



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



---

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

---

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DE ÁGUAS E  
SEDIMENTOS DO RIO GUAECÁ, SÃO SEBASTIÃO – SP, APÓS IMPACTO  
DE VAZAMENTO DE OLEODUTO DA REGIÃO**

**DANIELA MORAIS LEME**

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

**Março - 2007**



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E  
MUTAGÊNICO DE ÁGUAS E SEDIMENTOS DO RIO  
GUAECÁ, SÃO SEBASTIÃO – SP, APÓS IMPACTO DE  
OLEODUTO DA REGIÃO**

**DANIELA MORAIS LEME**

**Orientador: Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN-MORALES**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Estadual  
Paulista “Julio de Mesquita Filho”,  
Campus de Rio Claro, para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências Biológicas  
(Área de Concentração: Biologia Celular e  
Molecular).**

**Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Março de 2007**

574.5263 Leme, Daniela Morais

L551a Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de águas e sedimentos do rio Guaecá, São Sebastião – SP, após impacto de vazamento de oleoduto da região / Daniela Morais Leme. – Rio Claro : [s.n.], 2006  
156 f. : il., tabs., fots., mapas

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Maria Aparecida Marin-Morales

1. Ecologia aquática. 2. Teste de aberrações cromossômicas. 3. Teste do micronúcleo. 4. Ensaio do cometa. 5. Allium cepa. 6. Oreochromis niloticus. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

**Pelo amor, incentivo, suporte e confiança...**  
**Com todo amor, aos meus pais, Ivani e José**  
**Celso, dedico este trabalho.**

**À Luciana, minha querida irmã, e a Irani,  
minha querida avó, pelo amor e motivação.**

**Ao Fred, meu querido namorado e fiel  
companheiro, pelo carinho, amparo e toda  
ajuda conferida especialmente neste  
trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Marina não apenas pela valiosa orientação, apoio e confiança, mas também pela amizade e ensinamentos, que me fizeram crescer tanto na vida profissional como pessoal.

À Prof.a. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis pelas sugestões, incentivo e suporte financeiro que tem dado às pesquisas na área da genética toxicológica.

Ao Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo e Gás – PRH-05 – ANP/MCT pela concessão de bolsa e pelo suporte financeiro.

Ao Prof. Dr. Dimas Dias Brito por toda dedicação e ótima coordenação do PRH-05, o que proporciona o excelente desenvolvimento profissional dos membros deste programa.

Ao Zé Maria, por estar sempre pronto a ajudar e, por ser esta pessoa calma que poucos conseguem ser, tornar as coisas mais fáceis.

Aos professores do Departamento, principalmente a minha ex-orientadora, Prof.a. Dra. Sanae Kasahara, por todos os ensinamentos profissionais.

Ao Dr. João Carlos C. Milanelli pela colaboração prestada durante as coletas realizadas.

Ao Instituto Florestal (IF) pela colaboração prestada durante as coletas realizadas.

Ao Marcelo, guarda-parque do IF, pela árdua tarefa de me acompanhar nas coletas e carregar o galão de 20L de água.

Ao Centro de Biologia Marinha (CEBI Mar), Universidade de São Paulo (USP), pelo fornecimento dos dados meteorológicos referentes aos períodos de coleta das amostras no rio Guaecá e Ribeirão SABESP.

Ao Prof. Dr. Antônio Fernando Monteiro Camargo e ao Carlos, técnico do laboratório de Ecologia, pela ajuda na análise dos parâmetros físico-químicos das amostras de águas coletadas no rio Guaecá e Ribeirão SABESP.

À Cristiane Mileo pela ajuda na confecção das pranchas.

À Rogilene, técnica do laboratório de citogenética, pela ajuda prestada a este trabalho e pelas inúmeras risadas.

Ao Zito por toda ajuda na manutenção das tilápias.

Aos colegas do PRH-05, Fabiana, Thaís, Marcela, Acácio, Ricardo, Paulo, Soráia, Adriano, Renata, Camila, Fábio e Miguel.

Aos amigos e colegas de departamento: Reinaldo, Gal, Tiago, Marielle, Douglas, Tati, Zé, Fred, Bixão, Izabela, Cíntia, Rogi, Murillo, Antônio e Jaú.

Aos marinzetes, Rê Caritá, Jana, Jaque, Márcia, Thaís, Bruna, Du, Matheus e Dânia, não sei quem agradecer mais pela ajuda a este trabalho e também pelos momentos divertidos no laboratório.

À Jaque por cada dia mais se tornar uma grande amiga.

Ao Reinaldo, Bombeiro, Prof.ª Sanae e Prof.ª Patrícia por todos os jantares divertidíssimos.

À Aline e Betina, minhas companheiras de casa nestes dois anos de mestrado, pela paciência em ouvir meus problemas e pelos inúmeros conselhos.

Aos meus amigos e agregados da turma bio 2001, aos que ficaram em Rio Claro (Renatinha, Rô, Gi e Itú) pelos divertidas saídas e pelo apoio ao meu trabalho e aos que não estão mais aqui (Alê, Bê, Babi, Fê, Zé, Flor, Kelly e Kátia), mas que apesar da distância estão sempre presentes.

À minhas amigas de Campinas, Gabi, Mari e Rê, mesmo que distantes amigas como vocês são raras hoje em dia.

À Marlene, Nicole e Carol por serem sempre tão atenciosas comigo.

A toda minha família pelo amor e carinho.

À minha irmã Luciana, apesar de ser uma pessoa mal humorada às vezes, agradeço por ser uma pessoa muito especial que sempre poderei contar nos momentos difíceis.

À minha querida avó Irani por todo amor e carinho.

Ao Fred, meu amado namorado, pela sinceridade, amizade, companheirismo e toda ajuda na minha vida profissional.

A Buchecha, a cachorra mais fofa e companheira nestes últimos 4 anos.

Aos meus amados pais, Ivani e José Celso, por todos os ensinamentos e lições de vida, pelo amor e carinho e, principalmente, por sempre estar em ao meu lado me fazendo a pessoa mais feliz deste mundo.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram na realização deste trabalho e, caso tenha esquecido de alguém, por favor, me desculpe, não foi por mal.



## ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL E RELEVANCIA DO TEMA .....	01
2.OBJETIVOS .....	05
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	07
3.1. Caracterização da área de estudo .....	07
3.2. Caracterização do petróleo .....	16
3.3. Genética toxicológica e o biomonitoramento ambiental .....	24
3.4. Utilização do sistema-teste de <i>Allium cepa</i> para monitoramento de poluentes ambientais .....	29
3.5. Sistema-teste de peixes e considerações sobre a espécie de <i>Oreochromis niloticus</i> .....	34
3.6. Teste de aberrações cromossômicas .....	36
3.7. Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares ....	38
3.8. Ensaio do cometa .....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	58
5.1. Análise dos parâmetros físico-químicos .....	58
5.2. Análise química de inorgânicos .....	62
5.3. Análise química de hidrocarbonetos .....	66
5.4. Sistema-teste de <i>Oreochromis niloticus</i> .....	68
5.5. Análise de sedimentos pelo sistema-teste de <i>Allium cepa</i> .....	75
6. ARTIGO 1 .....	78
Freqüências de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células radiculares de <i>Allium cepa</i> expostas à águas impactadas por petróleo - um estudo de caso	

7. ARTIGO 2 .....	104
Mecanismos de Ação de Hidrocarbonetos de Petróleo sob o material genético de Células Meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	
8. CONCLUSÕES GERAIS .....	131
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	133

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	
<b>FIGURA 1</b> - Imagem aérea da Bacia de Guaecá .....	13
<b>FIGURA 2</b> - Aspecto Fisiográfico do rio Guaecá .....	14
<b>FIGURA 3</b> - Acidente do oleoduto OSBAT no rio Guaecá .....	15
<b>FIGURA 4</b> - Isômeros do Butano .....	17
<b>FIGURA 5</b> - Fórmula Molecular: Ciclopentano e Ciclohexano .....	17
<b>FIGURA 6</b> - Fórmula Molecular: Benzeno .....	18
<b>FIGURA 7</b> - Fórmulas Moleculares: Tolueno e Etilbenzeno .....	18
<b>FIGURA 8</b> - Fórmulas Moleculares: Nafataleno, Benzo[a]pireno e Benzo[a]antraceno .....	19
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
<b>FIGURA 9</b> - Imagem Satélite da Bacia de Guaecá .....	46
<b>FIGURA 10</b> - Esquema do ensaio de <i>Allium cepa</i> .....	51
<b>FIGURA 11</b> - Esquema do ensaio de <i>Oreochromis niloticus</i> e a preparação das lâminas para o teste do Micronúcleo .....	55
<b>FIGURA 12</b> - Esquema do ensaio de <i>Oreochromis niloticus</i> e a aplicação da técnica do ensaio do cometa .....	57
<b>FIGURA 13</b> - Classes de cometas em eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição às águas do rio Guaecá impactadas por hidrocarbonetos de petróleo .....	57

**RESULTADOS E DISCUSSÕES**

**FIGURA 14** - Eritrócitos de *Oreochromis niloticus*  
expostos às águas do rio Guaecá e Ribeirão SABESP  
..... 74

**LISTA DE TABELAS****Página****REVISÃO DE LITERATURA**

<b>TABELA 1</b> - Composição dos principais hidrocarbonetos no petróleo doce e ácido .....	19
<b>TABELA 2</b> - Composição e propriedades do petróleo de acordo com sua origem .....	20
<b>TABELA 3</b> - Concentrações de Benzeno, Tolueno e Xileno, na presença de diversos produtos derivados do petróleo em comparação com a solubilidade dessas puras .....	24

**RESULTADOS E DISCUSSÕES**

<b>TABELA 4</b> - Parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de águas coletadas em julho de 2005 (estação seca) .....	59
<b>TABELA 5</b> - Parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de águas coletadas em fevereiro de 2006 (estação chuvosa) .....	59
<b>TABELA 6</b> - Análise de Inorgânicos e Orgânicos nas amostras de águas coletadas em julho de 2005 (estação seca) no rio Guaecá e Ribeirão SABESP .....	62
<b>TABELA 7</b> - Análise de Inorgânicos e Orgânicos nas amostras de sedimentos coletados em julho de 2005 (estação seca) no rio Guaecá e Ribeirão SABESP ....	63
<b>TABELA 8</b> - Análise de Inorgânicos e Orgânicos nas amostras de águas coletadas em fevereiro de 2006 (estação chuvosa) no rio Guaecá e Ribeirão SABESP .....	64
<b>TABELA 9</b> - Análise de Inorgânicos e Orgânicos nas amostras de sedimentos coletados em fevereiro de 2006 (estação chuvosa) no rio Guaecá e Ribeirão SABESP .....	64

<b>TABELA 10</b> - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPHs) analisados e detectados na amostra de água do ponto 1 do rio Guaecá, coletada em Julho de 2005 (estação de seca) .....	66
<b>TABELA 11</b> - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) analisados e detectados na amostra de água do ponto 1 do rio Guaecá, coletada em Julho de 2005 (estação de seca).....	67
<b>TABELA 12</b> - Comparação das freqüências de Micronúcleos e Anormalidades Nucleares em eritrócitos de <i>Oreochormis niloticus</i> , após exposição dos peixes às amostras de águas do rio Guaecá e Ribeirão SABESP .....	72
<b>TABELA 13</b> - Análise de eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> expostos às amostras de águas do rio Guaecá e Ribeirão SABESP pela técnica do ensaio do cometa .....	73
<b>TABELA 14</b> - Comparação das Freqüências de Índice Mitótico, aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> , após exposição aos extratos solubilizados dos sedimentos do rio Guaecá .....	77

## RESUMO

---

O petróleo, uma das mais importantes fontes de energia do planeta, tem sido relacionado a muitos impactos ambientais, principalmente nos ecossistemas aquáticos, devido às atividades da indústria petrolífera, na qual ele é utilizado como matéria prima. Dentre os problemas causados nos organismos expostos, um dos mais sérios seria aquele que compromete o material genético, o que ressalta a importância da utilização de testes biológicos, relacionados a estes *endpoint* (genotoxicidade), para a avaliação das reações dos organismos à poluição ambiental. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de águas e sedimentos do rio Guaecá, São Sebastião - SP, após impacto por vazamento do oleoduto OSBAT, em 18 de fevereiro de 2004. As avaliações foram realizadas utilizando-se dois sistemas-teste, *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. O ensaio do cometa e o teste de MN com a espécie de *O. niloticus* foram utilizados para avaliar, respectivamente, a genotoxicidade e a utagenicidade das amostras de águas coletas no rio Guaecá. No entanto, os resultados obtidos para este sistema-teste não foram conclusivos devido a problemas metodológicos. Já a espécie de *A. cepa* foi utilizada para se estimar o potencial genotóxico e mutagênico das águas e dos sedimentos do rio Guaecá, por meio de análise de indução de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN). Essa, ao contrário de *O. niloticus*, mostrou-se sensível a avaliação do comprometimento da qualidade das águas do rio Guaecá impactadas por petróleo. Os resultados obtidos para este sistema-teste indicaram genotoxicidade e mutagenicidade para a amostra de água coleta na nascente do rio Guaecá, a qual corresponde ao local de afloramento do óleo vazado e a única amostra a apresentar hidrocarbonetos de petróleo, segundo os resultados das análises químicas de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs).

Palavras-chave: Mutagenicidade, Genotoxicidade, *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus*, Hidrocarbonetos de Petróleo.

## ABSTRACT

---

Petroleum, one of the most important energy source in the planet, has been related to many environmental impacts, principally in aquatic ecosystems due to the fact that petroleum industry uses water as raw material. Among the problems that are caused in the exposed organisms, the most serious is the one that compromise the genetic material, this fact explain the importance of using genotoxicity tests to evaluate the organisms reaction to environmental pollution. The present work had the objective to evaluate the mutagenic and genotoxic potentials of the waters and sediments of Guaecá River, São Sebastião – SP, after impact by OSBAT pipeline leakage on February 18<sup>th</sup>, 2004. Comet assay and micronucleus test were performed in *Oreochromis niloticus* to evaluate, respectively, the genotoxicity and mutagenicity of the water samples collected in Guaecá River. However, the obtained results for this test system were not conclusive due to methodological problems. Chromosome aberration test (CA) and micronucleus test (MN) were made in *Allium cepa* test system to evaluate the genotoxic and mutagenic potentials of the samples collected in Guaecá River. The micronucleus test in *Allium cepa* seemed to be sensitive to evaluate the compromising of the water quality of Guaecá River. The obtained results for this test system indicated genotoxicity and mutagenicity of the water collected in Guaecá River nascent, which corresponds to the place where the oil emerges and the only sample to present petroleum hydrocarbons, according to chemical analysis for total petroleum hydrocarbons (TPHs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).

Key-words: mutagenicity, genotoxicity, *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus*, petroleum hydrocarbons.



## **1. INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TEMA**

As atividades humanas têm provocado, ao longo dos anos, grandes impactos no meio ambiente, principalmente nos ecossistemas aquáticos, levando a um comprometimento da qualidade das águas.

O contínuo crescimento populacional e, conseqüentemente, o aumento no consumo da água, tem incentivado a utilização racional desse bem mineral, visando à conservação de sua qualidade, uma vez que se trata de um recurso finito e de suma importância para a manutenção da vida de todos os seres vivos do planeta.

Atualmente, a preocupação com a qualidade dos recursos hídricos é crescente, o que tem levado ao desenvolvimento de muitos estudos, principalmente pela necessidade real, devido ao crescente aumento de despejos de substâncias química nestes ambientes, as quais podem conferir riscos à saúde humana, bem como ao ecossistema como um todo. Tais preocupações têm levado os pesquisadores a desenvolverem metodologias capazes de avaliar as reações dos organismos expostos à poluição ambiental.

Segundo Ribeiro (2003), uma das classes de químicos ambientais mais preocupantes são as mutagênicas, devido à potencialidade de induzirem alterações na molécula de DNA, levando a uma alteração herdável da função gênica.

A indústria petrolífera vem sendo relacionada como uma das atividades humanas de risco ao meio ambiente, pois pode promover impactos desde o processo de extração até o refino de seus produtos. Entretanto, dentre os riscos conferidos aos diferentes ambientes, os mais preocupantes são aqueles relacionados com o comprometimento dos recursos hídricos, os quais podem ser gerados por todas as atividades das etapas de produção.

Em relação aos impactos gerados pela etapa de transporte da indústria petrolífera, a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo) vem registrando, desde 1980, acidentes ambientais por vazamentos de dutos e de navios petroleiros. Embora as ocorrências desses acidentes não sejam tão constantes, quando comparadas a outros acidentes, eles apresentam conseqüências sérias para o meio ambiente como um todo, bem como para a população exposta.

Sabe-se que o petróleo apresenta uma composição química complexa, variável e influenciada por condições físico-químicas, biológicas e geológicas do ambiente em que ele foi formado. Entretanto, independentemente de sua composição, o petróleo apresenta diversos efeitos deletérios aos organismos expostos, podendo causar, mesmo em concentrações muito baixas no ambiente, desde efeitos tóxicos crônicos, como diminuição ou inibição da capacidade reprodutiva, até efeitos genotóxicos e mutagênicos. Desta

maneira, impactos causados por derrames de óleo não estão apenas associados ao volume derramado, pois pequenos vazamentos podem causar severos danos às áreas atingidas e aos organismos expostos.

Dentre as áreas mais atingidas por estes tipos de acidentes no Brasil, o Litoral Norte do Estado de São Paulo vem se destacando, devido à presença do Terminal Marítimo Almirante Barroso (TEBAR), o qual é, atualmente, considerado o maior porto da PETROBRAS, sendo responsável por cerca de 60% do fluxo de carga no Brasil (CETESB, 2005). Adicionalmente, dentre os acidentes do Litoral Norte, temos como destaque os rompimentos do oleoduto da PETROBRAS (OSBAT), devido à localização no Parque Estadual da Serra do Mar, a qual se trata de uma área de Unidade de Conservação, com alta biodiversidade e inúmeros corpos d'águas.

Considerando toda problemática exposta acima e a necessidade de assegurar a qualidade das águas, têm sido desenvolvidas metodologias de avaliação e monitoramento de ecossistemas aquáticos utilizando-se de organismos vivos, como as espécies *Allium cepa* (Asparaginales, Alliaceae) e *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae). Estas espécies têm se mostrado eficientes na avaliação de efeitos genotóxicos e mutagênicos induzidos pela poluição ambiental em geral e, principalmente, para estudos de águas impactadas.

A interação entre diferentes métodos de avaliação das reações de organismos expostos a químicos ambientais pode fornecer uma visão mais global e abrangente dos possíveis danos induzidos por estes agentes. Dessa maneira, foram realizados, no presente estudo, ensaios para se avaliar o

possível potencial genotóxico e mutagênico de águas e sedimentos do rio Guaecá, São Sebastião-SP, após impacto causado pelo vazamento do oleoduto OSBAT, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como organismos-teste.

## 2. OBJETIVOS

---

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o comprometimento e a ação dos contaminantes das águas e dos sedimentos do rio Guaecá impactado pelo vazamento do oleoduto OSBAT (23°48'21.3"S/45°25'50.3"W), ocorrido em 18 de fevereiro de 2004, por meio das seguintes análises:

- Análise físico-química (pH, temperatura, salinidade, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido) das águas do rio Guaecá;
- Análises químicas de inorgânicos das águas e dos sedimentos do rio Guaecá;
- Análises químicas de compostos orgânicos (hidrocarbonetos totais de petróleo e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) das águas do rio Guaecá;
- Análise dos possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos das águas e dos sedimentos do rio Guaecá pela utilização do sistema-teste de *Allium cepa*;
- Análise dos possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos das águas do rio Guaecá pela utilização do sistema-teste de *Oreochromis niloticus*.

O presente estudo teve também como objetivo avaliar os mecanismos de ação de hidrocarbonetos de petróleo sob o material genético de organismos expostos, bem como avaliar a eficiência dos sistemas-teste propostos para a detecção deste tipo de contaminação.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

---

#### **3.1. Caracterização da Área de Estudo**

##### **3.1.1. Bacia de Guaecá**

A bacia de Guaecá está geograficamente inserida no Litoral Norte do Estado de São Paulo e pertence ao Município de São Sebastião. Adjacente à entrada sul do Canal de São Sebastião, a região de Guaecá comporta uma planície costeira bem desenvolvida, se comparada com outras praias contíguas a ela, onde o Maciço da Serra do Mar se aproxima intensamente da costa, sendo este caracterizado por escarpa rochosa com elevadas declividades (Figura 1).

A Bacia de Guaecá é caracterizada por suportar uma grande variedade de ecossistemas, entre os quais estão presentes diferentes ambientes marinhos/costeiros, como a Praia de Guaecá e extensos costões rochosos, bem como corpos de água doce que nascem na Serra. Para o interior, a partir da transição da planície, a bacia de Guaecá é intensamente colonizada pela Mata Atlântica que, no trecho de serra, assume características de Mata

Atlântica de Encosta com alta declividade denominada Floresta Tropical Pluvial (Ombrófila Densa).

A serra de Guaecá, parte integrante de Unidade de Conservação de Mata Atlântica, pertence ao Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo São Sebastião (Lei N° 9985 de 18 de julho de 2000 – SNUC; Decreto Estadual 10.251 de 30 de agosto de 1977), sob gestão legal do Instituto Florestal, vinculado à Secretaria de Estado do Meio Ambiente de São Paulo. Esta área é cortada por extensa malha de corpos d'água, a qual pode ainda estender-se na estação chuvosa (verão) devido a formação de corpos d'água de drenagens pluviais superficiais, como córregos e ribeirões que recebem contribuições de outros corpos d'água menores. Dentre os recursos hídricos presentes nesta região, o rio Guaecá, cuja foz está localizada na porção centro-norte da Praia de Guaecá, é caracterizado como um dos mais importantes.

### **3.1.2. Rio Guaecá**

O rio Guaecá, classificado pela Resolução CONAMA N° 357 de 17 de março de 2005 como corpo d'água de classe 1, está inserido na área de Unidade de Conservação do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo de São Sebastião, SP. Constitui-se de um sistema fluvial com trechos muito bem definidos de acordo com a topografia e geomorfologia da planície costeira e Serra do Mar. É caracterizado pela sinuosidade e pela presença de um leito rochoso, sendo encachoeirado em alguns pontos (Figura 2). Sua largura média está entre 3 a 5 metros em lâmina d'água rasa. No trecho de montante, o rio



apresenta declividade acentuada e uma densa mata ciliar em suas margens, a qual está associada à Mata Atlântica (Figura 2).

Na transição para a planície costeira, o rio Guaecá apresenta declividade reduzida, tornando-se mais meandrante. O sedimento arenoso passa a substituir os seixos e rochas e a calha se torna mais larga. Em alguns trechos, a profundidade do corpo d'água chega a 50 cm. A vegetação de floresta passa a ser substituída por vegetação arbustiva e herbácea, com predomínio de gramíneas e alguns raros bancos de macrófitas aquáticas, sujeita a inundação periódica.

Após cerca de 8 km de percurso, o rio Guaecá deságua na praia de Guaecá, com largura de até 10 metros na foz e um volume de água significativamente maior do que no trecho de montante resultante da contribuição de diversos corpos d'água e afloramentos ao longo do trecho.

Devido a suas características, é um sistema que sofre intensas variações de vazão e corrente. Chuvas de cabeceira geram rápidas mudanças no regime de drenagem, aumentando intensamente o volume de água na calha. Conseqüentemente, nestas situações, a profundidade do rio pode ultrapassar 1,5 m e as suas margens ficam consideravelmente expandidas na lateral, especialmente no trecho de planície costeira.

Considerando suas características fisiográficas e ecológicas, o rio Guaecá é um ambiente com elevada sensibilidade ao óleo, além de ser bastante susceptível devido à presença de oleodutos da PETROBRAS a montante, a qual confere ao ambiente uma extrema vulnerabilidade a impactos por petróleo. O rio Guaecá sustenta ainda uma intensa e diversa comunidade

biológica como consequência da grande variabilidade de “habitats” e nichos ecológicos que oferece, sendo colonizado por grande diversidade de invertebrados e vertebrados.

### **3.1.3. Descrição do Acidente do Oleoduto OSBAT**

Na manhã do dia 18 de fevereiro de 2004, foi observada a presença de óleo na foz do rio Guaecá que passa embaixo da ponte da rodovia BR 101 e deságua na porção norte da Praia de Guaecá, São Sebastião, SP (Figura 3). Tratava-se de um vazamento de petróleo decorrente de uma fenda na parede metálica do oleoduto OSBAT da PETROBRAS/TRANSPETRO, que se encontra enterrado a cerca de 1,5 m de profundidade. Neste dia, o oleoduto OSBAT bombeava uma mistura de 2 tipos de óleo, MARLIN e ESPÍRITO SANTO, do Terminal Aquaviário de São Sebastião para a Refinaria Presidente Bernardes em Cubatão.

A detecção do vazamento, pela visualização de óleo na foz do rio Guaecá, e, posteriormente, pela observação de afloramentos de óleo na nascente deste rio, indicou claramente que o produto já estava vazando anteriormente a esta constatação. Tal fato impossibilitou o conhecimento do volume real de óleo vazado e a duração total do vazamento. Em vista disso, o cenário acidental constituiu de uma pluma de contaminação no subsolo, bem como no aquífero freático, com vários pontos de afloramento a montante do rio Guaecá, o qual teve toda sua extensão afetada.

O evento agudo, resultante de um acidente isolado, adquiriu características crônicas, atuando como uma fonte de contaminação constante

ao longo dos meses seguintes, por mais de um ano. Apesar de o duto ter sido reparado, o solo e o aquífero freático acumularam grande quantidade de petróleo que vem aflorando em diversos pontos do rio Guaecá. No entanto, estes afloramentos de óleo pela nascente do rio Guaecá, bem como a pluma de contaminação no aquífero freático, vem diminuindo devido aos planos de contingências e remediação da área contaminada adotados pela empresa poluidora ao longo destes anos.

#### **3.1.4. Características do Óleo Vazado**

O petróleo vazado pelo rompimento do oleoduto OSBAT da PETROBRAS foi caracterizado como uma mistura de óleos do tipo MARLIM e ESPIRITO SANTO. Estes óleos se enquadram no grupo 3 da escala ITOPF (ITOPF, 1987), o que os definem como óleos pesados e de elevada persistência no ambiente. Os efeitos físicos desses óleos estão relacionados com as suas densidade e viscosidade, independentemente da toxicidade, pois causam danos e morte aos organismos pelo recobrimento corpóreo e, conseqüentemente, pela completa asfixia. A intoxicação é resultante do contato da biota com os componentes mais tóxicos da mistura, como compostos aromáticos e parafínicos.

Contudo, uma vez que não se sabe o momento efetivo do início do vazamento, o conhecimento preciso dos tipos de produtos vazados fica comprometido.

A descrição acima refere-se às informações obtidas por comunicação pessoal com funcionários da PETROBRAS, que relataram o tipo de produto

bombeado pelo duto no dia da constatação do vazamento. Muito possivelmente, uma avaliação detalhada do produto presente no ambiente indicaria a presença de mais de um tipo de produto, uma vez que diferentes partidas são freqüentemente bombeadas no OSBAT. No entanto, em vista desse desconhecimento, a informação sobre o tipo de óleo vazado restringe-se a descrição do produto (MARLIM/ESPIRITO SANTO) bombeado no dia 18 de fevereiro de 2004.



FONTE: INSTITUTO FLORESTAL-SP

**Figura 1.** Imagem aérea mostrando uma pequena área do Município de São Sebastião-SP, com destaque para a Bacia de Guaecá, a faixa do oleoduto OSBAT e ao TEBAR.



**Figura 2.** Aspecto fisiográfico do rio Guacá. **A e B.** Leito rochoso, declividade acentuada e Mata ciliar densa associada à Mata Atlântica a medida que se aproxima da montante do rio.



FONTE: CETESB

**Figura 3.** Acidente do oleoduto OSBAT no rio Guaecá, 18 de fevereiro de 2004. **A.** Faixa do oleoduto OSBAT inserido na Serra do Mar; **B.** Estação de Captação de Água do rio Ribeirão SABESP; **C.** Mancha de óleo próxima a nascente do rio Guaecá; **D.** Grande volume de óleo visualizado no rio Guaecá no momento da detecção do acidente; **E.** Cenário acidental mostrando operações de emergências para contenção do óleo vazado. **F.** e **G.** Operações de remoção do óleo do rio Guaecá.

## 3.2. Caracterização do Petróleo

### 3.2.1. Composição Química e Tipos de Óleo

O petróleo é definido como uma mistura complexa de hidrocarbonetos e de pequenas quantidades de compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio, assim como baixas concentrações de compostos orgânicos metálicos, principalmente níquel e vanádio (HANS-JOACHIM et al., 1981). A composição química do petróleo e a natureza física do mesmo podem variar, significativamente, entre as diferentes jazidas mundiais, o que, provavelmente, está relacionada com a origem e idade geológica de cada óleo, apesar de não comprovada esta correlação (PEDROZO et al., 2002).

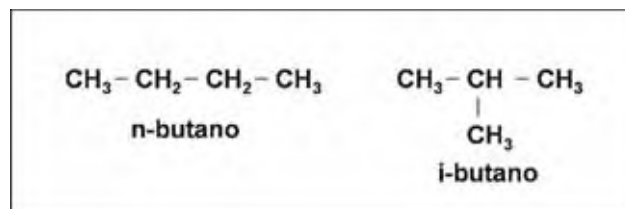
Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos constituídos exclusivamente de moléculas formadas por átomos de hidrogênio e carbono, dispostos em diversas configurações estruturais, sendo atualmente classificados em mais de 270 tipos distintos (PEDROZO et al., 2002). De forma geral, encontram-se três principais grupos de hidrocarbonetos constituintes do petróleo: alcanos (parafínicos), cicloalcanos (naftênicos) e aromáticos, como descritos por HANS-JOACHIM et al. (1981), abaixo listados.

- **Alcanos**

Os alcanos são constituídos de hidrocarbonetos saturados, isto é, os átomos de carbono apresentam somente ligações simples entre eles, e estão dispostos em cadeias abertas. Pode-se apresentar na forma de n-alcanos (parafinas normais), com uma cadeia não ramificada de átomos de carbonos e



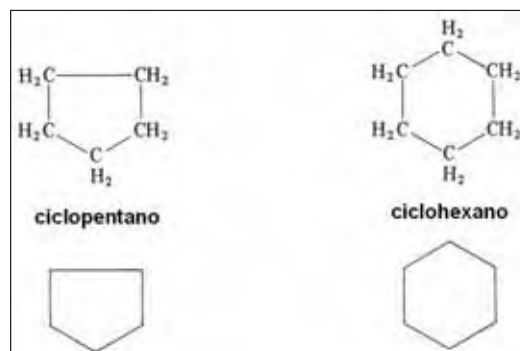
na forma de iso-alcenos (isoparafinas), com cadeias ramificadas (Figura 4). A fórmula geral dos alcenos é  $C_nH_{2n+2}$ , sendo a série iniciada pelo metano ( $CH_4$ ).



**Figura 4.** Isômeros do butano com as diferentes organizações estruturais.

- **Cicloalcanos**

Os cicloalcanos são também hidrocarbonetos saturados, mas com estrutura molecular em forma de anel (cadeias fechadas). Os mais importantes membros deste grupo são o ciclopentano ( $C_5H_{10}$ ) e o ciclohexano ( $C_6H_{12}$ ) (Figura 5), por apresentarem grandes anéis.



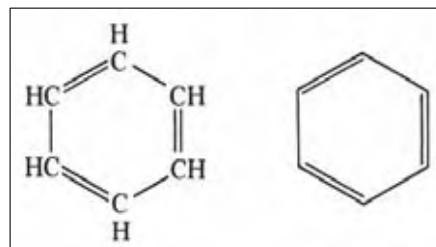
**Figura 5.** Fórmula molecular. **A.** Ciclopentano, **B.** Ciclohexano.

A fórmula geral dos alcenos é  $C_nH_{2n}$ , sendo a série iniciada pelo ciclopropeno ( $C_3H_6$ ), formado por um anel de 3 átomos de carbono.

- **Hidrocarbonetos Aromáticos**

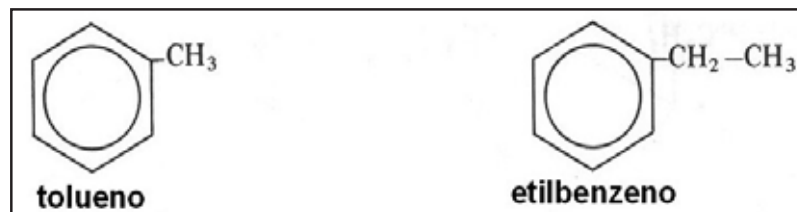
Os hidrocarbonetos aromáticos são constituídos de hidrocarbonetos insaturados, isto é, os átomos de carbono estão ligados entre si por pelo menos uma ligação dupla, e apresentam-se organizados em forma de anel benzênico, podendo ser constituídos por um ou mais anéis.

O benzeno é a forma mais simples dos hidrocarbonetos aromáticos, sendo constituído por 6 átomos de carbono ( $C_6H_6$ ) dispostos em anel, cuja estrutura é denominada de anel benzênico (Figura 6).



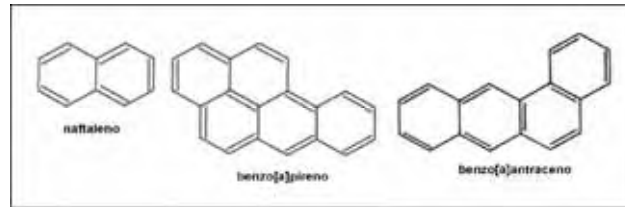
**Figura 6.** Fórmula molecular do benzeno.

Nesta molécula, cada átomo de hidrogênio pode ser ainda substituído por um grupo alquila, originando alquil benzenos, por exemplo, tolueno e etilbenzeno (Figura 7).



**Figura 7.** Fórmulas moleculares. **A.** Tolueno. **B.** Etilbenzeno.

Os hidrocarbonetos aromáticos com mais de um anel benzênico apresentam um sistema de condensação entre os anéis, sendo o exemplo mais simples o naftaleno ( $C_{10}H_8$ ) (Figura 8). Estes hidrocarbonetos são denominados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) (Figura 8).



**Figura 8.** Fórmulas moleculares. **A.** Naftaleno. **B.** Benzo[a]pireno, **C.** Benzo[a]antraceno.

Cada petróleo, por ser obtido de um diferente campo produtor, é uma mistura única. Assim, o *American Petroleum Institute* (API - 2006) reconhece, de acordo com a composição de seus hidrocarbonetos e, principalmente, de seus compostos sulfúricos, dois tipos de petróleo característicos: o petróleo doce e o ácido (Tabela 1). O primeiro apresenta em sua composição concentrações muito pequenas de enxofre, enquanto que no petróleo ácido a quantidade de enxofre é mais elevada quando comparada com a anterior.

**Tabela 1.** Composição dos principais hidrocarbonetos no petróleo doce e ácido.

Composição percentual dos hidrocarbonetos		
Hidrocarbonetos	Óleo doce (0,2% de enxofre)	Óleo ácido (2,5% de enxofre)
Parafínicos (alcanos)	8-18%	55-10%
Naftênicos (cicloalcanos)	70-75%	20-23%
Aromáticos	7-22%	10-22%

FONTE: IARC, 1989

As propriedades físico-químicas do petróleo são determinadas por sua composição total e pelas características de cada um dos seus constituintes. A densidade específica do petróleo é expressa em graus API, de acordo com a escala estabelecida pelo *American Petroleum Institute* (2006). Por sua

densidade relativa, o petróleo é ainda classificado em óleo leve, médio e pesado, sendo o óleo leve aquele que apresenta um API inferior a 0,82, o médio com API de 0,82 a 0,97 e o pesado com valores de API superiores a 0,97 (PEDROZO et al., 2002). Na Tabela 2 são apresentadas algumas características e propriedades físico-químicas do petróleo de acordo com a origem geográfica.

**Tabela 2.** Composição e propriedades do petróleo de acordo com a sua origem.

Propriedades	Baía Prudhoe	Louisiana	Kuwait	Bacia de Campos
Densidade (°API)	27	37	31,4	19,6
Densidade Relativa (g/ml) à 20°C	0,893	0,840	0,869	0,9331
Saturados (%p/p)* (%m/m)**	61,2*	65,19*	50,2*	41,3**
Aromáticos	35,6	26,3	28,4	32,9
Asfaltenos	1,2	0,2	3,5	2,1
Vanádio (mg/Kg)	20	1,9	28	29
Níquel (mg/Kg)	10	2,2	7,7	21
Enxofre (%p/p)	0,94	0,25	2,44	0,67
Nitrogênio (%p/p)	0,23	0,69	0,14	0,43

FONTES: CONCAWE, 2001; CENPES, 2001; OVERTON et al., 1994.

O petróleo mais leve produz um maior volume de gasolina, GLP e naftas (produtos leves), enquanto que petróleo de qualidade mais pesada produz mais óleos combustíveis e asfalto. Tipos com densidade intermediária produzem derivados médios, como o óleo diesel e o querosene, por exemplo (PEDROZO et al., 2002).

Os hidrocarbonetos constituintes do petróleo podem se apresentar sob diferentes formas físicas. Aqueles com estrutura molecular com até 4 átomos de carbono encontram-se sob a forma de gás, como o gás natural liquefeito

(GLP). Os hidrocarbonetos com 5 a 25 átomos de carbono podem ser encontrados sob a forma líquida, como o hexano. Já os que apresentarem mais que 25 átomos de carbono são encontrados sob a forma sólida, como, por exemplo, os constituintes da graxa e parafina (GÓES, 1997).

A interação dos hidrocarbonetos entre si e sua solubilidade em água depende da polaridade de suas moléculas. Geralmente, quanto maior a sua polaridade, maior será a sua solubilidade em água e seu ponto de ebulição. Os hidrocarbonetos aromáticos são mais solúveis na água e menos voláteis que os parafínicos com o mesmo número de átomos de carbono (PEDROZO et al., 2002).

Considerando a persistência dos hidrocarbonetos de petróleo no meio ambiente, uma característica física muito importante desses compostos é o conhecimento do seu ponto de ebulição. Geralmente, a persistência dos hidrocarbonetos no ambiente está diretamente relacionada ao seu respectivo ponto de ebulição, ou seja, quanto maior a temperatura de ebulição maior é sua permanência no ambiente (WHO, 1982). O ponto de ebulição de um hidrocarboneto depende do número de átomos de carbono presentes em sua molécula. Para os hidrocarbonetos parafínicos, pode-se dizer que há um aumento de 20°C no seu ponto de ebulição, para cada átomo de carbono acrescentado no comprimento de sua cadeia.

### **3.2.2. Níveis de Contaminação Ambiental de Hidrocarbonetos de Petróleo**

As refinarias de petróleo, além de usarem o óleo cru como produto primário, utilizam uma grande variedade de substâncias químicas que podem ser também liberadas para o meio ambiente através da geração de efluentes, resíduos sólidos e gases. Os poluentes tipicamente gerados pelas refinarias são hidrocarbonetos voláteis, monóxido de carbono, óxidos de enxofre, óxidos de nitrogênio, material particulado, amônia, sulfeto de hidrogênio, metais, ácidos utilizados e outros numerosos compostos tóxicos. As refinarias de petróleo liberam 75% dos seus contaminantes para o ar, 24% para a água (incluindo água subterrânea e superficial) e 1% para o solo (PEDROZO et al. 2002). Contudo, o processo de refino do petróleo não se resume a única etapa impactante da indústria petrolífera, pois grande parte do óleo e derivados liberados para o meio ambiente envolvem vazamentos não intencionais ou derramamentos. Segundo Doyle (2006), a quantidade total de petróleo e correlatos liberados para o meio ambiente, durante a produção, processamento e distribuição, gira em torno de 134 milhões de barris por ano, o que significa 23% do total refinado.

Derramamentos recorrentes de óleo podem promover a saturação do solo, exigindo sua escavação e remoção para tratamento. Em casos de vazamentos de tanques de estocagem subterrâneos, os processos de biodegradação e degradação natural são pouco efetivos na prevenção da contaminação de águas subterrâneas, uma vez que os diferentes constituintes do petróleo apresentam densidades diferentes. As frações menos densas que

a água (fase líquida não aquosa mais leve) geralmente apresentam um potencial de contaminação dos lençóis freáticos menor que os compostos clorados, como, por exemplo, as bifenilas policloradas (PCBs), que são mais densas que a água.

Em relação à água superficial, a baixa densidade de muitas frações do petróleo determina o menor risco a fauna e a flora aquáticas. Estas frações tendem a flutuar, formando filmes de 0,1 mm, ou menos, de espessura sobre a superfície da água, podendo ser dissipados, em dias ou em poucas semanas, pelos processos de degradação físicos e biológicos, o que reduz as potencialidades de danos acidentais. Já as frações mais pesadas podem acumular-se nos organismos bênticos, peixes e sedimentos.

Como a maioria das contaminações por petróleo ou derivados envolve uma mistura complexa de hidrocarbonetos, é improvável que as determinações na fase aquosa, abaixo da zona de contaminantes não hidrossolúveis, encontrem-se próximos aos limites de solubilidade. Se as concentrações estão próximas ou acima dos limites de solubilidade, os contaminantes não aquosos estão, provavelmente, presentes na amostra.

Os constituintes do petróleo são relativamente insolúveis em água, mas os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) e alguns hidrocarbonetos alifáticos de cadeia curta apresentam hidrossolubilidade considerável. Entretanto, quando estes componentes fazem parte da mistura complexa, estes nunca atingem as concentrações previstas pelas suas constantes de solubilidade individual (Tabela 3). Desta maneira, pode-se dizer que os níveis

de contaminação ambiental são sítios-específicos e dependem das características do produto liberado e do local impactado.

**Tabela 3.** Concentrações de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno em água, na presença de diversos produtos derivados do petróleo, em comparação com a solubilidade dessas substâncias puras.

Substância	Solubilidade da substância pura em água (mg/L)	Solubilidade em água quando presente no combustível de aviação (mg/L)
Tolueno	576,0	28,3
Etilbenzeno	180,0	10,6
n-Octano	0,884	0,173

FONTE: ATSDR, 1999.

### 3.3. Genética Toxicológica e o Biomonitoramento Ambiental

Segundo a *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA, 2007), poluição é definida como a presença de uma substância no ambiente que, devido a sua composição química ou concentração a qual se encontra, pode causar danos ao funcionamento dos processos naturais pela indução de efeitos indesejáveis ao meio ambiente e a saúde dos organismos expostos. Sabe-se que a poluição é fruto de atividades humanas, as quais, geralmente, são necessárias para a manutenção do estilo de vida atual. Desta forma, a utilização desordenada dos recursos naturais e o mau gerenciamento das atividades humanas têm provocado graves impactos aos ecossistemas, comprometendo seriamente a qualidade e a manutenção dos mesmos.

Dentre os ambientes afetados pela poluição, um dos mais preocupantes é o ambiente aquático devido à água ser um bem mineral essencial às funções vitais dos organismos e, conseqüentemente, à manutenção da vida do planeta.



Além disso, outro fator preocupante é o fato da água ser um solvente versátil, capaz de veicular substâncias químicas para longe dos focos de contaminação, o que pode levar a um comprometimento de outros ambientes.

Devido à preocupação com degradação ambiental e com a vulnerabilidade do material genético às agressões impostas pela contaminação ambiental, foi criada uma nova área de pesquisa, denominada de Genética Toxicológica (RABELLO – GAY et al., 1991). Tal área tem como objetivo não apenas estimar os possíveis danos às células pela detecção dos efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos, mas também identificar os mecanismos de ação de agentes químicos presentes no ambiente, aos quais diversos organismos vivos, inclusive o homem, estão expostos.

Sabe-se que, ao longo da vida, a molécula de DNA sofre alterações denominadas mutações que podem ser induzidas por erros durante a sua duplicação e/ou durante o ciclo de divisão celular (RIBEIRO e MARQUES, 2003). No entanto, as alterações na molécula de DNA não se restringem apenas às causas mencionadas acima, pois podem também ser decorrentes da ação antrópica ao meio ambiente, sendo induzidas pela ação de diversos xenobiontes.

Segundo Houk (1992), três grandes classes de danos podem ser descritas:

- Mutação gênica: referente a mutações pontuais que causam alterações nas seqüências de DNA dentro do gene;

- Mutação cromossômica estrutural: referente a altera es na estrutura cromossômica, usualmente resultando em ganho, perda, ou rearranjo de pedaços cromossômicos como dele es e transloca es;

- Muta o cromossômica numérica: referente a ganho ou perda de cromossomos intactos (aneuploidia, poliploidia).

Contudo, agentes capazes de interagir com a molécula de DNA não se restringem apenas aos mutagênicos, pois existem agentes genotóxicos que, além da capacidade de interagirem com o material genético, podem interagir com outros componentes celulares como as fibras do fuso e enzimas celulares (topoisomerases). Desta maneira, o termo genotoxicidade se designa a forma o de aductos de DNA, lesões na fita de DNA, síntese de DNA não programada e trocas entre cromátides-irmãs, enquanto que a mutagenicidade   determinada pela indu o de muta o no nível g nico ou cromoss mico. Pode-se dizer que os efeitos genotóxicos podem ser transit rios, ou seja, são susceptíveis de reparo, e que os efeitos mutagênicos são persistentes, se caracterizando em uma altera o permanente no conteúdo ou na estrutura do material genético de um organismo (DEARFIELD et al., 2002).

Embora ocorram muta es espontâneas, a maioria das muta es   induzida por xenobiontes, aos quais diversos organismos vivos, inclusive o homem, estão expostos. Segundo Lee e Steinert (2003), substâncias químicas causadoras de danos   molécula de DNA podem ser agrupadas em quatro diferentes grupos:

- (1) aqueles que agem diretamente sobre a molécula de DNA;
- (2) os que requerem via de metaboliza o para causarem danos;

(3) os que promovem a produção de espécies reativas de oxigênio;

(4) aqueles que causam inibição no reparo e na síntese do DNA.

Desta maneira, mais de 200 testes de curta duração, utilizando uma ampla variedade de organismos-teste, têm sido desenvolvidos, ultimamente, com a finalidade de avaliar agentes potencialmente causadores de danos genéticos presentes no ambiente (VANZELLA, 2006). De acordo com Martinez e Cólus (2002), bioindicadores podem fornecer medidas sensíveis e específicas da exposição de organismos à agentes genotóxicos e/ou mutagênicos, permitindo assegurar a saúde do ambiente e dos organismos nele presentes.

Uma eficiente investigação ambiental requer uma escolha adequada do ensaio a ser utilizado, sendo que, para tal sucesso, a escolha não deve levar em consideração apenas as características da amostra a ser testada, mas também outros fatores, como a validade do sistema-teste, seu custo relativo e a simplicidade do mesmo (HOUK, 1992).

Sistemas-teste podem ser divididos em grupos com base no sistema biológico empregado e na localização genética detectada. Bioensaios com procarióticos são capazes de detectar agentes que induzem mutações gênicas e danos primários no DNA. Já análises em eucarióticos são capazes de detectar uma amplitude maior de danos, incluindo desde mutações gênicas até danos cromossômicos e aneuploidias (HOUK, 1992).

Dentre os testes realizados em eucariotos, destacam-se a análise da frequência de DNA *fingersprinting*, as trocas entre cromátides-irmãs, a

quantificação de adutos de DNA, o ensaio do cometa, o teste de aberrações cromossômicas e o teste de micronúcleo.

O ensaio do cometa tem sido considerado um teste sensível para avaliação do estresse citotóxico e genotóxico, sendo capaz de detectar a influência de um amplo espectro de agentes potencialmente perigosos (STEINERT, 1996).

Segundo Rank et al. (2002), o teste de aberrações cromossômicas é uma das mais antigas e utilizadas ferramentas para avaliação de efeitos genotóxicos, proporcionando informações valiosas quanto ao modo de ação dos químicos testados.

O teste de micronúcleo vem sendo amplamente aplicado e é considerado por muitos autores um teste simples e efetivo para a avaliação de efeitos mutagênicos induzidos, quer seja por substâncias químicas puras ou amostras ambientais complexas. Tal aceitação é devido a sua capacidade de avaliar, pela presença de porções de cromatina intracitoplasmática, a indução de quebras e/ou perdas cromossômica.

Além dos três testes mencionados acima terem uma alta aceitação na avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade induzidas por químicos ambientais, eles podem ainda ser aplicados em uma ampla variedade de organismos-teste, incluindo desde mamíferos até vegetais superiores, o que permite uma avaliação mais precisa da contaminação ambiental.

### **3.4. Utilização do sistema-teste de *Allium cepa* para monitoramento de poluentes ambientais**

Ao longo dos anos, metodologias específicas utilizando diferentes organismos-teste vêm sendo desenvolvidas para possibilitar a detecção e avaliação de comprometimentos da molécula de DNA causados pela ação de xenobiontes. Estes testes, além de servirem de alerta sobre possíveis efeitos de agentes químicos, também visam assegurar a qualidade do ecossistema como um todo. Testes modelos de triagem e monitoramento ambiental devem ser facilmente executáveis e capazes de gerar resultados rápidos e reprodutíveis (FISKESJÖ, 1985).

Os vegetais superiores apresentam características que os tornam excelentes modelos genéticos para a avaliação de poluentes ambientais, sendo utilizados com muita frequência em estudos de monitoramento. Contudo, este destaque não se deve, apenas, à sensibilidade de detecção de mutágenos em diferentes ambientes, mas também pela possibilidade de avaliação de diversos *endpoints* genéticos, os quais abrangem desde as mutações pontuais até as aberrações cromossômicas em células de diferentes órgãos, como folhas, pólen e endospermas (GRANT, 1994).

Entre os vegetais superiores utilizados como modelos-teste, a espécie de *Allium cepa* vem se destacando devido a sua eficiência na detecção de danos genéticos quanto à avaliação de aberrações cromossômicas induzidas por poluentes ambientais (FISKESJÖ, 1985; RANK e NIELSEN, 1994; SMAKAKINCL et al., 1996; MATSUMOTO et al., 2006; FATIMA e AHMAD, 2006; MIGID et al., 2007), bem como por substâncias químicas puras (FISKESJÖ,

1982, 1985, 1988; RANK et al., 1993; RANK e NIELSEN, 1997; ATEEQ et al., 2002a; TÜRKÖGLU, 2007). Além da sensibilidade já citada, a espécie de *A. cepa* tem sido indicada por outras vantagens, como baixo custo, fácil manuseio e, principalmente, por apresentar bons parâmetros cromossômicos, como a presença de cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ), sendo este fator fundamental para estudos de avaliação de danos cromossômicos e/ou de distúrbios do ciclo de divisão celular, incluindo riscos de aneuploidia (FISKESJÖ, 1985, MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007 - *in press*).

A utilização de *A. cepa* como sistema-teste foi introduzida por Levan (1938) com a demonstração de distúrbios no fuso mitótico devido à utilização de colchicina. Mais tarde, este mesmo autor mostrou que diferentes soluções de sais orgânicos induziam diversos tipos de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* (LEVAN, 1945). Desde então, adaptações na metodologia do teste de *A. cepa* têm sido realizadas a fim de possibilitar uma avaliação mais abrangente de químicos, sendo eles misturas complexas, como o caso de grande parte das amostras ambientais, ou substâncias puras (FISKESJÖ, 1985; RANK et al, 1993; MA et al., 1995).

As primeiras adaptações do teste de *A. cepa* foram realizadas por Fiskesjö (1985) com a finalidade de torná-lo modelo teste de estudos de monitoramento ambiental. Para tal finalidade, o autor propôs modificações que possibilitaram desde a avaliação de compostos solúveis e insolúveis em água até avaliação de efeitos de misturas complexas. Mais tarde, Rank e Nielsen (1993) propuseram novas modificações ao teste, tornando-o ainda mais

eficiente para análise de misturas complexas. No entanto, todas as modificações propostas pelos autores foram relacionadas à avaliação de aberrações cromossômicas a qual detecta agentes potencialmente genotóxicos. Ma et al. (1995) propuseram modificações do teste para a avaliação de efeitos mutagênicos a partir de observação de indução de micronúcleos em células F<sub>1</sub> de radículas de *A. cepa* expostas à poluentes ambientais.

Sabe-se que aberrações cromossômicas como células com fragmentos e perdas cromossômicas podem decorrer em células micronucleadas, pois tanto os fragmentos como os cromossomos inteiros podem não ser não incorporados ao núcleo principal durante o ciclo celular (FENECH et al., 2002). Segundo Ma et al. (1995), dentre todos os *endpoints* possíveis de se avaliar, os micronúcleos são os mais efetivos e mais simples indicadores de danos citológicos, o que torna a análise deste parâmetro mais eficiente na avaliação de contaminação ambiental. No entanto, Rank e Nielsen (1997) apresentam opinião contrária aos autores mencionados acima, pois, para eles, a avaliação de aberração cromossômica como *endpoint* não é válida apenas para detecção do potencial genotóxico, mas também para avaliação de mecanismos de ação de agente testados, sejam estas substâncias puras ou misturas complexas. Sendo assim, a análise de aberrações cromossômicas também possibilita a investigação de agentes diversos, podendo esta ser classificada quanto ao seu real efeito sobre o material genético (aneugênico ou clastogênico).

Apesar do teste com *A. cepa* ter grande aceitação como teste de monitoramento ambiental, alguns autores apresentam certa restrição quanto a

utilização de sistemas-teste vegetais na avaliação de certas classes de carcinógenos, como a dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), das nitrosaminas e de muitas outras classes (RANK e NIELSEN, 1998; UHL et al., 2003). Tal fato é devido ao complexo sistema de metabolização presente em mamíferos e, especialmente no homem, onde estas substâncias o requerem para ativação do seu potencial genotóxico. No entanto, estudos de sistemas de ativação metabólica em plantas vêm sendo realizados há anos, já havendo comprovação da capacidade destes organismos na ativação de promutágenos em mutágenos (HIGASHI, 1988; PLEWA et al., 1996; PLEWA et al., 2003).

A presença deste sistema de ativação metabólica em plantas levou Fiskejõ a relatar, em 1985, a importância do sistema-teste de *A. cepa* na avaliação da genotoxicidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), pela utilização de benzo[a]pireno como substância teste. Segundo o autor, as células de *A. cepa* apresentam sistema de enzimas oxidases capazes de metabolizar hidrocarbonetos policíclicos e, apesar de outros sistemas-teste se mostrarem mais sensíveis à esta detecção, os resultados gerados pelo teste de *A. cepa* devem ser considerados como alerta para os organismos. Mais recentemente, muitos autores tem utilizado o sistema-teste de *A. cepa* para monitoramento de carcinógenos que requerem vias metabólicas específicas para a efetivação de sua ação carcinogênica e, para estes, a sensibilidade de detecção tem sido relatada (COTELLE et al., 1999; LEME e MARIN-MORALES, 2006; FATIMA e AHMAD, 2006).

Estudos de sensibilidade e de correlação entre sistemas-teste são fundamentais para a avaliação mais precisa de riscos ambientais, bem como



para a extrapolação de dados a outros organismos alvos, como o homem. Testes para detecção de riscos a saúde humana são realizados a partir da utilização de sistemas-teste com uma ampla variedade de organismos, uma vez que a utilização de indivíduos humanos para este tipo de avaliação é inviável por motivos éticos.

O teste de *A. cepa*, além de todas as vantagens mencionadas acima, tem mostrado alta sensibilidade e boa correlação quando comparado com outros sistemas-teste, principalmente com os de mamíferos. Segundo Grant (1982), de 148 químicos avaliados pelo teste de *Allium* 76% apresentaram respostas positivas, o que levou o autor a sugerir a inclusão deste teste como rotineiro de triagem para determinação de danos cromossômicos induzidos por químicos. Já Fiskejö (1985) relatou que a sensibilidade do teste de *A. cepa* era praticamente a mesma que as observadas para sistemas-teste realizados com algas e com linfócitos humanos. Posteriormente, Rank e Nielsen (1994) mostraram correlação de 82% do teste de *A. cepa* em relação ao teste de carcinogenicidade em roedores. Estes mesmo autores mostraram ainda que o teste de *A. cepa* foi mais sensível também que os testes de Ames e de *Microscreen*. Muitos trabalhos de comparação entre sistemas-teste vegetais vêm sendo realizados por diversos autores e a maioria tem mostrado uma maior sensibilidade de *A. cepa* em relação a outras plantas superiores utilizadas como organismos-teste, como, por exemplo, a espécie *Vicia faba* (MA et al., 1995; MIGID et al., 2007).

### **3.5. Sistemas-teste de peixes e considerações sobre a espécie de *Oreochromis niloticus***

Dentre os organismos empregados como sentinelas, os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática e podem ser utilizados na estimativa da periculosidade de novas substâncias químicas, bem como na detecção de poluição ambiental (POWERS, 1989).

Adicionalmente, por serem evolutivamente próximos, apresentam metabolismo similar aos vertebrados superiores quando expostos às mesmas substâncias químicas perigosas (AL-SABTI e METCALFE, 1995) e podem ser utilizados na detecção de substâncias teratogênicas e carcinogênicas em humanos (HARSHBARGER e CLARCK, 1990).

Os peixes desempenham ainda diferentes funções na cadeia trófica, sendo capazes de acumular substâncias tóxicas pela exposição direta quando presentes nas águas de mares e rios, ou de maneira indireta, através da cadeia alimentar do ecossistema (ATEEQ et al., 2002b). Além disso, devido aos alimentos constituírem a principal via de exposição humana às substâncias tóxicas, os peixes vêm sendo reconhecidos como um dos principais vetores de químicos perigosos para os humanos (AL-SABIT e METCALFE, 1995).

De acordo com Kligerman (1982), as primeiras investigações de efeitos mutagênicos induzidos por agentes químicos em material genético de peixes foram realizadas por Kligerman (1982), Tsoi (1970,1974) e Tsoi et al. (1975), já a primeira avaliação de danos cromossômicos em peixes provenientes de ambientes poluídos foi realizada por Longwell (1976).

De acordo com Sanchez-Galan et al. (1998), em teoria, uma espécie ideal de peixe para estudos de Genética Toxicológica é aquela que apresenta os seguintes critérios:

- (1) encontra-se amplamente distribuída nos diversos ecossistemas;
- (2) apresenta alta sensibilidade na detecção de poluentes, mesmo quando estes estão presentes no ambiente em baixas concentrações;
- (3) adequada para ensaios laboratoriais;
- (4) permite a captura de indivíduos em populações naturais sem o comprometimento da conservação da espécie.

Dentre as espécies de peixes utilizadas como organismos-teste, o gênero *Oreochromis* tem sido largamente empregado na Genética Toxicológica (GRISOLIA e STARLING, 2001; ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2003). Segundo Alves-Costa (2001), a espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) constitui um excelente modelo-teste para ensaios laboratoriais, sendo freqüentemente, utilizada na investigação da toxicidade de contaminantes presentes nos ecossistemas aquáticos. Adicionalmente, *O. niloticus* também é reconhecida pela sua alta sensibilidade na detecção de poluentes, respondendo rapidamente a alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996).

*Oreochromis niloticus* (Perciforme, Chilidae) é um peixe de água doce, onívoro (STARLING, 1998) e de origem africana que foi introduzido no Brasil pelo Centro de Pesquisas Ictiológicas do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (D.N.O.C.S.) em alguns açudes do Nordeste e, posteriormente, em algumas regiões do Sudeste (TANAKA, 2001). Atualmente, constitui de uma importante espécie de peixe comercializável do sudeste do Brasil, sendo

também uma espécie comumente encontrada em diversos estuários do mundo todo (VIJAYAN et al., 1996).

### **3.6. Teste de aberrações cromossômicas**

Ao longo dos anos, a molécula de DNA é alvo permanente de danos causados por poluentes (KOVALCHUCK et. al., 1998), os quais, se não reparados ou reparados de maneira incorreta, podem acarretar em mutações (KIRSCH-VOLDERS et. al., 1998).

Segundo Kirsch-Volders (2002), as mutações no material genético podem ser classificadas em duas categorias:

(1) mutações gênicas, alterações pontuais na seqüência de DNA;

(2) mutações cromossômicas, as quais são visualizadas a partir da presença de aberrações cromossômicas.

Aberrações cromossômicas são caracterizadas por mudanças na estrutura normal de um cromossomo ou no número total de cromossomos, podendo ocorrer espontaneamente ou como resultado da exposição à agentes físicos ou químicos (RUSSEL, 2002). Alterações cromossômicas estruturais podem ser induzidas por diversos fatores, como quebras no DNA, inibição da síntese de DNA e replicação de DNA alterado (ALBERTINI et al., 2000). Já as aberrações cromossômicas numéricas, como aneuploidia e poliploidia, são conseqüências de segregações anormais de cromossomos, podendo ocorrer tanto espontaneamente ou pela ação de um agente aneugênico (ALBERTINI et al., 2000).

Nos últimos 30 anos, o teste de aberrações cromossômicas tem sido largamente utilizado no monitoramento ocupacional e ambiental como biomarcador de efeitos genotóxicos induzidos por carcinógenos (HAGMAR et al., 2004). Desta maneira, este teste tem apresentado posição de destaque entre a bateria de testes recomendada por lei para avaliação de agentes genotóxicos (MATEUCA et al., 2006).

Segundo Mateuca et al. (2006), as vantagens do testes de aberrações cromossômicas não se restringem apenas a possibilidade de identificação dos diferentes tipos de aberrações cromossômicas, mas também pela possibilidade de detecção de alterações no índice mitótico, podendo assim estimar precisamente os modos de ação dos químicos testados.

O acúmulo de dados devido à larga aplicação do teste de aberrações cromossômicas nos últimos anos tem sido satisfatório para a análise da correlação entre a mensuração de aberrações e subsequente desenvolvimento de câncer (BONASSI et al., 2002). Sabe-se hoje que pessoas com elevadas frequências de aberrações cromossômicas apresentam risco significativo de desenvolvimento de câncer (OBE et al., 2002).

Devido ao potencial de detectar precoces efeitos de mutágenos e carcinógenos e a capacidade de prever o câncer, testes citogenéticos se tornarão, a cada dia, mais importantes, ressaltando cada vez mais sua utilização para detecção de contaminantes ambientais.

### 3.7. Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares

O Teste do Micronúcleo vem sendo considerado, por muitos autores, como uma das mais promissoras técnicas de avaliação de efeitos mutagênicos induzidos por agentes químicos (LANDOLT e KOCAN, 1983; HEDDLE et al., 1983; RIBEIRO, 2003; MATSUMOTO et al., 2006). Tal fato se deve aos micronúcleos serem resultantes de danos, reparados ou reparados erroneamente, nas células parentais (RIBEIRO, 2003), sendo facilmente visualizados nas células filhas como uma estrutura similar ao núcleo principal, porém, de tamanho reduzido.

Sabe-se que micronúcleos são resultados de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal durante o ciclo de divisão celular (FENECH, 2002). Fragmentos cromossômicos podem ser derivados de quebras cromossômicas decorrentes de ação clastogênica de uma substância (YI et al., 2003) ou a partir de aberrações cromossômicas como as pontes cromossômicas que podem se romper e originar fragmentos acêntricos (FISKESJÖ, 1993). Por outro lado, perdas cromossômicas são conseqüências da inativação dos fusos mitóticos durante a divisão celular, conferindo a ação aneugênica de uma substância (UHL et al., 2003).

Contudo, para uma estrutura ser considerada um micronúcleo ela deve ser morfológicamente semelhante ao núcleo principal, porém, de tamanho reduzido, com diâmetro entre 1/16 à 1/3 do núcleo principal. Além disso, outras características também devem ser consideradas como a não refringência, a não conexão ao núcleo principal e a presença de uma mesma intensidade de

coloração do núcleo principal, embora algumas vezes o micronúcleo possa apresentar coloração um pouco mais intensa (FENECH, 2000).

O Teste do Micronúcleo não é considerado uma técnica vantajosa apenas pela simplicidade de análise de resultados, mas também pela possibilidade de aplicação em qualquer população celular em proliferação, não sendo necessário o conhecimento cariotípico prévio do organismo-teste utilizado (HAYASHI et al., 1998). Desta maneira, o teste de micronúcleo foi, originalmente, desenvolvido com a utilização de eritrócitos policromáticos de medula óssea de roedores (SCHMIDT, 1976), e mais tarde estendido para eritrócitos circulantes (MACGREGOR et al., 1980). A partir de então, modificações no teste de micronúcleo têm sido realizadas com a finalidade de aplicação em um maior número de organismos-teste.

Dentre as modificações realizadas para tal teste, Hooftman e Raat (1982) propuseram adaptações que permitiram a aplicação em peixes, sendo denominado de “teste de micronúcleo písceo”. Tal modificação tem sido proposta como uma técnica rápida e barata para avaliação da contaminação ambiental (HOSE et al., 1987; AL-SABIT e METCALF, 1995; PRZYGODA, 1998; GRISOLIA e STARLING, 2001; ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2003; 2005; RUSSO et al., 2004; UNDROIU, 2006; BARSINIÉ et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA e FONTANETTI, 2006).

Eritrócitos de peixes têm se mostrado muito adequados para este teste, principalmente, pela facilidade de análise de micronúcleos, uma vez que se trata de eritrócitos nucleados (AL-SABTI e METCALFE, 1995). Além disso, a facilidade de obtenção de sangue periférico de peixes torna a técnica de

micronúcleo ainda mais simples e rápida (GRASSI, 2002), característica necessária para avaliação da contaminação ambiental.

Contudo, o teste do micronúcleo aplicado em qualquer tipo de célula é dependente do ciclo celular, uma vez que os danos induzidos no primeiro ciclo serão visíveis como micronúcleos no segundo ou subsequente ciclo de divisão celular (TATES et al., 1980). Em geral, a duração do ciclo celular nos organismos depende do tempo necessário para a replicação do DNA e da divisão nuclear. A duração deste ciclo em diferentes tecidos tem sido relatada por diversos autores para mamíferos, porém, poucos dados são encontrados a respeito da duração do ciclo celular em tecidos de peixes teleósteos, principalmente, devido à variação do ciclo ser dependente da temperatura. No entanto, a indução máxima de micronúcleos em espécies de peixes, geralmente, ocorre dentro de 1 a 5 dias após a exposição ao agente estudado (AL-SABIT e METCALFE, 1995).

Anormalidades nucleares vêm sendo relatadas por muitos autores no decorrer da análise de micronúcleos (TOLBERT et al., 1991, 1992; FENECH et al., 1999). Tais anormalidades estão relacionadas a erros durante o ciclo de divisão celular, processos de morte celular (necrose e apoptose) e a efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos induzidos por agentes químicos (NAKANO e OKA, 1991; CORMARK, 1991; TOLBERT et al., 1992; FENECH, 2000). Por estas razões, alguns autores vêm sugerindo que a análise de algumas anormalidades nucleares, como células apoptóticas e necróticas, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares, sejam concomitantemente realizadas com o teste de micronúcleo (FENECH et al., 1999; FENECH, 2000).



Contudo, a relação entre anormalidades nucleares e suas causas, como a indução por agentes genotóxicos e/ou mutagênicos, não é totalmente esclarecidas para os diversos organismos-teste utilizados. Carrasco et al. (1990) descreveu alterações na morfologia nuclear em eritrócitos de peixes, porém, os autores não conseguiram estabelecer correlações significativas entre as alterações encontradas e as áreas poluídas estudadas. No entanto, diversos autores têm utilizado a análise de anormalidades nucleares juntamente com o teste de micronúcleos para o monitoramento ambiental por estes organismos e resultados satisfatórios tem sido relatado (BOMBAIL et al., 2001; PACHECO e SANTOS, 1998; AYLLÓN e GARCIA-VAZQUEZ, 2000; ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2003, HOSHINA, 2005; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA e FONTANETTI, 2006).

### **3.8. Ensaio do cometa**

Nas últimas décadas, diversas metodologias para avaliação de danos ao DNA têm sido desenvolvidas e, dentre elas, o ensaio do cometa tem sido considerado como uma das mais eficientes ferramentas para tal finalidade. Este destaque é conferido por ser caracterizado como um teste sensível, rápido e econômico, além de requerer poucas células para a sua execução (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998; SASAKI et al., 1997; KOSZ-VNENCHAK e ROKOSZ, 1997). Desta maneira, o ensaio do cometa tem sido indicado como um método apto a detectar mudanças muito pequenas na estrutura do DNA, tais como as atividades de reparo, o modo de seu empacotamento e sua integridade (KOPPEN et al., 1999).

Östling e Johanson (1984) foram os primeiros pesquisadores a desenvolverem uma metodologia capaz de mensurar danos no DNA em células individuais com a utilização da eletroforese em gel. Para o sucesso de tal técnica, os pesquisadores consideraram o comportamento da molécula de DNA em células individualizadas, bem como sua organização dentro do núcleo. Deste modo, as células foram embebidas em agarose e dispostas em uma lâmina de microscopia, tendo as membranas lisadas por detergentes, as proteínas nucleares extraídas por altas concentrações de sais e, conseqüentemente, a liberação do DNA. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à eletroforese sob condições neutras e os nucleóides migraram em direção ao ânodo. As células com alta freqüência de quebras no DNA apresentaram migrações em diferentes velocidades pelos diferentes fragmentos de DNA com diferentes tamanhos, gerando a aparência de uma cauda de cometa. Ao contrário, as células sem ou com baixa freqüência de danos não apresentaram essas caudas. Contudo, foi constatado pelos autores que a realização da técnica sob condições neutras apresentou algumas limitações, como apenas a possibilidade de detecção de quebras de fita dupla e de ligações cruzadas.

Mais tarde, Singh et al. (1988) propuseram adaptações no ensaio do cometa para realização do mesmo em condições alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ), aumentando a eficiência da técnica. O ensaio do cometa em condições alcalinas permite, além da detecção de quebras de fita simples e ligações cruzadas, a observação de quebras de dupla-fita, sítios álcali-lábeis, sítios abásicos e excisão de sítios incompletos de reparo (ROJAS et al., 1999; TICE

et al., 2000; COLLINS, 2004). Esse aumento da sensibilidade do teste foi possível pelo fato de a dupla fita de DNA, quando exposta a pH extremamente alcalino, sofrer desnaturação, separando-se em fitas simples (GONTIJO e TICE, 2003).

Mais recentemente, McNamee et al. (2000) propuseram modificações nos métodos ortodoxos de célula única, fazendo com que várias células fossem processadas de uma só vez, aumentando a eficiência da técnica sem comprometer a confiabilidade da mesma. Os resultados obtidos por eles mostraram-se similares àqueles previamente reportados pela aplicação da metodologia convencional do ensaio do cometa.

Monteith e Vanstone (1995) compararam o potencial do ensaio do cometa, como teste de genotoxicidade, com outras técnicas *in vitro* (aberrações cromossômicas e mutações em células pulmonares V79 de hamsteres chineses) e *in vivo* (micronúcleos de medula óssea em camundongos e reparo de DNA em ratos), demonstrando que o cometa tem a habilidade de detectar danos no DNA, tanto quanto as demais técnicas.

O ensaio do cometa, por suas diversas vantagens já citadas, tem se mostrado uma técnica adequada para o biomonitoramento ambiental, bem como para a genética toxicológica em geral (TICE et al., 1995). Desta maneira, tal técnica tem sido considerada eficiente na detecção da genotoxicidade de contaminantes aquáticos (KOSZ-VNENCHAK e ROKOSZ, 1997; SASAKI et al., 1997; AVISHAI et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2004), sendo aplicada em diversos organismos, sejam estes provenientes de estudos de campo (AL-

SABIT et al., 1995; HAYASHI et al., 1998; BOMBAIL et al., 2001) ou de ensaios laboratoriais (PANDRANGI et al., 1995; BELPAEME et al., 1998).

A aplicação do ensaio do cometa em eritrócitos de várias espécies de peixes tem se mostrado muito satisfatória, destacando a sensibilidade destas células aos efeitos genotóxicos induzidos por agentes químicos (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998; NACCI et al., 1996; BELPAEME et al., 1996). No entanto, a aplicação do ensaio do cometa em peixes não se restringe apenas ao tipo celular mencionado acima, podendo também ser aplicado em células hepáticas, branquiais, renais e intestinais (NACCI et al., 1996; BELPAEME et al., 1998; ABD-ALLAH et al., 1999).

O ensaio do cometa também tem se mostrado uma ferramenta bastante útil na avaliação da genotoxicidade de área impactadas por petróleo e seus derivados. Exemplo disso pode ser visto nos estudos de HAMOUTENE et al. (2002) pela aplicação da técnica em invertebrados expostos a águas contaminadas por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, que mesmo baixas concentrações de hidrocarbonetos são capazes de gerar lesões no DNA de organismos expostos. Além deste, outros trabalhos vêm mostrando que a aplicação do ensaio do cometa em áreas impactadas por petróleo revelam danos no DNA (SOUZA, 2005; HOSHINA, 2005).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **4.1. Localização da Área de Estudo e dos Pontos de Coleta das Amostras de Águas e Sedimentos**

As amostras de águas e sedimentos foram coletadas em julho de 2005 (estação de seca) e fevereiro de 2006 (estação chuvosa), no rio Guaecá (área afetada por vazamento de oleoduto) e Ribeirão SABESP (afluente do rio Guaecá não afetado pelo vazamento de óleo), localizados no Município de São Sebastião - SP. O estabelecimento dos pontos de coleta se deu com base nos pontos previamente estabelecidos pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), empresa responsável pela fiscalização da área. Desta forma, as amostras foram coletadas em 4 pontos distintos, ao longo dos 8 Km do rio Guaecá, e 1 ponto do rio ribeirão SABESP, como descrito a seguir:

- ponto 1 (P1), nascente do rio Guaecá e local de afloramento do óleo vazado (23°48'21.3"S/45°25'50.3"W);
- ponto 2 (P2), principal ponto de contenção e remoção de óleo do rio Guaecá (23°48'30.7"S/45°26'34.1"W);

- ponto 3 (P3), ponto de menor declividade do rio Guaecá;
- ponto 4 (P4), foz do rio Guaecá e último ponto de contenção e monitoramento permanente pela CETESB ( $23^{\circ}49'25.9''S/45^{\circ}27'08.4''W$ );
- ponto 5 (P5), ponto do rio Ribeirão Sabesp, próximo ao local de captação da SABESP.

A melhor visualização da área de estudo e dos pontos de coleta está apresentada na Figura 9.



**Figura 9.** Imagem de satélite de parte do Município de São Sebastião-SP, com destaque para a Bacia de Guaecá, mostrando a localização dos pontos de coleta do rio Guaecá e do Ribeirão SABESP.

#### 4.2. Procedimentos Utilizados para a Realização da Coleta das Amostras de Águas e Sedimentos

Galões plásticos novos, com capacidade de 20L, e recipientes plásticos novos, de capacidade de 5L, foram utilizados, respectivamente, para a coleta das amostras de águas e sedimentos destinadas aos ensaios de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. Para as amostras de águas destinadas às análises químicas de hidrocarbonetos, frascos de vidro de 2L, previamente tratados com HCl 50%, foram utilizados para coleta. Para as amostras de águas destinadas às análises químicas de elementos inorgânicos, foram também utilizados frascos de vidro de capacidade de 2L, sem prévio tratamento com HCl 50%.

O procedimento das coletas das amostras de águas foi realizado segundo a metodologia de coleta de águas superficiais, descrita pela CETESB (1987), como segue:

(1) Primeiramente, os galões foram submergidos nas águas do local de coleta, para uma lavagem previa do mesmo com a água do ponto a ser coletado;

(2) Após este procedimento, os recipientes foram, novamente, submergidos nas águas dos respectivos pontos, porém, em locais correspondentes aos pontos médios da largura do rio, até o completo preenchimento de seu volume;

(3) Após a coleta das amostras de águas, os galões foram, imediatamente, lacrados e refrigerados a  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , para o transporte.

A coleta das amostras de sedimentos foi realizada segundo a Norma de amostragem de resíduos sólidos de amostras compostas da ABNT NBR 10007:2004.

A obtenção de amostras compostas é caracterizada pela misturas de sub-amostras coletadas em toda a extensão de um mesmo ponto do rio. Este tipo de coleta foi adotado neste trabalho, por ser considerado o mais indicado para a representação de amostras de sedimentos de rios. Desta maneira, a coleta das amostras de sedimentos foi procedida da seguinte forma:

(1) sub-amostras de 200 gramas de sedimentos foram coletadas em 4 pontos ao longo da largura do rio, para cada ponto de coleta, e sempre em uma profundidade de 0 - 5 cm do sedimento;

(2) as sub-amostras de cada ponto de coleta, foram misturadas e homogenizadas, para a obtenção da amostra composta daquele ponto;

(3) as amostras compostas foram dispostas em recipientes plásticos, que foram imediatamente refrigerados à  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , para o seu transporte.

## **4.2. Material Biológico**

Como organismos-teste, utilizou-se sementes da espécie de *Allium cepa* (variedade baia periforme), marca<sup>®</sup> Topseed, e espécimes de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), popularmente conhecido como tilápia do Nilo.

## **4.3. Métodos**

### **4.3.1. Análise das Variáveis Físico-Químicas**



As análises das variáveis físico-químicas das amostras de águas (pH, temperatura, salinidade, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido) foram realizadas, no momento da coleta, com o auxílio do aparelho multi-sensor da marca HORIBA, modelo U10.

#### **4.3.2. Análises de Químicas de Inorgânicos**

As análises de elementos inorgânicos das amostras de águas e de sedimentos coletados no rio Guaecá e Ribeirão SABESP foram realizadas pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Piracicaba. Estas análises consistiram na detecção e quantificação dos elementos inorgânicos através do método de espectrometria de emissão ótica, com fonte de plasma (ICP OES).

#### **4.3.3. Análise de Química de Hidrocarbonetos**

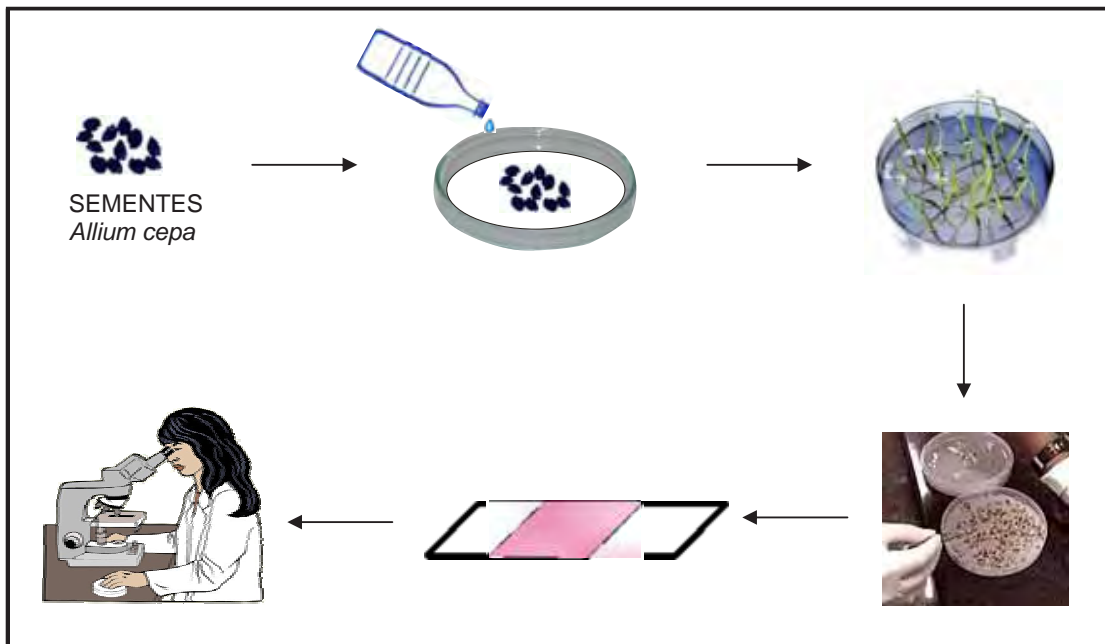
Análises químicas de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPHs) e de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) de amostras de água coletadas no rio Guaecá e Ribeirão SABESP foram realizadas pela empresa Analytical Technology, São Paulo-SP. Para a análise de TPHs, foi seguido o método USEPA 8015, o qual utiliza a técnica de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (Gcfid). A análise de PAHs seguiu o método USEPA 8270, com a utilização da técnica de cromatografia gasosa com detector de massas (Gcms), a qual é capaz de detectar os seguintes PAHs: 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(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno.

#### 4.3.4. Bioensaios com sementes de *Allium cepa*

Sementes de cebola, dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro, foram submetidas à germinação nas amostras de águas e nos extratos solubilizados dos sedimentos, obtidos segundo a Norma da ABNT NBR 10006:2004, coletados nos rios Guaecá e Ribeirão SABESP. Os tratamentos controles foram realizados pela mesma procedência descrita acima, sendo utilizada água milli-Q para o controle negativo e  $4 \times 10^{-4}$ M de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3) para o controle positivo. Apenas para a amostra do ponto 1, coletada em julho de 2005, foi também realizado um tratamento com esta amostra filtrada, devido a grande quantidade de frações não-solúveis de óleo presente. Para a germinação das sementes, foi utilizada uma placa de Petri nova por tratamento.

Radículas com cerca de 2.0 cm de comprimento foram coletadas e fixadas em ácido álcool-acético (3:1 – v/v) por 24 h em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, realizou-se a troca por fixador recém-preparado, para armazenamento das raízes à 4°C, até a sua utilização na confecção das lâminas.



**Figura 10:** Esquema do ensaio de *Allium cepa*.

#### 4.3.4.1. Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em Células Meristemáticas de *Allium cepa*

Os testes de Aberração de Cromossômicas (AC) e de Micronúcleos (MN) em células meristemáticas de radículas de *Allium cepa*, foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com algumas modificações.

As raízes fixadas foram lavadas em 3 banhos de água destilada, por aproximadamente 5 minutos, sendo posteriormente submetidas a hidrólise ácida em HCl 1 N a 60°C durante 11 minutos, seguidas por novos banhos em água destilada. Após esta etapa, as raízes foram ligeiramente secas em papel de filtro e o material foi transferido para frascos escuros, para coloração em reativo de Schiff, por aproximadamente 2 horas, segundo metodologia descrita por FEULGEN e ROSSENBECK (1924, *appud* MELLO e VIDAL, 1978).

Decorrido este tempo, as raízes foram lavadas em água destilada, até a total retirada do corante. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram, suavemente, esmagados em uma gota de carmim acético (2%) e recobertos com lamínulas. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética, para serem, posteriormente, analisadas.

Para a análise das aberrações cromossômicas, diferentes tipos de aberrações foram considerados (perdas, fragmentos, pontes, atrasos, aderências cromossômicas, entre outros) nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase). No entanto, para a avaliação das AC como um único *endpoint* todas as diferentes aberrações foram reunidas em um só grupo. A análise de micronúcleos, nestas células, foi considerada como outro parâmetro de avaliação, não sendo agrupada junto com as aberrações cromossômicas. O Índice mitótico (IM), relacionado com o número de células em divisão, constituiu um terceiro parâmetro de avaliação.

A análise de todos estes parâmetros se deu pela contagem de cerca de 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina para um total de 10 lâminas. Análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, o qual possibilita a comparação dos tratamentos com controle negativo, bem como dos tratamentos entre si, a 0,05 de nível de significância. Os melhores resultados foram fotodocumentados em microscópio Carl Zeiss, com a objetiva de 100x e ocular 10, conferindo um aumento de 1000x, para serem utilizados na apresentação dos resultados.

#### 4.3.4.2. Teste de Micronúcleos em Células F<sub>1</sub> de *Allium cepa*

Para a análise de micronúcleos em células F<sub>1</sub> (região não-meristemática), foi seguido o protocolo estabelecido por Ma et al. (1995).

Esta análise foi aplicada somente para as amostras que induziram AC em células dos meristemas radiculares de *A. cepa* com valores significativos (pontos 1 e 3 – coleta de julho de 2005), além dos controles negativos e positivos. Para a análise, as raízes foram submetidas à coloração em reativo de Schiff como descrito anteriormente. As lâminas foram preparadas por esmagamento suave da região F<sub>1</sub>, que está localizada a 1 milímetro acima da região meristemática, seguido do procedimento citado para região meristemática. A contagem de micronúcleos e a análise estatística foram seguidas, de acordo com o descrito acima para as lâminas de células meristemáticas.

#### 4.3.5. Bioensaios com *Oreochromis niloticus*

Espécimes de *Oreochromis niloticus* foram transferidos do tanque de criação de peixes, localizado no Jardim Experimental do Instituto de Biociências da UNESP – campus de Rio Claro, para o Laboratório de Toxicidade de Águas, do mesmo Instituto, onde foram aclimatados a 23°C, com sistema de filtragem e aeração. Posteriormente, para cada bioensaio realizado, os espécimes foram divididos aleatoriamente em 8 grupos experimentais com 5 peixes cada.

Os grupos experimentais foram dispostos em 8 aquários contendo 15L cada, sendo 2 para os controles (negativo e positivo), 1 para a amostra do

Ribeirão SABESP, 4 para as amostras do rio Guaecá e 1 para a amostra diluída em água, na proporção 3:1 – v/v, do P1 do rio Guaecá, devido a grande quantidade de óleo presente nesta amostra. Para as demais amostras não houve necessidade de realização de ensaios com diluições. Como controle negativo foi utilizado água de poço artesiano e para controle positivo foi injetado, intraperitonealmente, em cada espécime deste grupo, metilmetano sulfonato (5µl/kg, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3). Após completar 72 horas de tratamento, amostras de sangue, de todos os indivíduos, foram coletadas por punção cardíaca, utilizando seringas descartáveis tipo insulina (1mL) previamente lavadas com heparina.

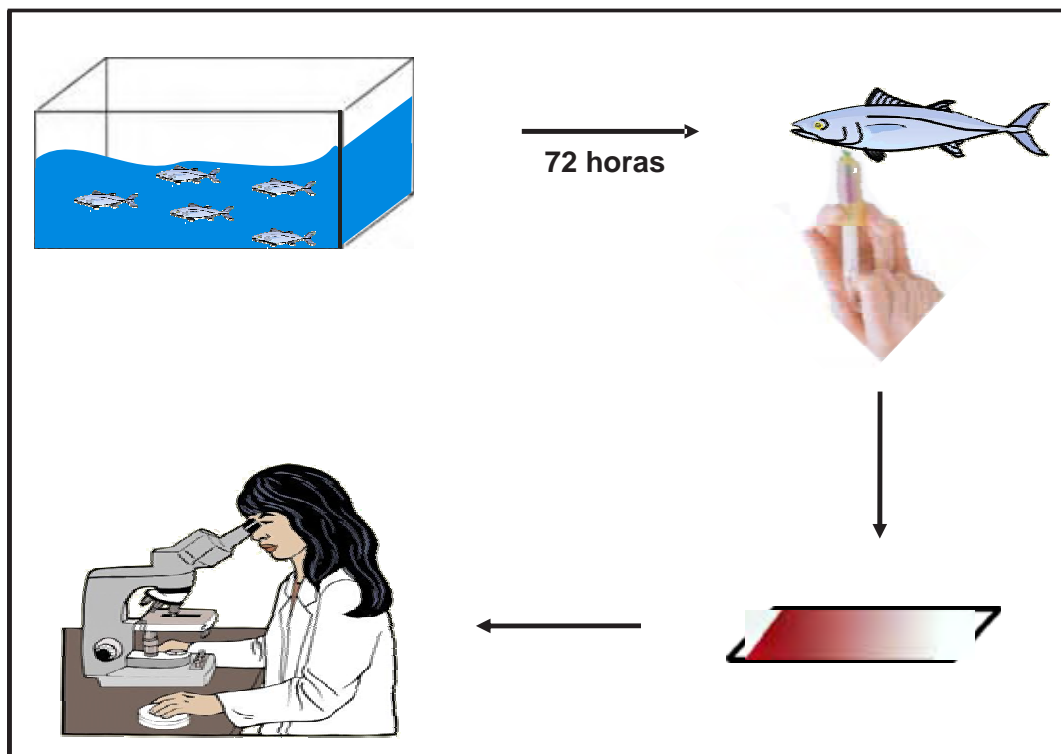
#### 4.3.5.1. Teste do Micronúcleo

A confecção das lâminas foi feita por meio da técnica de esfregaços (extensões sanguíneas), sendo a primeira gota descartada com a finalidade de evitar contaminação do material. Foram realizadas três extensões sanguíneas para cada espécime de *Oreochromis niloticus*.

As lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e, após 24 horas, submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N a 60°C, por 11 minutos. Imediatamente após a hidrólise, as lâminas foram submetidas à coloração em reativo de Schiff por duas horas (MELLO e VIDAL, *op. cit.*).

Foram analisados 1000 eritrócitos por peixe, nos quais foram determinadas as frequências de células micronucleadas e portadoras de anormalidades nucleares, segundo descrição de Carrasco et al. (1990). A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, o qual possibilita a

comparação dos tratamentos com o controle negativo, bem como dos tratamentos entre si, a 0,05 de nível de significância. Os melhores resultados foram fotodocumentados para serem utilizados na apresentação dos resultados.



**Figura 11.** Esquema do ensaio de *Oreochromis niloticus* e a preparação das lâminas para o teste do Micronúcleo.

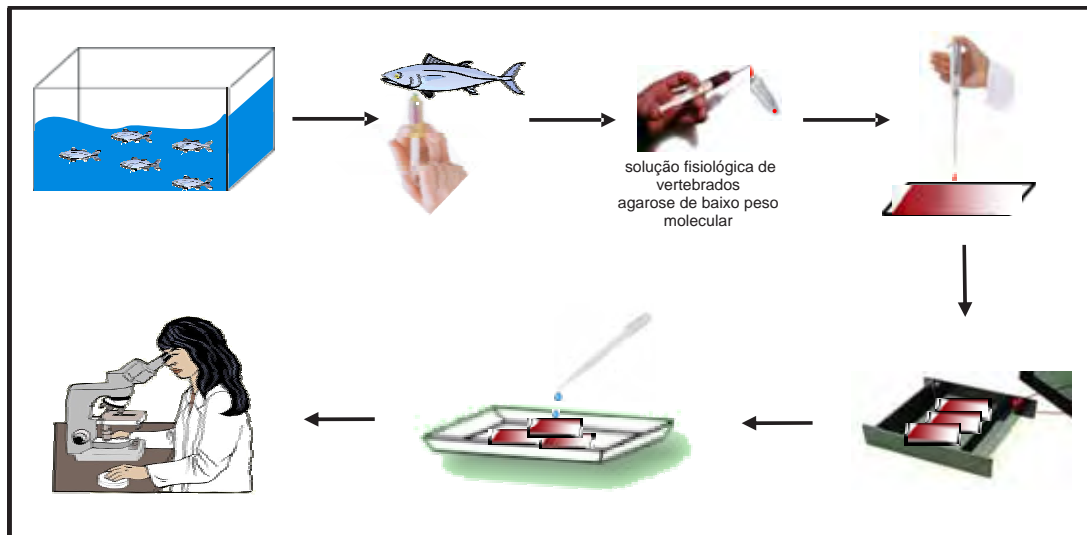
#### 4.2.5.2. Ensaio Cometa

Para realização do ensaio do cometa utilizou-se a metodologia descrita por Singh et al. (1988), com algumas modificações. Primeiramente, as lâminas foram mergulhadas em agarose normal 1,5% a 60°C, secas e armazenadas em geladeira. Amostras de 3µL de sangue de peixes foram diluídas em 1000µL de

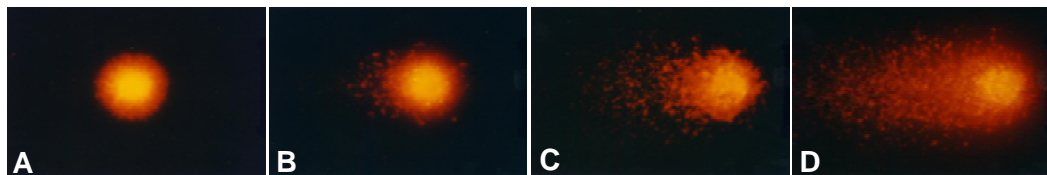
solução fisiológica de vertebrados e as lâminas montadas com 10 $\mu$ L desta suspensão celular adicionados a 120 $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em uma solução de lise (1mL de triton X-100, 10mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, ~8,0g de NaOH sólido, 10g de lauryl sarcosinato sódico para 1L), em geladeira por, no mínimo, 1 hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese contendo tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH 12.1) à 4°C, na qual permaneceram por 20 minutos, antes da corrida de eletroforese em corrente 25V e 300mA. Decorrido os 20 minutos de corrida, as lâminas foram neutralizadas em tampão (Tris 0,4M-HCl, pH7,5) por 15 minutos, secas a temperatura ambiente e fixadas com etanol 100% por 10 minutos. A coloração foi realizada com brometo de etídio (0.02mg/mL).

Para cada peixe foram analisados, aleatoriamente, 100 nucleóides, com a utilização de microscópio de fluorescência Leica, filtro B - 3<sup>4</sup> (excitação:  $\lambda$ =420n-490nM, barreira:  $\lambda$ =520nM), em objetiva de 40x. Os nucleóides foram classificados, visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos em classe 0, nenhum ou pouco dano; classe 1, pequeno dano; classe 2, médio dano; classe 3, grande dano (KOBAYASHI et al., 1995). Os escores de cada tratamento foram verificados e submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis para comparação de danos entre os tratamentos e o controle negativo, bem como dos tratamentos entre si.





**Figura 12.** Esquema da realização do ensaio de *Oreochromis niloticus* e a aplicação da técnica do ensaio do cometa.



**Figura 13.** Classes de cometa em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* após a exposição as águas impactadas por hidrocarbonetos de petróleo do rio Guaecá. **A.** Classe 0; **B.** Classe 1; **C.** Classe 2; **D.** Classe 3.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

---

Neste trabalho, foram avaliados os parâmetros físico-químicos e químicos (inorgânicos e orgânicos) para as amostras de águas e análises químicas de substâncias inorgânicas para as amostras de sedimentos do rio Guaecá e do Ribeirão SABESP, ambos situados na Serra do Mar, Município de São Sebastião-SP.

As amostras de água e sedimento coletadas nestes rios foram utilizadas em ensaios biológicos (genotoxicidade e mutagenicidade), para estimar as possíveis ações dos contaminantes presentes nas mesmas.

Para a avaliação das amostras de água, foram aplicadas as metodologias de Aberrações cromossômicas e de Micronúcleos em sistema teste de *A. cepa* e de Micronúcleo e de ensaio do cometa em sistema teste de *Oreochromis niloticus*. Para as amostras de sedimentos, foi aplicada, apenas, a metodologia de Aberrações cromossômicas em *A. cepa*.

### **5.1. Análises de parâmetros físico-químicos**

Os resultados obtidos das análises dos parâmetros físico-químicos estão reunidos nas Tabelas 4 e 5.

**Tabela 4.** Parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de águas coletadas em julho de 2005 (estação seca).

Pontos de coleta	pH	Temperatura (°C)	Salinidade (%)	Condutividade (mS/cm)	turbidez	Oxigênio dissolvido (mg/L)
ponto 1	7,05	16,7	0,01	0,311	95	0,84
ponto 2	7,89	16,6	0	0,133	0	7,76
ponto 3	8,07	16,6	0	0,80	0	10,50
ponto 4	7,70	17,6	0,14	2,88	2	8,6
ponto 5	8,27	18,6	0	0,066	0	10,07

**Tabela 5.** Parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de águas coletadas em fevereiro de 2006 (estação chuvosa).

Pontos de coleta	pH	Temperatura (°C)	Salinidade (%)	Condutividade (mS/cm)	turbidez	Oxigênio dissolvido (mg/L)
ponto 1	7,29	25,2	0	0,179	284	4,51
ponto 2	6,97	24,3	0	0,133	16	6,15
ponto 3	7,05	24,9	0	0,86	8	7,27
ponto 4	6,96	26,2	0	0,118	8	7,70
ponto 5	6,9	24,7	0	0,064	5	8,50

Segundo os órgãos ambientais, como a Companhia de Tecnologia e Saneamento do Estado de São Paulo (CETESB, 2007), as análises de parâmetros físicos e químicos são considerados fundamentais para a avaliação de qualidade de águas. Adicionalmente, tais análises têm se mostrado também essenciais na certificação dos resultados obtidos por testes biológicos empregados na área de monitoramento ambiental. Desta maneira, análises físico-químicas tem sido realizadas concomitantemente aos ensaios biológicos, para a certificação das reações dos organismos-teste aos agentes químicos estudados.

O potencial hidrogeniônico (pH) é considerado um importante parâmetro físico no controle de qualidade de águas, principalmente, quando estas são destinadas ao abastecimento de centros urbanos. Além disso, o pH se destaca

por ser um fator de influência em grande parte das reações químicas (FREITAS et al., 2002). De acordo com os resultados expressos nas Tabelas 1 e 2, foi possível observar que não houve grandes variações entre os valores de pH obtidos para as amostras das águas coletadas, sendo estes sempre próximos ao valor de pH neutro.

A temperatura é um parâmetro que está ligado à quantidade de energia térmica ou calor de um sistema. Elevadas temperaturas correspondem a um aumento da velocidade de agitação térmica dos átomos. Desta maneira, a temperatura exerce um importante papel na velocidade de reações químicas e no estado físico da matéria (ESTEVES, 1998). As variações de temperatura encontradas para as águas do rio Guaecá foram compatíveis com a sazonalidade, ou seja, no inverno (julho de 2005) as temperaturas foram mais baixas do que as registradas para o verão (fevereiro de 2006) (Tabelas 1 e 2).

A condutividade é um parâmetro físico que pode trazer importantes informações quanto a presença de sais dissolvidos. Pode-se inferir que, quanto maior o valor de condutividade, maior é a quantidade de matéria iônica dissolvida (ESTEVES, 1998). Pela análise dos resultados obtidos, observamos que o valor de condutividade foi consideravelmente superior apenas para a amostra de água do ponto 4 do rio Guaecá, coletada em julho de 2005 (Tabela 1). No entanto, este resultado parece não ter relação com o impacto do vazamento do oleoduto OSBAT e sim pela localização deste ponto, pois o mesmo corresponde a foz do rio, tendo assim influência de águas salgadas. Além disso, por se tratar de uma amostra coletada no período de seca, era de se esperar um valor elevado de sua condutividade, uma vez que neste período

o volume de água do rio é menor e os componentes normais, ou possíveis poluentes ambientais existentes encontram-se mais concentrados.

A salinidade encontra-se intimamente relacionada à condutividade, pois é uma medida da quantidade de sais presentes em uma amostra (ESTEVES, 1998). Desta maneira, nossas análises para os valores de salinidade, mostraram que apenas o ponto 4 registrou valor elevado (Tabela 1), dentre as amostras coletadas em julho de 2005.

A turbidez de um líquido está relacionada com a presença de partículas em suspensão, as quais podem ser decantáveis a curto, médio e longo prazo, dependendo do seu tamanho e de sua densidade. De maneira geral, os componentes que conferem turbidez à água enquadram-se em células microbianas, argilas, matéria parcialmente umificada, matéria orgânica em decomposição e substâncias químicas formadoras de precipitados (FREITAS et al., 2002). Nossos dados mostraram valores elevados de turbidez nas amostras de água do ponto 1 do rio Guaecá, coletadas em julho de 2005 e fevereiro de 2006 (Tabelas 1 e 2). Tais valores, como já mencionado para a condutividade, não estão relacionados ao impacto do vazamento de óleo e sim às características do ponto de coleta. O ponto 1, corresponde a nascente do rio Guaecá, é caracterizado por pequeno volume de água e presença de sedimento argiloso, sendo este último o principal fator relacionado com os valores elevados de turbidez registrados.

O oxigênio dissolvido (OD), medido em miligramas por litro (mg/l) de água analisada, provém, em geral, da dissolução do oxigênio atmosférico e também da produção liberada por alguns microorganismos presentes na água.

Tal fator constitui-se de um importante parâmetro físico-químico de análise de qualidade de águas, uma vez que ele é caracterizado como fator vital para os organismos aquáticos e, conseqüentemente, para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas aquáticos (CETESB, 2007).

Nossos dados mostraram valores baixos de OD apenas para a amostra de água coletada no ponto 1 do rio Guaecá, da coleta de julho de 2005 (Tabela 1). Ao contrário dos resultados mencionados anteriormente, provavelmente, este valor esteja relacionado ao impacto do óleo, devido a grande quantidade de óleo presente nas águas do ponto 1 do rio Guaecá. Grandes quantidades de óleo podem formar camadas densas na superfície da água, impedindo as trocas gasosas e, conseqüentemente, a oxigenação promovida pela obtenção de oxigênio atmosférico (CETESB, 2007). Por outro lado, este baixo valor de OD pode estar relacionado a uma intensa atividade microbiana, a qual, com a finalidade de quebrar as moléculas de hidrocarbonetos de petróleo no processo de biodegradação, aumenta o consumo de oxigênio, promovendo uma demanda bioquímica de oxigênio dissolvido (DBO).

## 5.2. Análises Químicas de Inorgânicos

Os resultados obtidos para as análises de inorgânicos estão reunidos nas Tabelas 6, 7, 8 e 9.

**Tabela 6.** Análise química de inorgânicos nas amostras de águas coletadas em junho de 2005 (estação de seca) no rio Guaecá e Ribeirão SABESP.

pontos metais (mg/L)	Ca	Mg	Na	Al	Fe	K	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
ponto 1	12,1	9,01	6,0	<0,10	10,5	5,0	1,9
ponto 2	3,31	3,13	18,1	<0,10	<0,10	2,3	6,4
ponto 3	2,13	1,79	10,4	<0,10	<0,10	1,5	3,5
ponto 4	22,7	65,6	577	<0,10	<0,10	21,6	138
ponto 5	1,38	1,24	7,2	<0,10	<0,10	1,1	2,5

pontos / metais (mg/L)	P	Si	Cu	Zn	Mn	Ba	B
ponto 1	<0,20	<0,10	<0,01	0,07	6,44	0,03	0,214
ponto 2	<0,20	4,75	<0,01	<0,04	0,14	<0,01	0,274
ponto 3	<0,20	3,97	<0,01	<0,04	0,06	<0,01	0,214
ponto 4	<0,20	6,02	<0,01	<0,04	0,06	0,20	0,133
ponto 5	<0,20	6,22	<0,01	<0,04	<0,01	<0,01	0,171

pontos / metais (mg/L)	Cd	Cr	Ni	Pb	Sr	V	Mo
ponto 1	<0,005	<0,005	<0,005	<0,02	0,098	<0,005	<0,01
ponto 2	<0,005	<0,005	<0,005	<0,02	0,047	<0,005	<0,01
ponto 3	<0,005	<0,005	<0,005	<0,02	0,029	<0,005	<0,01
ponto 4	<0,005	<0,005	<0,005	<0,02	0,347	<0,005	<0,01
ponto 5	<0,005	<0,005	<0,005	<0,02	0,019	<0,005	<0,01

**Tabela 7.** Análise química de inorgânicos nas amostras de sedimentos coletadas em junho de 2005 (estação de seca) no rio Guacá e Ribeirão SABESP.

pontos / metais (mg/L)	Ca	Mg	Na	Al	Fe	K	P
ponto 1	0,28	0,75	0,59	5,70	4,79	1,16	396
ponto 2	0,27	0,62	0,81	5,41	3,95	1,47	318
ponto 3	0,61	0,45	1,09	6,16	6,81	2,62	525
ponto 4	0,59	0,45	1,52	3,74	3,10	1,51	497
ponto 5	0,94	0,55	1,56	6,71	3,89	2,57	531

pontos / metais (mg/L)	Si	Cu	Zn	Mn	Ba	Mo	Cd
ponto 1	219	39,4	88,6	905	390	<2,50	<0,25
ponto 2	63	17,5	63,7	650	402	<2,50	<0,25
ponto 3	51	2,7	50,5	826	587	<2,50	<0,25
ponto 4	116	7,2	37,4	452	470	<2,50	<0,25
ponto 5	35,2	8,58	48,1	517	642	<2,50	<0,25

pontos / metais (mg/L)	Cr	Ni	Pb	Co	Sr	V
ponto 1	109	54,0	10,5	28,8	29,0	115
ponto 2	88,6	29,6	13,3	18,4	44,7	94,5
ponto 3	71,0	16,0	15,8	18,3	90,5	147
ponto 4	36,7	11,4	9,95	13,0	87,3	70,8
ponto 5	39,0	12,3	16,1	13,8	129	86,3

**Tabela 8.** Análise química de inorgânicos nas amostras de águas coletadas em fevereiro de 2006 (estação chuvosa) no rio Guaecá e Ribeirão SABESP.

pontos / metais (mg/L)	Ca	Mg	Na	Al	Fe	K	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>
ponto 1	10,5	6,6	27,8	<0,10	0,8	5,4	6,2
ponto 2	6,0	2,8	26,3	<0,10	0,4	3,2	10,6
ponto 3	4,1	1,5	19,1	<0,10	0,2	2,5	8,3
ponto 4	5,1	2,1	24,3	<0,10	0,2	2,8	9,1
ponto 5	3,1	1,8	20,9	<0,10	<0,05	2,6	7,9

pontos / metais (mg/L)	P	Si	Cu	Zn	Mn	Ba	B
ponto 1	<0,20	7,0	<0,01	<0,10	1,49	0,04	0,03
ponto 2	<0,20	14,0	<0,01	<0,10	0,15	0,02	0,02
ponto 3	<0,20	9,9	<0,01	<0,10	0,07	0,01	0,02
ponto 4	<0,20	9,9	<0,01	<0,10	0,09	0,02	0,02
ponto 5	<0,20	7,0	<0,01	0,1	0,04	0,01	0,02

pontos / metais (mg/L)	Cd	Cr	Ni	Pb	Sr	V	Mo
ponto 1	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,10	<0,01	<0,01
ponto 2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,04	<0,01	<0,01
ponto 3	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,03	<0,01	<0,01
ponto 4	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,03	<0,01	<0,01
ponto 5	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,02	<0,01	<0,01

**Tabela 9.** Análise química de inorgânicos nas amostras de sedimentos coletadas em fevereiro de 2006 (estação chuvosa) no rio Guaecá e Ribeirão SABESP.

pontos / metais (mg/L)	Ca	Mg	Na	Al	Fe	K	P
ponto 1	0,50	0,78	0,81	7,03	4,45	0,50	268
ponto 2	0,27	1,34	0,81	5,41	3,95	0,27	160
ponto 3	0,62	0,76	1,12	7,24	4,25	0,62	398
ponto 4	0,61	0,60	1,20	7,83	3,34	0,61	368
ponto 5	0,54	0,64	0,97	6,78	0,27	0,54	293

pontos / metais (mg/L)	S	Cu	Zn	Mn	Ba	Mo	B
ponto 1	97,7	33,4	72,2	855	481	1,36	<0,50
ponto 2	208	53,3	117	757	575	0,74	13,1
ponto 3	99,2	19,5	63,4	608	563	<0,25	<0,50
ponto 4	142	17,1	51,6	417	562	<0,25	<0,50
ponto 5	59,8	11,6	49	289	582	<0,25	<0,50



pontos metais (mg/L)	Cr	Ni	Pb	Co	Sr	V	Cd
ponto 1	117	53,0	8,84	28,7	70,7	106	<0,25
ponto 2	137	56,3	15,8	32,3	35,7	128	<0,25
ponto 3	73,9	25,3	15,8	18,3	80,7	91,8	<0,25
ponto 4	52,9	20,1	19,0	14,7	83,9	70,3	<0,25
ponto 5	40,6	14,2	18,4	12,2	82,2	61,0	<0,25

Análises químicas de substâncias inorgânicas são, atualmente, imprescindíveis para a avaliação de qualidades de águas, principalmente, se estas são destinadas ao consumo humano ou atividades de lazer. Sabe-se que os seres vivos necessitam de pequenas quantidades de alguns metais para a realização de suas funções vitais. No entanto, níveis excessivos desses elementos podem causar diversos efeitos deletérios à saúde dos organismos vivos. Dentre os metais, a classe dos metais pesados destaca-se pela periculosidade por tratarem-se de elementos altamente reativos com a potencialidade de bioacumulação nos organismos expostos (FREITAS et al., 2002).

Nossos dados não foram conclusivos para a análise química de metais, pois, apesar dos valores obtidos, para a maioria dos elementos, enquadrarem-se aos valores padrões de qualidade de águas (Resolução CONAMA N° 357, de 17 de março de 2005), os que diferiram podem não estar relacionados à contaminação por hidrocarbonetos de petróleo e sim às características naturais das águas do rio Guaecá. Águas da nascente do rio Guaecá, diferentemente dos demais pontos do rio, apresentam altas concentrações de ferro, característica esta decorrente da presença deste metal nos sedimentos do local (comunicação pessoal com funcionários do Instituto Florestal). No entanto, não há registros de avaliações de concentrações de metais para as águas do rio

Guaecá anteriores ao impacto do vazamento do oleoduto OSBAT, o que comprometeu a conclusão exata dos dados obtidos por esta análise.

### 5.3. Análises Químicas de Hidrocarbonetos

Os resultados obtidos para as análises químicas de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPHs) e de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) mostraram presença destes agentes apenas para a amostra de água do ponto 1 do rio Guaecá, coletada em junho de 2005 (Tabelas 10 e 11).

**Tabela 10.** Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPHs) analisados e detectados pela análise química na amostra de água do ponto 1 do rio Guaecá, coletada em junho de 2005 (estação de seca).

Amostra	Ponto de coleta	TPHs	Concentração (µg/l)	LD (µg/l)		
Julho 2005	ponto 1	C10	ND	50,00		
		C11	ND	50,00		
		C12	148.34	50,00		
		C13	148.34	50,00		
		C14	310.40	50,00		
		C15	271.53	50,00		
		C16	261.53	50,00		
		C17	966.30	50,00		
		C18	509.27	50,00		
		C19	ND	50,00		
		C20	ND	50,00		
		C21	ND	50,00		
		C22	ND	50,00		
		C23	ND	50,00		
		C24	ND	50,00		
		C25	ND	50,00		
		C26	ND	50,00		
		C27	ND	50,00		
		C28	ND	50,00		
		C29	ND	50,00		
		C30	ND	50,00		
		C31	ND	50,00		
		C32	ND	50,00		
		<b>Total de n-alcenos</b>			<b>2615.71</b>	
		<b>MCNR</b>			<b>79896.62</b>	

MCNR: Mistura Complexa não Resolvida

ND: não detectado

LD: limite de detecção

**Tabela 11.** Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) analisados e detectados pela análise química na amostra de água do ponto 1 do rio Guaecá, coletada em junho de 2005 (estação de seca).

Amostra	Ponto de coleta	PAHs	Concentração (µg/l)	LD (µg/l)
Julho 2005	ponto 1	naftaleno	7.08	0,25
		acenaftileno	4.56	0,25
		acenafteno	1.91	0,25
		fluoreno	15.12	0,25
		fenantreno	78.78	0,25
		pireno	9.43	0,25
		benzo(a)antraceno	3.82	0,25
		criseno	18.88	0,25
		antraceno	ND	0,25
		fluoranteno	ND	0,25
		benzo(b)fluoranteno	ND	0,25
		benzo(k)fluoranteno	ND	0,25
		benzo(a)pireno	ND	0,25
		indeno(1,2,3-cd)pireno	ND	0,25
		dibenz(a,h)antraceno	ND	0,25
		benzo(g,h,i)perileno	ND	0,25
		<b>Total of PAHs</b>	<b>139.58</b>	

ND: não detectado

LD: limite de detecção

Atualmente, análises químicas de hidrocarbonetos são consideradas essenciais para a avaliação da contaminação ambiental, uma vez que estes agentes são relacionados a muitos efeitos nocivos a saúde humana, incluindo alguns tipos de câncer. Dentre os hidrocarbonetos, uma das classes mais preocupantes é a dos PAHs, devido ao conhecimento dos seus efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos aos organismos expostos (AINA et al., 2006). Desta forma, a análise de PAHs tem se destacado entre as análises químicas para detecção de hidrocarbonetos, sendo realizada concomitantemente aos ensaios biológicos. A análise química no presente trabalho foi fundamental para complementação dos dados obtidos para o teste de *Allium cepa*, pois foi possível correlacionar os dados da análise química com os do teste biológico empregado.

#### 5.4. Sistema-teste de *Oreochromis niloticus*

A avaliação de impactos e riscos decorrentes de vazamentos de óleo é um processo complexo que envolve desde análises químicas até o desenvolvimento ou adaptações de metodologias ecotoxicológicas (BOLOGNESI et al., 2006).

Segundo Udroui (2006), o teste do micronúcleo (MN) é amplamente utilizado para estimar danos citogenéticos induzidos por agentes físicos e químicos, podendo ser facilmente aplicado em diversos organismos, como, por exemplo, os peixes.

Peixes têm sido utilizados como organismos-teste devido às suas diferentes funções na cadeia trófica, à característica de acumular substâncias tóxicas e por responder a baixas concentrações de mutágenos (ÇAVAS et al., 2005). Por estas razões, a utilização de peixes como bioindicadores dos efeitos da poluição ambiental tem se mostrado crescente, permitindo uma detecção precoce de problemas no ambiente aquático (LÓPEZ-BAREA, 1996; VAN DER OOST et al., 2003).

Desta forma, a aplicação do teste do MN em peixes tem se mostrado muito eficiente na detecção de uma ampla variedade de agentes (GRAVATO & SANTOS, 2003; RODRIGUEZ-CEA et al., 2003; PALHARES & GRISOLIA, 2002; BAHARI et al., 1994), incluindo contaminações por hidrocarbonetos de petróleo (HOSHINA, 2005; VANZELLA, 2006; SOUZA & FONTANETTI 2006).

No presente estudo, teste do MN e de anormalidades nucleares foram aplicados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após a exposição dos organismos em águas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo. Os

resultados obtidos pela análise de eritrócitos micronucleados (Fig. 14A e B) e portadores de anormalidades nucleares de *O. niloticus* estão reunidos na Tabela 12. Dentre as anormalidades nucleares classificadas por Carrasco et al. (1990), foram observadas no presente trabalho núcleo do tipo “broken-egg” (Fig. 14C), núcleo “blebbed” (Fig. 14D), núcleo “notched” (Fig. 14E), núcleo “lobed” (Fig. 14F) e cariólise (Fig. 14H).

Quanto as freqüências de MN, não foram observados resultados significativos entre o controle negativo e as amostras de água do rio Guaecá e do Ribeirão SABESP, em nenhuma das coletas realizadas (Tabela 12). No entanto, nossos resultados não são conclusivos, pois as amostras do rio Guaecá, referentes a coleta de julho de 2005, foram armazenadas por um longo período, o que pode ter inviabilizado o teste. As águas coletadas não foram imediatamente utilizadas pela falta de material biológico no período referente a análise, pois neste período de inverno os peixes ficam mais sensíveis e morrem com muita facilidade, principalmente, devido a contaminação fúngica, decorrente da diminuição da imunidade em temperaturas baixas. Outro fator, que pode ter comprometido o teste foi o tempo de exposição dos peixes de 72 horas. Vanzella (2006), em ensaios com exposição de *Prochilodus lineatus* (curimba) em frações solúveis de óleo diesel, constatou que as freqüências de micronúcleos aumentavam em relação ao aumento do tempo de exposição, sendo o tempo máximo testado de 96 horas.

Ao contrário dos resultados obtidos pela análise de MN, as freqüências de anormalidades nucleares foram significativamente maiores, em relação ao

controle negativo, para as amostras de águas do ponto 1 bruto e diluído 3:1 e dos pontos 2 e 3 do rio Guaecá, apenas para a coleta de inverno (Tabela 12).

Recentemente, a presença de anormalidades nucleares tem sido reportada por diversos autores em diferentes organismos, inclusive em peixes (CARRASCO et al., 1990; ÇAVAS & ERGENE-GÖZÜKARA, 2003, 2005; BARSINIENÈ et al., 2006; SOUZA & FONTANETTI, 2006). A observação de eritrócitos portadores de tais anormalidades pode ser indicativo da presença de agentes químicos capazes de promoverem alterações nucleares, embora esta ação ainda seja pouco conhecida para peixes. Para a elucidação desse efeito, serão necessários estudos adicionais mais específicos, a fim de compreender melhor a natureza das anormalidades nucleares.

Ao longo das últimas décadas, o ensaio do cometa tornou-se um dos mais utilizados testes-modelo de avaliação de danos no DNA, sendo aplicado para diversas finalidades, como testes de genotoxicidade, biomonitoramento humano, ecogenotoxicologia e estudos fundamentais de danos e reparos no DNA (COLLINS, 2004). Desta maneira, o ensaio do cometa tem sido frequentemente aplicado, conjuntamente ao teste do MN, para estudos de monitoramento ambiental (RUSSO et al., 2004).

O ensaio do cometa foi aplicado em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* para ambas as coletas (inverno e verão) realizadas no rio Guaecá e Ribeirão SABESP, porém, obteve-se resultados apenas para a coleta de verão (Tabela 13), devido a problemas na padronização da técnica. Para essa coleta, o ensaio foi realizado em versão alcalina com pH 12.1, a qual apenas não permite a detecção de sítios álcali-lábeis e sítios abásicos.

Apesar das freqüências de nucleóides com e sem danos, obtidas para os tratamentos controles e para as amostras de águas do rio Guaecá e Ribeirão SABESP, mostrarem diferenças numéricas, estas não foram significativas, quando comparadas pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis (Tabela 13). Desta forma, o ensaio do cometa não evidenciou ação genotóxica para eritrócitos de *O. niloticus* submetidos às amostras de águas dos diferentes pontos dos rios Guaecá e Ribeirão SABESP.

Por fim, podemos concluir que, devido aos problemas de obtenção e manutenção dos espécimes de *O. niloticus* e a necessidade de uma melhor padronização das metodologias aplicadas, os ensaios de MN e do cometa não foram conclusivos para a avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos e mutagêncios induzidos por águas contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo.

**Tabela 12.** Comparação das freqüências de Micronúcleos e Anormalidades Nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição dos peixes às amostras de água do rio Guaecá e Ribeirão SABESP.

Amostra	Pontos de coleta	Número amostral	Número total de eritrócitos analisados	Micronúcleos	Anormalidades Nucleares
<b>Julho 2005</b>	controle negativo	4	1000	0	0,71±3,31
	controle positivo	3	1000	0,13±0,57	1,53±6,43
	ponto 1	3	1000	0	2,80±18,82*
	ponto 1 – água diluída	5	1000	0,02±0,45	2,00±9,42*
	ponto 2	5	1000	0,14±1,14	2,33±12,10*
	ponto 3	3	1000	0	5,81±13,67*
	ponto 4	5	1000	0,02±0,44	1,66±6,83
	ponto 5	2	1000	-----	-----
<b>Fevereiro 2006</b>	controle negativo	4	1000	0,22±1,5	6,0±32,52
	controle positivo	5	1000	0,20±1,41	5,74±31,83
	ponto 1	5	1000	0,10±1,22	6,51±33,15
	ponto 1 – água diluída	4	1000	0,02±0,5	2,35±11,47
	ponto 2	5	1000	0,02±0,44	4,50±32,90
	ponto 3	5	1000	0,14±1,51	6,28±29,64
	ponto 4	5	1000	0,20±2,34	6,53±55,37
	ponto 5	4	1000	0,10±1,41	3,87±33,42

média±DP

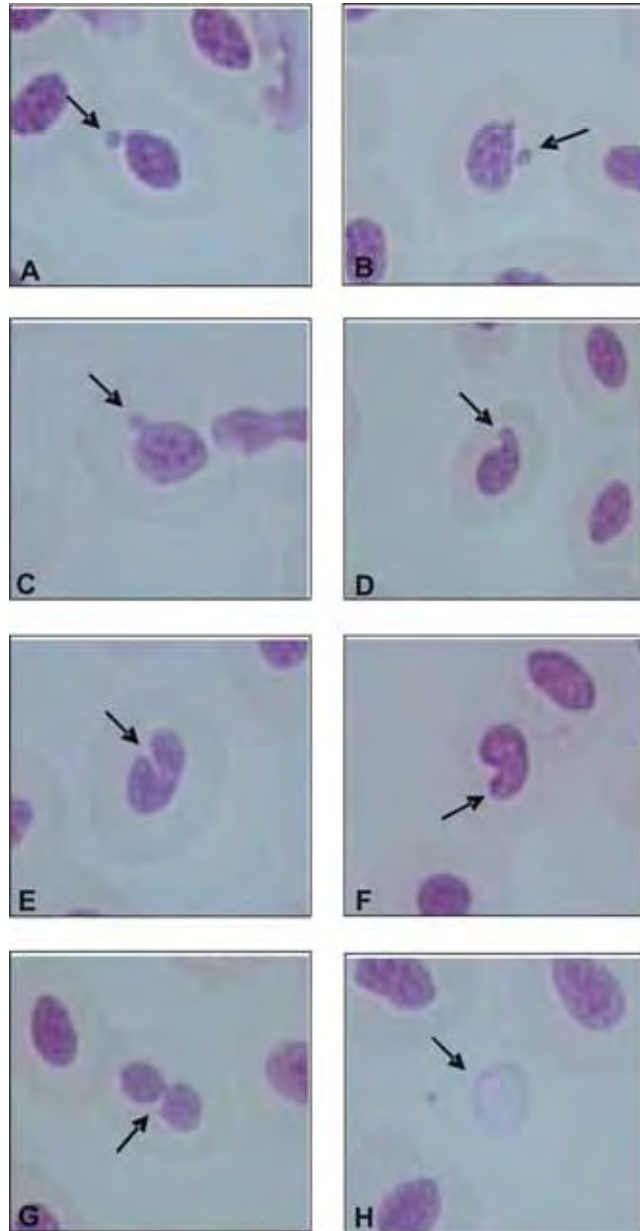
\* diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.



**Tabela 13.** Análise de eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos às amostras de águas do rio Guacá e Ribeirão SABESP pela técnica do ensaio do cometa.

Pontos de coleta	Total de nucleóides analisados	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Score
controle negativo	100	24	18	55	10	158
	100	75	19	3	1	28
	100	0	1	24	78	283
	100	58	18	27	1	48
<b>Total</b>	<b>400</b>	<b>157±33,67</b>	<b>56±8,67</b>	<b>109±21,36</b>	<b>90±37,24</b>	<b>X=129,25±117,35</b>
controle positivo	100	0	69	21	99	150
	100	8	76	17	1	260
	100	0	0	6	0	315
	100	0	2	12	95	323
	100	0	0	5	108	337
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>8±3,57</b>	<b>147±39,43</b>	<b>61±6,90</b>	<b>303±41,45</b>	<b>X=277±76,77</b>
ponto 1	100	0	3	65	36	241
	100	17	55	17	16	137
	100	12	57	6	26	147
	100	22	56	22	11	133
	100	2	74	11	15	141
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>53±9,51</b>	<b>245±31,27</b>	<b>143±21,12</b>	<b>160±16,99</b>	<b>X=168,5±46,08</b>
ponto 1 diluído	100	0	9	77	16	211
	100	8	87	7	3	110
	100	0	0	1	100	302
	100	2	38	52	12	178
<b>Total</b>	<b>400</b>	<b>10±1,41</b>	<b>134±26,87</b>	<b>137±36,06</b>	<b>131±62,22</b>	<b>X=200,25±87,68</b>
ponto 2	100	0	8	10	84	280
	100	0	0	18	86	294
	100	1	3	30	68	134
	100	0	3	29	70	271
	100	0	1	15	94	219
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>1±0,44</b>	<b>15±3,08</b>	<b>102±8,79</b>	<b>402±11,08</b>	<b>X=239,6±65,48</b>
ponto 3	100	8	37	53	3	152
	100	0	6	35	71	289
	100	0	1	22	92	321
	100	0	0	27	82	300
	100	0	0	52	49	251
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>8±3,57</b>	<b>44±15,95</b>	<b>189±14,20</b>	<b>297±35,34</b>	<b>X=262,6±66,84</b>
ponto 4	100	0	7	18	77	274
	100	46	17	20	18	111
	100	0	0	19	85	293
	100	32	41	31	3	112
	100	64	34	9	4	64
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>142±28,29</b>	<b>99±17,42</b>	<b>97±7,82</b>	<b>187±40,33</b>	<b>X=170,8±104,90</b>
ponto 5	100	5	27	43	25	188
	100	71	41	4	2	55
	100	7	69	8	21	148
<b>Total</b>	<b>300</b>	<b>83±37,54</b>	<b>137±21,38</b>	<b>55±21,45</b>	<b>48±12,28</b>	<b>X=130,33±68,23</b>

\* diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.



**Figura 14.** Eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos às águas do rio Guaecá e Ribeirão SABESP. **A e B.** Micronúcleos; **C.** Núcleo do tipo “broken-egg”; **D.** Núcleo do tipo “blebbed”; **E.** Núcleo do tipo “notched”; **F.** Núcleo do tipo “lobed”; **G.** Formação de célula binucleada; **H.** Cariólise.

### 5.5. Análise de Sedimentos pelo Sistema-teste de *Allium cepa*

No âmbito da área de monitoramento ambiental, sedimentos são reconhecidos como reservatórios de contaminantes nos ecossistemas aquáticos, os quais se comportam como liberadores de agentes tóxicos que ameaçam continuamente a saúde e a viabilidade da biota aquática (CHEN e WHITE, 2004). Dentre os poluentes armazenados nos sedimentos, agentes genotóxicos e mutagênicos tem se destacado, devido ao seu alvo de ação ser o material genético de organismos vivos.

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) são importantes poluentes ambientais, sendo amplamente estudados na área de monitoramento de sedimentos aquáticos, devido a periculosidade que confere aos organismos expostos. As fontes de contaminação de PAHs são inúmeras, porém, podemos citar como uma das grandes atividades liberadoras destes agentes para o ambiente aquático a indústria do petróleo (BIHARI et al., 2006).

Muitos estudos na área da genética toxicológica têm sido realizados ultimamente para avaliação dos efeitos induzidos por sedimentos contaminados com PAHs. No entanto, a maioria destes estudos está relacionada a sedimentos marinhos e, quando relacionados a sedimentos de rios, a maioria se restringe a utilização do teste de mutagenicidade em *Salmonella* (CHEN e WHITE, 2004).

Testes de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN) foram aplicados em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas aos extratos solubilizados de sedimentos do rio Guacá impactado por petróleo. Os resultados obtidos para estas análises estão reunidos na Tabela 14.

Pela análise dos resultados, podemos inferir que freqüências significativas de AC foram obtidas para as radículas submetidas aos extratos solubilizados de todos os sedimentos coletados em julho de 2005 (Tabela 14). No entanto, grandes quantidades de óleo foram visualizadas apenas na amostra de sedimento referente ao ponto 1 do rio Guaecá, dificultando o estabelecimento da correlação das freqüências significativas de AC obtidas e a contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. Tal correlação ficou ainda mais prejudicada pela falta de análises químicas de hidrocarbonetos para estas amostras, pelos altos custos que representavam.

Para a análise de MN, observou-se freqüência significativa apenas para a amostra de sedimento do ponto 2 do rio Guaecá, referente a coleta de fevereiro de 2006 (Tabela 14). Contudo, a correlação de tal resultado com a contaminação por hidrocarbonetos de petróleo também não pode ser estabelecida devido, como mencionado acima, a falta de análises químicas de hidrocarbonetos para as amostras coletadas.

Portanto, conclui-se que para uma avaliação mais precisa das reações dos organismos à contaminação de sedimentos por hidrocarbonetos de petróleo, há necessidade de associar aos testes biológicos, análises químicas destes agentes, a fim de estabelecer uma possível correlação entre estes dois parâmetros. Adicionalmente, sugerimos que avaliações de sedimentos pelo teste de *Allium cepa* sejam conduzidas submetendo as sementes à germinação no próprio sedimento e não nos seus extratos solubilizados e lixiviados, como alguns autores sugerem (COTELLE et al., 1999). Entendemos que esta sugestão poderia levar a resultados mais confiáveis, pois certificaria a relação

da resposta do organismos-teste com os contaminantes presentes nas amostras, eliminando a hipótese de perdas de elementos durante os processos de preparo dos extratos solubilizados ou lixiviados. No entanto, testes comparativos entre amostras de sedimentos e os seus respectivos extratos devem ser realizados, para a confirmação dos efeitos induzidos por hidrocarbonetos de petróleo presentes em sedimentos de rios impactados por vazamentos de óleo.

**Tabela 14.** Comparação das Frequências de Índice Mitótico, Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição aos extratos solubilizados dos sedimentos do rio Guaecá.

Amostra	Pontos de coleta	Número de células analisadas	Índice Mitótico	Aberrações Cromossômicas	Micronúcleos
Julho 2005	controle negativo	5000	17,27±18,15	0,83±2,34	0,62±0,87
	controle positivo	5000	18,47±15,77	3,80±8,23*	2,68±2,18
	ponto 1	5000	22,44±13,45	3,96±6,20*	1,83±1,42
	ponto 2	5000	25,13±18,90	4,48±5,60*	1,68±1,32
	ponto 3	5000	25,46±20,51	4,20±5,27*	1,90±1,50
	ponto 4	5000	26,84±15,66	5,47±7,45*	3,09±2,30
	ponto 5	5000	25,23±12,67	2,54±7,25	1,53±3,18
Fevereiro 2006	controle negativo	5000	29,18±10,46	1,34±2,33	0,13±1,05
	controle positivo	5000	32,25±13,21	1,45±2,75	2,08±7,22*
	ponto 1	5000	32,00±23,40	1,00±2,02	0,45±2,86
	ponto 2	5000	32,64±18,86	1,45±2,95	0,85±3,74*
	ponto 3	5000	32,18±14,27	1,36±3,09	0,37±1,91
	ponto 4	5000	32,70±11,20	1,00±1,63	0,40±1,56
	ponto 5	5000	31,56±7,35	0,80±2,56	0,33±1,16

média±DP

\* diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

**ARTIGO 1** \_\_\_\_\_

**Freqüências de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos  
em células radiculares de *Allium cepa* expostas a águas  
impactadas por petróleo – um estudo de caso**

**Daniela Morais Leme<sup>1</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
Av 24-A, 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

\*Autor responsável pela correspondência: Av. 24 A, 1515, Bela Vista, CEP: 13506-900, Rio  
Claro/SP-Brasil, e-mail: mamm@rc.unesp.br, fone +55 (19) 3526-4143, fax: 55 (19) 3536-0009.

## Resumo

A utilização de *Allium cepa* como organismo-teste para monitoramento da genotoxicidade ambiental tem se mostrado muito eficiente ao longo dos anos. Tal eficiência se deve não apenas às facilidades do ensaio, baixo custo e rápida obtenção de resultados, mas, principalmente, à alta correlação com os outros sistemas-teste, incluindo os de mamíferos. A contaminação ambiental por hidrocarbonetos tem sido foco preocupante, atualmente, pelos riscos que estes agentes podem promover à saúde humana. Testes de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN) foram aplicados em células de raízes de *Allium cepa*, para avaliar a qualidade das águas do rio Guaecá, localizado na cidade de São Sebastião-SP, Brasil, afetadas por vazamento de oleoduto. Análises químicas de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPHs) e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PHAs) também foram realizadas para as amostras coletadas. As coletas foram feitas em julho de 2005 (estação de seca) e fevereiro de 2006 (estação chuvosa), em 4 pontos distintos do rio. A maior incidência de AC e MN em células meristemáticas de *A. cepa* foi observada após a exposição das sementes à amostra coletada, apenas para o período de seca, na nascente do rio, a qual corresponde ao local de afloramento do óleo vazado. Para as radículas submetidas a esta amostra, além da região meristemática também foi analisada a incidência de MN em células F<sub>1</sub> (região não-meristemática), a qual mostrou uma maior frequência destas irregularidades, indicando a evolução de AC para MN. As análises químicas destas amostras comprovaram a contaminação de TPHs e PHAs, mostrando uma correlação direta entre a contaminação por hidrocarbonetos de



petróleo e os efeitos genotóxicos e mutagênicos observados no teste de *Allium cepa*.

Palavras-chaves: Teste de *Allium cepa*, Aberrações Cromossômicas, Micronúcleos, poluição de águas, petróleo.

## 1. Introdução

As atividades humanas têm provocado, ao longo dos anos, grandes impactos no meio ambiente, principalmente em ecossistemas aquáticos, o que tem levado a um comprometimento da qualidade das águas, a qual é considerada um dos fatores essenciais para a manutenção das funções vitais e, conseqüentemente, da vida no planeta.

O petróleo, uma das mais importantes fontes de energia do planeta, tem sido relacionado com atividades humanas geradoras de impactos ambientais, onde a maioria delas comprometem corpos d'águas, decorrente das atividades da indústria petrolífera, que usa o petróleo como matéria prima [1]. Desta maneira, as grandes contaminações ambientais por hidrocarbonetos, detectadas ao redor do mundo, vêm sendo relacionadas às atividades desta indústria, as quais podem liberar poluentes desde os processos de extração até o refino de seus produtos [2].

Muitos problemas de saúde humana, incluindo alguns tipos de câncer, atualmente, são atribuídos à presença de diversos contaminantes presentes no meio ambiente e na água, em particular [3]. Dentre todos os hidrocarbonetos descritos, a classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PHAs), também presentes no petróleo, tem sido indicado como um dos mais perigosos contaminantes ambientais, devido aos seus efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos [4].

O aumento significativo da poluição ambiental e a crescente preocupação com o bem-estar social têm levado pesquisadores a desenvolverem testes biológicos eficientes, pois estes são indispensáveis para a avaliação de

reações de organismos vivos frente à contaminação ambiental complexa, bem como para indicar os efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes presentes no meio ambiente. Desta forma, a garantia e manutenção de ambientes seguros requerem testes padrões para avaliação de agentes genotóxicos e/ou mutagênicos de fácil execução e de rápida obtenção de resultados, além de serem facilmente reproduzíveis [5].

Considerando as necessidades mencionadas acima, sistemas-teste vegetais vêm se destacando como excelentes modelos genéticos para triagem e monitoramento de poluentes ambientais [5,6]. Tal destaque não se deve apenas a sensibilidade de detecção de mutágenos em diferentes ambientes, mas também pela possibilidade de avaliação de diversos “endpoints” genéticos, os quais abrangem desde mutações pontuais até aberrações cromossômicas em células e/ou em órgãos como folhas, pólenes e endospermas [6].

Dentre os vegetais superiores utilizados como modelos-teste, a espécie de *Allium cepa* vem se mostrando um eficiente modelo genético de monitoramento ambiental. Desde a introdução desta espécie como sistema-teste [7], adaptações na metodologia do teste de *A. cepa* têm sido realizadas a fim de possibilitar uma melhor avaliação da contaminação ambiental complexa [5,8,9]. Tais adaptações possibilitaram uma maior abrangência de utilização deste teste, além de destacar a sua sensibilidade, para a detecção de danos genéticos induzidos por poluentes ambientais presentes em diversos ambientes e em especial na água [3,10-15].

A espécie de *A. cepa* tem sido indicada, não apenas pela sua alta eficiência e sensibilidade, mas também por outras vantagens, como baixo

custo, fácil manuseio e, principalmente, por apresentar boas condições cromossômicas, como a presença de cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ), sendo este fator fundamental para estudos de avaliação de danos cromossômicos e/ou de distúrbios do ciclo de divisão celular, incluindo riscos de aneuploidia [5, 16].

Outro ponto que destaca a utilização do teste de *A. cepa* é a alta sensibilidade e boa correlação com outros sistemas-teste, principalmente com os de mamíferos. Sabe-se que tais fatores são fundamentais para avaliação mais precisa de riscos ambientais, bem como para a extrapolação de dados para outros organismos alvos, como, por exemplo, o homem. Desta maneira, FISKESJÖ [5] constatou para o teste de *A. cepa*, praticamente a mesma sensibilidade que sistemas-teste de algas e de linfócitos humanos. RANK e NIELSEN [10] mostraram, além da maior sensibilidade do teste de *A. cepa* em relação aos testes de Ames e *Microscreen*, uma correlação de 82% deste teste com o de carcinogenicidade em roedores. Além disso, estudos de sensibilidades entre vegetais superiores têm mostrado maior sensibilidade da espécie *A. cepa* em relação a outros organismos-teste, como, por exemplo, o de *Vicia faba* [9,15].

Considerando que a contaminação ambiental por hidrocarbonetos, principalmente pelos PHAs, pode causar vários danos à saúde humana, e que uma das importantes fontes de contaminação são as atividades da indústria petrolífera, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos induzidos por águas impactadas por petróleo, usando *Allium cepa* como sistema-teste. Além disso, o presente estudo investigou a eficiência

e a sensibilidade do teste de *A. cepa* para avaliação da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Caracterização da área de estudo e procedimentos de coleta das amostras de águas**

O rio Guaecá, localizado no Parque Estadual da Serra do Mar, São Sebastião-SP, Brasil, foi usado no presente trabalho como área de estudo (Figura 1). Este rio, situado em uma área de preservação permanente, a qual é caracterizada pela alta biodiversidade e pela proximidade da estação de captação de água para abastecimento, foi impactado por vazamento de petróleo em fevereiro de 2004, devido ao rompimento do oleoduto da região. Por se tratar de um duto subterrâneo, o óleo vazado atingiu, primeiramente, as águas subterrâneas, sendo, posteriormente, aflorado na nascente do rio Guaecá, afetando todo o curso deste rio.

As coletas foram realizadas em julho de 2005 (estação de seca) e fevereiro de 2006 (estação de chuva). As amostras foram coletadas em 4 pontos distintos, ao longo dos 8 Km do rio Guaecá, como descrito a seguir: ponto 1 (P1), nascente do rio e local de afloramento do óleo vazado; ponto 2 (P2), principal ponto de contenção e remoção de óleo do rio, estabelecido pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo – Brasil), empresa responsável pela fiscalização da área; ponto 3 (P3), ponto de menor declividade do rio e ponto 4 (P4), foz do rio (Figura 1).

Para o procedimento das coletas destas amostras foi adotada a metodologia de coleta de águas superficiais, descrita pela CETESB (1987), como segue: galões plásticos novos, com capacidade de 20L, foram, primeiramente, os submergidos nas águas do local de coleta, para uma lavagem previa do mesmo com a água do ponto a ser coletado. Após este procedimento, os recipientes foram, novamente, submergidos nas águas dos respectivos pontos, porém, em locais correspondentes aos pontos médios da largura do rio, até o completo preenchimento de seu volume. Após a coleta das amostras de águas, os galões foram, imediatamente, lacrados e refrigerados a  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , para o transporte.

Dados meteorológicos referentes aos períodos das coletas realizadas no rio Guaecá foram obtidos junto à Estação Meteorológica do Centro de Biologia Marinha (CEBIMar) da Universidade de São Paulo (USP), Brasil (Tabela 1). De acordo com estes dados, julho de 2005 apresentou o menor índice de chuvas deste ano, caracterizando a estação de seca, enquanto que fevereiro de 2006 representou a estação chuvosa por apresentar um alto índice pluviométrico.

## **2.2. Organismo-teste**

Foram utilizadas sementes da espécie de *Allium cepa* (variedade baia periforme), marca<sup>®</sup> Topseed, por caracterizar-se em um material de análise mais homogêneo, tanto geneticamente como fisiologicamente, acessível durante o ano inteiro, o que nos proporciona uma maior confiabilidade para os ensaios realizados.

### 2.3. Metodologia

Os ensaios de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN) em células meristemáticas de radículas de *Allium cepa*, foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido por Grant [16], com algumas modificações, descritas abaixo. Sementes de cebola, dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro, foram submetidas à germinação nas diferentes amostras de águas coletadas, sendo utilizada uma placa de Petri para cada ensaio. Devido a grande quantidade de frações não-solúveis de óleo presentes na amostra do ponto 1, coletada em julho de 2005, também foi realizado um ensaio com esta amostra filtrada. Quando as radículas atingiram cerca de 2.0 cm de comprimento, elas foram coletadas e fixadas em ácido álcool-acético (3:1-v/v) por 24 h. Após a fixação, as raízes foram submetidas à coloração em reativo de Schiff, como descrito por Feulgen e Rossenbeck, appud Mello e Vidal [17]. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram recobertos com lamínulas e, suavemente, esmagados em uma gota de carmim acético (2%). As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética, para serem, posteriormente, analisadas. Água ultrapura foi usada para o teste controle negativo, e  $4 \times 10^{-4}$  M de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3) para o controle positivo. Para a análise de AC, vários tipos de aberrações foram considerados (fragmentos cromossômicos, perdas de cromossomos, pontes, atrasos, aderências, entre outros) nas diferentes fases de divisão celular (metáfase, anáfase e telófase), sendo todos os registros reunidos em uma só categoria para possibilitar a avaliação das AC como um único “endpoint”. A incidência de MN em células meristemáticas de A.

*cepa* foi considerada como outro parâmetro de avaliação, não sendo agrupada junto com as AC. O Índice Mitótico (IM), que corresponde à relação do número de células em divisão, constituiu um terceiro parâmetro de avaliação. A análise de todos estes parâmetros se deu pela contagem de cerca de 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina para um total de 10 lâminas. Análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, o qual possibilita a comparação dos tratamentos com controle negativo, bem como dos tratamentos entre si, em nível de significância de 0,05.

Para a análise de MN em células  $F_1$  (região não-meristemática), foi seguido o protocolo estabelecido por Ma et al. [9]. Esta análise foi realizada apenas para as radículas expostas as amostras dos pontos 1 e 3, correspondentes a julho de 2005, e aos controles negativo e positivo, referentes a esta mesma coleta. Para a análise, as raízes foram submetidas à coloração em reativo de Schiff como descrito anteriormente. As lâminas foram preparadas por esmagamento suave da região  $F_1$ , que está localizada a 1 milímetro acima da região meristemática, seguindo o mesmo procedimento citado para região meristemática. A contagem de MN e a análise estatística foram seguidas, de acordo com o descrito acima para as lâminas de células meristemáticas.

#### **2.4. Análises Químicas**

Análises químicas de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPHs) e de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) de amostras de água coletadas no rio Guaecá e Ribeirão SABESP foram realizadas pela empresa



Analytical Technology, São Paulo-SP. Para a análise de TPHs, foi seguido o método USEPA 8015, o qual utiliza a técnica de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (Gcfid). A análise de PAHs seguiu o método USEPA 8270, com a utilização da técnica de cromatografia gasosa com detector de massas (Gcms), a qual é capaz de detectar os seguintes PAHs: 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(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno.

### 3. Resultados

Dentre as amostras submetidas à análise química, apenas a amostra de água do ponto 1, coletada em julho de 2005, teve resultado positivo para a contaminação de TPHs e PAHs (Tabela 2 e 3).

Os resultados obtidos para os testes de AC e MN, usando o sistema-teste de *Allium cepa*, estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Para os IM, foram observadas diferenças de valores entre os ensaios realizados para as duas coletas, sendo obtidos valores mais baixos para os tratamentos da primeira coleta (julho de 2005), em relação à segunda (fevereiro de 2006). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os IM dos tratamentos, quando comparados com o controle negativo, para nenhum dos ensaios realizados.

As freqüências de AC observadas nas células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição nas águas coletadas no rio Guaecá, em geral, se mostraram superiores às encontradas para o controle negativo, embora nem todas as diferenças foram significativas estatisticamente. Somente as freqüências de AC observadas para as amostras dos pontos 1 e 3, da coleta de julho de 2005, apresentaram valores significativos em relação ao controle negativo. No entanto, quando analisadas as freqüências de MN das células meristemáticas expostas a amostra de água coletada no ponto 1 (estação seca), observamos um valor significativamente maior do que o obtido para o controle negativo. Esta análise, quando comparada com as freqüências de MN, obtidas para as demais amostras do rio Guaecá (estação seca), também se mostrou significativamente maior. Para os ensaios realizados com a amostra filtrada do ponto 1, coletada em julho de 2005, não observamos diferenças significativas das freqüências de AC e MN, em relação a mesma amostra não filtrada. Porém, como descrito para a amostra não filtrada, valores significativos foram obtidos em relação ao controle negativo.

Análises de MN em células  $F_1$  foram realizadas devido à alta freqüência de AC observadas nas células meristemáticas submetidas à amostra do ponto 1, bem como ao valor significativo de AC detectado para a amostra não contaminada do ponto 3, ambas referentes a coleta de Julho de 2005. Tal análise mostrou que a incidência de MN foi significativamente maior, em relação a do controle negativo, apenas para as radículas expostas a amostra do ponto 1, a qual ainda se mostrou superior quando comparada com a

freqüência de MN obtida para as células meristemáticas submetidas a esta mesma amostra.

#### 4. Discussão

O Índice Mitótico (IM) tem se mostrado um importante parâmetro para a avaliação dos efeitos de agentes químicos sobre o ciclo celular [11,18,19]. As diferenças observadas para os valores de IM nos dois experimentos realizados no presente estudo, não parecem estar relacionadas com as características particulares de cada amostra testada, mas sim aos fatores climáticos, uma vez que os ensaios foram realizados em diferentes estações do ano. Desta maneira, observou-se que no inverno, o IM se mostrou menor, devido a uma diminuição da divisão celular, decorrente das temperaturas mais baixas deste período, enquanto que no verão, este índice exibiu valores maiores para todos os testes realizados.

Aberrações cromossômicas (AC) são reconhecidas como importantes conseqüências de ações genotóxicas de agentes químicos [20], aos quais muitos organismos, inclusive o homem, estão expostos. Estudos epidemiológicos tem mostrado que pessoas com elevadas freqüências de AC apresentam risco significativo de desenvolvimento de câncer [21]. Por estas razões, testes biológicos para avaliação de AC como “endpoint” de agentes químicos têm sido desenvolvidos com a finalidade de garantir um ambiente seguro. Dentre estes sistemas-teste, o teste de *Allium cepa* tem se caracterizado como um modelo rápido e eficiente na avaliação da

genotoxicidade causada por poluentes ambientais [5,6,22-25], bem como para a avaliação de qualidades de águas [3].

Nossos dados mostraram que a análise de AC não foi totalmente eficiente para a avaliação de genotoxicidade das águas do rio Guaecá, após impacto por petróleo, pois encontramos resultados significativos de AC tanto para a amostra mais impactada por óleo (ponto 1), como para a amostra não impactada (ponto 3), segundo os resultados das análises químicas. No entanto, a avaliação da indução de MN em células meristemáticas de *Allium cepa*, junto com o teste de AC, possibilitou uma análise precisa da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que apenas para a amostra do ponto 1, de julho 2005, foi observada frequência significativa não só em relação ao controle negativo como também em relação aos demais pontos de coleta do rio Guaecá. Tal amostra corresponde ao local de afloramento do óleo vazado para o rio, sendo a única amostra para a qual foi constatada a presença de TPHs e PHAs pelas análises químicas.

Devido a grande presença de óleo na amostra do ponto 1, referente à coleta de julho de 2005, foi realizado teste com a amostra submetida a filtração para compreender a relação entre os possíveis danos causados pelas frações solúveis e não solúveis do óleo vazado. Os valores de AC e MN não foram significativos entre estas amostras (filtrada e não filtrada), indicando que a indução de AC e MN nas células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição a água coletada no ponto 1, deve estar relacionadas com a presença das frações solúveis do óleo presentes na amostra, conforme constatado nas análises químicas.

Os dados também mostraram alta correlação entre as elevadas freqüências de AC e MN em células *Allium cepa* observadas para a amostra de água do ponto 1, coletada na estação de seca. Tal relação foi confirmada pela análise de MN em células  $F_1$  (região não-meristemática), a qual mostrou que algumas células meristemáticas portadoras de AC, provavelmente, progrediram para células micronucleadas, pela alta freqüência de MN observada para estas células  $F_1$ . Segundo Fenech [26], MN são resultados de fragmentos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal durante o ciclo celular. Fragmentos cromossômicos podem ser derivados de quebras cromossômicas decorrentes de ação clastogênica de uma substância [27], ou a partir de aberrações cromossômicas, como as pontes anafásicas, as quais podem se romper e originar fragmentos acêntricos [24]. Por outro lado, perdas cromossômicas são conseqüências da inativação dos fusos mitóticos durante a divisão celular (ação aneugênica) [28]. Desta maneira, os MN observados em células  $F_1$  devem ter sido originados de danos não reparados ou reparados de modo incorreto nas células parentais [29]. Outra hipótese para a alta freqüência de MN na região  $F_1$  seria a de que células meristemáticas portadoras de AC poderiam ser inviáveis, o que as levariam a um processo de morte celular. Como o índice de AC foi alto, a morte destas células aberrantes poderiam levar a uma diminuição no total de células  $F_1$ , o que aumentaria, proporcionalmente, o número de células com MN nesta região.

Apesar do teste de *A. cepa* ter grande aceitação como teste de monitoramento ambiental, alguns autores apresentam certa restrição quanto a utilização de sistemas-teste vegetais na avaliação de certas classes de

carcinógenos, como a dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PHAs), das nitrosaminas e de algumas outras [28,30]. Tal fato é devido ao complexo sistema de metabolização, necessário para ativação do potencial genotóxico destas substâncias, e que estão presentes em mamíferos e no homem. No entanto, estudos de sistemas de ativação metabólica em plantas vêm sendo realizados, há anos, e a capacidade de vegetais superiores ativarem promutágenos em mutágenos já foi comprovada por vários pesquisadores [31-33]. Contudo, sabe-se que alguns dos metabólitos produzidos por esta via diferem daqueles gerados pela via de metabolização de mamíferos [34].

Apesar da controvérsia exposta acima, a importância do sistema-teste de *Allium cepa*, para avaliação da genotoxicidade de PHAs, foi mostrada por Fiskejõ desde 1985 [5] com a utilização de benzo[a]pireno. Segundo o autor, as células de *Allium cepa* apresentam um sistema de enzimas oxidases capazes de metabolizar hidrocarbonetos policíclicos e, apesar de outros sistemas-teste se mostrarem mais sensíveis, os resultados gerados pelo teste de *Allium cepa* devem ser considerados como alarme, alertando para a possibilidade de ação semelhante em outros organismos. Nossos dados corroboram com a afirmação de Fiskejõ [5], pela alta sensibilidade observada no teste de *Allium cepa* realizado com as águas do rio Guaecá, impactadas pelo vazamento de óleo, uma vez que mutagenicidade foi observada, apenas, para a amostra na qual foi detectada presença de TPHs e PHAs pelas análises químicas .

Desta maneira, concluiu-se que, águas impactadas por hidrocarbonetos de petróleo podem apresentar efeitos genotóxicos e mutagênicos sobre organismos expostos, como mostrou claramente o caso do rio Guaecá, pela

mutagenicidade observada apenas para a amostra na qual foi detectada a presença de TPHs e PHAs pela análise química. Além disso, sugere-se que os valores significativos de AC e MN, observados nas células de *Allium cepa* seja, provavelmente, decorrente da ação dos PHAs quantificados na análise química, uma vez que é sabido que PHAs são perigosos carcinógenos ambientais. Concluiu-se também que vazamentos de oleodutos em rios, se gerenciados de maneira correta, com a realização de planos adequados de contingências do acidente pela empresa poluidora [35], com a remoção e contenção de óleo vazado, podem levar a uma recuperação da qualidade das águas, como foi observado para o rio Guaecá, uma vez que não foram detectados impactos por hidrocarbonetos nem nas análises químicas, nem nos testes de AC e MN para as amostras coletadas em fevereiro de 2006.

Por fim, concluiu-se ainda que o sistema-teste de *A. cepa* foi sensível para a análise proposta, se mostrando um modelo eficiente na detecção de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. No entanto, embora ambos os tipos celulares utilizados, meristemáticas e F<sub>1</sub>, tenham sido adequados para esta análise, sugerimos que a contagem de MN nas células meristemáticas sejam computados, juntamente, com as AC, para tornar a análise mais confiável. Sugerimos ainda que os testes de AC em células meristemáticas seja complementares as análises de MN em células F<sub>1</sub>, para o esclarecimento da ação celular do químico investigado.

### Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Dr. João Carlos C. Milanelli e ao Instituto Florestal, São Sebastião-SP, Brasil, pela colaboração prestada durante as coletas realizadas; ao Centro de Biologia Marinha (CEBIMar), Universidade de São Paulo (USP), pelo fornecimento dos dados meteorológicos referentes aos períodos de coleta das amostras e ao Programa de Recursos Humanos ANP/FINEP/MCT-CTPETRO, PRH-05, Universidade Estadual Paulista (UNESP)-Rio Claro pelo suporte financeiro.

### Referências

- [1] M.F.M. Pedrozo, E.M. Barbosa, H.X. Corseuil, M.R. Schneider, M.M. Linhares, Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo, Salvador: NEAMA, 2002. p.229.
- [2] M.F.G. Mencioni, I.T. Gabardo, M.E.R. Carneiro, S.M. Barbanti, G.C. Silva, C.G. Massone, Brazilian Oil Spills Chemical Characterization – Case Studies, Environ. Forensics 3 (2002) 303-321.
- [3] R.A. Fátima, M. Ahmad, Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays, Mutat. Res. 609 (2006) 81-91.
- [4] R. Aina, L. Palin, S. Citterio, Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L., Chemosphere 65 (2006) 666-673.



[5] G. Fiskesjö, The Allium test as a standard in environmental monitoring, *Hereditas* 102 (1985) 99-112.

[6] W.F. Grant, the present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens, *Mutat. Res.* 310 (1994) 175-185.

[7] A. Levan, The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*, *Hereditas* 24 (1938) 471-486.

[8] J. Rank, M.H., Nielsen, A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures, *Hereditas* 118 (1993) 49-53.

[9] T.-H. Ma, Z. Xu, C. Xu, H. McConnell, E.V. Rabago, G.A. Arreola, H. Zhang, The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants, *Mutat. Res.* 334 (1995) 185-195.

[10], J. Rank, M.H. Nielsen, Evaluation of the Allium anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutat. Res.* 312 (1994) 17-24.

[11] V. Smaka-Kincl, P. Stegnar, M. Lovka, M.J. Toman, The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. *Mutat. Res.* 368 (1996) 171-179.

[12] S. Cotelle, J.-F. Masfaraud, J.-F. Féraud, Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426 (1999) 167-171.

[13] S.T. Matsumoto, M.S. Mantovani, M.I.A. Malaguttii, A.L. Dias, I.C. Fonseca, M.A. Marin-Morales, 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. Genet. Mol. Biol. 29 (2006) 148-158.

[14] D.M. Leme, M.A. Marin-Morales, Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico de águas e sedimentos do rio Guaecá, São Sebastião – SP, após impacto de vazamento de oleoduto da região, utilizando o sistema-teste de *Allium cepa*. IN: IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, São Pedro/SP, 2006.

[15] H.M. Abdel Migid, Y.A. Azab, W.M. Ibrahim, Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. Ecotox. Environ. Safe. 66 (2007) 57-64.

[16] W.F. Grant, Chromosome aberration assays in *Allium*, Mutat. Res. 99 (1982) 273-291.

[17] Feulgen e Rossenbeck (1924, *appud* MELLO & VIDAL, 1978)

[18] M. Kuras, J. Nowakowska, E. Sliwinska, R. Pilarski, R. Ilasz, T. Tykarska, A. Zobel, K. Gulewicz, Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.)DC, Journal of Ethonopharmacology 107 (2006) 211-221.

[19] S. Türkoglu, Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. Mutat. Res. 626 (2007) 4-14.

[20] A.T. Natarajan, Chromosome aberration: past, present and future, Mutat. Res. 504 (2002) 3-16.

[21] G. Obe, P. Pfeiffer, J.R.K. Savage, C. Johannes, W. Goedecke, P. Jeppesen, A.T. Natarajan, W. Martínez-López, G.A. Folle, M.E. Drets, Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution, *Mutat. Res.* 504 (2002) 17-36.

[22] G. Fiskesjö, the *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions, *Mutat. Res.* 197 (1988) 243-260.

[23] G. Fiskesjö, A. Levan, Evaluation of the first ten MeIC chemicals in the *Allium cepa*. *Atlas* 21 (1993) 139-149.

[24] G. Fiskesjö, The *Allium cepa* test in wastewater monitoring. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8 (1993) 291-298.

[25] M.H. Nielsen, J. Rank, Screening of toxicity and genotoxicity of wastewater by the use of the *Allium cepa* test, *Hereditas* 121 (1994) 249-254.

[26] M. Fenech, The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455 (2002) 81-95.

[27] H. Yi, Z. Meng, Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* e *Vicia faba*, *Mutat. Res.* 537 (2003) 109-114.

[28] M. Uhl, M.J. Plewa, B.J. Majer, S. Knasmüller, Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. In: J. Maluszynska, M. Plewa, (Org.) *Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and human Health: a course manual*. Katowice, 2003, 150p.

[29] L. R. Ribeiro, Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: L. R. Ribeiro, D.M. Salvadori, E.K. Marques (Org.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, 2003, 355p.

[30] J. Rank, M.H. Nielsen, Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutat. Res.* 418 (1998) 113-119.

[31] K. Higashi, Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutat. Res.* 197(1988) 273-288.

[32] M.J. Plewa, E.D. Wagner, D.A. Stavreva, T. Gichner, Plant activation and its role in environmental mutagenesis and antimutagenesis. *Mutat. Res.* 350 (1996) 163-171.

[33] M.J. Plewa, E.D. Wagner, Y.H. Ju, The plant activation of aromatic amines into unique high molecular weight agents that induced genomic DNA damage in mammalian cells. In: J. Maluszynska, M. Plewa, (Org.) *Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and human Health: a course manual.* Katowice, 2003, 150p.

[34] J. Rueff, C. Chiapella, J.K. Chipman, F. Darroudi, I.D. Silva, M. Duverger-van Bogaert, E. Fonti, H.R. Glatt, P. Isern, A. Laires, A. Léonard, M. Llagostera, P. Mossesso, A.T. Natarajan, F. Palitti, A.S. Rodrigues, A. Schinoppi, G. Turchi, G. Werle-Schneider, Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays, *Mutat. Res.* (1996) 151-176.

[35] CETESB, Relatório Técnico: Acidente com o Oleoduto OSBAT – PETROBRAS / TRANSPETRO - GUAECÁ – SÃO SEBASTIÃO, São Paulo: CETESB, 2005.

**Tabela 1.** Dados meteorológicos referentes aos períodos de coletas das amostras no rio de Guaecá, São Sebastião - SP.

Mês	Média de temperatura máxima (°C)	Média de temperatura mínima (°C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Índice de Chuva (mm)
Julho 2005	33,14	15,39	85,43	0,008
Fevereiro 2006	35,9	21,06	89,43	0,043

**Tabela 2.** Hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs) detectados pela análise química na amostra de água do ponto 1 do rio Guaecá, coletada em junho de 2005 (inverno).

Amostra	Ponto de coleta	TPHs	Concentração (µg/l)	Limite Detecção (µg/l)
Julho 2005	ponto 1	C12	148.34	50,00
		C13	148.34	50,00
		C14	310.40	50,00
		C15	271.53	50,00
		C16	261.53	50,00
		C17	966.30	50,00
		C18	509.27	50,00
		Total de n-alcenos	2615.71	
		MCNR	79896.62	

MCNR: mistura complexa não resolvida

**Tabela 3.** Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PHAs) detectados pela análise química na amostra de água do ponto 1 do rio Guaecá, coletada em junho de 2005 (inverno).

Amostra	Ponto de coleta	PHAs	Concentração (µg/l)	Limite Detecção (µg/l)
Julho 2005	ponto 1	naftaleno	7.08	0,25
		acenaftileno	4.56	0,25
		acenafteno	1.91	0,25
		fluoreno	15.12	0,25
		fenantreno	78.78	0,25
		pireno	9.43	0,25
		benzo(a)antraceno	3.82	0,25
		criseno	18.88	0,25
		Total of PHAs	139.58	

**Tabela 4.** Comparação das Frequências de Índice Mitótico, Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição às amostras de águas do rio Guaecá.

Amostra	Pontos de coleta	Número de células analisadas	Índice Mitótico	Aberrações Cromossômicas	Micronúcleos
Julho 2005	controle negativo	5000	17.32±16.26	0.86±2.02	0.125±0.87
	controle positivo	5000	18.46±13.71	4.00±8.00 <sup>a</sup>	0.54±2.17
	ponto 1	5000	15.00±8.00	7.5±21.73 <sup>a</sup>	2.72±8.27 <sup>a</sup>
	ponto 1 – água filtrada	5000	19.57±17.40	8.20±25.55 <sup>a</sup>	3.86±22.46 <sup>a</sup>
	ponto 2	5000	15.10±8.76	3.36±3.73	0.26±1.37 <sup>b</sup>
	ponto 3	5000	18.55±11.06	4.16±5.00*	0,52±3.37 <sup>b</sup>
	ponto 4	5000	15.88±16.81	3.41±5.57	0.25±1.10 <sup>b</sup>
Fevereiro 2006	controle negativo	5000	29.20±10.96	1.34±2.32	0.14±1.06
	controle positivo	5000	32.26±11.87	1.45±2.72	2.10±7.20 <sup>a</sup>
	ponto 1	5000	31.21±16.46	1.10±2.64	0.84±4.00
	ponto 2	5000	31.34±11.35	1.5±2.51	0.78±2.86
	ponto 3	5000	30.62±14.12	1.33±3.77	1.28±8.48
	ponto 4	5000	31.28±21.07	1.86±3.63	1.62±5.34

média±D

<sup>a</sup> diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.05$ ), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis

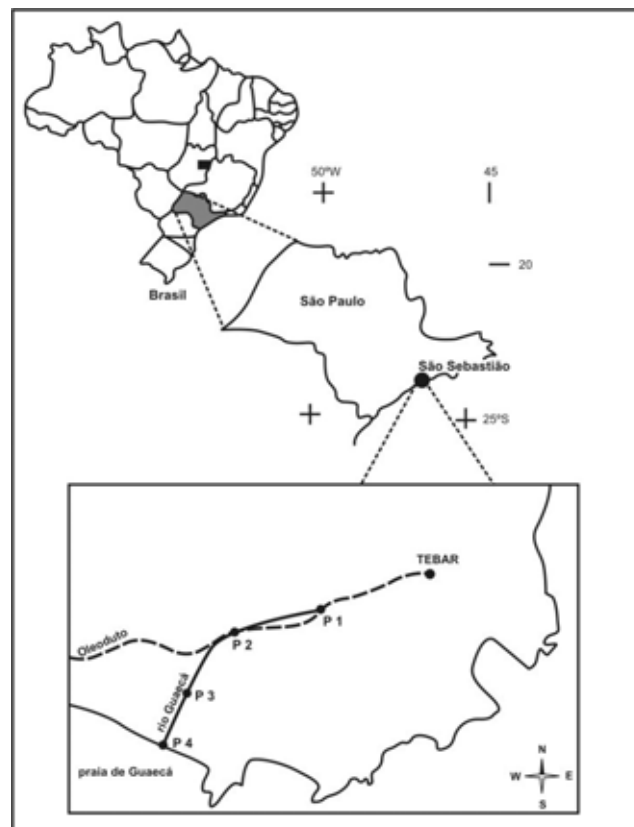
<sup>b</sup> diferença significativa em relação à amostra de água do ponto 1 de Julho de 2005 ( $p < 0.05$ ), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

**Tabela 5.** Comparação das frequências de Micronúcleos em células meristemáticas e  $F_1$  de *A. cepa* após exposição à amostra de água do ponto 1, coletada em Julho de 2005.

Amostra	Pontos de coleta	Número de células analisadas	Frequência de MN em células meristemáticas	Frequência de MN em células $F_1$
Julho 2005	controle negativo	5000	0.125±0.87	0.16±0.78
	controle positivo	5000	0.54±2.17	1.36±3.26
	ponto 1	5000	2.72±8.27 <sup>a</sup>	12.8±15.64 <sup>a</sup>
	ponto 1 – água filtrada	5000	3.86±22.46 <sup>a</sup>	13.2±14.8 <sup>a</sup>
	ponto 3	5000	0,52±3.37	0,16±1,13

média±DP

<sup>a</sup> diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.05$ ), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.



**Figura 1.** Localização do Município de São Sebastião, dos pontos de coleta no rio Guaecá e do oleoduto responsável pelo impacto de óleo no referido rio. P1: nascente do rio e local de afloramento do óleo vazado; P2: principal ponto de contenção e remoção de óleo do rio; P3: ponto de menor declividade do rio; P4: foz do rio.





**Mecanismos de Ação de Contaminantes Presentes em Águas Impactadas por Petróleo, sob o Material Genético de Células Meristemáticas de *Allium cepa***

**Daniela Morais Leme<sup>1</sup>, Dejanira de Franceschi de Angelis<sup>2</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
Av 24-A, 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista  
(UNESP), Av 24-A, 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil

## Resumo

Teste de aberrações cromossômicas (AC) vem sendo largamente utilizado, não apenas para estimar o potencial genotóxico de agentes químicos, mas também para avaliar os mecanismos de ação destes agentes sob o material genético de organismos expostos e assim obter um melhor entendimento da atuação de substâncias químicas sobre a molécula de DNA. Na ecotoxicologia, os agentes químicos são classificados de acordo com sua ação, podendo ser considerados de ação clastogênica ou aneugênica. Dentre os organismos-teste utilizados para esta finalidade, a espécie de *Allium cepa* vem se destacando pela sua sensibilidade de resposta e pelas boas características cromossômicas, as quais são essenciais para estudos de danos cromossômicos ou distúrbios do ciclo de divisão celular. Desta maneira, com o objetivo de avaliar os mecanismos de ação de águas impactadas por hidrocarbonetos de petróleo, foi aplicado o teste de AC em células meristemáticas de *A. cepa* expostas à água do rio Guaecá, São Sebastião-SP, impactada por vazamento de oleoduto da região. Os resultados mostraram elevadas freqüências de AC e Micronúcleos (MN) para as radículas expostas à água contaminada do rio Guaecá, além da indução de morte celular, visualizadas por alguns tipos de aberrações no material genético de *A. cepa* expostos a esta água. Os resultados também apontaram ações tanto clastogênica como aneugênica da amostra de água em estudo em decorrência provavelmente da presença de hidrocarbonetos derivados do vazamento de petróleo.

Palavras-chave: aberrações cromossômicas, agente aneugênico, agente clastogênico, *Allium cepa*, hidrocarbonetos de petróleo.

## 1. Introdução

As aberrações cromossômicas (AC) são caracterizadas por mudanças na estrutura normal de um cromossomo ou no número total de cromossomos, podendo ocorrer espontaneamente ou como resultado de exposição de agentes físicos ou químicos (RUSSEL, 2002). Agentes físicos e químicos podem induzir AC por diferentes mecanismos de ação, sendo estes denominados de ações clastogênica e aneugênica. Ação clastogênica é caracterizada pela indução de quebras cromossômicas durante o processo de divisão celular, ao contrário da ação aneugênica, que é dada pela inativação de estruturas celulares, como, por exemplo, os fusos mitóticos, com conseqüentes perdas cromossômicas (FENECH, 2000).

Alguns autores afirmam que as AC estão intimamente relacionadas com neoplasias e que existe uma correlação positiva entre elevadas freqüências de AC e o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (NATARAJAN, 2002; BONASSI et al., 2002; OBE et al., 2002). Desta maneira, a presença de AC tem se caracterizado em importantes eventos indicativos precedentes da carcinogênese, sendo consideradas biomarcadores fundamentais para a avaliação dos efeitos da exposição humana a agentes físicos e químicos (NATARAJAN, 2002; OBE et al., 2002).

A preocupação com a crescente introdução de agentes químicos no ambiente e os aumentos significativos de casos de câncer têm promovido o desenvolvimento e a aplicação de inúmeros testes biológicos para avaliar os efeitos induzidos por estes agentes. Dentre estes testes, o teste de AC, que é um dos mais antigos e mais utilizados, vem sendo considerado como um dos

poucos métodos diretos capazes de mensurar mutações em sistemas expostos a mutágenos ou carcinógenos potenciais (RANK et al., 2002). Adicionalmente, tal teste, por ser baseado na citogenética clássica, é facilmente aplicado em uma ampla variedade de organismos, o que favorece a sua utilização no monitoramento ambiental.

Entre os organismos utilizados em testes de AC, plantas superiores são reconhecidas como excelentes indicadores de efeitos genotóxicos e mutagênicos de químicos ambientais (GRANT, 1994, 1999), tendo a espécie de *Allium cepa* como destaque. Desta maneira, teste de AC em *Allium cepa* vem sendo considerado um eficiente teste de curta-duração para avaliação de poluentes ambientais em geral (FISKESJÖ, 1985, 1988; COTELLE et al., 1999) e, em particular, para poluentes aquáticos (SMAKA-KINCL et al., 1996; RANK e NIELSEN, 1993, 1994; MATSUMOTO et al., 2006; FATIMA e AHMAD, 2006; MIGID et al, 2007). Além disso, as características cromossômicas desta espécie favorecem a aplicação do teste de AC, não apenas para investigação de efeitos genotóxicos, mas também para a compreensão de mecanismos de ação dos químicos investigados (FISKESJÖ, 1985; RANK e NIELSEN, 1997).

Considerando que hidrocarbonetos de petróleo podem apresentar efeitos danosos sob o material genético de organismos expostos e que a compreensão dos mecanismos de ação de tais agentes é fundamental para melhor entendimento de sua atuação sob o DNA, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos de ação de águas impactadas por hidrocarbonetos de petróleo em decorrência de vazamento de oleoduto.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Material de Estudo**

Amostra de água do rio Guaecá, localizado no Parque Estadual da Serra do Mar, Município de São Sebastião-SP, Brasil, foi utilizada como material de estudo para se avaliar as conseqüências na biota associada a este recurso hídrico, que foi impactado por petróleo decorrente de vazamento de oleoduto em fevereiro de 2004 (Figura 1). A coleta foi realizada em julho de 2005, na nascente do rio Guaecá (Figura 1), ponto este correspondente ao afloramento do óleo vazado para o rio e o único local do rio que foi detectada presença de hidrocarbonetos de petróleo (TPHs e PAHs), pelas análises químicas (Tabelas 1 e 2). Para o procedimento das coletas destas amostras foi adotada a metodologia de coleta de águas superficiais, descrita pela CETESB (1987), como segue: galões plásticos novos, com capacidade de 20L, foram, primeiramente, os submergidos nas águas do local de coleta, para uma lavagem previa do mesmo com a água do ponto a ser coletado. Após este procedimento, os recipientes foram, novamente, submergidos nas águas dos respectivos pontos, porém, em locais correspondentes aos pontos médios da largura do rio, até o completo preenchimento de seu volume. Após a coleta das amostras de águas, os galões foram, imediatamente, lacrados e refrigerados a  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , para o transporte.

## 2.2. Organismo-teste

Como organismo-teste, foram utilizadas sementes da espécie de *Allium cepa* (variedade baia periforme), marca<sup>®</sup> Topseed, por caracterizar-se em um material de análise homogêneo, tanto genética como fisiologicamente, proporcionando uma maior confiabilidade nos resultados.

## 2.3. Metodologia

Os ensaios de aberração de cromossômicas (AC) em células meristemáticas de radículas de *Allium cepa*, foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com algumas modificações. Sementes de cebola, dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro, foram submetidas à germinação na amostra de água coletada no rio Guaecá e nos tratamentos controles negativo e positivo, sendo utilizada uma placa de Petri para cada tratamento. Água ultrapura foi usada para o teste controle negativo, e  $4 \times 10^{-4}$  M de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3) para o controle positivo. Quando as radículas atingiram cerca de 2.0 cm de comprimento, elas foram coletadas e fixadas em ácido álcool-acético (3:1-v/v) por 24 h. Após a fixação, as raízes foram submetidas à coloração em reativo de Schiff, como descrito por Feulgen e Rossenbeck (1924, *appud* MELLO e VIDAL, 1978). Para o preparo das lâminas, os meristemas foram recobertos com lamínulas e, suavemente, esmagados em uma gota de carmim acético (2%). As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética, para serem, posteriormente, analisadas. Vários

tipos de AC foram analisados, nas diferentes fases de divisão celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase), sendo agrupados em categorias, de acordo com os mecanismos de ação. As quebras e as pontes cromossômicas foram reunidas como derivadas de efeito clastogênico, enquanto que as perdas, aderências, atrasos, multipolaridade e c-metáfases foram consideradas decorrentes de distúrbios nos fusos mitóticos, caracterizando o efeito aneugênico. Como indicativo de processos de morte celular, foram utilizadas as alterações nucleares classificadas de núcleos lobulados e células polinucleadas. A incidência de micronúcleos (MN), assim como o seu tamanho, também foram registrados para avaliação de ações clastogênica e/ou aneugênica. A análise se deu pela contagem de cerca de 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina para um total de 10 lâminas. Para a comparação das freqüências totais de células aberrantes, obtidas nos ensaios com a amostra de água do rio Guaecá e o controle negativo, foi aplicado o teste estatístico de Kruskal-Wallis.

### **3. Resultados**

Os resultados obtidos para o teste de AC, usando o sistema-teste de *Allium cepa*, estão reunidos na Tabela 3 e Figura 2.

Pela análise dos dados obtidos, observou-se que a freqüência total de células aberrantes foi significativamente maior, em relação ao controle negativo, após a exposição das sementes á amostra de água coletada no rio Guaecá (Tabela 3). Adicionalmente, a análise dos tipos de células aberrantes



mostrou-se diversificada, incluindo desde aberrações cromossômicas até alterações nucleares (Tabela 3, Figura 2).

Dentre as AC observadas, as quebras e as pontes cromossômicas apresentaram, quando agrupadas, as menores freqüências (0,43) quando comparadas com o agrupamento das demais aberrações como perdas, atrasos, aderências, multipolaridade e c-metáfases (1,46). Quanto às alterações nucleares, para o agrupamento das freqüências de núcleos lobulados e células poliplóides, obteve-se um valor de 1,06. Além disso, dentre as anormalidades nucleares, observamos a presença de MN para as radículas expostas a amostra de água do rio Guaecá. A análise de MN nestas radículas também mostrou uma variação quanto ao tamanho dos mesmos (Figura 2).

#### 4. Discussão

Teste de AC em *Allium cepa* caracteriza-se não apenas como um rápido exame de efeitos genotóxicos e mutagênicos de substâncias químicas presente no meio ambiente (FISKEJÖ, 1985, 1988; RANK e NIELSEN, 1993, 1994; GRANT, 1994, 1999; SMAKA-KINCL et al., 1996; COTELLE et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2006; MIGID et al., 2007), mas também como um sistema apto a avaliar mecanismos de ação de agentes químicos sob o DNA de organismos expostos (RANK e NIELSEN, 1997; FERNANDES et al., 2007 - *in press*).

A análise das freqüências totais de AC, obtidas no presente estudo, mostrou diferença significativa entre o teste com a água do rio Guaecá impactada por hidrocarbonetos e o controle negativo. No entanto, a avaliação

da frequência total de AC indica apenas a genotoxicidade desta água e não os mecanismos de ação dos hidrocarbonetos de petróleo sob o material genético do organismo-teste. Analisando, isoladamente, cada tipo de aberração encontrada, podemos inferir os efeitos destes químicos, quanto à sua ação clastogênica ou aneugênica.

Segundo Fenech et al. (2002), micronúcleos podem ser resultados de fragmentos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal durante o ciclo celular. Uma substância capaz de induzir a formação de micronúcleos pode ser considerada uma substância clastogênica ou aneugênica (YI et al., 2003). A ação clastogênica de uma substância é comprovada pela presença de micronúcleos decorrentes de quebras cromossômicas durante o processo de divisão celular, ao contrário da ação aneugênica, que é dada pela inativação do fuso mitótico, que levará a perda de cromossomos inteiros, ficando os mesmos ausentes no núcleo principal da célula.

Yamamoto e Kikuchi (1980) demonstraram que, medindo o diâmetro dos micronúcleos, era possível determinar se o agente era clastogênico ou aneugênico. Os autores observaram que os micronúcleos produzidos por agentes clastogênicos eram, de maneira geral, menores que aqueles produzidos por agentes aneugênicos. No entanto, apesar do método ter sido satisfatório para um grande número de micronúcleos, este não se mostrou confiável em muitos outros casos. Combes et al. (1995) concluíram que a análise do tamanho do micronúcleo não é parâmetro, suficientemente, seguro para a determinação da ação clastogênica ou aneugênica do xenobionte sobre

as células expostas. Fenech (2000), baseado em estudos com células humanas e de outros tipos celulares, afirma que o tamanho dos cromossomos, por ser heterogêneo, não confere em bom parâmetro para o estabelecimento de uma correlação segura entre o tamanho do micronúcleo e o indicativo de efeito clastogênico ou aneugênico. Para o autor, um micronúcleo pequeno pode conter tanto um fragmento de um cromossomo grande, como um cromossomo pequeno inteiro.

Contudo, ao contrário da espécie humana, algumas espécies de vegetais superiores têm sido amplamente empregadas para avaliação da genotoxicidade de agentes químicos, devido às boas características de seus cromossomos, que permitem, além da investigação do potencial genotóxico, a avaliação dos mecanismos de ações dos agentes testados. Dentre estas espécies, *Allium cepa* vem se destacado pelo seu padrão cariotípico simétrico, o qual apresenta homogeneidade quanto ao tamanho de seus cromossomos, sendo estes grandes, além de se encontrarem em número reduzido ( $2n=16$ ) (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985). Desta maneira, o método proposto por Yamamoto e Kikuchi (1980), de detecção de ações clastogênica e/ou aneugênica de uma substância em relação ao tamanho de micronúcleos, pode ser válido para sistema-teste de *A. cepa*.

Nossos dados mostraram MN de tamanhos variados e com diferentes graus de condensação em decorrência da exposição de radículas de *A. cepa* à amostra de água impactada do rio Guaecá. Tal resultado nos sugere que o petróleo, por ser constituído de uma mistura complexa de hidrocarbonetos, pode ter tanto uma ação clastogênica como aneugênica. Estas ações sobre o

material genético pode estar relacionada, principalmente, com os PAHs, pois os efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos já são reconhecidos para esta classe de poluentes (AINA et al., 2006). No entanto, apesar da utilização do método proposto por Yamamoto e Kikuchi (1980), outras técnicas, como bandamento cromossômicos (C, NOR e fluorocromos base-específicos) e hibridação *in situ* (FISH), devem ser aplicadas para a confirmação da hipótese proposta.

Fragmentos cromossômicos podem ser derivados de quebras cromossômicas decorrentes de pontes anafásicas, que por sua vez podem ser originadas de translocações cromossômicas coesivas (FISKEJÖ, 1993). Nossos resultados não mostraram freqüências elevadas de quebras cromossômicas nos meristemas radiculares de *A. cepa* submetidos às águas do rio Guaecá, porém, mostraram, como mencionado acima, freqüências elevadas de micronúcleos de tamanho e condensação variadas. Desta forma, os micronúcleos menores e mais condensados podem indicar a ocorrência de quebras cromossômicas, dadas pela ação clastogênica dos hidrocarbonetos de petróleo presentes nas águas do rio Guaecá.

Segundo Fiskejő e Levan (1993), Marcano e Del Campo (1995), Marcano et al. (1999), Türkoglu (2007) aderências cromossômicas são sinais comuns da ação tóxica sobre o material genético e decorre, provavelmente, em efeitos irreversíveis para a célula, promovendo a morte da mesma. Para Marcano et al. (2004), as aderências cromossômicas originam pontes e, conseqüentemente, quebras cromossômicas. As pontes cromossômicas decorrentes de aderências podem ser múltiplas e persistirem até a telófase

(GIACOMELLI, 1999). Nossos resultados mostraram a presença de aderências cromossômicas, porém, estas não se encontraram em frequências elevadas nas células meristemáticas expostas a água do rio Guaecá. No entanto, a simple presença de aderências nestas células pode esclarecer a presença de pontes e quebras cromossômicas nas memas, bem como de feitos aneugênicos, devido ao seu mecanismo de indução.

C-metáfases são evidências da ação aneugênica de uma substância, uma vez que proporcionam a completa inativação do fuso mitótico das células (FISKEJÖ, 1985; FISKEJÖ, 1993). Os fusos são inativados quando nenhuma placa equatorial é organizada, o que pode acarretar em um impedimento da divisão dos centrômeros. Segundo Krisch-Volders (2002) e Fernandes et al. (2007 - *in press*), a presença de C-metáfases pode levar a formação de núcleos poliplóides, embora o resultado mais freqüente seja a formação de uma grande quantidade de micronúcleos. Os resultados obtidos com os meristemas radiculares de *A. cepa* submetidos à amostra de água do rio Guaecá, não apresentou freqüência elevada de C-metáfases. Porém, nossos resultados parecem ser concordantes com os de Krisch-Volders (2002), uma vez que observamos uma grande quantidade de micronúcleos em células de *A. cepa* expostas à amostra de água do rio Guaecá, indicando uma ação aneugênica dos hidrocarbonetos presentes nesta amostra.

Segundo Türkoglu (2007), atrasos cromossômicos são decorrentes de falhas na movimentação dos cromossomos para os pólos opostos da célula, durante processos de divisão celular. Nossos dados mostraram baixas frequências de atrasos cromossômicos, porém, devido a sua decorrência, a

presença de tal categoria foi considerada como ação aneugênica da mistura de hidrocarbonetos testada.

De acordo com Rank e Nielsen (1998), anáfases multipolares decorrem do mau funcionamento do fuso mitótico, que distribui os cromossomos de forma irregular, encaminhando-os para mais de dois pólos nas células, contrariamente ao que ocorre em células de divisão normal. Em nossos estudos foram observadas baixas frequências de anáfases e telófases multipolares, para a amostra de água do rio Guaecá, mas uma elevada frequência de núcleos lobulados foi observada para o tratamento com esta amostra.

Fernandes (2005) mostrou que a formação de núcleos lobulados podem ser decorrentes de anáfases multipolares portadoras de pontes cromossômicas. Segundo a autora, essa instabilidade cromossômica instalada durante a divisão nuclear parece não impedir que a membrana nuclear se reestruture. Esta membrana acompanharia a distribuição irregular do material genético na célula e daria origem a estes núcleos disformes (núcleos lobulados). Pelos mesmos dados, concluímos que a presença de núcleos lobulados decorra na indução de processos de morte celular, uma vez que estes núcleos não aparecem nas análises de células  $F_1$  de radículas de *A. cepa* (LEME et al., 2007, no prelo).

Alguns autores acreditam que as perdas e quebras cromossômicas, como também o próprio material excedente, promovido por replicação do material genético, tendem a formar micronúcleos que podem vir a ser eliminados da célula, sob a forma de "mini cells", formando pequenas porções

citoplasmáticas portadoras de um reduzido conteúdo nuclear (FERNANDES et al., 2007 – *in press*). No presente estudo, foi observada uma frequência elevada de “mini cells” em meristemas radiculares de *A. cepa*, após tratamento com a amostra de água do rio Guaecá. A presença destas “mini cells” parece ser decorrentes da eliminação de MN de células multimicronucleadas, dados estes concordantes com os apresentados por FERNANDES et al. (2007 – *in press*), quando analisou efeito de agentes aneugênicos.

Contudo, a partir de toda análise realizada, concluímos que os hidrocarbonetos de petróleo podem apresentar tanto uma ação clastogênica como aneugênica, bem como induzir processos de morte celular, sob o material genético de organismos expostos. Adicionalmente, concluímos ainda que, provavelmente, estes efeitos sejam decorrentes da mistura de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs), como detectada pela análise química da amostra de água do rio Guaecá.

Por fim, concluímos que o teste de AC em *A. cepa*, associada a análise dos tamanhos de MN, confere em um bom método para a investigação de mecanismos de ação de agentes químicos. No entanto, a avaliação de outras técnicas citogenéticas é indicada, pois pode conferir uma maior certificação dos resultados.

### **Agradecimentos**

Gostaríamos de agradecer ao Dr. João Carlos C. Milanelli e ao Instituto Florestal, São Sebastião-SP, Brasil, pela colaboração prestada durante as coletas realizadas e ao Programa de Recursos Humanos ANP/FINEP/MCT-

CTPETRO, PRH-05, Universidade Estadual Paulista (UNESP)-Rio Claro pelo suporte financeiro.

### Referências

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.

BONASSI, S.; AU, W.W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. **Mutation Research**, v.511, p.73-86, 2002.

COMBES, R.D.; STOPPER, H.; CASPARY, W.J. The use of the L5178Y mouse lymphoma cells to assess mutagenic, clastogenic and aneugenic activity of chemicals. **Mutagenesis**, v.10, p.403-408, 1995.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.-F.; FÉRARD, J.-F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and *Tradescantia*-micronucleus assays. **Mutation Research**, v.426, p. 167-171, 1999.

FATIMA, R.A.; AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays, **Mutation Research**, v. 609, p. 81-91, 2006.



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

FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, Limerick, p.411-4116, 2002.

FERNADES, T.C.C., 2005. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2005. 212 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2005.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. (2007), doi:10.1016/j.pestbp.2006.12.003.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring, **Hereditas**, v.102, p. 99-112, 1985.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, v.197, p.243-260, 1988.

FISKESJÖ, G. The *Allium cepa* test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v.8, p.291-298, 1993.

FISKEJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium* test. **ATLA**, v.21, p.139-149, 1993.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, v.99, p.273-291, 1982.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v.310, p.175-185, 1994.

GRANT, W.F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutation – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, v.426, p.107-112, 1999.

GIACOMELLI, F.R.B. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para região sul**. 1999. 131f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR, 1999.

KRISCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v.504, p.137-148, 2002.

LEME, D.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome Aberration and Micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. 2007, no prelo.

MARCANO, L.; DEL CAMPO; A. Estudio ultraestructural del nucléolo en poblaciones meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L. tratadas com inhibidores metabólicos. **Ciencia**, v.3, p.73-82, 1995.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; MONTIEL, X.; MORENO, P. Inhibición de la actividad biosintética nucleolar inducidas por el plomo en meristemas radiculares de cebolla (*Allium cepa*). **Rev. Fac. Agron. Univ. Zulia**, v.16, p.476-487, 1999.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v.94, p.221-226, 2004.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTII, 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.

MIGID, A.H.M.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p.57-64, 2007.

NATARAJAN, A.T. Chromosome aberration: past, present and future, **Mutation Research**, v.504, p.3-16, 2002.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution, **Mutation Research**, v.504, p.17-36, 2002.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v.18, p.49-53, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, v.312, p.17-24, 1994.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on *N*-methyl-*N*-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, v.390, p.121-127, 1997.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v.418, p.113-119, 1998.

RANK, J.; LOPEZ, L.C.; NIELSEN, M.H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acedine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v.136, p.13-18, 2002.

RUSSEL, P.J. Chromosomal mutation. In: B. Cummings (Ed.), **Genetics**, Pearson Education Inc, San Francisco, 2002. p.595-621.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, v.368, p.171-179, 1996.

TÜRKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v.626, p.4-14, 2007.

YAMAMOTO, K.I.; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Research*, v.71, p.127-131, 1980.

YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* e *Vicia faba*. ***Mutation Research***, v.537, p.109-114, 2003.

**Tabela 1.** Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPHs) registrados pela análise química na amostra de água do rio Guaecá.

Amostra	Ponto de coleta	TPHs	Concentração (µg/l)	Limite Detecção (µg/l)
Julho 2005	ponto 1	C12	148.34	50,00
		C13	148.34	50,00
		C14	310.40	50,00
		C15	271.53	50,00
		C16	261.53	50,00
		C17	966.30	50,00
		C18	509.27	50,00
		Total de n-alcanos	2615.71	
		MCNR	79896.62	

MCNR: mistura complexa não resolvida

**Tabela 2.** Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) registrados pela análise química na amostra de água do rio Guaecá.

Amostra	Ponto de coleta	PAHs	Concentração (µg/l)	Limite de Detecção
Julho 2005	ponto 1	naftaleno	7.08	0,25
		acenaftileno	4.56	0,25
		acenafteno	1.91	0,25
		fluoreno	15.12	0,25
		fenantreno	78.78	0,25
		pireno	9.43	0,25
		benzo(a)antraceno	3.82	0,25
		criseno	18.88	0,25
		Total of PAHs	139.58	

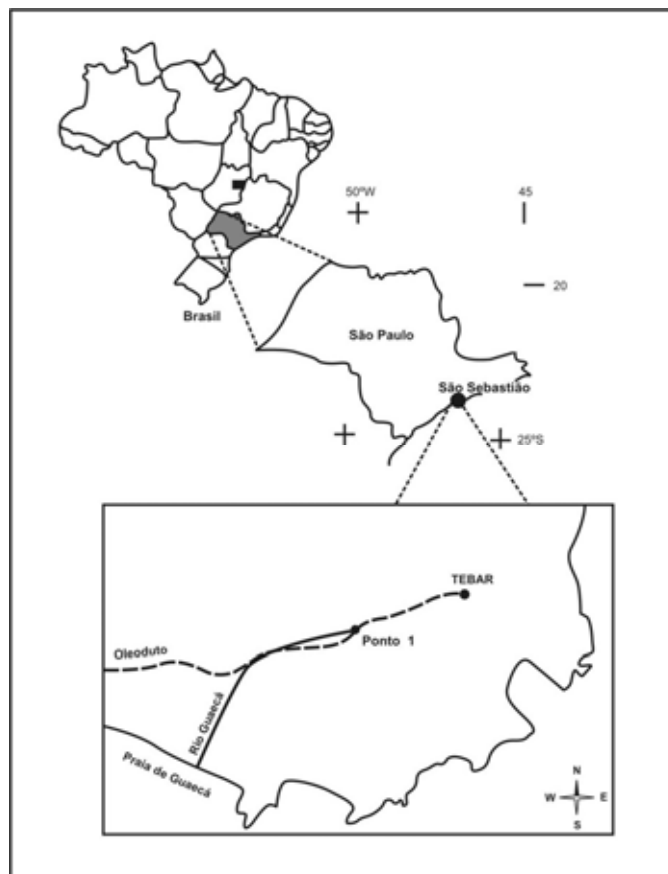
**Tabela 3.** Frequências de células aberrantes em radículas de *Allium cepa* expostas a amostra de água do rio Guaecá contaminada por hidrocarbonetos de petróleo.

	Controle Negativo (milli-Q)	Controle Positivo (MMS)	Amostra contaminada de água do rio Guaecá	
Aberrações Cromossômicas por 5000 células	<b>Quebras Cromossômicas</b>	0,01±0,31	0,16±0,87	0,05±0,67
	<b>Pontes Cromossômicas</b>	0,10±0,84	0,50±1,99	0,38±2,45
	<b>Perdas Cromossômicas</b>	0,01±0,31	0,14±1,13	0,31±1,45
	<b>Atrasos Cromossômicos</b>	0,01±0,31	0,07±0,51	0,10±0,70
	<b>Aderências Cromossômicas</b>	0,40±1,33	1,20±4,22	0,47±2,64
	<b>Multipolaridade</b>	0,01±0,31	0,02±0,31	0,20±0,70
	<b>C-metáfases</b>	0,08±0,70	0,07±0,51	0,38±2,82
	<b>Núcleos Lobulados</b>	0±0	0±0	1,05±6,65
Alterações Nucleares por 5000 células	<b>Células Poliplóides</b>	0±0	0,29±3,37	0,01±0,31
	<b>Brotos Nucleares</b>	0,07±0,96	0,48±1,71	1,86±8,37
	<b>Micronúcleos</b>	0,12±0,95	0,53±2,28	2,68±9,10
	<b>"Mini cells"</b>	0±0	0,02±0,31	1,96±8,13
	<b>Células aberrantes</b>	0,97±2,34	4,68±8,23*	10,45±23,45*

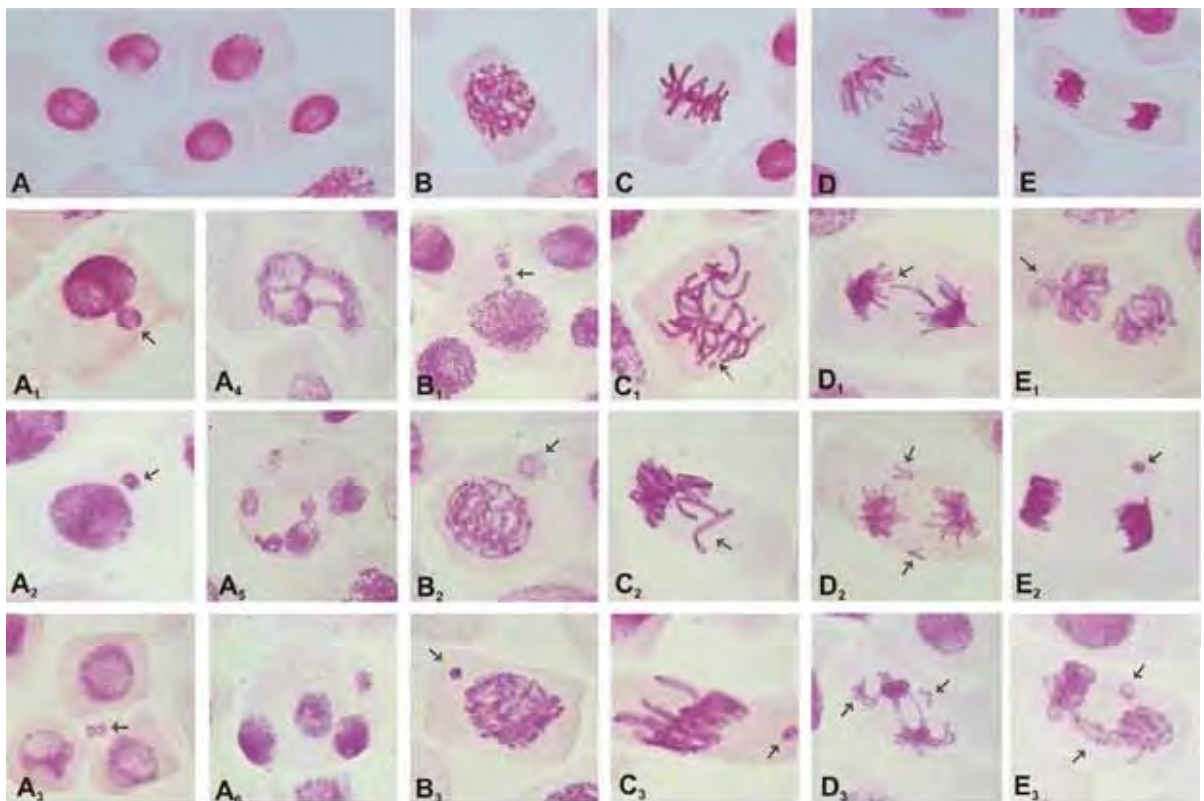
média±DP

\* diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.





**Figura 1.** Localização do Município de São Sebastião, do ponto de coleta no rio Guaecá (ponto 1) e do oleoduto responsável pelo impacto de óleo no referido rio.



**Figura 2.** Células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao tratamento controle negativo e à amostra de água do rio Guaecá. **A.** Núcleo interfásico; **A<sub>1</sub>**. Broto nuclear; **A<sub>2</sub>**. MN; **A<sub>3</sub>**. "Mini cells"; **A<sub>4</sub>**. Núcleo lobulado; **A<sub>5</sub>** e **A<sub>6</sub>**. Células polinucleadas com MNs; **B.** Prófase; **B<sub>1</sub>**. Início de formação de "mini cells" em prófase; **B<sub>2</sub>**. Prófase com MN de tamanho grande e pouco condensado; **B<sub>3</sub>**. Prófase com MN de tamanho pequeno e condensado (não sincronismo de fase entre o micronúcleo e o núcleo principal); **C.** Metáfase; **C<sub>1</sub>**. Metáfase com quebra cromossômica, **C<sub>2</sub>**. Metáfase com perda cromossômica; **C<sub>3</sub>**. Metáfase com MN (não sincronismo de fase entre o micronúcleo e o núcleo principal); **D.** Anáfase; **D<sub>1</sub>**. Anáfase com ruptura de ponte cromossômica; **D<sub>2</sub>**. Anáfase com perda cromossômica; **D<sub>3</sub>**. Anáfase multipolar com ponte e perda cromossômica; **E.** Telófase; **E<sub>1</sub>**. Telófase com material genético se separando do conjunto de cromossomo que constituirá o núcleo filho; **E<sub>2</sub>**. Telófase com MN (não sincronismo de fase entre o micronúcleo e o núcleo principal); **E<sub>3</sub>**. Telófase com ponte cromossômica e MN.

## **6. CONCLUSÃO GERAIS**

---

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que:

- as análises de metais não se mostraram relevantes para o presente trabalho pela falta de dados anterior ao vazamento que caracterizassem os traços de metais naturais das águas do rio Guaecá;

- análises químicas de hidrocarbonetos de petróleo, principalmente de PAHs, são importantes para a certificação das reações dos organismos-teste aos agentes estudados, como visualizado no presente trabalho, no qual mutagenicidade foi detectada pelo teste de *Allium cepa* apenas para a amostra de água contaminada por TPHs e PAHs, conforme os resultados da análise química;

- águas impactadas por hidrocarbonetos de petróleo podem apresentar efeitos genotóxicos e mutagênicos aos organismos expostos, conforme observado no rio Guaecá pela avaliação de suas águas por meio do sistema-teste de *Allium cepa*;

- o correto gerenciamento dos vazamentos de oleodutos pode levar a recuperação da qualidade das águas previamente impactadas, como visualizado no caso do rio Guaecá, no qual os resultados das análises

químicas de hidrocarbonetos de petróleo e do teste de *Allium cepa* não indicaram contaminações por estes agentes na coleta de fevereiro de 2006;

- a partir dos resultados obtidos para o sistema-teste de *Allium cepa*, sugerimos que, para obtenção de resultados mais confiáveis, o uso de sedimento como substrato de germinação de sementes de *A. cepa* pode ser mais eficiente que a realização de ensaios com extratos solubilizados ou lixiviados;

- os testes de AC e MN em células meristemáticas de *Allium cepa* e o teste de MN em células F<sub>1</sub> desta mesma espécie se mostraram eficientes para avaliação dos efeitos mutagênicos dos agentes químicos estudados. Adicionalmente, os testes de AC e MN em células meristemáticas de *A. cepa* também se mostraram eficientes para avaliação dos mecanismos de ação dos hidrocarbonetos de petróleo estudados. Assim, a análise de ambos os testes parece ser indicada para avaliação de contaminações por hidrocarbonetos de petróleo;

- o sistema-teste de *Allium cepa* mostrou-se sensível às análises propostas, sendo indicado para a detecção e avaliação de contaminações de águas por hidrocarbonetos de petróleo, ao contrário do sistema-teste de *Oreochromis niloticus*, que, por dificuldades na realização dos ensaios, não se caracterizou em bom organismo-teste.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABD-ALLAH, G.A.; EL-FAYOUMI, R.I.; SMITH, M.J.; HECKMANN, R.A.; O'NEILL, K.L. A comparative evaluation of aflatoxin B1 genotoxicity in fish models using the comet assay. **Mutation Research**, v.446, p.181-188, 1999.

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINK, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.; TICE, R.; WATER, M.D.; AITIO, A. IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, v.463, p.111-172, 2000.

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

ALVES-COSTA, J.R.M. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação de chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus***. 2001 [s.n.] Dissertação

(Mestrado em Biologia Celular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR. 2001.

[API] American Petroleum Institute. In: **About Oil and Natural Gas**. Disponível em: <http://www.api.org/aboutoilgas/>. Acesso em: outubro 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT. NBR – 10006 – **Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004. 3p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT. NBR – 10007 – **Procedimento para amostragem de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004.

AATEEQ, B.; ADUL FARRAH, M.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2-4-D and butachlor evaluated by Allium rot tip test. **Mutation Research**, v.514, p.05-113, 2002a.

AATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; ALI, M.N.; AHAMAD, W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, v.518, p.135-144, 2002b.

AVISHAI, N.; RABINOWITZ, C.; MOISEEVA, E.; RINKEVICH, B. Genotoxicity of Kishon River, Israel: the application of an *in vitro* celular assay. **Mutation Research**, v.518, p.21-37, 2002.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of fish micronucleus test. **Mutation Research**, v.467, p.177-186, 2000.

BARAHI, I.B.; NOOR, F.M.; DAUD, N.M. Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*. **Mutation Research**, v.313, p.1-5, 1994.

BARSIENĖ, J.; DEDONYTĖ, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKĖNAITĖ, L.; ANDERSEN, O.K. Investigation of micronuclei and nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquatic Toxicology**, v.78, p.99-104, 2006.

BELPAEME, K.; DELBEKE, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cytogenetic studies of PCB on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v.11, p.485-492, 1996.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K. ZHU, L.; 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.

BIHARI, N.; FAFANDEL, M. HAMER, B. KRALJ-BILEN, B. PAH content, toxicity and genotoxicity of coastal marine sediments from the Rovinj area, Northern Adriatic, Croatia. **Science of the Total Environment**, v.366, p.602-611, 2006.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; SCIUTTO, A. Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of oil spill: Haven case study. **Marine Environmental Research**, v.62, p.287-291, 2006.

BOMBAIL, V.; DENNIS, A.W.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v.44, p.383-392, 2001.

BONASSI, S.; AU, W.W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. **Mutation Research**, v.511, p.73-86, 2002.

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



ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, v.538, p.81-91, 2003.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v.74, p.264-271, 2005.

ÇAVAS, T.; GARANKO, N.N.; ARKHIPCHUK, V.V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.569-574, 2005.

CHEN, G.; WHITE, P.A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. **Mutation Research**, v.567, p.151-225, 2004.

[CETESB] Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. Coord. Edmundo Garcia Agudo (et al.) São Paulo, 1987.

[CETESB] Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Relatório Técnico: Acidente com o Oleoduto OSBAT – PETROBRAS / TRANSPETRO - GUAECÁ – SÃO SEBASTIÃO**. São Paulo, 2005.

[CETESB] Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Portal do governo do Estado de São Paulo. São Paulo, 2007. In: **Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis>. Acesso em: janeiro 2007.

COLLINS, A.R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principle, Applications and Limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p.249-261, 2004.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.-F.; FÉRARD, J.-F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and *Tradescantia*-micronucleus assays. **Mutation Research**, v.426, p.167-171, 1999.

CORMARK, D.M. **Ham's Histologia**, 9 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1991. p.5 e p.35.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v.521, p.121-135, 2002.

DOYLE J. Crude awakening: the oil mess in America. Washington: Friends of the Earth, 1994. In: **AGENCY OF TOXIC SUBSTANCE DISEASE REGISTRY**. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles>. Acesso em: outubro de 2006.

[EPA] Environmental Protect Agency. In: **Water Pollution**. Disponível em: <http://www.epa.gov/ebtpages/watewaterpollution.html>. Acesso em: janeiro de 2007.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2 ed., 1998. p.602.

FATIMA, R.A.; AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays. **Mutation Research**, v.609, p.81-91, 2006.

FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v.14, n.6, p.605-612, 1999.

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

FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, Limerick, p.411-4116, 2002.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. (2007), doi:10.1016/j.pestbp.2006.12.003.

FISKESJÖ, G.; LASSEN, C. Benzo[a]pireno and nitrosoguanidine in the *Allium* test. **Mutation Research**, v.97, p.188, 1982.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, p.99-112, 1985.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, v.197, p.243-260, 1988.

FISKESJÖ, G. The *Allium cepa* test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v.8, p.291-298, 1993.

FREITAS, V.P.S.; BRÍGIDO, B.M.; BADOLATO, M.I.C.; ALABURDA, J. Padrão físico-químico da água de abastecimento público da região de Campinas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.61, n.1, p.51-58, 2002.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in Allium. **Mutation Research**, v.99, p.273-291, 1982.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v.310, p.175-185, 1994.

GRASSI, L.E.A. Uso da técnica de micronúcleos para avaliação de genotoxicidade em peixes dos rios Jaguari e Atibaia – Bacia Hidrográfica do Rio Piracicaba – São Paulo – Brasil, In: **Hematologia, biometria, teor de compostos organoclorados e frequência de formação de micronúcleos em teleósteos de água doce, sob diferentes condições limnológicas**. 2002. 166 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2002.

GRAVATO, C.; SANTOS, M.A. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.55, p.352-358, 2003.

GRISOLIA; C.K.; STARLING, F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, v.491, p.39-44, 2001.

GÓES, R.C.S. **Toxicologia Industrial: um guia prático para prevenção e primeiros socorros**. Rio de Janeiro: Revinter, 1997.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p.173-200.

HAGMAR, L.; STROMBERG, U.; BONASSI, S.; HANSTEEN, I.-L.; KNUDSEN, L.E.; LINDHOLM, C.; NORPPA, H. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: result from Nordic and Italian cohorts. **Cancer Research**, v.64, p.2258-2263, 2004.

HANS-JOACHIM, N.; PACZYŃSKA-LAHME, B.; SEVERIN, D. **Composition and properties of petroleum**. Stuttgart: Enke, 1981.

HAMOUTENE, D.; PAYNE, J.F.; RAHIMTULA, A.; LEE, K. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbon. **Marine Environmental Research**, v.54, p.471-474, 2002.

HARSHBARGER, J.C.; CLARCK, J.B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North-America. **Science of the Total Environment**, v.94, n.1-2, p.1-32, 1990.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, v.399, n.2, p.125-133, 1998.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; IRKHART, B.; MACGREGOR, J.T.E.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity – a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, v.123, p.61-118, 1983.

HIGASHI, K. Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. **Mutation Research**, v.197, p.273-288, 1988.

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

HOSE, J.E.; CROSS, J.N.; SMITH, S.G.; DIELL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of southern California. **Marine Environmental Research**, v.22, p.167-176, 1987.

HOSHINA, M.M. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de petróleo, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e**

**Oreochromis niloticus**. 2005. 160 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2005.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. **Mutation Research**, v.277, p.91-138, 1992.

[ITOPF] International Tanker Owners Pollution Federation. 1987. **Response to Marine Oil Spills**. London: Witherby.

KIRSCH-VOLDERS, M.; CUNDARI, F.; VERDOODT, B. Towards a unifying model for the metaphase/anaphase transition. **Mutagenesis**, v.13, p.321-335, 1998.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v.504, p.137-148, 2002.

KLIGERMAN, A.D. Fishes as biological detectors of the effects genotoxic agents. In: HEDDLE, J. A. (ed). **Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology**, Academic Press, 1982. p.435-456.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAMA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gel electrophoresis. **MMS Comm**, v.3, p.103-115, 1995.



KOPPEN, G.; TONCELLI, L.M.; TRIEST, L.; VERSCHAEVE, L. The comet assay: a toll to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.110, n.1-2, p.13-24, 1999.

KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, ROKOSZ, K. The comet assay for detection of potential genotoxicity of polluted water. **Folia biologica**, v.45, n.3-4, p.153-156, 1997.

KOVALCHUCK, O.; KOVALCHUCK, I.; ARKIPOV, A.; TELYUK, P.; HOHN, B.; KOVALCHUCK, L. The *Allium cepa* chromosome aberration test realibly measures genotoxicity of soils of inhabited areas in Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, v.415, p.47-57, 1998.

LANDOLT, M.L.; KOCAN, R.M. Fish cell cytogenetics: a measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. In: NRIAGU, J.R. **Aquatic Toxicology**. New York: J. Wiley, 1983, p.336-353.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel eletrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v.544, p.43-64, 2003.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. **Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico de águas e sedimentos do rio Guacá, São Sebastião – SP, após impacto de vazamento de oleoduto da região, utilizando o sistema-**

**teste de Allium cepa.** In: IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, São Pedro/SP, 2006.

LEVAN, A. The effect of colchicines in root mitosis in Allium. **Hereditas**, v.24, p.471-486, 1938.

LEVAN, A. Cytological reactions induced by inorganic salt solutions. **Nature**, v.156, p.751-752, 1945.

LÓPEZ-BARREA, J. Biomarkers to detect environmental pollution. *Toxicology Letters*, v.88, p.79, 1996.

MA, T.-H.; XU, Z.; XU, C.; McCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.334, p.185-195, 1995.

MacGREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; GOULD, D.R. Clastogen induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. **Environmental Mutagenesis**, v.2, n.4, p.509-514, 1980.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KRISCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v.88, p.1515-1531, 2006.

MATSUMOTO, S.T. **Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP**. 2004. 216 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto/SP, 2004.

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.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: A bacia do rio Tibagi, cap.29m p.551-557, 2002.

McNAMEE, J.P.; McLEAN, J.R.N.; FERRAROTTO, C.L.; BELLIER, P.V. Comet assay: rapid processing of multiple samples. **Mutation Research**, v.466, p.63-69, 2000.

MIGID, A.H.M.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p.57-64, 2007.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potencial value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v.399, n.2, p.135-147, 1998.

MONTEITH, D.K.; VANSTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of the DNA damage. **Mutation Research**, v.345, n.3 1995.

NACCI, D.E.; CAYULA, S.; JACKMIN, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**, v.35, p.197-210, 1996.

NAKANO, T.MD.; OKA, K. MD. Transition of Ki-67 index of uterine cervical tumors during radiation therapy. **Cancer**, v.68, p.517-523, 1991.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, v.504, p.17-36, 2002.

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

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Induction of EROD activity and genotoxicity effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.38, p.252-259, 1998.

PALAHRES, D.; GRISOLIA, C.K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in Tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.281-284, 2002.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline Single Cell Gel (comet) Assay and Genotoxicity Monitoring using Bullheads and Carp. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v.26, p.345-356, 1995.

PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M.; CORSEUIL, H.X.; SCHNEIDER, M.R.; LINHARES, M.M. **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo**. Salvador: NEAMA, 2002. p.229.

PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; STAVREVA, D.A.; GICHNER, T. Plant activation and its role in environmental mutagenesis and antimutagenesis. **Mutation Research**, v.350, p.163-171, 1996.

PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; JU, Y.H. The plant activation of aromatic amines into unique high molecular weight agents that induced genomic DNA damage in mammalian cells. IN: MALUSZYNSKA, J.; PLEWA, M. (Org.).

**Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and human Health: a course manual.** Katowice, 2003. p.39-60.

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

PRZYGODA, R.T.; McKEE, R.H.; AMORUSO, M.A., FREEMAN, J.J. Assessment of the utility of the micronucleus test for petroleum-derived materials. **Mutation Research**, v.438, p.145-153, 1999.

RABELO-GAY, M.N.; RODR'IGUEZ, M.A.R.; MONTELEONE-NETO, R. Testes com organismos superiores. In: **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação.** Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, 1991. 59p.e 75p.

RANK, J.; JENSEN, A.-G.; SKOV, B.; PEDERSEN, L.H.; JENSEN, K. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and Allium anaphase-telophase test. **Mutation Research**, v.300, p.29-36, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v.18, p.49-53, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, v.312, p.17-24, 1994.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, v.390, p.121-127, 1997.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v.418, p.113-119, 1998.

RANK, J.; LOPEZ, L.C.; NIELSEN, M.H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v.136, p.13-18, 2002.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003.p.201-219.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A impotência da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p.21-27.

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

ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v.722, p.25-254, 1999.

RUSSEL, P.J. Chromosomal mutation. In: B. Cummings (Ed.), **Genetics**, Pearson Education Inc, San Francisco, 2002. p.595-621.

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCLACHI, M.A.; STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, p.168-174, 2004.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A.R.; IZQUIERDO, J.I.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and fluctuating assymetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. **Mutation Research**, v.412, p.219-225, 1998.

SASAKI, Y.F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and alkaline



single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, v.393, n.1-2, p.133-139, 1997.

SCHMIDT, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLANDER, A. **Chemical Mutagenesis: Principles and Methods for Their Detection**. New York: Plenum Press, 1976, p.31-53.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, n.1, p.184-191, 1988.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. **Mutation Research**, v.368, p.171-179, 1996.

SOUZA, T.S. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo, utilizando Oreochromis niloticus (Perciformes, Cichlidae) como organismo-teste**. 2005. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2005.

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.

STARLING, F.L.R.M. **Development of biomanipulation strategies for the remediation of eutrofication problems in an urban reservoir, Lago Paranoá, Brazil.** PhD Thesis. University of Stirling, Scotland, 1998.

STEINERT, S.A., Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. **Marine Environmental Research**, v.42, p.253-259, 1996.

TANAKA, P.R. **O papel das tilápias (*Oreochromis niloticus*) no ciclo do fósforo no Lago Azul (Rio Claro-SP).** 2001. 40 f. (Trabalho de Conclusão de Curso – Ecologia) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2001.

TATES, A.D.; NEUTEBOOM, I.; HOFKER, M. DEN ENGELSE, L. A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN/DMN) in hepatocytes of rat liver *in vivo*. **Mutation Research**, v.74, p.11, 1980.

TICE, R.R. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D.H.; VENITT, S. (Eds.), **Environmental Mutagenesis**. Bios scientific Publishers, Oxford, p.315-339, 1995.

TICE, R.R., AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other anomalies in buccal smears: a field test in snuffs users. **American Journal of Epidemiology**, v.134, n.8, p.840-850, 1991.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, v.271, p.69-77, 1992.

TÜRKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v.626, p.4-14, 2007.

UHL, M.; PLEWA, M.J.; MAJER, B.J.; KNASMÜLLER, S. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. In: MALUSZYNSKA, J.; PLEWA, M. (Org.). **Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and human Health: a course manual**. Katowice, 2003. p.11-30.

UNDROI, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v.79, p.201-204, 2006.

VANZELLA, T.P. **Efeitos genotóxicos e mutagênicos da fração solúvel do óleo diesel em uma espécie de peixe neotropical**. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina/PR, 2006.

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

VIJAYAN, M.M.; MORGAN, J.D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E.G.; IWAMA, G.K. Food privation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal of Experimental Biology**, v.199, p.2467-2475, 1996.

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

Yi, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* e *Vicia faba*, **Mutation Research**, v.537, p.109-114, 2003.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.