmente, as células vivas e as células mortas encontradas (RIBEIRO et al. 2003).

2.2.7. Ensaio do cometa em células HepG2

Após o tempo de exposição aos tratamentos (3 horas), foi realizada a coleta da suspensão celular. O meio de cultura foi descartado e os frascos lavados por 2 vezes com 5 mL de PBS. Após a retirada do excesso de PBS, as células foram tripsinizadas (Trypsina 0,5%) e levadas à estufa a 37°C por 5 minutos e inativadas com 5 mL de uma mistura de meio novo e soro. A suspensão celular foi passada por seringa de 1 mL, para obtenção de células individualizadas. A suspensão obtida foi transferida para tubos Falcon® e centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado, deixando-se 0,5 mL para a homegeinização do pellet.

Para o ensaio do cometa, lâminas previamente cobertas com agarose comum, receberam 20 μ L da suspensão celular + 120 μ L de agarose de baixo

ponto de fusão (37°C), sendo então recobertas com lamínula. Após um breve período de solidificação a 4°C (15 minutos), as lamínulas foram removidas e as lâminas incubadas em solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, ~8g de NaOH sólido para 1 L), pH 10, no escuro, em geladeira a 6°C, por, no mínimo, 1 hora. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese, contendo o tampão de corrida eletroforética (NaOH 300mM + EDTA 1mM, com pH>13), onde permaneceram por 20 minutos, para a denaturação do DNA. Na sequência, foi realizada a eletroforese por 20 minutos a 39 V (~ 0,8 V/cm) e 300 mA. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com 3 banhos de 5 minutos cada em tampão de neutralização (pH 7,2). Após a neutralização, as lâminas foram fixadas, por 10 min, em etanol absoluto. A coloração foi feita com 50 µL de solução de GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada) por lâmina e a análise realizada, imediatamente, após à sua coloração. Foram analisados em microscopia de epifluorescência Leica, objetiva de 40x, filtro B - 34 (excitação: $\lambda = 420 \text{ nm} - 490 \text{ nm}$, barreira: $\lambda = 520 \text{ nm}$) 100 nucleóides por lâmina, totalizando 600 nucleóides por tratamento. Os nucleóides foram classificados, visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos em: classe 0 – nucleóide sem danos, portanto sem cauda; classe 1: nucleóide com pouco dano - cauda menor que o seu diâmetro; classe 2: nucleóide com médio dano -cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes do seu diâmetro; classe 3: nucleóide com grande dano - cauda maior que 2 vezes o seu diâmetro (KOBAYASHI *et al.*, 1995; SPEIT *et al.*, 1996). Os escores foram obtidos multiplicando-se o número de nucleóides encontrados em cada classe pelo número da classe correspondente (0,1,2 ou 3), com valores variando de 0 (ausência total de danos) a 300 (dano máximo causado).

2.2.8. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese em células HepG2

Para a realização do teste do micronúcleo em células HepG2 foi utilizada a técnica descrita por Darroudi e Natarajan (1993), com algumas modificações, como segue: as células foram cultivadas por um ciclo celular

completo (24 horas), antes da adição dos tratamentos. Em seguida, foram realizados tratamentos simultâneos de 3 horas, com a adição de 50 µL dos diferentes extratos brutos e diluídos (três frascos para cada amostra).

Após os tratamentos, as células foram lavadas, por duas vezes, com PBS. Em seguida foram adicionados 5 mL de meio de cultura completo com 3 µg/mL de citocalasina B, permanecendo nos frascos por 28 horas. Decorrido este tempo, as células foram colhidas e fixadas em Carnoy (etanol/ácido acético 3:1 – v: v). A seguir, a suspensão celular foi gotejada sobre lâminas limpas, geladas e contendo um filme de água. Após secagem, as lâminas foram coradas, por 5 min, com Giemsa 5% . Depois de prontas, as lâminas foram analisadas em aumento de 100 x, sendo contabilizadas 1000 células por frasco, totalizando 3000 células por tratamento.

2.2.9. Análise estatística

Os resultados do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo foram submetidos ao teste estatístico ANOVA: critério/*Dunnnett* ($p < 0,05$), para comparação dos dados obtidos entre os tratamentos e o controle negativo.

3. Resultados e discussão

3.1. Análise de HPAs

Pela análise química, foi observado dentre todos os HPAs prioritários investigados, e, somente o naftaleno foi encontrado. Os resultados da quantificação dos HPAs presentes no extrato bruto estão apresentados na tabela 2.

Segundo a USEPA (United States Environmental Protection Agency), 16 HPAs são considerados essenciais, dentre eles, destaca-se o naftaleno. O naftaleno é um hidrocarboneto policíclico aromático formado por 10 carbonos e 8 hidrogênios, distribuídos em dois anéis aromáticos fundidos. Por possuir apenas 2 anéis, possui maior solubilidade em água (30 mg/L) e, por ter baixa massa molecular, possui maior volatilidade (NETTO et. al., 2000; VIJAYAVEL et al.; 2004). Este composto e seus derivados são os principais hidrocarbonetos presentes no petróleo bruto (UNEP, 1992). A maior solubilidade deste poluente é responsável pela sua maior toxicidade para

organismos aquáticos (YUNKER et al., 2002; DE LUCA et al., 2005; BOONYATUMANOND et al., 2006; CELINO;QUEIROZ,2006). Segundo Aína et. al. (2006), embora não existam muitas evidências da genotoxicidade para o naftaleno, os seus estudos apontaram para uma atividade genotóxica deste HPAs.

Mesmo diante da alta toxicidade do composto em ambientes aquáticos, a legislação brasileira não apresenta parâmetros para a presença de naftaleno em águas superficiais, mas sim para águas subterrâneas, solo e lodo. Nestes casos, de acordo com a resolução CONAMA 357/05, o valor aceitável para águas subterrâneas é de 140 µg/L e para solo e lodo é de até 0,12 mg/Kg.

Os maiores índices de naftaleno foram observados para as coletas realizadas em novembro de 2011, onde o maior valor foi observado para o Rio Piracicaba, seguido do próprio efluente da refinaria.

Nossos dados mostraram que deve existir alguma atividade antrópica que lançou efluentes com este composto no Rio Jaguari, a montante da captação da Replan; que as atividades da refinaria intensificaram as concentrações deste HPA pela ineficiência do tratamento realizado pela empresa; e que o Rio Piracicaba teve o maior comprometimento por este químico, possivelmente por consequência de um fator aditivo decorrente da presença deste hidrocarboneto nos Rios Jaguari e Atibaia.

Nos demais períodos avaliados, a presença de naftaleno não parece estar relacionada com as atividades da refinaria e sim de atividades desenvolvidas a montante da captação da empresa (Rio Jaguari) e a montante do despejo de seu efluente (Rio Atibaia).

3.2. Azul de Trypan

Neste estudo, foi observado que as células submetidas aos extratos (brutos e diluídos) de todas as coletas, submetidos ao teste com o Azul de Trypan, apresentaram valores de viabilidade celular acima de 80%, o que permitiu a continuidade do ensaio do cometa.

3.3. Ensaio do cometa

As avaliações feitas com extrato bruto das amostras de águas dos rios estudados neste trabalho indicaram potencial genotóxico para estes extratos.

Porém, quando se avaliou os extratos diluídos (simulação da concentração real nas águas coletadas), muitas vezes, não foi observada genotoxicidade nas células expostas (Tabela.3).

Os maiores valores de genotoxicidade foram registrados para o mês de novembro de 2011, corroborando com os valores do naftaleno que também se mostraram em altos níveis neste período (Tabelas 2 e 3). Os resultados de genotoxicidade deste período mostraram que a amostra do efluente teve os maiores níveis, indicando a existência de um potencial genotóxico para este ponto. Os resultados observados para as amostras dos rios (P1 e P3) podem ser decorrentes da alta pluviosidade no período (Tabela 1), que acarretou em um carreamento dos poluentes presentes nas margens, para o leito dos rios.

Gagné et al. (2011) também utilizaram extratos de águas coletadas no rio Athabasca, Canadá, rio este que sofre influência de areias betuminosas (areias com alto teor de HPAs). Neste estudo foi realizado um ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade com cultura primária de hepatócitos de truta arco íris, por meio de metodologia de precipitação alcalina modificada para ensaio de fluorescência, para quantificar quebras de fita simples e dupla do DNA. Os autores observaram altos índices de quebras do DNA, com uma indução significativa de danos para todos os pontos analisados ao longo do rio. Estes danos podem ter sido causados pelos HPAs, pois foi observado neste estudo que os extratos foram capazes de induzir a atividade da P4501A e GST, que são enzimas responsáveis pela biotransformação dos HPAs.

Em outro estudo de genotoxicidade com extratos de sedimentos de uma zona costeira da cidade de Qingdao na China, realizado por Yang et al. (2010) quantificaram os HPAs das amostras, e semelhante ao realizado no presente trabalho, aplicaram o teste do cometa para avaliação de genotoxicidade em células de cultura. Os autores utilizaram como material biológico de avaliação, células de brânquias (FG). Foi observado por eles que das 3 amostras, 2 delas continham HPAs de origem petrogênica e essas amostras apresentaram os maiores escores no teste de cometa ($154,00 \pm 9,6$).

Os resultados do teste do cometa realizado com o extrato diluído da coleta de novembro/2011 não mostraram diferenças estatisticamente significativas, como demonstradas na Tabela 3. Estes dados indicam que, neste período avaliado, tanto as águas dos rios estudados como do efluente

não apresentaram genotoxicidade para o material biológico usado na investigação. Como os extratos diluídos simulam as concentrações de poluentes das amostras, podemos inferir que os níveis de poluentes presentes nos rios, não são suficientes para induzir genotoxicidade para células HepG2.

A análise de genotoxicidade realizada com as amostras coletadas em março e maio de 2012 (extratos brutos) apresentaram resultados estatisticamente significativos para águas dos rios, mas não para o efluente da refinaria (Tabela 3). Estes dados mostram que nestes locais amostrados existia a presença de compostos potencialmente genotóxicos, comprovada pela análise química realizada, onde pode se observar a presença de naftaleno nestes pontos. Como estas amostras não têm relação com o efluente da empresa (montante da captação e do despejo do efluente), os resultados parecem não ter relação com as atividades da refinaria.

Para o mês de março de 2012, foi observado que os P3 e P4 apresentaram potencial genotóxicos, mostrando que o Rio Atibaia sofre impacto por contaminantes acima do local de recebimento do efluente da refinaria (Tabela 3). Esses impactos podem ser decorrentes de várias fontes, tais como, efluente urbano, efluente de outras indústrias ou ainda de atividade agrícola, que também são muito comuns na região. Já para as coletas realizadas em maio de 2012, pode-se observar que, neste período, apenas as amostras do rio Jaguari (P1) apresentaram atividade genotóxica, que também pode ser explicada por emissões diversas, como citados acima.

Os resultados obtidos corroboram com o estudo realizado por Sacchi et al. (2013), onde os pesquisadores avaliaram a genotoxicidade das águas da lagoa Sacca di Goro do Rio Pó na Itália, por meio de ensaio de anormalidades nucleares em células isoladas de brânquias de *Ruditapes philippinarum*. Nesse estudo, os autores também observaram influência da sazonalidade na indução de micronúcleos.

Os testes realizados com o extrato diluído de março/2012 demonstraram diminuição dos escores de genotoxicidade para todos os pontos coletados, porém mantendo a diferença estatisticamente significativa para P3 (montante do descarte do efluente) e P4 (Tabela. 3). Isto indica que os poluentes presentes na água do Rio Atibaia (nestes pontos citados), independente da sua concentração, podem induzir efeitos genotóxicos no

material biológico testado. Como o efluente não apresentou genotoxicidade significativa pode-se inferir que a genotoxicidade de P4 está mais relacionada à genotoxicidade de P3, porém com um impacto adicional promovido pelo efluente da refinaria.

Os extratos diluídos utilizados neste trabalho, obtidos das amostras de água coletadas em maio de 2012 apresentaram, como todos os outros períodos amostrados, uma grande diminuição nos escores (Tabela 3) e, conseqüentemente, resultados não significativos de genotoxicidade.

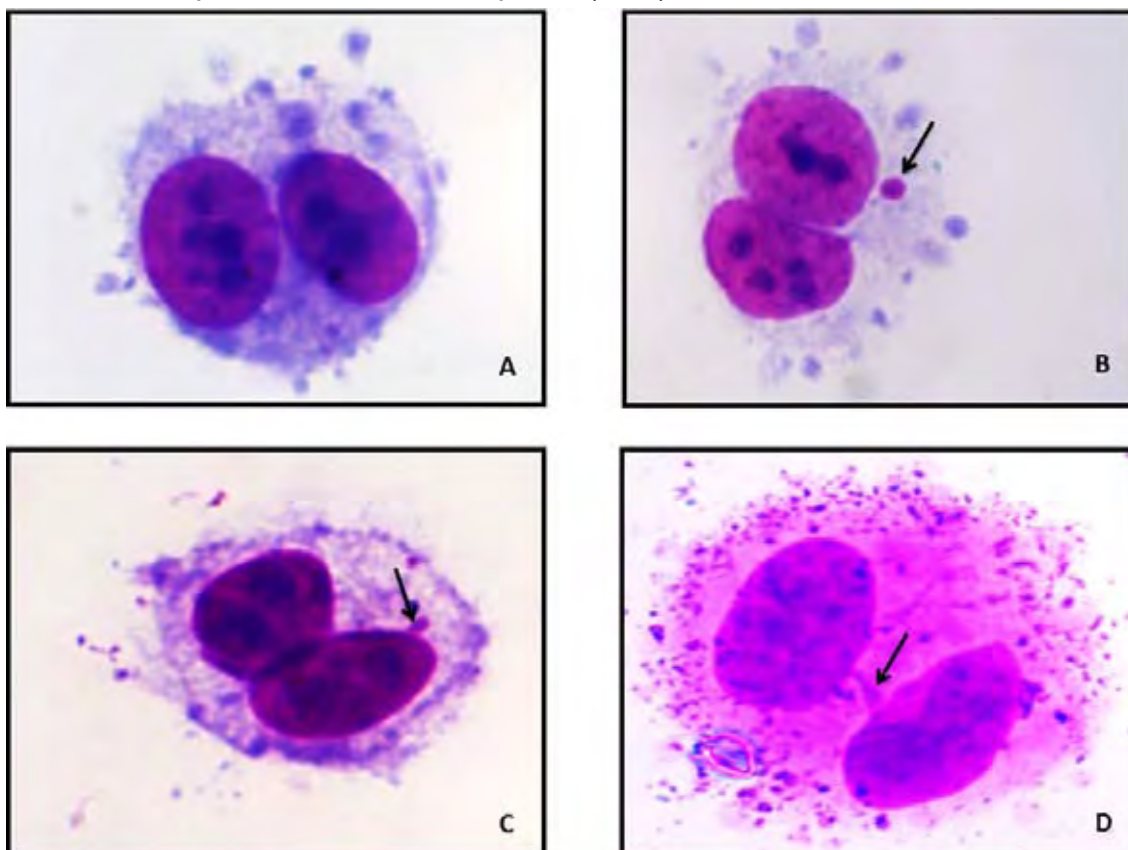
Vincente-Hubert et al. (2012) também utilizaram o teste do cometa em células HepG2, para avaliar a genotoxicidade de material particulado em suspensão e dos sedimentos do estuário do rio Sena, que sofre influência de várias atividades industriais, inclusive de uma refinaria de petróleo. Os autores observaram que 12 das 14 amostras estudadas induziram aumento de danos no DNA, quando comparadas com as células do controle negativo. Os autores correlacionaram a potencialidade genotóxica com a presença de HPAs nas amostras, visto que todas as amostras com potencialidade genotóxica também apresentaram níveis significativos de HPAs.

3.3.1. Testes de micronúcleo

A análise da mutagenicidade e genotoxicidade, por meio do teste de MN com bloqueio de citocinese, foi realizada com células HepG2 mantidas em cultura.

Foram contabilizadas as frequências de MN, de brotos e de ponte nucleoplásmicas, de acordo com classificação de Fenech et al. (2003), sendo MN considerado “endpoint” de mutagenicidade e brotos e pontes “endpoints” de genotoxicidade (Figura 2).

Figura 2. A. Célula HepG2 binucleada Normal; B. Célula HepG2 binucleada com micronúcleo (seta); C. Célula HepG2 binucleada com broto nuclear (seta); D. Célula HepG2 binucleada com ponte (seta).



Os resultados obtidos pela análise de MN, com os extratos brutos das amostras de águas coletadas em novembro de 2011, mostram indução de MN apenas para P4 ($2,56 \pm 1,37$), indicando que o rio já vem sofrendo agressões à montante do ponto de descarte do efluente da empresa que, somada aos efeitos do efluente da refinaria, levaram a uma ação mutagênica significativa para o extrato deste ponto.

As análises relativas à presença de células com brotos nucleares (efeito genotóxico), realizadas com o extrato bruto dos pontos de coleta dos rios, mostraram resultados estatisticamente significativos para P3, P4 e P5 (Tabela 4). A presença de genotoxicidade nos extratos dos rios Atibaia e

Piracicaba pode ser justificada pela presença de poluentes no rio Atibaia antes mesmo do lançamento do efluente da refinaria. A genotoxicidade aumentada, após o descarte da refinaria (P4), pode ter sido ocasionada pelo efeito aditivo entre os HPAs presentes no rio Atibaia e os contaminantes do efluente da refinaria. Contudo, pode-se observar que as águas do rio Piracicaba, apesar de também apresentarem efeitos genotóxicos, apresentam diminuição da genotoxicidade, quando comparado com P4 (Tabela 4). Estes dados estão em concordância com os resultados obtidos no ensaio do cometa. Com relação à presença de pontes, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os resultados das amostras e do CN.

Para o ensaio realizado com os extratos diluídos do período de novembro de 2011 (Tabela 4), não foi observado nenhum valor estatisticamente significativos de MN e anormalidades nucleares quando comparado com o CN. Esses dados corroboram os resultados encontrados por Hara (2012), em experimentos desenvolvidos com cultura de células em CHO-K1, para águas dos mesmos rios. A autora observou que as amostras do efluente bruto da refinaria (antes de passar pelo tratamento biológico), apresentam substâncias potencialmente genotóxicas e mutagênicas, mas que as amostras coletadas do efluente já tratado não apresentaram mais estes efeitos, indicando assim uma eficiência do tratamento realizado pela empresa.

A avaliação feita com os extratos brutos da coleta realizada em março/2012 evidenciou que o P2 foi o único que apresentou índices significativos de micronúcleos. Dentre as alterações observadas, os brotos nucleares foram os mais frequentes (Tabela 4). O P2 e P3 apresentaram altos índices de indução de brotos, com valores significativamente maiores que os resultados observados para a coleta anterior e para o CN (Tabela 4). Diante destes resultados, podemos inferir que a maior incidência de queimadas de cana-de-açúcar comuns para este período pode ter influenciado na concentração de HPAs nas águas, o que foi facilmente observado pelos testes realizados com o extrato bruto (concentração dos poluentes presentes nas amostras) Os contaminantes das amostras podem interferir na divisão celular, que, segundo Fenech e Crott (2002) acarretam em ampliações do DNA, e conseqüentemente maior indução de brotos ou em um maior índice de MN. Os autores ainda afirmam que essas alterações não são passíveis de serem

detectadas no ensaio do cometa, pois este detecta apenas danos de fita simples ou dupla, sítios álcali-labeis e crosslinks. Quanto à presença de pontes, não foram observadas diferenças significativas entre os pontos de coleta e o CN.

Travassos (1995) destaca que em um período de déficit hídrico, observado para a bacia do rio Caí de novembro a março, foi registrado uma maior concentração de poluentes do que o período de altos índices pluviométricos. Por outro lado, o autor ressalta que o excedente da água da chuva, poderia acarretar em um intenso escoamento, arrastando os poluentes das margens do rio ou ainda em uma ressuspensão de poluentes presentes nos sedimentos do leito do rio, aumentando a quantidade de partículas e poluentes disponíveis.

A análise do efeito do extrato diluído, para o mesmo período de março 2012, percebe-se um aumento considerável na quantidade de micronúcleos, apresentando diferenças estatisticamente significativas em P1, P2 e P4 (Tabela 4). O alto valor em P1 indica que o Rio Jaguari já apresenta comprometimento de suas águas. O P2 apresentou um valor aumentado de indução de MN, provavelmente devido ao efeito aditivo entre os poluentes do Rio Jaguari e os derivados das atividades da refinaria. Para o P4 foi observado índices de indução de MN equivalentes aos observados para o P1 (Tabela 4).

Em um estudo realizado com cultura de linfócito, para avaliação da qualidade das águas do rio Caí, rio este que tem a influência de um complexo de refinaria de petróleo do Rio Grande do Sul, Lemos e Erdtmann (2000) obtiveram resultados que demonstram uma correlação direta entre a indução de MN e a sazonalidade.

Na última estação avaliada neste trabalho, maio/2012, não foram observadas, para ensaios realizados tanto com o extrato bruto como o diluído, induções significativas de micronúcleos, brotos e de pontes, em relação ao CN. (Tabela 3). Provavelmente, esses resultados se devam ao início do período de seca, que diminui o carreamento de contaminantes das margens para o leito do rio. De acordo com Vega et. al. (1998) e Ferreira et al. (1994), vários fatores podem afetar o grau de poluição de um rio, como, por exemplo, as condições hidrológicas e climáticas dos ecossistemas. Segundo os autores, as variações sazonais são fatores que tem grande efeito sobre a concentração dos

poluentes no meio aquático. Desta forma, pode-se esperar o aumento ou diminuição dos danos causados pelos contaminantes, conforme essas variações.

Os dados aqui apresentados sugerem, assim como os de Hoshina et al. (2008) e Hara (2012), que o tratamento do efluente da refinaria tem reduzido a quantidade de resíduos lançados no rio, embora, em algumas estações do ano podemos observar que este tratamento não é eficiente para evitar o impacto que causam sobre o ambiente. De acordo com as análises realizadas, pode-se constatar, por meio dos ensaios realizados com o extrato bruto das amostras dos rios e do efluente da refinaria, que existem substâncias presentes nas amostras que apresentam tanto potencial genotóxico como mutagênico para águas de rios. Os extratos diluídos, que simulam as concentrações dos poluentes presentes nas amostras das águas dos rios e do efluente estudados neste trabalho, mostram que a concentração de poluentes nas amostras, muitas vezes, é insuficiente para induzir efeitos deletérios sobre o material genético das células testadas (HepG2).

Diante das evidências genotóxicas e mutagênicas encontradas neste trabalho, pode-se inferir que o naftaleno, conjuntamente com outros compostos eventualmente presentes nas águas dos rios e do efluente avaliados são capazes de induzir danos, mesmo quando em baixas concentrações. Também nota-se que a concentração dos contaminantes é um importante fator para a indução de danos, e que pode estar, inclusive relacionada com o volume de chuvas e as condições climáticas locais. Embora não haja parâmetros na legislação para a toxicidade do naftaleno em águas superficiais, há evidências de sua ação genotóxica e mutagênica. Em vista dos resultados encontrados, pode-se sugerir que seja feita uma avaliação mais minuciosa em recursos hídricos, que possam ser impactados pelo naftaleno, bem como realizar estudos que possam estabelecer limites seguros para a presença desse hidrocarboneto em recursos hídricos e, assim, assegurar a saúde do ambiental.

Tabela 2. Valores referentes às análises de HPAs, presentes nos extratos brutos.

P stra	Amo	Novembro 2011	Março 2012	Maio 2012
		Naftaleno (mg.L ⁻¹)	Naftaleno (mg.L ⁻¹)	Naftaleno (mg.L ⁻¹)
	P1	62,2	9,9	44,3
	P2	109,1	N.D.	N.D.
	P3	N.D.	21,7	26,0
	P4	63,1	20,7	52,8
	P5	111,5	20,6	37,2

Legenda: N.D. – Não Determinado; Valores obtidos por análise realizada pela empresa Global Análise e Consultoria.

Tabela 3. Classe de danos e escores observados para o teste do cometa, realizado com células HepG2, submetidas aos extratos brutos e diluídos de amostras de águas coletadas de rios que estão sob a influência de atividades da Replan. Período de novembro de 2011, março e maio de 2012.

Coleta	PC	Extrato Bruto						Extrato Diluído					
		Classes			Escore	Classe			Escore	Classe			
		0	1	2		3	0	1		2	3		
Nov. 2011	CN	97,66 ± 1,50	2,00 ± 0,51	0,33 ± 0,51	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,66 ± 1,86	99,16 ± 0,98	0,16 ± 0,40	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,00 ± 1,09	3,16 ± 3,12
	CP	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	300,00 ± 0,00*	300,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	300,00 ± 0,00*
	P1	75,16 ± 9,82	14,50 ± 7,44	6,00 ± 3,79	4,33 ± 1,03	39,50 ± 14,30*	39,50 ± 14,30*	98,50 ± 1,04	1,16 ± 0,98	0,33 ± 0,51	0,33 ± 0,51	0,00 ± 0,00	1,83 ± 1,32
	P2	74,83 ± 10,59	10,16 ± 2,78	6,00 ± 3,52	9,00 ± 6,09	49,16 ± 25,53*	49,16 ± 25,53*	98,33 ± 1,03	0,50 ± 0,83	0,66 ± 1,03	0,66 ± 1,03	0,50 ± 1,22	3,33 ± 3,20
	P3	87,00 ± 2,52	3,83 ± 2,92	3,16 ± 0,75	6,00 ± 2,28	28,16 ± 4,75*	28,16 ± 4,75*	98,16 ± 1,16	1,16 ± 1,32	0,50 ± 0,54	0,50 ± 0,54	0,50 ± 0,83	3,66 ± 2,42
Mar. 2012	P4	86,00 ± 6,19	8,66 ± 6,37	1,33 ± 1,36	4,00 ± 1,09	23,33 ± 5,20*	23,33 ± 5,20*	95,66 ± 2,33	2,50 ± 2,07	1,00 ± 1,54	1,00 ± 1,54	0,66 ± 0,81	6,50 ± 4,32
	P5	89,66 ± 3,72	4,00 ± 2,96	2,00 ± 1,41	4,33 ± 1,36	21,00 ± 6,54*	21,00 ± 6,54*	98,50 ± 1,22	1,00 ± 0,89	0,33 ± 0,51	0,33 ± 0,51	0,16 ± 0,40	2,16 ± 2,22
	CN	93,33 ± 2,58	2,16 ± 1,72	1,16 ± 0,98	1,33 ± 1,05	8,50 ± 4,08	8,50 ± 4,08	97,83 ± 1,72	1,16 ± 1,60	0,33 ± 0,81	0,33 ± 0,81	0,66 ± 0,51	3,83 ± 2,63
	CP	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	300,00 ± 0,00*	300,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	300,00 ± 0,00*
	P1	96,83 ± 2,48	1,16 ± 0,75	1,00 ± 1,54	1,00 ± 1,54	6,16 ± 5,74	6,16 ± 5,74	97,33 ± 1,03	0,66 ± 0,51	0,83 ± 0,98	0,83 ± 0,98	1,16 ± 0,98	5,83 ± 3,25
Maio 2012	P2	94,33 ± 4,13	4,16 ± 2,40	1,00 ± 1,54	2,52 ± 2,07	11,66 ± 8,14	11,66 ± 8,14	95,50 ± 2,66	0,83 ± 1,16	1,66 ± 1,50	1,66 ± 1,50	2,00 ± 1,41	10,16 ± 6,27
	P3	92,00 ± 2,52	1,33 ± 1,21	0,83 ± 0,75	5,83 ± 2,63	20,50 ± 7,50*	20,50 ± 7,50*	92,66 ± 4,27	1,66 ± 1,63	2,66 ± 1,86	2,66 ± 1,86	3,00 ± 1,89	16,00 ± 8,94*
	P4	93,33 ± 3,38	0,50 ± 0,83	0,83 ± 0,75	5,33 ± 2,50	18,16 ± 8,37*	18,16 ± 8,37*	90,66 ± 3,20	3,50 ± 2,42	2,16 ± 0,98	2,16 ± 0,98	3,66 ± 1,96	18,83 ± 6,27*
	P5	95,66 ± 1,50	1,50 ± 1,37	0,66 ± 0,81	2,16 ± 0,75	9,33 ± 1,96	9,33 ± 1,96	98,50 ± 1,97	1,33 ± 1,96	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,40	1,83 ± 2,22
	CN	95,00 ± 2,85	1,83 ± 0,75	1,83 ± 1,60	1,16 ± 1,32	9,00 ± 6,09	9,00 ± 6,09	97,83 ± 1,72	1,33 ± 1,36	0,16 ± 0,40	0,16 ± 0,40	0,66 ± 0,31	3,66 ± 2,80
Maio 2012	CP	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	300,00 ± 0,00*	300,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	300,00 ± 0,00*
	P1	90,16 ± 2,48	4,33 ± 1,63	3,16 ± 4,53	2,33 ± 1,50	17,66 ± 6,02*	17,66 ± 6,02*	97,16 ± 2,22	0,66 ± 0,51	1,16 ± 1,17	1,16 ± 1,17	1,00 ± 0,89	6,00 ± 4,97
	P2	83,83 ± 15,76	8,83 ± 11,44	4,83 ± 4,53	2,66 ± 3,38	26,50 ± 24,27	26,50 ± 24,27	97,00 ± 2,60	1,00 ± 1,26	1,16 ± 0,75	1,16 ± 0,75	0,83 ± 0,93	5,83 ± 4,91
	P3	94,00 ± 2,00	3,83 ± 0,98	1,50 ± 0,83	0,66 ± 0,10	8,83 ± 4,07	8,83 ± 4,07	97,66 ± 1,03	0,16 ± 0,40	0,83 ± 0,75	0,83 ± 0,75	1,33 ± 0,81	5,83 ± 2,31
	P4	86,50 ± 6,22	9,83 ± 4,70	2,66 ± 2,33	1,00 ± 1,26	18,16 ± 9,68	18,16 ± 9,68	95,50 ± 5,61	2,16 ± 3,92	1,00 ± 1,54	1,00 ± 1,54	1,33 ± 1,75	8,16 ± 8,77
P5	99,50 ± 0,83	0,50 ± 0,83	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,50 ± 0,83*	0,50 ± 0,83*	98,00 ± 3,03	0,66 ± 1,21	0,16 ± 1,60	0,16 ± 1,60	1,16 ± 1,60	4,50 ± 6,53	

Legenda: PC – Ponto de coleta; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo; *- estatisticamente significativos com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, p<0.05).

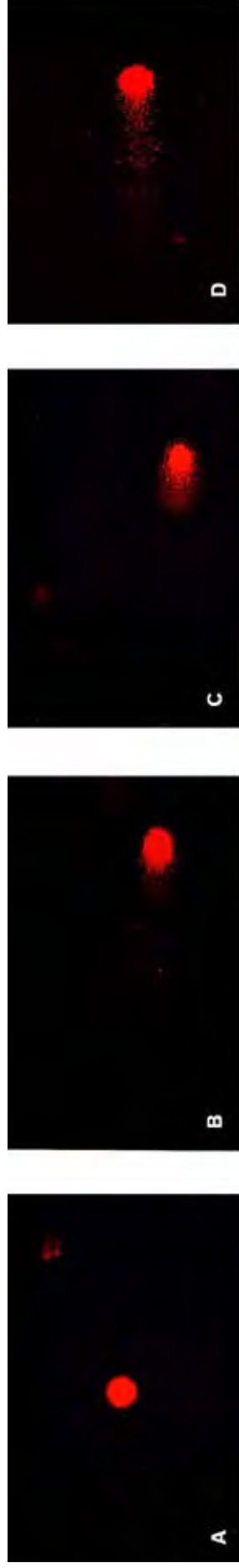


Figura 3. Caracterização das classes de danos observados para o ensaio do cometa em célula HepG2. A. Classe 0 - nucleóide apresentando nenhum dano. B. Classe 1 - nucleóide apresentando pouco dano. C. Classe 2 - nucleóide apresentando médio dano. D. Classe 3 - nucleóide apresentando muito dano.

Tabela 4. Frequência, valores médios e desvio padrão de micronúcleo (MN), broto nuclear e ponte nuclear em ensaios realizados com células HepG2, expostas a extratos brutos e diluídos de águas dos rios que estão sob a influência da Replan. Período de novembro de 2011, março e maio de 2012.

Coleta	PC	Extrato Bruto						Extrato Diluído								
		Micronúcleo			Broto Nuclear			Micronúcleo			Broto Nuclear			Ponte		
		Freq.	Média ± DP	Freq.	Média ± DP	Freq.	Média ± DP	Freq.	Média ± DP	Freq.	Média ± DP	Freq.	Média ± DP	Freq.	Média ± DP	
Nov. 2011	CN	2,5	0,83±0,11	2,3	0,76 ± 0,05	0,2	0,20 ± 0,00	7,0	23,34 ± 5,13	27,2	90,67 ± 25,36	0,8	2,67 ± 2,88			
	CP	8,7	2,90 ± 0,52*	22,8	7,6 ± 2,00*	1,7	0,56 ± 0,40	8,9	29,67 ± 13,20	29,4	98,00 ± 8,39	1,1	3,67 ± 2,08			
	P1	3,8	1,26 ± 0,40	2,3	1,63 ± 0,87	0,7	0,53 ± 0,47	10,1	33,67 ± 8,50	36,5	121,67 ± 30,24	0,8	2,67 ± 0,58			
	P2	4,6	1,53 ± 0,15	3,9	1,30 ± 0,40	1,6	0,53 ± 0,23	6,6	22,00 ± 3,60	20,1	67,00 ± 18,33	0,3	1,00 ± 1,00			
	P3	4,5	1,50 ± 0,43	19,4	6,46 ± 5,10*	0,9	0,30 ± 0,00	9,2	30,67 ± 10,67	17,1	57,00 ± 18,08	0,1	0,33 ± 0,57			
Mar. 2012	P4	7,7	2,56 ± 1,37*	31,4	10,46 ± 1,00*	2,5	0,83 ± 0,56	6,4	21,33 ± 2,08	16,7	55,67 ± 10,40	0,5	1,67 ± 0,57			
	P5	6,6	2,20 ± 0,95	20,9	6,96 ± 2,08*	2,2	0,73 ± 0,30	7,6	25,33 ± 10,02	20,1	67,00 ± 18,03	0,4	1,33 ± 1,53			
	CN	1,8	6,00 ± 1,73	20,9	69,66 ± 10,59	0,4	4,00 ± 1,00	6,3	21,00 ± 4,36	3,8	12,66 ± 1,53	0,8	2,66 ± 1,53			
	CP	7,3	24,33 ± 3,05*	92,4	266,00 ± 7,00*	2,9	9,66 ± 0,57	10,4	34,66 ± 2,08*	9,4	31,33 ± 11,01*	1,4	4,66 ± 1,15			
	P1	2,7	9,00 ± 8,71	45,5	147,33 ± 35,36	0,4	1,33 ± 2,30	8,9	29,67 ± 3,79*	6,5	21,66 ± 2,52	0,8	2,66 ± 0,57			
Maio 2012	P2	5,3	17,66 ± 5,03*	59,5	178,33 ± 62,22*	1,8	6,00 ± 5,96	10,8	36,00 ± 2,00*	7,0	23,34 ± 3,05	1,7	5,66 ± 0,58			
	P3	3,4	11,33 ± 3,78	79,8	308,00 ± 56,66*	1,3	4,33 ± 1,15	7,2	24,00 ± 1,74	6,3	21,00 ± 6,08	0,9	3,00 ± 1,73			
	P4	2,3	7,66 ± 2,08	44,2	147,33 ± 49,33	1,4	4,66 ± 3,78	8,4	28,00 ± 2,65*	7,8	26,00 ± 5,29*	0,7	2,33 ± 2,30			
	P5	2,8	9,33 ± 0,57	39,8	132,66 ± 33,24	1,8	6,00 ± 2,00	7,3	24,33 ± 3,22	6,3	21,00 ± 2,08	0,7	2,33 ± 0,57			
	CN	2,8	9,33 ± 1,15	14,2	47,33 ± 13,43	0,3	1,00 ± 1,00	1,0	4,33 ± 1,52	24,5	81,66 ± 20,59	0,8	2,66 ± 1,15			
	CP	6,1	20,33 ± 7,02*	41,4	138,00 ± 12,53*	0,9	3,00 ± 0,00	3,5	11,66 ± 4,50 *	50,5	168,33 ± 38,00*	1,5	5,00 ± 2,00			
	P1	3,2	10,66 ± 4,51	24,7	82,33 ± 11,24	0,3	1,00 ± 0,00	1,9	6,33 ± 2,08	22,2	74,33 ± 14,42	0,6	2,00 ± 1,00			
	P2	3,8	9,66 ± 4,04	18,8	62,66 ± 13,50	0,7	2,33 ± 1,53	1,4	4,66 ± 2,08	28,9	96,33 ± 27,42	0,7	2,33 ± 1,15			
	P3	1,9	6,33 ± 3,05	20,9	69,66 ± 8,08	0,5	1,66 ± 2,08	0,8	2,66 ± 2,08	20,0	66,66 ± 10,96	0,6	2,00 ± 1,00			
	P4	1,4	4,66 ± 1,53	24,0	80,00 ± 30,79	0,2	0,66 ± 1,15	2,6	8,66 ± 2,51	38,7	129,00 ± 44,22	1,4	4,66 ± 2,51			
P5	1,2	4,00 ± 0,00	20,2	67,33 ± 11,06	0,7	2,33 ± 1,53	1,3	4,33 ± 1,52	12,1	60,33 ± 7,02	0,3	4,33 ± 1,52				

Legenda: PC – Ponto de coleta; CN – Controle negativo; * - estatisticamente significativos com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, p<0.05).

4. Referências Bibliográficas

AINA, R.; PALIN, L.; CITTERIO, S. Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L. **Chemosphere**. v.65, p. 666–673, 2006.

ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, Amsterdam, 560, 57–67, 2004.

BARRIONUEVO, W. R ; LANÇAS, F.M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Quim. Nova**, v.24, p.172-175, 2001.

BARROSO, H.S. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) em organismos marinhos da Baía do Almirantado, Península Antártica. 2010. F. 160. Tese (Doutorado) Instituto oceanográfico da universidade de São Paulo. São Paulo.

BONASSI, S.; NERI, M.; LANDO, C.; CEPPI, M.; LIN, Y.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; FENECH, M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. **Mutation Research**, v. 543, p. 155-166, 2003.

BOONYATUMANOND, R.; WATTAYAKORN, G.; TOGO, A.; TAKADA, H. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 942-956, 2006.

CELINO, J. J.; QUEIROZ, A. F. S. Fonte e grau da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da baía de Todos os Santos, Bahia. **REM - Revista Escola de Minas**, v. 59, p. 265-270, 2006.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. 2005. **Resolução Conama 357**. Disponível em: < www.mma.conama.gov.br/conama > Acesso em 27/02/2013.

COONEY, J. D. Freshwater tests. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. Washington, D. C., Taylor & Francis, 2ª Ed., p. 71-102, 1995.

DE LUCA, G.; FURESI, A.; MICERA, G.; PANZANELLI, A.; PIU, P. C.; PILO, M. I.; SPANO, N.; SANNA, G. Nature, distribution and origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments of Olbia harbor (Northern Sardinia, Italy). **Marine Pollution Bulletin**. v.50, p.1223–1232, 2005.

DEGUCHI, Y.; TOYOIZUMI, T.; MASUDA, S.; YASUHARA, A.; MOHRI, S.; YAMADAB, M. INOUE, Y.; KINAE, N. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. **Mutation Research**. v.627, p.178–185, 2007.

DOWLING, K.; MOTHERSILL, C. The further development of rainbow trout primary epithelial cell cultures as a diagnostic tool in ecotoxicology risk assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 53, p. 279-89, 2001.

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

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65-75, 2003.

FENECH, M.; CROTT, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 504, 131-136, 2002.

FERRAZ, E.S.B.; MARTINELLI, L.A.; VICTÓRIA, R.L. Coletânea do “notícia PiraCena” : a bacia do rio Piracicaba. Piracicaba: C.N. 2001.178 p.

FERREIRA, C. J. A.; SORIANO, B. M. A.; GALDINO, S.; HAMILTON, S. K. Anthropogenic factors affecting waters of the Pantanal wetland and associated rivers in the upper Paraguay river basin of Brazil. **Revista Limnológica Brasiliensis**, v. 5, p. 135-148, 1994.

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

GAGNÉ, F.; ANDRÉ, C.; DOUVILLE, M.; TALBOT, A.; PARROTT, J.; McMASTER, M.; HEWITT, M. An examination of the toxic properties of water extracts in the vicinity of an oil sand extraction site. **Journal of the environmental monitoring**, v.13, p. 3075–3086, 2011.

HARA, R. V.; Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade das águas dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba, na região de influência da refinaria de Paulínia – SP. 2012. F. 170. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – SP.

HOSHINA, M. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutation Research**, v.656, p.44–48, 2008.

KLOBUCAR, G. I. V.; PAVLICA, M.; ERBEN, R.; PAPES, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic Toxicology**, v.64, p.15-23, 2003.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v.402, p. 185-202, 1998.

KUBISCH, R.; BOHRN, N.; FLEISCHER, M.; STÜTZ, E. Cell-Based Sensor System Using L6 Cells for Broad Band Continuous Pollutant Monitoring in Aquatic Environments. **Sensors**, v.12, p. 3370-3393, 2012.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research**, v.650, p.80–86, 2008.

LEMOS, C.T.; ERDTMANN, B. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. **Mutation Research**, v. 467, p. 1–9, 2000.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C., MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**. v.29, p.148-158, 2006.

MEYBECK, M.; HELMER R. (1992). An introduction to water quality. In CHAPMAN, D. (1992) Water quality assessment. Cambridge, University Press. 585p.

NATARAJAN, A.T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v. 5, p. 399-403, 1991.

NEFF, J.N. Polycyclic aromatic hidrocarbons in aquatic environment: sources, fate an biological effects. **Applied Science**. Essex, Engrand, 1979.

NETTO, A. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. P.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): Uma revisão metodológica. **Química Nova**, v.23, p.765-773, 2000.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 123, p. 291–298, 1978.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Jornal of Laboratory Clinical Medicine**, v.70, p. 58-169, 1967.

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I.; MOJAS, N.; ERBEN, R.; PAPES, D. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research**, v.490, p.209–214, 2001.

RABELLO-GAY, M. N. Testes com organismos superiores. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e critérios de avaliação**, Ribeirão Preto – SP. Sociedade Brasileira de Genética, p. 59-75.1991.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; McCARTY, L.S. *Introduction to Aquatic Toxicology*. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. Washington, D. C., Taylor & Francis, 2^oEd, p.3-67, 1995.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E.K. M. **Mutagênese Ambiental**. p. 215. Editora da ULBRA, 2003.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SACCHI, A.; MOUNEYRAC, C.; BOLOGNESI, C.; SCIUTTO, A.; ROGGIERI, P.; FUSI, M.; BEONE, G.M.; CAPRI, E. Biomonitoring study of an estuarine coastal

ecosystem, the Sacca di Goro lagoon, using *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). **Environmental Pollution**. v.177, p.82-89, 2013.

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

SPEIT, G.; VASQUEZ, M.; Hartmann, A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutation Research**, v.681, p.3-12, 2009.

SQUADRONE, S., PREARO, M, BRIZIO, P. GAVINELLI, S. PELLEGRINO, M., SCANZIO, T., GUARISE, S., BENEDETO, A., ABETE, M. C. Heavy metals distribution in muscle, liver, kidney and gill of European catfish (*Silurus glanis*) from Italian Rivers. **Chemosphere** (2012),

STEPNOWSKI ,P.; SIEDLECKA,E.M.; BEHREND, P.; JASTORFF,B. Enhanced photo-degradation of contaminants in petroleum refinery waste water. **Water Research**, v.36, p. 2167- 2172,2002.

TRAVASSOS, M.P.; Gestão em poluição ambiental: caso da poluição por metais pesados no rio Caí- RS. 1994.Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense, Niterói –RJ.

TUNDISI, J.G. Reservatórios como sistemas complexos: Teoria, aplicações perspectivas para usos múltiplos. *In* Ecologia de reservatórios: estrutura, funções e aspectos sociais (R. Henry, ed.). Fundbio / Fapesp, Botucatu / São Paulo, p.19-38, 1999.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 441, p. 215-224,1999.

UNEP - Urban Air Pollution in Megacities of the World. **World Health Organization, United Nations Environment Programme**, Blackwell, Oxford 1992

UNITED STATES ENVIRONMENTAL AGENCY (USEPA). Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria–Nonylphenol. Disponível em: <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/aqlife/pollutants/nonylphenol/index.cfm>

VEGA, M.; PARDO, R.; BARRADO, E.; DEBÁN, L. Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. **Water Research**, Amsterdam, v. 32, n. 12, 3581-3592, 1998.

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

VINCENT- HUBERT, F.; HEAS – MOISAN, K.; MUNSCHY,C.; TRONCZYNSKI,J. Mutagenicity and genotoxicity of suspended particulate matter in the Seine river estuary. **Mutation Research**, v. 741, p. 7-12, 2012.

WAKE,H. Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment. **Estuarine, Coastal And Shelf Science**, v.62 , p. 131- 140, 2005.

YANG, F.; ZHANG, Q.; GUO, H.; ZHANG, S. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and teratogenicity of marine sediments from Qingdao coastal areas using in vitro fish cell assay, comet assay and zebrafish embryo test. **Toxicology in Vitro**. V.24, p.2003–2011, 2010.

YUNKER, M. B.; MACDONALD, R. W.; VINGARZAN, R.; MITCHELL, H.; GOYETTE, D.; SYLVESTRE, S., PAHs in the Fraser river basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. **Organic Geochemistry**. v. 33, p. 489-515, 2002.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Programme on Chemical Safety – IPCS. **Selected petroleum products**, Geneva, (Environmental Health Criteria, v.20, 1982.

6 Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo, tanto para o artigo de revisão como para as experimentos realizados com amostras das águas dos Rios Jaguari, Atibaia, Piracicaba, bem como dos efluentes gerados pela refinaria de Paulínia-SP, por meio dos ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, realizados com as células HepG2 permitem inferir que:

- Os HPAs são compostos com atividades estrogênicas, embora poucos estudos tenham sido desenvolvidos com estes compostos;

- pela análise química utilizada pode-se comprovar a eficiência do método de EFS em isolar HPAs;

- a análise química de HPAs permitiu verificar a presença de HPAs prioritários nas amostras, porém apenas do naftaleno foi encontrado em quantidades consideráveis.

- a coleta de novembro de 2011 apresentou a maior presença de naftaleno, dentre todas as coletas realizadas;

- o sistema teste utilizado neste estudo foi a célula de hepatoma humano mantida em cultura (HepG2), e se mostrou indicado para a essa avaliação pois é um sistema de fácil manipulação e sensível aos testes de genotoxicidade e mutagenicidade realizados;

- o teste do cometa realizado em células HepG2 foi eficiente em detectar danos genotóxico nos ensaios realizados, sendo que demonstrou maior efeito genotóxico nos testes realizados com a coleta de novembro de 2011. Este ensaio tem respondido, de forma eficiente, para diagnóstico de comprometimento ambiental, sendo, por isso, considerado uma ferramenta adequada para se avaliar impactos ambientais;

- o teste de anormalidades nucleares, realizado em células HepG2, apresentou alta sensibilidade para determinar efeito genotóxico e os resultados obtidos neste teste, corroboraram com os resultados do teste do cometa;

- o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese, realizado com células HepG2 mantidas em cultura, representa um ensaio fácil e sensível para avaliação da mutagenicidade de amostras ambientais.

- o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese, em células HepG2, foi sensível para avaliar os efeitos da exposição ao extrato bruto e diluído das

amostras, indicando que o naftaleno contido nas amostras apresentou potencial mutagênico para, pelo menos, um ponto em cada coleta realizada;

- as avaliações dos danos genotóxico e mutagênicos demonstraram tanto efeito sinérgico como aditivo do naftaleno e outros contaminantes presentes nas amostras;

- as avaliações realizadas com as amostras coletadas no rio Piracicaba e no ponto a jusante do descarte do efluente da refinaria demonstraram o aumento do comprometimento das águas com a associação dos contaminantes presentes nas águas do rio Atibaia e os contaminantes adicionados pelo descarte do efluente da refinaria.

7 Referências Bibliográficas

ALEXANDRE , M. R., LIMA, M.B.; FEITOSA, E. A.; EMÍDIO, E. S.; DÓREA, H. S. Distribution and sources of aliphatic hydrocarbons in surface sediments of Sergipe River estuarine system. **Marine Pollution Bulletin**. v.64, p.1721–1725, 2012.

AL-SABTI K.; METCALFE C. D.; Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, Amsterdam, v.343, n.2-3, p.121-135, 1995.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, F. 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, p. 177–186, 2000.

AVCI, A.; KAÇMAZ, M.; DURAK, I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to petroleum refinery industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, p.101-105, 2005.

AZQUETA, A.; GUTZKOW ,K.B.; PRIESTLEY, C.C; MEIER,S.; WALKER, J.S.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A.R. A comparative performance test of standard, medium- and high-throughput comet assays. **Toxicology in Vitro**. V. 27, p.768–773, 2013.

BARBEE,G.C.;BARICHB, J.;DUNCANB, B.; BICKHAMC, J.W.;MATSONC, C.W. HINTZED, C. J.; AUTENRIETHE, R.L.; ZHOUF, G.; MCDONALDF, T.J.;CIZMASF, L.;NORTONG,D.; DONNELLY, K.C. In situ biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Ecotoxicology and Environmental Safety** , v.71, p.454–464, 2008.

BAIRD, C. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Environmental Chemistry, W. H. Freeman and Company, New York, 1995.

BARSIENE, J.; DEDONYT, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKENAITĖ, L., ANDERSEN, O.K. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquatic Toxicology**. v.78S p.S99–S104, 2006.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**. V.415, p. 167–184, 1998.

BERTHELOT-RICOU, A.; PERRIN, J. ; DI GIORGIO, C.; DE MEO, M.; BOTTA, A.; COURBIERE, B. Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells. **Fertility and Sterility**. v.95, p. 1452-1457, 2011.

BLUMER, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in nature. **Science Americam**. v. 234 p.34–45, 1976.

BOETTCHER, M.; GRUND, S.; KEITER, S.; KOSMEHL, T.; REIFFERSCHIED, G.; SEITZ, N.; ROCHA, P.S.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research**. v.700, p.11–17, 2010.

BOLOGNESI, C., BUSCHINI, A., BRANCHI, E., CARBONI, P., FURLINI, M., MARTINO, A., MONTEVERDEA, M.; POLI, P., ROSSI, C. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. **Science of the total environment**, Amsterdam, 333, 127-136, 2004.

ÇAVAS, T.; ÇINKILIÇ, N.; VATAN, O.; YILMAZ, D.; COSKUN, M. In vitro genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and cH2AX foci assays. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. V.104, p.212–217, 2012.

CETESB-COMPANHIA, DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO. "AMBIENTAL. Manual de gerenciamento de áreas contaminadas." *CETESB. In: SERPA, EL & MARKER, A.(Coords.), 2a. ed. São Paulo (2001).*

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. 2005. **Resolução Conama nº 357**. Disponível em:< www.mma.conama.gov.br/conama> Acesso em 27/02/2013.

DASGUPTA, S., LUCAS, R.E.B., WHEELER, D. Small Plants, Pollution and Poverty: New Evidence from Brazil and Mexico. World Bank Policy Research Department Working Paper, November, 1998.

DEGUCHI, Y.; TOYOIZUMI, T.; MASUDA, S.; YASUHARA, A.; MOHRI, S.; YAMADAB, M. INOUE, Y; KINAE, N. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. **Mutation Research**. v.627, p.178–185, 2007.

DING, Y. S.; ASHLEY, D.L. WATSON, C. H. Determination of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from domestic cigarettes. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 471-478, 2005.

DIPAOLLO, C. Aplicação do ensaio do cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey,1860), exposto à β - naftoflavona. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

DONMEZ-ALTUNTAS, H.; BITGEN, N. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the general population in Turkey by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Mutation Research**. v.748, p.1– 7, 2012.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; ÇELIK, A.; KÖLELI, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotóxico damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**. v.16,p.385–391, 2007.

FELLENBERG, G.; **Introdução aos Problemas da Poluição Ambiental**, Ed. Pedagógica e Universitária Ltda: São Paulo, 1980.

FINLAYSON-PITTS, B. J.; PITTS JR, J. N.. Tropospheric Air Pollution: Ozone, Airborne Toxics, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, and Particles. **Science**, v. 276, p. 1045-1052, 1997.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**. v.392, p. 11–18,1997.

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

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65-75, 2003.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**.v.2, p.1084-1104, 2007.

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

FONTENELE, E. G. P. ; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A.R.P.; JÚNIOR, R. M. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.54, p.6-16, 2010.

HARA, R. V.; Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade das águas dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba, na região de influência da refinaria de Paulínia – SP. 2012. F. 170. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – SP.

HASPLOVA, K.; HUDECOVA ,A. MAGDOLENOVA, Z.; BJORAS ,M.; GALOVA, E.; MIADOKOVA, E.; DUSINSKA, M. DNA alkylation lesions and their repair in human cells: Modification of the comet assay with 3-methyladenine DNA glycosylase (AlkD). **Toxicology Letters.** v.208 p.76–81, 2012.

HE, J.L.; CHEN, W.L.; JIN, L.F.; JIN, H.Y. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. **Mutation Research.** V.469, p.223–231,2000.

HOSHINA, M. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutation Research**, v.656, p.44–48, 2008.

JIANG, L.; CAO, J.; AN, Y.; GENG, C.; QU, S.; JIANG, L.; ZHONG, L. Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v.21, n.8, p. 1486 - 1492, 2007.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL,R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.;UHL, M.;MERSCH-SUNDERMANN, V.;WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.;NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v.402, p. 185-202, 1998.

KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN , V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B. J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology.** v.198, p.315–328,2004.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research**, v.650, p.80–86, 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A.; *Allium cepa* Test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mut. Res.**, v.682, p.71-81, 2009.

LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W. G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**. v.48, p.46–53,2009.

LIMA, F. M. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em material particulado atmosférico na região central de Niterói-RJ. 2006. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ.

LOPES, W. A. ; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na atmosfera. *Química Nova*. V. 19, p. 497-516, 1996.

MAIOLI, O. L. G; RODRIGUES, K. C.; KNOPPERS, B. A.; AZEVEDO, D. A. Distribution and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments from Two Brazilian Estuarine Systems. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 8, p.1543-1551, 2010.

MARIN-MORALES, M. A. Mutagênese Ambiental (revisão crítica da produção científica). 2009. Tese (Livre docência) – Universidade Estadual Paulista , Rio Claro – SP.

MAZZEO, D. E. C. Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxico e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microorganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista , Rio Claro – SP.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 4334–4340, 2010.

MOORE, P. D.; YEDJOU, C.G.; TCHOUNWOU, P. B. Malathion-Induced Oxidative Stress, Cytotoxicity, and Genotoxicity in Human Liver Carcinoma (HepG2) Cells. **Environmental Toxicology**, v.25, p. 221 – 226, 2009.

MORITA, D. M.; Prevenção e controle da poluição da água e do solo causada por resíduos industriais perigosos. 2010. Tese (Livre docência) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

NASS, D.P. O conceito de Poluição. **Revista Eletrônica de Ciências. São Carlos: Universidade de São Paulo/Instituto de Química**, n. 13, 2002.

NAKAGAWA, L. E. Alteração de característica do solo para remoção hexaclorobenzeno de água contaminada. 2003. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

OHE, T. WATANABE, T. WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**. v.567, p.109–149,2004.

OLIVEIRA, G. A. R. Comparação da eficiência do tratamento por fotoeletrocatalise em relação à coloração química convencional na redução da mutagenicidade de azo corantes empregando o ensaio de micronúcleos. 2010. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto-SP.

OLIVEIRA, R. C. S. Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em célula tumoral HepG2. 2012. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 123, p. 291–298, 1978.

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I.; MOJAS, N.; ERBEN, R.; PAPES, D. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research**, v.490, p.209–214, 2001.

PEREIRA NETTO, A.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. P.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): Uma revisão metodológica. **Química Nova**, v.23, p.765-773, 2000.

PERERA, F. P. Environment and Cancer: Who Are Susceptible? **Science**, v. 278, p.1068-1073, 1997.

RAMDINE, G.; FICHET, D.; LOUIS, M.; LEMOINE, S. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment and oysters (Crassostrearearhizophorae) from mangrove of Guadeloupe: Levels, bioavailability, and effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v.79, p. 80–89.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SÁNCHEZ-GUERRA, M.; PELALLO-MARTÍNEZ, N.; DÍAZ-BARRIGA, F.; ROTHENBERG, S.J.; HERNÁNDEZ-CADENA, L.; FAUGERON, S.; OROPEZA-HERNÁNDEZ, L.F.; GUADERRAMA-DÍAZ, M.; QUINTANILLA-VEGA, B. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA damage in Mexican children. **Mutation Research** , v.742, p.66– 71, 2012.

SANTOS,C. PREVENÇÃO À POLUIÇÃO INDUSTRIAL: IDENTIFICAÇÃO DE OPORTUNIDADES, ANÁLISE DOS BENEFÍCIOS E BARREIRAS. 2005. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. Em: Chemical Mutagens. Plenum Press. New York, v. 4, p. 31-53, 1976.

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

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

SPEIT, G.; VASQUEZ, M.; Hartmann, A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutation Research**, v.681, p.3-12, 2009.

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M.S.; KNASMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G.A.; RIBEIRO, L.R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**. V.21, p.1650–1655, 2007.

TILMANT, K.; GERETS, H.H.J.; DE RON, P.; COSSU-LEGUILLE, C.; VASSEUR, P.; DHALLUIN, S.; ATIENZAR, F.A. The automated micronucleus assay for early

assessment of genotoxicity in drug discovery. **Mutation Research**. v.751, p.1– 11, 2013.

TUVIKENE, A. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs). **Ann. Zool. Fennici**. V.32, p.295 – 309, 1995.

VALENTIN-SEVERIN, I.;HEGARAT, L.L. ;LHUGUENOT,J.C.; BON, A.M.L.; CHAGNON, M.C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**. v.536, p. 79 – 90, 2003.

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

VINCENT- HUBERT, F.; HEAS – MOISAN, K.; MUNSCHY,C.; TRONCZYNSKI,J. Mutagenicity and genotoxicity of suspended particulate matter in the Seine river estuary. **Mutation Research**, v. 741, p. 7-12, 2012.

WAKE,H. Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment. **Estuarine, Coastal And Shelf Science**, v.62 , p. 131- 140, 2005.

ZANDER, M.. Polycyclic Aromatic and heteroaromatic hydrocarbons. **The Handbook of Environmental Chemistry**, v.3, p.109-131, 1980.