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

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE MISTURAS
COMERCIAIS DE DIESEL E BIODIESEL PURAS E EM SIMULAÇÕES DE
VAZAMENTO EM ÁGUA E SOLO**

DANIELA MORAIS LEME

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

Dezembro - 2010



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO**



**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE MISTURAS
COMERCIAIS DE DIESEL E BIODIESEL PURAS E EM SIMULAÇÕES DE
VAZAMENTO EM ÁGUA E SOLO**

DANIELA MORAIS LEME

Orientador: Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES

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

**Rio Claro
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 2010**

574.88 Daniela Morais Leme
L551a Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de misturas comerciais de diesel e biodiesel puras e em simulações de vazamento em água e solo / Daniela Morais Leme. - Rio Claro : [s.n.], 2010
204 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales

1. mutagênese ambiental. 2. poluição ambiental. 3. contaminação de sistemas aquáticos e solos. 4. impactos do biodiesel e diesel. 5. efeitos citotóxicos. 6. efeitos mutagênicos. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Ivani e José Celso. Não há palavras para expressar a importância de vocês na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales, agradeço por todos estes anos de convivência, que foram muito valiosos para mim. Obrigada pelas oportunidades concedidas e pela alta credibilidade em meu trabalho, sempre me motivando a continuar a carreira de pesquisadora.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado concedida, que viabilizou a execução deste trabalho (Processo No. 2007/04304-3).

À BioVerde, empresa brasileira de biocombustível, pelo fornecimento dos combustíveis biodiesel e diesel utilizados no presente trabalho.

À Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi pela parceria estabelecida para a realização da parte química deste projeto. Agradeço não só por esta parceria, mas pelas sugestões e incentivo, que contribuíram imensamente na melhor execução deste trabalho.

Ao Marcos Canto Machado, integrante do grupo da Profa. Mary Rosa, agradeço pela execução dos procedimentos de extração das amostras teste e pela realização das análises químicas.

À Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira pela valiosa co-orientação no teste de Ames e por todas as discussões e demais colaborações prestadas a este trabalho.

À Elisa R. A. Ferraz pela paciência em me ensinar o teste de mutagenicidade com *Salmonella*.

À Dr. Tamara Grummt por conceder-me a grande oportunidade de trabalhar na Agência de Proteção Ambiental Alemã (UBA - Umweltbundesamt) sob sua supervisão.

Ao Davi Butturi Gomes por toda assessoria estatística prestada.

Aos professores e funcionários do departamento pela assessoria prestada a este trabalho e pela agradável convivência.

Aos amigos e colegas de departamento: Cintya, Cris, Marielle, Reinaldo, Simone, Tiago, Tati.

À todos marinzetes, não vou listar todos aqui pois são muitos, por toda ajuda prestada a este trabalho e pelos ilários momentos de descontração.

À toda minha família e amigos por sempre estarem ao meu lado em qualquer situação. Obrigada pelo amor, carinho e por tornarem uma vida feliz.

À minha querida irmã Luciana parte fundamental na minha vida. Obrigada por você existir, pois se não o que seria de mim sem uma irmã 11 meses mais velha.

À minha querida avó Irani pelo amor, carinho e inúmeras orações.

À minha prima Cecilia Carmem por todo suporte dado nos momentos difíceis e por não me deixar desistir dos meus objetivos. Agradeço também pelo amor, carinho e momentos divertidos.

Ao Fred, meu amado "unido", pela sinceridade, amizade, companheirismo e ajuda na minha vida profissional. Obrigada por fazer parte da minha vida e tornar meus dias mais felizes.

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

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho e peço desculpas caso tenha esquecido alguém.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TEMA	1
2. OBJETIVOS	9
3. REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1. Contextualização do combustível biodiesel	
3.2. Efeitos adversos a saúde de organismos vivos em decorrência da exposição à fitoestrógenos	
3.3. Ensaio de mutagenicidade com <i>Salmonella typhimurium</i>	11
3.4. A utilização do sistema-teste de <i>Allium cepa</i> para a avaliação de mutágenos	17
3.5. Citometria de fluxo e Genética Toxicológica	18
3.6. Avaliação da citotoxicidade de poluentes ambientais	20
3.7. Emprego do ensaio do cometa para detecção do potencial genotóxico de químicos ambientais	25
3.8. Avaliação da mutagenicidade de poluentes ambientais pelo teste do Micronúcleo (MN)	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Material	31
4.2. Métodos	32
4.2.1. Simulação de vazamento de misturas de diesel e biodiesel em solo	32
4.2.2. Simulação de vazamento de misturas de diesel e biodiesel em água	33
4.2.3. Procedimentos de preparo das amostras de solo obtidas pelas simulações de vazamento realizadas	33
4.2.4. Procedimentos de preparo das amostras de água obtidas pelas simulações de vazamento realizadas	34

4.2.5. Análise química de PAHs	36
4.2.6. Ensaio <i>in vivo</i>	37
4.2.6.1. Bioensaios com sementes de <i>A. cepa</i> (tratamento contínuo)	37
4.2.6.2. Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de <i>A. cepa</i>	38
4.2.7. Ensaio <i>in vitro</i>	39
4.2.7.1. Determinação das doses testadas das amostras teste	39
4.2.7.2. Ensaio de mutagenicidade com <i>Salmonella typhimurium</i>	39
4.2.7.2.1. Protocolo de Pré-Incubação	39
4.2.7.2.2. Ames MPF (<i>Microplate Fluctuation Protocol</i>)	41
4.2.7.3. Ensaio com cultura de células de mamíferos	43
4.2.7.3.1. Cultura Celular	43
4.2.7.3.2. Teste do MTT em cultura de células HepG2	43
4.2.7.3.3. Ensaio do cometa em células HepG2	44
4.2.7.3.4. Teste do MN padrão em células HepG2	46
4.2.7.3.5. Teste do MN em citometria de fluxo [<i>in vitro MicroFlow</i> [®] <i>kit (Litron) assay</i>]	46
4.2.7.3.6. Detecção alterações no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	48
4.2.7.3.7. Detecção de células apoptóticas pelo emprego de Anexina V [<i>Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I</i>]	49
4.2.7.3.8. Avaliação da citotoxicidade pelo sistema xCELLigence TM	50
5. RESULTADO E DISCUSSÕES	52
5.1. Resultados da análise química de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs)	52

5.2. Resultados do teste de <i>Allium cepa</i> referente às amostras de água	55
5.3. Resultados dos ensaios realizados em células HepG2 com as amostras brutas de água	57
5.3.1. Teste do MTT	59
5.3.2. Ensaio do Cometa	60
5.3.3. Teste do MN padrão	61
5.4. Resultados do teste do MN <i>in vitro</i> em citometria de fluxo com células HepG2	63
5.5. Artigo 1	70
<i>Allium cepa</i> test in environmental monitoring: A review on its application	
5.6. Artigo 2	81
<i>Mutagenicity assessment of water systems polluted by biodiesel and its diesel blends using the Salmonella assay and the in vitro MicroFlow® kit (Litron) assay</i>	
5.7. Artigo 3	117
<i>In vitro</i> cytotoxicity assessment of biodiesel and its diesel blends in cases of water pollution	
5.7. Artigo 4	147
<i>An overview of biodiesel soil pollution: data based on cytotoxicity and mutagenicity assessments</i>	
6. CONCLUSÕES GERAIS	186
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	188

LISTA DE ABRVIATURAS E SIGLAS

2AA	2-aminoantraceno
2-AAF	2-acetylaminofluorene
2-AF	2-aminofluoreno
2-NF	2-nitrofluoreno
4NQO	4-nitroquinolina-1-óxido
AC	Aberrações Cromossômicas
Ames MPF	<i>Microplate Fluctuation Protocol</i>
Anexina V ⁻ /PI ⁻	Células normais (ausência de processos de morte celular)
Anexina V ⁺ /PI ⁻	Células em apoptose
Anexina V ⁺ /PI ⁺	Células em necrose ou estágios finais de apoptose
ANP	Agência Nacional do Petróleo
ATP	Adenosina Trifosfato
B100	Biodiesel puro
B20	Mistura 20% de biodiesel + 80% de diesel
B5	Mistura 5% de biodiesel + 95% de diesel
B50	Mistura 50% de biodiesel + 50% de diesel
CHO-K1	Linhagem celular - <i>Chinese hamster ovary cells</i>
CI	Índice Celular (<i>Cell index</i>)
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
D100	Diesel puro
DMSO	Dimetilsulfóxido

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNOC	2-metil-4,6-dinitrofenol
EDC	disruptor endócrino (<i>endocrine disrupting compound</i>)
EMA	Brometo de Etídio Monoazídico (<i>Ethidium Monoazide Bromide</i>)
FI	<i>Fold Increase</i>
FIB	<i>Fold Increase Over Baseline</i>
HepG2	Linhagem celular - <i>Human hepatocellular carcinoma cells</i>
HPLC-Flu	Cromatografia Líquida Associada a um Detector de Fluorescência
IM	Índice Mitótico
Jurkat	Linhagem celular - <i>Human T cell leukemia</i>
MMC	Mitomicina C
MMS	Metilmetano Sulfonato
MN	Micronúcleo
MP	Membrana Plasmática
MSPD	Dispersão da Matriz em Fase Sólida
MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>
N4-ACT	<i>N⁴-aminocytidine</i>
PAH	Hidrocarboneto Policíclico Aromático (<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>)
PBS	Tampão Fosfato-salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PI	Iodeto de Propídio (<i>Propidium Iodide</i>)
PS	Fosfolipídio Fosfatidilserina (<i>Phospholipid Phosphatidylserine</i>)
SBMCTA	Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental

SD	Desvio Padrão (<i>Standard Deviation</i>)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
TMRE	<i>Tetramethylrhodamine Ethyl Ester</i>
UBA	Agência de Proteção Ambiental Alemã (<i>Umweltbundesamt</i>)
US EPA	United States Environmental Protection Agency
V79	Linhagem celular - <i>Chinese hamster fibroblast cells</i>
VB	Vimblastina
$\Delta\Psi_m$	Potencial de Membrane Mitochondrial

RESUMO

A questão energética é hoje um tema de preocupação mundial. A limitação das fontes de energia fóssil e seus efeitos indesejáveis ao meio ambiente têm estimulado a busca de novas fontes alternativas, desde que renováveis. Em diversos países, como no Brasil, têm sido destinados grandes incentivos ao desenvolvimento do setor de biocombustíveis, no qual se inclui o biodiesel. O futuro promissor do biodiesel está relacionado não apenas ao fato de ser um combustível renovável, mas também às suas contribuições na redução da emissão de poluentes atmosféricos e à sua maior degradabilidade, em relação aos combustíveis fósseis. No entanto, poucos são os estudos realizados com o biodiesel para avaliar os seus possíveis impactos, quando usados puro ou em misturas ao óleo diesel, sobre o ambiente (principalmente corpos d'água e solos) e sobre os organismos vivos, em caso de uma possível contaminação ambiental. O presente estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do biodiesel e de suas misturas com diesel (B5, B20 e B50), por meio de simulações de vazamento em água e solo. As simulações foram realizadas no verão, para caracterizar um vazamento em condições tropicais, sendo aplicados diferentes ensaios biológicos [teste de *Allium cepa*, ensaio *Salmonella*/microsoma, ensaios de mutagenicidade com células CHO-K1 e HepG2 *in vitro*, ensaio para detecção de indução de morte celular (alterações do $\Delta\Psi_m$, externalização da fosfatidilserina), avaliação da citotoxicidade em tempo real (sistema xCELLigence™)] nas amostras de água e solo obtidas nos experimentos. Foi observada no presente estudo uma significativa citotoxicidade, que foi relacionada com constituintes do óleo diesel, mais especificamente, com os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs). Já os efeitos genotóxicos/mutagênicos, observados nos demais ensaios realizados com o diesel e biodiesel, mostraram ser decorrentes da ação de constituintes presentes na matéria-prima utilizada na produção do biodiesel e que persistem no biocombustível comercializado. Os resultados toxicológicos mostraram que o biodiesel pode ser tão prejudicial ou, até mesmo, mais prejudicial que o diesel. Estes dados alertam para a necessidade de cautela na utilização deste combustível, pois mesmo não causando grandes emissões de poluentes atmosféricos, não pode ser reconhecido como um recurso energético ambientalmente seguro.

Palavras-chaves: Biodiesel de soja, Diesel, Contaminação de Água e Solo, Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade

ABSTRACT

The energy-related issue is currently a subject that causes world concern. The limitations of fossil energy sources and their undesirable effects upon the environment have encouraged the search for new alternative sources, as long as they are renewable ones. In several countries, like Brazil, great incentives have been allocated to the development of the biofuel sector, and that includes biodiesel. The promising future of biodiesel is related not only the fact of being a renewable biofuel, but also to its contribution to reducing release of air pollutants and its higher degradability when compared to fossil fuels. Nevertheless, not enough studies have been conducted with biodiesel to evaluate their possible impacts – either when they are used crude or in biodiesel blends – upon both the environment (especially water bodies and soils) and living organisms, should there be environmental contamination. The aim of this study was to assess toxicity, genotoxicity and mutagenicity of biodiesel and its diesel blends (B5, B20 and B50), by simulating spills into water and soil. The simulations were carried out in the summer in order to characterize a spill under tropical conditions, and different assays [*Allium cepa* test, *Salmonella* mutagenicity assay, in vitro mutagenicity assays with CHO-K1 and HepG2 cells line, detection of cell death inductions (changes in $\Delta\Psi_m$, phosphatidylserine externalization), cytotoxicity assessment by xCELLigence™ system] were conducted using soil and water samples obtained in the experiment. In this study, significant cytotoxicity was observed, which was found to be related to biodiesel contaminants, even more specifically, to its polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). On the other hand, the genotoxic/mutagenic effects observed in the other assays done with diesel and biodiesel proved to result from the action of pollutants present in the raw material used in biodiesel production, and which are persistent in commercialized biofuel. The toxicologic results showed that biodiesel may be as harmful as, or even more harmful than diesel. These data serve as a warning about the use of this fuel. Even though it does not release great amounts of air pollutants, it cannot be recognized as an environmental-friendly energy resource.

Key words: Soybean Biodiesel, Diesel, Water and Soil Contamination, Cytotoxicity, Genotoxicity and Mutagenicity

1. INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TEMA

Ao longo dos anos, a indústria petrolífera vem sendo considerada como uma das grandes fontes de energia do planeta, sendo caracterizada como uma atividade essencial para a manutenção do estilo de vida atual de grande parte da população humana. Entretanto, quase toda a cadeia de produção desta indústria está baseada no petróleo, uma matéria prima não renovável.

A possibilidade de escassez do petróleo e seus impactos negativos ao meio ambiente têm estimulado este setor a buscar novas fontes de energia, porém, renováveis. Desta iniciativa foi criado o combustível do tipo biodiesel. O biodiesel é considerado, atualmente, uma alternativa interessante, quando comparada ao óleo diesel, pois pode ser produzido a partir de fontes naturais domésticas (e.g., soja, canola, etc), contribuindo, assim, para a redução da dependência de combustíveis derivados de petróleo, principalmente para países não produtores (BALAT; BALAT, 2010). Além disso, o impulsionamento do setor do biodiesel deve-se também a caracterização deste biocombustível como uma alternativa ecológica mais viável em relação à utilização de combustíveis fósseis (DEMIRBAS, 2009; JANAUN; ELLIS, 2010; ATADASHI et al., 2010).

Os registros de avaliações dos impactos ambientais gerados pela indústria do biodiesel referem-se, principalmente, à poluição atmosférica. Diversos estudos têm mostrado que a utilização do biodiesel, puro ou em misturas ao diesel, em motores de ignição por compressão reduz a emissão de poluentes atmosféricos reconhecidos pelos seus efeitos adversos a saúde humana, como, por exemplo, material particulado, monóxido de carbono, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), nitro-PAHs, entre outros (YANG et al., 2007; HU et al., 2008; KARAVALAKIS et al., 2009; HE et al., 2010; EPA, 2010). Contudo, poucos são os relatos na literatura dos efeitos deletérios causados por este bicomcombustível, ou por suas misturas ao diesel, em organismos expostos a outros meios de contaminação, como águas e solos impactados por estes produtos.

A poluição antropogênica de águas e solos tem sido tema de intensas pesquisas científicas em todo mundo. Agentes genotóxicos presentes nestes meios podem afetar negativamente a saúde dos organismos vivos, incluindo a do homem, por diferentes vias de exposição. Dentro deste contexto e em vista do grande incentivo ao setor do biodiesel, devem ser considerados alguns fatores relacionados à produção e utilização deste biocombustível para se estimar seu real risco, em casos de contaminações ambientais.

Um dos fatores relevantes nesta questão refere-se ao emprego do biodiesel como agente de limpeza e biorremediação de óleos crus (MILLER; MUDGE, 1997; MUDGE; PEREIRA, 1999; PEREIRA; MUDGE, 2004; FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ et al., 2007) e alcatrão de hulha (TAYLOR; JONES, 2001). De acordo com estes trabalhos, o biodiesel atua como um detergente, porém com menor eficiência, agindo como um agente dispersante e solubilizante, biodisponibilizando os PAHs presentes no

petróleo e no alcatrão de hulha, possibilitando, assim, uma ação mais eficaz dos microorganismos degradadores. A descoberta de tal propriedade é de extrema relevância para a área da biorremediação, pois muitos PAHs são reconhecidamente mutagênicos e, uma vez biodisponíveis aos microorganismos, o processo de biodegradação pode ser acelerado, levando à recuperação mais rápida das áreas impactadas. Entretanto, esta biodisponibilidade induzida pode também conferir efeitos prejudiciais aos demais organismos presentes no meio, principalmente, quando a ação dos microorganismos degradadores ainda não se iniciou ou se dá de maneira lenta, podendo levar dias, meses ou anos, até a completa eliminação do poluente.

O diesel contém de 2000 a 4000 hidrocarbonetos que compõem uma mistura de compostos de cadeias lineares e ramificadas, cicloalcanos e compostos aromáticos, obtidos da destilação da fração média do petróleo (GALLEGO et al., 2001). Sabe-se que os PAHs, presentes também no óleo diesel, tem sido indicados como uma das classes mais perigosas de contaminantes ambientais, devido aos seus efeitos tóxicos (AINA et al., 2006). Assim, a adição de biodiesel ao diesel pode ser um ponto importante para redução das emissões de poluentes atmosféricos, porém, pode ser um agravante em casos de contaminações de águas, superficiais e/ou subterrâneas, e de solos, como já mencionado anteriormente.

A certificação da qualidade do biodiesel não inclui a avaliação da presença de diversos componentes no produto final, que podem ser relevantes do ponto de vista ambiental. Segundo a Resolução da Agência Nacional do Petróleo (ANP) N° 7 de 19.03.2008, baseada também em normas internacionais, são requeridos na análise do biodiesel apenas os parâmetros relacionados à qualidade final que um biocombustível deve apresentar antes de seu uso, tais como viscosidade, teor de água, teor de éster,

glicerol total, resíduos de metanol ou etanol, etc (BRASIL, 2010). A presença de certos contaminantes detrimenais ao ambiente, provenientes da matéria-prima utilizada no processo de produção do biodiesel, não é considerada hoje na avaliação da qualidade do biodiesel comercializado.

A escolha da fonte de matéria-prima a ser utilizada na produção do biodiesel está relacionada à sua disponibilidade de aquisição pelo produtor, ao seu rendimento no processo e à qualidade do bicompostível produzido (BALAT; BALAT, 2010). No entanto, de acordo com Sarafi; Thomas (2007), a escolha da matéria prima deste biocompostível também pode ter uma posterior correlação com o aumento e diminuição das taxas de emissão de poluentes atmosféricos, uma vez que a composição química do biodiesel e sua propriedade de combustão estão estritamente relacionadas à fonte de fabricação. Desta forma, assim como citado para poluição atmosférica, o tipo de matéria-prima utilizado na produção do biodiesel pode interferir negativamente, em casos de contaminações, também no meio aquático e terrestre. Contudo, esta relação agora não se deve às alterações da composição química do biodiesel propriamente dito, mas sim a possibilidade da presença de contaminantes provenientes da fonte de matéria-prima utilizada.

1.1. Avaliação genotóxica de poluentes ambientais

Dentre as classes de poluentes, uma das mais preocupantes e que tem sido foco de muitos estudos é a classe dos agentes genotóxicos e mutagênicos. A preocupação decorre do fato destes agentes induzirem alterações na molécula de DNA, podendo levar, além do sério comprometimento da saúde dos organismos expostos, a um

comprometimento significativo das gerações futuras, por agirem em uma molécula orgânica relacionada com a hereditariedade (RIBEIRO, 2003).

As alterações permanentes na molécula de DNA, denominadas de mutações, estão associadas ao desenvolvimento de várias doenças como arteriosclerose, esquizofrenia, anemias falciformes, doenças neoplásicas, entre outras. Sabe-se que, atualmente, o câncer é a segunda causa de óbito no mundo, sendo responsável, anualmente, por mais de 60 milhões de mortes (PINTO; FELZENSZWALD, 2003). Segundo alguns autores, a alta incidência de casos de cânceres está associada aos componentes da dieta, às infecções e aos carcinógenos naturais. Ao contrário, uma baixa incidência desta doença está relacionada com a exposição a agentes químicos ambientais. Entretanto, a exposição aos químicos ambientais é um fator preocupante para muitos pesquisadores, pois representa uma fonte adicional de mutações para o indivíduo, o que leva a necessidade da avaliação dos riscos induzidos por eles e de estudos que auxiliam na minimização dos seus efeitos (DOLL; PETO, 1981; AMES; GOLD, 2000).

Atualmente, inúmeros testes de curta-duração, utilizando uma ampla variedade de organismos-teste, vêm sendo desenvolvidos para a avaliação do perigo genético induzido por agentes químicos ambientais (VANZELLA, 2006). Para que a investigação ambiental seja eficiente, há a necessidade de uma escolha adequada do tipo de ensaio a ser utilizado, cuja 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, determinados tanto pelo tipo de sistema biológico utilizado como pelo tipo e localização dos danos genéticos

promovidos. Os bioensaios com procariontes podem ser úteis no diagnóstico de agentes indutores de que induzem mutações gênicas e de 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).

O teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* é considerado uma ferramenta rápida e útil para avaliação da atividade genotóxica tanto de substâncias puras (McCANN et al., 1975) como de amostras ambientais (KUMMOROW et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007). Tal teste é considerado, atualmente, como a método de triagem mais utilizado para a detecção de substâncias carcinogênicas e genotóxicas, sendo validada em larga escala em laboratório (UMBUZEIRO e VARGAS, 2003). Este teste emprega linhagens de *S. typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (his^-), apresentando diferentes mutações no *operon* deste aminoácido, sendo construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. Tais linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura com ausência de histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem sua capacidade de síntese. Desta forma, o número de revertentes pode ser facilmente mensurado, após a exposição de uma população de células a uma dada substância (UMBUZEIRO e VARGAS, 2003).

Os vegetais superiores também se enquadram na classe dos organismos-teste de destaque, sendo considerados excelentes modelos genéticos para avaliação de mutágenos ambientais, tanto pela sua sensibilidade de detecção, como também pela possibilidade de avaliação de diferentes *endpoints* genéticos, os quais abrangem desde as mutações pontuais até as aberrações cromossômicas (AC), passíveis de serem observadas em diferentes órgãos e células (GRANT, 1994). Entre os vegetais superiores

utilizados como modelos-teste, a espécie de *Allium cepa* vem se destacando devido a sua eficiência em avaliar danos genéticos induzidos por poluentes ambientais ou por substâncias químicas puras (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além da sua alta sensibilidade, a espécie de *A. cepa* tem sido também indicada por outras vantagens, como baixo custo, fácil manuseio, e, principalmente, por apresentar bons parâmetros cromossômicos, com 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 (FISKESJÖ, 1985).

Culturas de células de mamíferos são utilizadas, com sucesso, em estudos de avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade de agentes químicos. Estes testes apresentam vantagens pela facilidade na padronização das condições do ensaio, pela possibilidade de realizar tratamento das células em várias fases do ciclo celular e pela organização do material genético assemelhar-se às células *in vivo* (RABELO-GAY et al., 1991). A escolha do tipo celular está relacionada ao objetivo do estudo em questão, como, por exemplo, células derivadas de peixes são sensíveis na avaliação dos impactos ambientais de sistemas aquáticos, mas não são indicadas para estimar os efeitos de contaminantes atmosféricos. Para avaliações genotoxicológica de substâncias químicas têm sido frequentemente utilizadas as linhagens celulares CHO-K1 (*Chinese hamster ovary cells*) e V79 (*Chinese hamster fibroblast cells*) (BLAKEY et al., 2008). Entretanto, a ausência de uma via de metabolização endógena, necessária para uma avaliação mais eficiente de pró-mutágenos, levou alguns pesquisadores a empregarem linhagens celulares portadoras do sistema de metabolização de xenobióticos, como as células HepG2 (*Human hepatocellular carcinoma cell line*) (KNASMÜLLER et al.,

1998; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003; KNASMÜLLER et al., 2004; AN et al., 2007).

Para melhor avaliação dos impactos ambientais decorrente de atividades antropogênicas, tem sido indicada a utilização de metodologias diversificadas, desenvolvidas com diferentes organismos-teste. A aplicação de ensaios variados pode permitir um diagnóstico mais eficaz dos reais riscos dos poluentes, contribuindo para a garantia de um ambiente seguro.

2. OBJETIVOS

Em linhas gerais, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os riscos toxicológicos de águas e solos poluídos com biodiesel e suas misturas ao diesel. Para isso, objetivos específicos foram delimitados, como segue:

- Quantificação de PAHs nas amostras teste para a correlação dos dados químicos com os dados biológicos obtidos;
- Análise do potencial citotóxico das amostras teste por ensaios de detecção de alterações no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$); de detecção de apoptose pelo emprego Anexina V e pela avaliação da citotoxicidade em tempo real utilizando o sistema xCELLigence™;
- Avaliação da genotoxicidade/mutagenicidade das amostras teste pela aplicação do teste de AC e micronúcleo (MN) em *A. cepa*; do ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* [protocolo de pré-incubação e Ames MPF (*Microplate fluctuation protocol*)] e de ensaios com cultura de células CHO-K1 [*in vitro* MicroFlow® kit (Litron) assay] e HepG2 (teste do MN padrão e em citometria de fluxo e ensaio do cometa);

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Contextualização do combustível biodiesel

As sérias preocupações com a degradação do meio ambiente e dos recursos naturais levou a Comissão Mundial sobre Ambiente e Desenvolvimento (World Commission on Environment and Development – WCED) a exigir metas de desenvolvimento, tanto econômico como social, baseadas em termos de sustentabilidade (HANSMANN, 2010). Segundo o relatório de Brundtland, publicado pela WCED em 1987, desenvolvimento sustentável é “o desenvolvimento que satisfaz as necessidades presentes, sem comprometer a capacidade das gerações futuras de suprir suas próprias necessidades” (MOSER, 2009). Para a implantação de um modelo sustentável na sociedade moderna, diversos fatores devem ser considerados e colocados em prática, como, por exemplo, a gestão de riscos ambientais e as preocupações com a integração ambiental, social e econômica na formação de políticas e medidas de decisões (HANSMANN, 2010).

Inúmeros assuntos têm sido pauta de discussões no âmbito da sustentabilidade, sendo a questão energética um dos destaques, devido, principalmente, aos impactos negativos dos combustíveis fósseis ao ambiente. O crescente interesse na expansão da

produção e utilização dos biocombustíveis requer a necessidade do estabelecimento de critérios de sustentabilidade para este setor (GARCEZ; VIANNA, 2009). Como um combustível alternativo e renovável, o biodiesel tem apresentado o potencial de contribuir para o desenvolvimento sustentável de muitos países e regiões. No entanto, um cuidadoso planejamento e uma eficiente gestão são necessários para realmente garantir a sustentabilidade da indústria do biodiesel (SUKKASI et al., 2010).

O biodiesel é caracterizado como um combustível limpo e renovável, obtido de matérias-primas orgânicas, como óleos vegetais e gordura animal. As propriedades físico-químicas do biodiesel são similares às do combustível fóssil diesel e pode, portanto, substituir totalmente ou parcialmente o diesel em motores de ignição por compressão (PASQUALINO et al., 2006).

O biodiesel é produzido pelo processo de transesterificação. Este processo pode ser realizado de diversas maneiras, como pela utilização de um catalisador ácido, um catalisador alcalino, um biocatalisador, entre outros (RANGANATHAN et al., 2008). Basicamente a reação de transesterificação consiste na transformação de triglicerídeos em ésteres de ácidos graxos, na presença de um álcool (metanol ou etanol) e um catalisador, usualmente hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH) (MITTELBACH; REMSCHMIDT, 2004), originando biodiesel e glicerol (VASUDEVAN; BRIGGS, 2008).

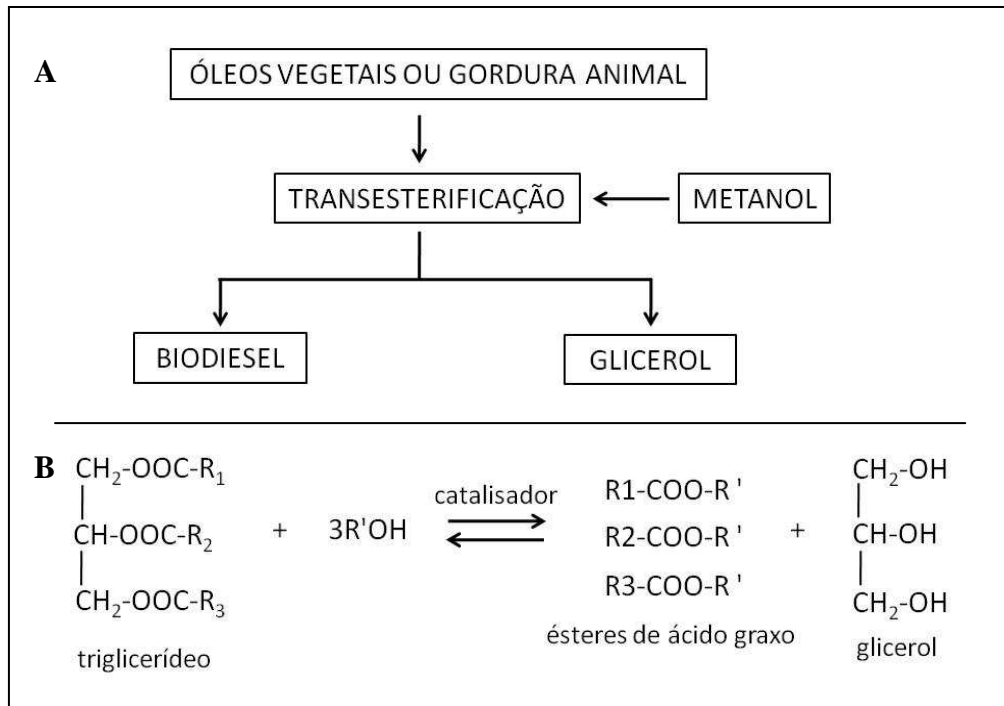


Figura 1. A. Seqüência de produção do biodiesel pelo processo de transesterificação; **B.** Equação geral do processo de transesterificação de triglicerídeos com álcool.

Atualmente, grande parte do biodiesel produzido no mundo é proveniente de material-prima vegetal, mais especificamente de soja (BALAT; BALAT, 2010). Sabe-se que a soja é uma das principais fontes vegetais de isoflavonas, sendo a genisteína, daidzeína e gliciteína as mais abundantes (PANIAGUA-PÉREZ et al., 2005; KLEIN; KING, 2007).

3.2. Efeitos adversos a saúde de organismos vivos em decorrência da exposição à fitoestrógenos

Uma grande variedade de compostos naturais e antropogênicos estão inseridas na lista de poluentes aquáticos emergentes, devido aos diversos efeitos nocivos que podem causar a saúde dos organismos vivos, mesmo em concentrações não significativas no ambiente (RICHARDSON, 2009). Dentre estes químicos, os

fitoestrógenos, substâncias naturais derivadas das plantas, apresentam estrutura e funcionalidade similar ao hormônio estradiol (DUFFY et al., 2007). A classificação dos fitoestrógenos baseia-se em suas estruturas químicas e o grupo das isoflavonas, presentes em altas concentrações na soja, tem sido os mais estudados (RICE; WHITEHEAD, 2006).

Diversos efeitos adversos à saúde dos organismos vivos, incluindo o homem, têm sido reportados para algumas isoflavonas, como genisteína e daidzeína (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009). Helferich et al. (2008), em uma revisão sobre a relação dos fitoestrógenos e câncer de mama, mostraram que a genisteína está relacionada de maneira ER-dependente e em dose-resposta ao crescimento deste tipo de tumor. De acordo com Ko et al. (1999), esta isoflavona também induz vitelogenina em peixes, com efeito semelhante ao observado para o 17β -estradiol (MALISON et al., 1985, 1988). Estudos para a verificação da influência de águas contaminadas com genisteína no desenvolvimento gonadal de *Oryzias latipes* (killifish japonês), concluíram que as isoflavonas são relevantes estrogênicos que podem estar envolvidos na alteração do desenvolvimento sexual de populações de peixes selvagens (KIPARISSIS et al., 2003). Recentemente, Sassi-Messai et al. (2009), avaliando a ação da genisteína no desenvolvimento de *Danio rerio* (zebrafish), mostraram que esta substância é capaz de atuar por duas diferentes vias, sendo a primeira pela indução de apoptose de maneira ER-independente e a segunda pela regulação da expressão de aromatase-B no cérebro de forma ER-dependente. Os resultados deste estudo mostram a necessidade de uma maior atenção aos riscos que os fitoestrógenos, como a genisteína, podem conferir aos organismos expostos.

Contudo, apesar do foco atual nos fitoestrógenos estar voltado à sua categorização como um desregulador endócrino (*endocrine disrupting compound* - EDC), estudos mostram que estes agentes químicos também tem o potencial de indução de efeitos genotóxicos e mutagênico em organismos vivos (KULLING; METZLER, 1997; METZLER et al., 1998; VIRGILIO et al., 2004; STOPPER et al., 2005). Segundo Klein; King (2007), a genisteína, um abundante fitoestrógeno na soja, é caracterizada como um agente clastogênico por ensaios com células *in vitro*. Virgilio et al. (2004) mostrou que a genisteína causa uma clara indução de MN, de maneira dose-dependente, em células V79, sendo caracterizada ainda como um agente clastogênico. Estes mesmos autores mostraram que a daidzeína, outro fitoestrógeno presente em altas concentrações na soja, também é capaz de induzir MN em células V79, porém, numa intensidade menor quando comparado à ação da genisteína.

3.3. Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

O ensaio *Salmonella*, também conhecido como teste de Ames, é considerado uma clássica ferramenta de avaliação da mutagenicidade de diversos agentes químicos (FERRAZ et al., 2010).

Este teste emprega linhagens de *S. typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (his-), apresentando diferentes mutações no operon deste aminoácido, sendo construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. Tais linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura com ausência de histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem sua capacidade de síntese. Desta forma, o número de revertentes é facilmente mensurado, pela contagem de colônias que crescem em meio mínimo, após a

exposição de uma população de células ao agente a ser testado (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

As linhagens de *Salmonella* utilizadas para este teste pertencem ao grupo de Enterobactéria capazes de produzir azoredutase e nitroredutase (CETESB, 1997; UMBUZEIRO et al., 2005). Elas apresentam diferentes mutações em vários genes do operon histidina, sendo que cada uma destas mutações são projetadas para responder a mutágenos que atuem por diferentes vias. Além disso, estas linhagens também compreendem mutações adicionais, como descritas a seguir, que as tornam mais sensíveis para a avaliação de uma ampla gama de substâncias químicas (TEJS, 2008).

A mutação *rfa* está presente em todas as linhagens de *S. typhimurium*. Ela é responsável por tornar a bactéria mais permeável a moléculas de alto peso molecular (e.g. aminas aromáticas, hidrocarbonetos poliaromáticos, etc) pela perda parcial da barreira de lipopolissacarídeos da parede bacteriana (MARON; AMES, 1983; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

A deleção *uvrB* também está presente em todas as linhagens de *S. typhimurium*, exceto na TA102, a qual foi construída primariamente para detectar mutágenos que necessitam de um sistema de reparo por excisão intacto (MARON; AMES, 1983). Esta mutação aumenta a sensibilidade de detecção de mutágenos pela deleção do gene *uvrB* que é responsável pelo reparo do DNA por excisão, favorecendo, assim, mecanismos de reparo sujeitos a erro (MARON; AMES, 1983; CLAXTON et al., 1987; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Por razões técnicas, a deleção deste gene estendeu-se também ao gene da biotina, o que tornou necessário a presença desta vitamina para o crescimento das linhagens de *S. typhimurium* (MARON; AMES, 1983).

O plasmídeo pKM101 foi introduzido nas linhagens TA1535 e TA1538, para a produção das linhagens isogênicas TA100, TA98, TA97, TA102 e TA104. Este plasmídeo é responsável pelo aumento do reparo do tipo error-prone, também conhecido como sistema SOS (CLAXTON et al., 1987). O sistema SOS é induzido como uma resposta emergencial para evitar a morte celular na presença de dano significativo ao DNA (GRIFFITHS et al., 2001). O plasmídeo pAQ1 está presente na linhagem TA102 e carrega a mutação hisG428, que amplifica o número de sítios específicos para mutagênese (MARON; AMES, 1983). Já o plasmídeo pYG233, presente nas linhagens YG1041 e YG1042, carrega os genes que codificam as enzimas nitrorredutase e O-acetiltransferase da *S. typhimurium* (HAGIWARA et al., 1993).

Os sítios alvos de mutação (*hot spots*), ou seja, pontos da seqüência de bases nitrogenadas com maior probabilidade de interação com mutágenos, difere entre as linhagens de *Salmonella*, uma vez que as mutações podem ocorrer em diferentes etapas da síntese de histidina. A mutação hisD3052, presente nas linhagens TA98, TA1538 e YG1041, afeta a leitura correta (-1C) de uma seqüência próxima, constituída de oito resíduos CG -CGCGCGCG- repetitivos. Já a mutação hisG46, presente nas linhagens TA100, TA1535 e YG1042, resulta na substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC) (MARON; AMES, 1983). A mutação hisC3076, da linhagem TA1537, é uma mutação por erro no quadro de leitura, próxima ao sítio de uma seqüência repetitiva -C-C-C- (AMES, 1973). A mutação hisD6610, presente na linhagem TA97, detecta mutágenos que causam erro no quadro de leitura, tendo uma citosina adicional em seqüência de seis citosinas no sítio de mutação (LEVIN et al., 1982a).

Nota-se que o sítio alvo de mutação no DNA das linhagens citadas anteriormente está relacionado a pares de base GC. Ao contrário, foram desenvolvidas duas linhagens adicionais (TA102 e TA104), que contém AT no seu sítio de mutação *hisG428*. Para a TA102, este sítio está inserido no plasmídeo multicópia pAQ1 e na TA104 no cromossomo bacteriano. A mutação *hisG428* refere-se a uma mutação *ochre*, TAA no gene *hisG*, a qual pode ser revertida por seis possibilidades de mudanças de pares de base, sendo quatro por transversão e duas por transição (LEVIN et al., 1982b).

Linhagens tradicionais de *Salmonella*, como a TA98, embora tenham capacidade de reduzir compostos do tipo nitro, apresentam menor atividade de nitroredutase do que sua linhagem parental LT2. Esta redução na atividade é devida à deleção de um dos genes responsáveis pela produção desta enzima (PORWOLLIK et al., 2001). Além disso, outras linhagens foram desenvolvidas, algumas incapazes de produzir essa enzima (TA98 NR e TA100 NR), e outras com alta produção da mesma (YG1021 e YG1026). Resultados de testes empregando estas linhagens são úteis para a compreensão do papel da redução do grupo nitro na mutagenicidade de certos compostos. Com o mesmo objetivo, são empregadas linhagens com deficiência de atividade de O-acetiltransferase (TA98 DNP6) ou com alta produção desta enzima (YG1024 e YG1029). Além disso, foram desenvolvidas linhagens com alta produção de ambas as enzimas, nitroredutase e O-acetiltransferase (YG1041 e YG1042) (UMBUZEIRO et al., 2005).

Assim, considerando a disponibilidade de diferentes linhagens de *S. typhimurim* para a avaliação de mutágenos, a combinação das mesmas, durante a execução do teste de Ames, pode auxiliar na elucidação da atividade mutagênica de diversos agentes químicos. Quanto à escolha das linhagens de *Salmonella*, as linhagens TA98 e TA100

são as mais comumente utilizadas para estudos de triagem, mostrando eficiência na detecção de um grande número de mutágenos. Dependendo do objetivo e resultado dos testes, bem como da quantidade de amostra disponível, deve-se acrescentar outras linhagens ao diagnóstico (MORTELMANS; ZIEGER, 2000). Para amostras ambientais, tanto líquidas (efluentes industriais e domésticos, águas superficiais ou subterrâneas, águas brutas ou tratadas) como sólidas (solo, resíduos e sedimentos), o ensaio deve ser conduzido minimamente com as linhagens TA98 e TA100, na presença e na ausência de sistema de metabolização exógeno. Outras linhagens devem ser adicionadas sempre que necessário, acompanhadas das justificativas pertinentes (SBMCTA, 2009).

Algumas classes de substâncias químicas, como a dos PAHs e das aminas aromáticas, necessitam ser metabolizadas *in vivo* para exercerem seus efeitos mutagênicos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Como as bactérias não possuem o sistema de oxidação Citocromo P450 usado pelos vertebrados para a biotransformação de compostos exógenos, é importante mimetizar esse sistema nos ensaios realizados com este organismo-teste. Tal procedimento é feito mediante adição de um homogeneizado de células de fígado de rato pré-tratado com o indutor enzimático Aroclor-1254 (S9). Assim, as substâncias que exercem sua atividade mutagênica, após metabolização via citocromo P450, serão detectadas pela adição de S9 e aquelas que não necessitam desse sistema de oxidação para exercerem seu efeito mutagênico, serão identificados na ausência de S9 (JARVIS, et al., 1996).

A maioria dos mutágenos genotóxicos que comprovadamente causam tumores em seres humanos é considerada pré-carcinógeno, ou seja, são compostos estáveis no pH fisiológico e, portanto, incapazes de reagir com o DNA. Esses mutágenos são biotransformados por enzimas como citocromo P450 (CYP) e glutatona s-transferases

(GTS), em compostos mais hidrossolúveis e, portanto passíveis de serem excretados. Em alguns casos, os produtos gerados são extremamente eletrofílicos (uma característica comum dos mutágenos genotóxicos ambientais) e irão reagir com centros nucleofílicos das células, dentre eles regiões do DNA, levando à formação de adutos. Tais adutos, quando não reparados corretamente, podem levar ao aparecimento de uma mutação permanente no DNA, que pode ser pontual ou cromossômica, dependendo da quantidade e tipo do mutágeno ambiental (PINTO; FELZENSZWALB, 2003).

Diversos protocolos do ensaio *Salmonella*/microsoma têm sido descritos na literatura ao longo dos anos. O primeiro protocolo do teste de Ames, denominado de *spot test*, consistia na aplicação de uma pequena quantidade do químico a ser testado diretamente no centro da placa de Agar mínimo, ou seja, Agar suplementado com biotina e traços de histidina, previamente plaqueada com o organismo-teste. Já o segundo protocolo desenvolvido foi o ensaio de incorporação em placas, o qual se mostrou mais sensível e quantitativo que o método *spot test*. Este ensaio consiste na adição de uma mistura de tampão ou S9, linhagem testadora, químico teste e Agar de superfície em uma placa de Agar mínimo (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

A partir do desenvolvimento do ensaio de incorporação em placas, diversas modificações têm sido propostas a este protocolo padrão com o intuito de aumentar a sensibilidade do teste e permitir a avaliação de uma quantidade mais abrangente de químicos, incluindo gases e químicos voláteis (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

O protocolo de pré-incubação difere do ensaio de incorporação em placas pela etapa de incubação de 20 a 30 minutos a 37°C das linhagens testadoras expostas ao químico teste, antes da realização do plaqueamento em Agar mínimo. Acredita-se que os metabólitos mutagênicos de vida curta tenham uma maior possibilidade de interagir

com as linhagens em um pequeno volume de mistura pré-incubada, se comparado com o plaqueamento imediato. Além disso, o menor volume possibilita uma maior concentração de S9 e co-fatores (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

O teste de microssuspensão, também conhecido como teste de Kado, foi projetado inicialmente para a detecção de metabólitos mutagênicos em amostras de urina de animais tratados com químicos, devido ao pequeno volume de amostra disponível nestes estudos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Neste método, utiliza-se as culturas pernoite concentradas 10 vezes, sendo a mistura incubada a 37°C por 90 minutos. Só depois a mistura é adicionada ao Agar de superfície e o plaqueamento é realizado (KADO et al., 1983; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). O teste de microssuspensão apresenta aumento na sensibilidade, quando comparado com o método de incorporação em placas. Provavelmente, tal fato ocorre devido à maior concentração de reagentes e aumento do número de bactérias adicionadas. Além disso, é provável que um número maior de bactérias aumente o número de “alvos” disponíveis para interagir com os mutágenos (KADO et al., 1983). Esta metodologia é interessante quando se dispõe de pouca quantidade de amostra ou quando se pretende usar maior número de linhagens (FERRAZ, 2008).

Recentemente, pesquisadores desenvolveram uma versão líquida realizada em microplacas do teste de mutagenicidade padrão com *Salmonella*, denominado de Ames MPF (*Microplate Fluctation Protocol*) (GEE et al., 1994; FLÜCKIGER-ISLER et al., 2004, KAMBER et al., 2009). As vantagens deste método estão relacionadas à redução da quantidade de amostra teste necessária para a realização do ensaio, do tempo de execução e com o aumento da eficiência, em comparação com o método tradicional do teste em placas (UMBUZEIRO et al., 2010). O Ames MPF é realizado durante a

exposição da amostra em meio líquido disposto em uma placa de 24-poços, sendo transferido para uma placa de 384-poços para o crescimento dos revertentes e contagem dos resultados (FLÜCKIGER-ISLER et al., 2004).

3.4. A utilização do sistema-teste de *Allium cepa* para avaliação de mutágenos

A revisão da literatura referente ao sistema-teste de *A. cepa* será apresentada a seguir no artigo de revisão “*Allium cepa* test in environmental monitoring: “A review on its application” publicado em 2009 na revista *Mutation Research Review*”. Neste artigo, foram compilados os resultados de vários trabalhos realizados com o sistema-teste de *A. cepa*, para a avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de xenobiontes, derivados das mais variadas atividades humanas (vide página 70).

3.5. Citometria de fluxo e Genética Toxicológica

Genética Toxicológica é uma área que vem apresentando muitos desafios e que requer mudanças significativas em relação às abordagens tradicionais, principalmente em relação à avaliação do risco da exposição a agentes químicos (POTTENGER; GOLLAPUDI, 2009).

A utilização da citometria de fluxo na área da Genética Toxicológica é algo novo e em ascensão, devido ao fato deste processo possibilitar a aquisição de dados em um curto período de tempo. Esta agilidade na aquisição de resultados é extremamente interessante e valiosa, principalmente, quando se aplica esta metodologia a estudos ambientais, onde os impactos promovidos por xenobióticos devem ser mitigados de maneira imediata, para assegurar o equilíbrio do meio ambiente e a saúde dos organismos vivos.

A citometria de fluxo foi desenvolvida na década de 60, sendo imediatamente aplicada na área da saúde para a análise de células de mamíferos (WANG et al., 2010). Esta técnica permite a realização de medições quantitativas, físicas e/ou químicas, de células individuais ou conteúdos celulares em altas taxas de velocidade (CRAM, 2002). Resumidamente, o conceito básico da citometria de fluxo está baseado na passagem de um fluxo de partículas individuais por uma região central, contendo um ou mais feixes de lasers, onde as partículas são analisadas pela sua fluorescência, por múltiplos comprimentos de onda e pontos de dispersão de luz (NUNEZ, 2001; CRAM, 2002; ORMEROD, 2008, WANG et al., 2010).

Enquanto citômetros de fluxo evoluíram para equipamentos mais simples, sua complexidade inerente não pode ser negligenciada, tanto em termos de seu potencial para fazer medições multivariadas sofisticadas quanto em relação as suas exigências de amostras de excelentes qualidades. Nesta técnica, é extremamente importante a precisão e cuidado com o preparo das amostras para que se tenham resultados de alta qualidade e confiabilidade (CRAM, 2002).

As aplicações de citometria de fluxo e a caracterização de partículas são inúmeras. O campo de aplicabilidade da citometria de fluxo tem se expandido rapidamente, devido ao desenvolvimento e comercialização de uma diversidade muito grande de fluorocromos, com alta especificidade para constituintes celulares. Desta forma, diferentes informações, como a quantidade de DNA, RNA e proteínas e a análise de características intracelulares, podem ser obtidas por citometria de fluxo pelo emprego de reagentes e sondas específicas (ORMEROD, 2008).

Na da área da Genética Toxicológica, as aplicações da citometria de fluxo estão voltadas, principalmente, para a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de

substâncias químicas. Dentre os ensaios aplicados para esta finalidade, podemos mencionar os testes de detecção de apoptose, englobando diferentes *endpoints*, deste processo de morte celular (DENECKER et al., 2000; GOLDSTEIN et al., 2000; WATERHOUSE et al., 2001; FORSBERG et al., 2004; LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2006; BLANKENBERG, 2009; FRANCO et al., 2009) e o teste do micronúcleo (MN), que foi recentemente adaptado para a análise em citometria de fluxo (NÜSSE; MARX, 1997; AVLASEVICH et al., 2006; BRYCE et al., 2007, 2008; COLLINS et al., 2008; BRYCE et al., 2010; SHI et al., 2010).

A seguir, a revisão bibliográfica aqui apresentada dará uma maior ênfase à descrição dos ensaios baseados em citometria de fluxo que foram desenvolvidos no presente trabalho.

3.6. Avaliação da citotoxicidade de poluentes ambientais

O ambiente exerce um papel fundamental na saúde dos organismos vivos. A exposição destes organismos aos diversos químicos ambientais pode decorrer em efeitos prejudiciais, que pode contribuir, substancialmente, para o aumento da incidência de doenças de importância à saúde pública. As doenças ambientais são aquelas, em geral, despertadas ou agravadas pela exposição de poluentes, incluindo, por exemplo, cânceres, doenças crônicas respiratórias, diabetes e neurodegeneração (FRANCO et al., 2009).

O grande objetivo das ciências ambientais, atualmente, é identificar e compreender as alterações ou regulações dos processos biológicos básicos promovidos pelos poluentes ambientais, que desencadeiam os efeitos deletérios no organismo exposto.

As células respondem e se adaptam a sinais ambientais, como agentes tóxicos, por diversos mecanismos, que envolvem diferentes vias de comunicação e processos de tradução de sinal (KULTZ, 2005). Estressores ambientais são conhecidos por mediar uma grande variedade de efeitos tóxicos, como, principalmente, a genotoxicidade. Entretanto, tem sido reconhecido que muitos dos efeitos induzidos por poluentes ambientais são mediados pela regulação e/ou indução de processos de morte celular, como a apoptose (ASSEFA et al., 2005).

Apoptose e necrose são dois mecanismos distintos de morte celular, devido às diferenças bioquímicas e morfológicas envolvidas nestes processos (CHO et al., 2010). A visão ortodoxa de que substâncias químicas induzem morte celular por necrose, devido a injúrias severas, prevaleceu durante muitos anos na área da Toxicologia. No entanto, sabe-se que a indução de morte celular por agentes químicos esta relacionada à característica química da substância e à dose utilizada (RAFFRAY; COHEN, 1997).

A morte celular por necrose é um fenômeno degenerativo que segue uma lesão irreversível, quando as células são expostas a condições extremas de temperatura, pH ou concentrações extremamente tóxicas de substâncias químicas. Este processo é marcado pelo inchaço mitocondrial, seguido de lise da célula, devido à rápida perda da integridade da membrana celular. A degradação do DNA, na necrose, ocorre pela ação de nucleases e proteases lisossomais, após a degradação das membranas celulares (ZAKERI; AHUJA, 1997). Diferente da apoptose, a necrose é considerada um processo de morte celular não programada. No entanto, alguns trabalhos têm mostrado que a necrose, em condições especiais como a intervenção das caspases, pode ser regulada por uma via bem orquestrada, sendo denominada, neste caso, de necrose programada (PROSKURYAKOV et al., 2003; CHO et al., 2010).

A apoptose é uma forma de morte celular programada, pela qual a célula morre sem causar distúrbios nos tecidos vizinhos, o que facilita a sua eliminação pelas células vizinhas ou pelo sistema imune. O processo apoptótico pode ser ativado por duas vias distintas, dependendo do tipo de sinal detectado pela célula, por exemplo, sinais intra- e extra-celulares (LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2006). Quando ativadas pelos apropriados sinais internos e externos, as células sofrem uma retração citoplasmática pré-programada, seguida da formação de corpos apoptóticos, os quais são constituídos pelo conteúdo intracelular circundado por fragmentos de membranas. Os corpos apoptóticos, após sua formação, são subseqüentemente englobados por células adjacentes e fagócitos, sem que haja qualquer resposta inflamatória (BLANKENBERG, 2009). A desregulação da apoptose tem sido associada com diversas patologias humanas, incluindo cânceres (GREEN; EVAN, 2002).

Apesar da ativação do conjunto de executores caspases ocorrer tanto nas vias apoptóticas extrínseca (Apoptose Tipo I) como intrínseca (Apoptose Tipo II), a diferença marcante entre elas baseia-se no papel da mitocôndria. A via intrínseca da apoptose, também conhecida como via mitocondrial, é ativada por uma ampla gama de estímulos citotóxicos, incluindo os decorrentes da exposição a poluentes ambientais (FRANCO et al., 2009). A liberação do citocromo c no citoplasma é o marco da via intrínseca da apoptose. A liberação do citocromo c é acompanhado pela perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Quando o citocromo c é liberado ao citoplasma, ele interage com o fator 1 de ativação da apoptose (Apaf-1), ATP e pró-caspase 9, para formar uma estrutura denominada de apoptosomo. O apoptosomo cliva e ativa a caspase 9, a qual, por sua vez, ativa as caspases 3, 6 e 7. Após a ativação da caspase 3, há uma rápida distribuição e exposição dos fosfolipídios fosfatidilserina (PS -

phospholipid phosphatidylserine) para a superfície celular (BLANKENBERG, 2009), contrariando a sua posição convencional, que se restringe ao folheto interno da membrana plasmática, fato este controlado pela enzima dependente de ATP, denominada flipase.

A avaliação das alterações do $\Delta\Psi_m$ constitui um importante parâmetro para a identificação de apoptose, pois a diminuição deste potencial está relacionada a um irreversível processo apoptótico (CASTEDO et al., 2002; JAYARAMAN, 2005). A associação da metodologia de citometria de fluxo e sondas fluorescentes de detecção do $\Delta\Psi_m$ caracterizam um método ideal para a investigação da função mitocondrial *in situ*, devido a sua capacidade de estimar a magnitude do $\Delta\Psi_m$ em um grande número de células individuais (ROTTENBER; WU, 1998). Vários tipos de sondas moleculares têm sido empregados na avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial interna, sendo muitas destas sondas classificadas como cátions lipofílicos. Para estas sondas serem eficientes na estimativa do $\Delta\Psi_m$, diversos critérios devem ser considerados, como sua facilidade de detecção e o fato de serem inócuas ao $\Delta\Psi_m$ (SCADUTO; GROTYOHANN, 1999). Derivados de rodaminas, como TMRE (*Tetramethylrhodamine Ethyl Ester*) têm sido aplicados, com sucesso, na detecção do $\Delta\Psi_m$ (SCADUTO; GROTYOHANN, 1999; JAYARAMAN, 2005; KING et al., 2007; BOUCHIER-HAYES et al., 2008; JACOBI et al., 2009). Estes corantes são acumulados na mitocôndria em situações de alto $\Delta\Psi_m$ e, quando este potencial é reduzido, o corante é liberado para o citoplasma e a fluorescência é emitida (JACOBI et al., 2009).

Segundo Denecker et al. (2000), a perda de assimetria dos fosfolípidos da membrana é um importante biomarcador de apoptose. PS é um fosfolípido de carga negativa normalmente presente nos folhetos das membranas voltados ao citosol.

Estágios iniciais de apoptose são marcados pela translocação do PS da camada interna para a externa da MP, com a manutenção da integridade da mesma (VERMES et al., 1995). A exposição de PS tem sido relacionada ao reconhecimento das células apoptóticas pelos fagócitos, que resulta na rápida eliminação destas células (FADOK et al., 1998).

Investigações da exposição de PS para o folheto externo da MP têm sido realizadas, com sucesso, pelo emprego de Anexina V (RAYNAL; POLLARD, 1994; VERMES et al., 1995; ENGELAND et al., 1998; DENECKER et al., 2000; SPAN et al., 2002; GUPTA et al., 2010). Anexina V é uma proteína com afinidade de ligação a fosfolipídios dependente de Ca^+ com alta afinidade a PS e que se liga a célula quando este fosfolipídio é exposto (RAYNAL; POLLARD, 1994). Para a medição deste evento apoptótico, Anexina V é conjugada com o corante fluorescente FITC, formando uma sonda sensível para análises de citometria de fluxo de células em processos de apoptose (ENGELAND et al., 1998). Entretanto, a exposição de PS não é um evento exclusivo da apoptose e ocorre também na necrose, porém, com uma diferença de que neste último processo não há a manutenção da integridade da MP. Desta forma, para uma avaliação precisa apenas de células apoptóticas, a coloração com Anexina V é realizada em conjunto com um corante vital, por exemplo, Iodeto de Propídio (IP) (VERMES et al., 1995). Assim, as células vivas, as apoptóticas e as necróticas apresentam marcações diferentes, sendo negativa tanto para Anexina V como IP, positiva para Anexina V e negativa para IP e positiva para ambos Anexina V/IP, respectivamente (ENGELAND et al., 1998).

A maioria dos métodos utilizados para a avaliação da citotoxicidade de agentes químicos são medidas qualitativas de um único *endpoint* do estado celular (SCHMITZ

et al., 2009; SEILER et al., 2009; URCAN et al., 2010). Estes ensaios compreendem a manipulação de diversas etapas e ainda, eventualmente, requerem a lise das células, o que pode comprometer a confiabilidade dos resultados gerados. O sistema xCELLigence™ (desenvolvido pela Roche e ACEA Biosciences) é uma tecnologia inovadora que permite monitorar quantitativamente, em tempo real, a aderência, proliferação e migração celular, indicando, assim, viabilidade e citotoxicidade (KEOGH, 2010, URCAN et al., 2010). Para isso, microeletrodos de ouro são incorporados na parte inferior de uma placa de cultura de células padrão, por onde passa uma corrente elétrica em intervalos regulares, que permite a medição da impedância elétrica em períodos pré-determinados (SCHMITZ et al., 2009; SEILER et al., 2009; KEOGH, 2010, URCAN et al., 2010). As alterações causadas na impedância, pela aderência e espalhamento celular, são expressas como índice celular (CI – *Cell Index*). Desta forma, o CI é um reflexo do número total de células, da qualidade da aderência e da morfologia celular, que pode variar no decorrer do tempo (KEOGH, 2010).

3.7. Emprego do ensaio do cometa para a detecção do potencial genotóxico de químicos ambientais

Muitas técnicas de detecção de danos no DNA têm sido utilizadas para identificar substâncias com atividade genotóxica (TICE et al., 2000). O ensaio do cometa é um método rápido e sensível para a detecção de danos primários no DNA, aplicado em células individuais, que tem ganhado grande aceitação dentre os testes rotineiros utilizados para a avaliação da genotoxicidade de substâncias químicas (HELMA; UHL, 2000).

Este teste foi desenvolvido, inicialmente, por Östling e Johanson (1984), como 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 suas 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 frequência de quebras no DNA apresentaram migrações em diferentes velocidades, devido aos diferentes tamanhos dos fragmentos de DNA, gerando a aparência de uma cauda de cometa. Ao contrário, as células sem ou com baixa frequência de danos não apresentaram essas caudas. Contudo, foi constatado pelos autores que a realização da técnica sob condições neutras (pH ~ 7) apresentava algumas limitações, como a possibilidade de detecção de quebras de fita dupla e de ligações cruzadas.

Posteriormente, Singh et al. (1988) propuseram adaptações ao ensaio do cometa desenvolvido em condições neutras para realização em condições alcalinas (pH > 13), o que levou a um aumento da 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 da dupla fita de DNA, quando exposta a pH extremamente alcalino, sofrer desnaturação, separando-se em fitas

simples (GONTIJO; 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 sua confiabilidade. 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 (AC) e mutações em células pulmonares V79 de hamsteres chineses] e *in vivo* (MNs de medula óssea em camundongos e reparo de DNA em ratos) e demonstraram que o ensaio do cometa é tão eficiente quanto às demais técnicas para detectar danos no DNA.

As diversas vantagens do ensaio do cometa, incluindo o fato de ser uma técnica facilmente aplicada em diferentes tipos celulares e sua alta sensibilidade na avaliação de agentes genotóxicos, têm contribuído para sua ampla utilização (UHL et al., 1999, 2000; EHRLICH et al., 2002; LU et al., 2002; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003; KNASMÜLLER et al., 2004; AN et al., 2007; TSUBOY et al., 2007; WINTER et al., 2008).

3.8. Avaliação da mutagenicidade de poluentes ambientais pelo teste do Micronúcleo (MN)

O teste de Ames é caracterizado como o teste *in vitro* mais utilizado entre os testes rotineiros empregados na detecção de xenobióticos. No entanto, o conhecimento de substâncias carcinogênicas, naturais e/ou sintéticas, que apresentam um mecanismo não direto de indução de danos ao DNA e que são negativas para o ensaio convencional

de mutagenicidade com bactérias, requerem a aplicação de sistemas-teste que permitam uma melhor avaliação dos reais efeitos dos xenobióticos (STOPPER; MÜLLER, 1997). Desta forma, a avaliação acurada da periculosidade de um agente químico requer a aplicação de diferentes ensaios biológicos, capazes de detectar diferentes *endpoints* genéticos. Geralmente, as baterias de testes padrão são determinadas para avaliar dois tipos de danos genéticos, as mutações gênicas e os danos cromossômicos (THYBAUD et al., 2007).

Os danos no DNA, avaliados por meio de ensaios cromossômicos constituem um ponto essencial da genética toxicológica, pois as mutações cromossômicas são eventos importantes a serem considerados nos processos carcinogênicos (FENECH, 2008). A avaliação destes parâmetros tem se dado, preferencialmente, pela aplicação do testes de AC e do MN, sendo que este último tem recebido um maior destaque, devido à simplicidade de aplicação e de obtenção de resultados.

MN é considerado um *endpoint* sensível capaz de prever os resultados do teste de AC (SHI et al., 2010), pelo fato de serem resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros perdidos durante o ciclo mitótico de divisão celular, em decorrência de ações clastogênica ou aneugênica (FENECH, 2000). Adicionalmente, o teste do MN vem sendo considerado uma técnica vantajosa, não apenas pela facilidade de interpretação de resultados, como também pela possibilidade de aplicação em qualquer população de células em proliferação, não sendo necessário o conhecimento prévio do cariótipo do organismo-teste utilizado (HAYASHI et al., 1998). Estas características contribuíram para a ampla utilização do teste do MN, como um método eficiente de triagem de diversos produtos químicos e de amostras ambientais que apresentam possíveis potenciais mutagênicos.

Apesar do MN ser rapidamente analisado, quando comparado ao teste de AC, a análise microscópica deste *endpoint* é ainda considerada relativamente demorada, o que estimulou pesquisadores a desenvolverem metodologias automatizadas deste ensaio (BRYCE et al., 2008). Desta forma, têm sido reportados inúmeros trabalhos que utilizam métodos de análise de MNs baseados em análise de imagem, citometria de varredura a laser e citometria de fluxo (AVLASEVICH et al., 2006). Entretanto, entre estes métodos, o teste do MN *in vitro* baseado em citometria de fluxo tem se destacado, devido à capacidade de avaliação de frequências de MNs em um grande número de células, em um curto período de tempo (NÜSSE; MARX, 1997; AVLASEVICH et al., 2006).

Segundo Collins et al. (2008), as análises de MN, realizadas pela técnica de citometria de fluxo, apresentaram inicialmente resultados falsos positivos, em decorrência da citotoxicidade do agente testado. Para solucionar este problema, diversas estratégias vêm sendo aplicadas para se aumentar a especificidade do ensaio nos diagnósticos de mutagenicidade (AVLASEVICH et al., 2006; BRYCE et al., 2007, 2008, 2010). Uma delas foi desenvolvida pelo laboratório Litron (Rochester, NY, EUA), que inseriu, dentre as etapas de coloração requeridas para a avaliação de MNs por citometria de fluxo, uma etapa de pré-coloração com brometo de etídio monoazídico (EMA - *ethidium monoazide bromide*) (BRYCE et al., 2008). A coloração por EMA permite distinguir cromatinas de células necróticas e apoptóticas, em estágios intermediários e finais de morte celular (SHI et al., 2010).

O teste do MN por citometria de fluxo foi avaliado, primeiramente, em linhagens celulares em suspensão (AVLASEVICH et al., 2006; BRYCE et al., 2007, 2008). Mais tarde, esta metodologia foi adaptada para ser aplicada em cultura de células

de adesão, como as células CHO-K1 (*Chinese hamster ovary cells*) e V79 (*Chinese hamster fibroblast cells*), que são rotineiramente empregadas no ensaio de microscopia do MN *in vitro* (BRYCE et al., 2010, SHI et al., 2010). Em linhas gerais, esta técnica consiste na etapa de pré-coloração com corante EMA, seguida de etapas sequenciais de coloração do DNA, as quais são realizadas, concomitantemente, a digestão de membranas celulares para a obtenção de núcleos e partículas sub-2n livres, que serão posteriormente analisadas pelo citrômetro de fluxo (AVLASEVICH et al., 2006).

Estudos de comparativos entre as diferentes metodologias do teste do MN têm apontado uma boa concordância de resultados entre a avaliação deste *endpoint* por microscopia e citometria de fluxo (AVLASEVICH et al., 2006; SHI et al., 2010). Desta forma, apesar da citometria de fluxo só ser recentemente usada na avaliação da incidência de MNs, os poucos estudos da literatura já apontam para a sua eficiência e sensibilidade em avaliações de mutágenos, com a grande vantagem da possibilidade de análise de um grande número de células em apenas alguns minutos, em relação à técnica padrão (NÜSSE; MARX, 1997; AVLASEVICH et al., 2006; BRYCE et al., 2007, 2008, 2010; SHI et al., 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução de todos os métodos apresentados neste capítulo, o presente trabalho contou, além da estrutura do Laboratório de Mutagênese da UNESP-Rio Claro/SP, com as parcerias estabelecidas com a Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi, docente do Instituto de Química, da UNESP-Araraquara/SP; com a Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira, docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP/SP; e com a Dr. Tamara Grummt, pesquisadora e chefe do Departamento de Toxicologia de Água Potável e de Piscina, da Agência de Proteção Ambiental Alemã (*Umweltbundesamt* – UBA).

4.1. Material

Foram utilizados neste trabalho, dois tipos de combustíveis, o diesel e biodiesel, ambos fornecidos pela empresa BioVerde, localizada na cidade de Taubaté-SP. O cuidado de se obter os combustíveis com uma empresa produtora e não por fornecedores (postos de combustíveis), foi para isentar a possibilidade de adulteração dos combustíveis, o que poderia gerar resultados não confiáveis. Segue abaixo informações mais específicas sobre os combustíveis utilizados neste trabalho.

- Diesel: diesel A S500 (diesel com teor de enxofre máximo de 500 mg/kg, sem adição de biodiesel), validade 2 anos.
- Biodiesel: biodiesel de soja produzido por transesterificação com metanol, lote L-125, validade 12 meses.

Ambos os combustíveis foram armazenados, em recipientes plásticos adequados fornecidos pela empresa fornecedora, em locais com temperatura controlada na faixa de 20°C e no abrigo de luz. As misturas de diesel e biodiesel utilizadas neste trabalho [B5 (5% de biodiesel e 95% de diesel), B20 (20% de biodiesel e 80% de diesel) e B50 (50% de biodiesel e 50% de diesel)] foram preparadas no momento da utilização.

Como materiais biológicos foram utilizados: sementes de *Allium cepa* (variedade baia periforme, da marca Topseed); linhagens celulares HepG2 (*Human hepatocellular carcinoma cells*), CHO-K1 (*Chinese hamster ovary cells*) e Jurkat (*Human T cell leukemia*), todas provenientes de DSMZ GmbH, Alemanha, exceto as linhagens HepG2, que também foram adquiridas junto ao Laboratório de Toxicologia Ambiental, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP/SP; linhagens TA98 (*hisD3052, rfa, Δbio, uvrB, pKM101*), TA100 (*hisG46, rfa, Δbio, uvrB, pKM101*), TA1535 (*hisG46, rfa, Δbio, uvrB*) and TA1537 (*hisC3076, rfa, Δbio, uvrB*) de *Salmonella typhimurium*.

4.2. Métodos

4.2.1. Simulação de vazamento de misturas de diesel e biodiesel em solo

As simulações de vazamento das misturas de diesel e biodiesel em solo foram realizadas na estação quente (verão - março de 2009), de acordo com o protocolo estabelecido por Taylor; Jones (2001), com algumas modificações. As amostras de solo

utilizadas para as simulações foram obtidas na própria UNESP, Campus de Rio Claro-SP, com o cuidado de selecionar uma região não impactada por atividade humana (Tabela 1). As simulações foram realizadas, como segue: foram adicionados, em recipientes plásticos com 30 cm de profundidade, 250 mL das misturas B5, B20 e B50 e dos combustíveis puros B100 (biodiesel) e D100 (diesel) a 500 g de solo, totalizando cinco simulações distintas. Os solos contaminados, preparados conforme descrição acima, foram, umedecidos com 100 mL de água ultrapura e expostos ao ambiente natural por 22 horas. O início da exposição das simulações ao ambiente ocorreu às 18 horas, a fim de evitar perdas significativas por volatilidade, já no início do experimento. Desta forma, as simulações ficaram expostas por 13 horas a situação de ausência de luz solar, 3 horas a luz solar de baixa intensidade e 6 horas a luz solar de alta intensidade. Decorrido as 22 horas, amostras dos solos contaminados foram coletadas e armazenadas em frascos âmbar, a 4°C, para o posterior tratamento das amostras e realização dos ensaios biológicos propostos, bem como a análise química de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs).

Tabela 1. Caracterização do solo utilizado para a realização das simulações de vazamentos neste meio com biodiesel e suas misturas ao óleo diesel.

Amostra	Granulometria										Matéria Orgânica (g/kg)	Condutividade Elétrica (dS/m)	
	Areia (g/kg)						Silte (g/kg)	Argilas (g/kg)		Floculação (%)			Classe de Textura
	AMG	AG	AM	AF	AMF	AT		c/ disp.	água				
SC (solo controle – solo bruto não impactado pelos produtos teste)	6	16	119	257	72	469	79	451	100	78	Argila	26	146,7

Granulometria - métodos de determinação: Bouyoucos (densímetro); S.S.S.A. Book Series: 5 Methods of Soil Analysis Part4; Classe de diametro (mm) U.S.D.A. 5 frações de areia [muito grossa (AMG) = 2 a 1; grossa (AG) = 1 a 0,5; média (AM) = 0,5 a 0,25; fina (AF) = 0,25 a 0,10; muito fina (AMF) = 0,10 a 0,05; areia total (AT) = 2 a 0,05; silte = 0,05 a 0,002; argila total < 0,002; argila água < 0,002]. 2 frações de areia [grossa (AG) = 2 a 0,25 e fina (AF) = 0,25 a 0,05; areia total (AT) = 2 a 0,05; silte = 0,05 a 0,002; argila total < 0,002]. Classe de textura: Argila (c/ dispersante) até 149 g/kg = arenosa (ar); de 150 a 249 g/kg = média arenosa (md-ar); de 250 a 349 g/kg = média argilosa (md-arg); de 350 a 599 g/kg = argilosa (arg); de 600 g/kg ou superior - muito argilosa (m-arg). Método de quantificação matéria orgânica: dicromato/titulométrico. Método de medição da condutividade elétrica: condutivímetro (1:2,5).

4.2.2. Simulação de vazamento de misturas de diesel e biodiesel em água

As simulações de vazamento das misturas de diesel e biodiesel em água foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido por Nicodem et al. (1998) e Vanzella et al. (2007), em escala de laboratório, com algumas modificações. Assim como acima descrito, as simulações em água também foram realizadas na estação quente (verão - março de 2009), simulando um vazamento em condições tropicais (variação de temperatura de 33,6-20,8°C).

Foram adicionados, em aquários de vidro com capacidade de 50 L, 625 mL da mistura B5, B20 e B50 e dos combustíveis puros B100 e D100 a 40 L de água de poço artesiano, totalizando cinco simulações distintas. Os vazamentos foram submetidos à agitação constante, com auxílio de uma bomba submersa (Sarlo Better 650), e expostos ao ambiente por 22 horas. O início da exposição das simulações ao ambiente ocorreu às 18 horas, a fim de evitar perdas significativas por volatilidade, durante o início das simulações. Desta forma, os aquários ficaram expostos por 13 horas a uma situação de ausência de luz solar e 9 horas a luz solar de baixa-média intensidade. Decorrido às 22 horas, a fração superior insolúvel foi descartada e a água contaminada coletada e armazenada em frascos âmbar, a 4°C, para seu posterior preparo e realização dos bioensaios e das análises químicas dos PAHs.

4.2.3. Procedimentos de preparo das amostras de solo obtidas pelas simulações de vazamento realizadas

A extração das amostras de solo foi realizada de acordo com o método de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) (FUJITA, 2009). Esta técnica consiste na dispersão da amostra sólida ou semi-sólida em um adsorvente apropriado para a

extração de resíduos ambientais e alimentares, e engloba a extração e *cleanup* dos extratos em uma única etapa. A amostra é introduzida em um recipiente contendo um suporte sólido (sorvente) e misturada, até a sua completa homogeneização, a esse material (matriz+sorvente). Em seguida, este material é transferido para uma coluna de vidro, onde é realizada a eluição dos analitos de interesse, com a adição de um solvente adequado. O suporte sólido ou dispersante atua como um abrasivo, promovendo o rompimento da estrutura física da amostra e como um adsorvente de compostos na matriz. O material misturado pode ser empacotado em uma coluna e os analitos podem ser eluídos imediatamente.

Resumidamente, misturou-se 1 g da amostra de solo com 2 g de alumina desativada, que foram posteriormente macerados por 1 min. Esta mistura, foi, então, transferida para uma coluna de vidro de 25x0,5 cm, empacotada com os seguintes adsorventes: lã de vidro/2g de alumina desativada/1 g de sílica/1g de Na₂SO₄/lã de vidro/a mistura macerada/lã de vidro. Foram adicionados 500 µL de KOH saturado em metanol. A eluição foi realizada com 3 porções de 5 mL de hexano-acetona (1:1 – v/v) e o extrato obtido foi concentrado em corrente de N₂ a *secura*. Os extratos foram armazenados a -20°C, até a sua utilização para a execução dos testes biológicos e da análise química de PAHs.

4.2.4. Procedimentos de preparo das amostras de água obtidas pelas simulações de vazamento realizadas

A extração das amostras de água foi realizada de acordo com o procedimento de tratamento das amostras fortificadas, estabelecido pelo método US EPA 550.1 (EPA, 1990). Primeiramente, realizou-se o condicionamento dos cartuchos de SPE (*solid*

phase extraction), como segue: cartuchos de C-18 (capacidade de 200mg; 3 mL, Agilent technologies) (utilizados para a extração de compostos não polares a compostos moderadamente polares) foram acoplados ao sistema de vácuo Manifold para o ajuste do gotejamento do cartucho em 8 mL min^{-1} (vazão otimizada). Após esta etapa, os cartuchos foram lavados com 4 porções de 10 mL de diclorometano, seguidos de 4 porções de 10 mL de metanol, sendo que entre cada lavagem realizada não se deixou secar a fase estacionária. Em seguida, os cartuchos foram lavados com duas porções de 10 mL de água deionizada, sendo que, após a primeira lavagem, deixou-se secar o cartucho e na segunda deixou-se a fase estacionária coberta com água (camada de cerca de 1 mm).

Para a etapa de extração dos PAHs, adaptou-se o sistema de extração, utilizando um funil de 100 mL, o qual foi acoplado ao cartucho de SPE, como reservatório para as amostras, facilitando, assim, o procedimento de extração. Para a extração, foi utilizado um volume de 250 mL da amostra. A vazão, controlada por bomba de vácuo, foi fixada em 8 mL min^{-1} . Os funis e aparatos contendo as amostras foram envoltos em papel alumínio, para evitar o contato com a luz ambiente, já que os PAHs são fotossensíveis. O eluato (água sem a presença dos PAHs) foi descartado, o cartucho lavado com 10 mL de água milli-Q e, em seguida, seco por 10 minutos. Posteriormente, eluiu-se o cartucho com 2 porções de 5 mL de diclorometano e as vidrarias que estiveram em contato com a amostra fortificada também foram lavadas com 2mL excedentes de diclorometano. Este volume foi adicionado ao volume do extrato.

A secagem do extrato foi realizada em uma coluna de secagem de 2,5 cm com Na_2SO_4 anidro, previamente seco em estufa por 8 h a 180°C . Por esta coluna, passaram-se 10 mL de diclorometano e o extrato obtido. Em seguida, a coluna foi lavada com 2

mL adicionais de diclorometano e os volumes obtidos foram misturados. O extrato foi concentrado em corrente de N₂, até secar completamente, para depois ser armazenado a -20°C, até a sua utilização na execução dos testes biológicos e nas análises químicas dos PAHs.

4.2.5. Análise química de PAHs

A quantificação dos PAHs nas amostras teste foi realizada de acordo com o protocolo US EPA-550.1 (EPA, 1990), o qual emprega a técnica de cromatografia líquida associada a um detector de fluorescência (HPLC-Flu), sendo capaz de detectar os 16 PAHs considerados prioritários por esta agência ambiental: naftaleno, acenaftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pyreno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(e)pireno, benzo(e)acefenantrileno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, indene(123-cd)pireno.

Para a análise química, as amostras, depois de extraídas, foram injetadas, em triplicata, no equipamento HPLC-Flu, VARIAN LC-920, nas seguintes condições otimizadas: Coluna SUPELCOSIL LC PAH (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) SUPELCO; fase móvel ACN:H₂O 60% ACN (5'), 68% ACN (4'), 100% ACN (7'), 93% ACN (9'); fluxo de 1,8mL/min durante toda a análise; volume de injeção igual a 50µL; tempo de análise de 25 minutos e condições do detector de fluorescência expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Condições do detector de fluorescência utilizados na quantificação dos PAHs nas amostras teste pelo método HPLC-Flu.

Intervalo de tempo (minutos)	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
0 - 8,60	220	322
8,60 - 22,80	240	392
22,80 - 25,00	300	498

4.2.6. Ensaio *in vivo*

4.2.6.1. Bioensaios com sementes de *A. cepa* (tratamento contínuo)

Ao contrário dos demais bioensaios que serão descritos a seguir, o teste de *A. cepa* foi conduzido com as amostras integras de água e solo.

Sementes de *A. cepa*, dispostas em frascos hermeticamente fechados (*clear wide-mouth glass bottles*), foram submetidas à germinação nas amostras de água e solo derivadas das simulações de vazamento realizadas. Quando as raízes atingiram cerca de 2 cm de comprimento, elas foram coletadas e fixadas em álcool ácido-acético (3:1 – v/v) por 6 a 18 horas em temperatura ambiente. Após este tempo, realizou-se a troca por fixador recém-preparado, para armazenamento das raízes a 4°C, até a sua utilização na confecção das lâminas.

Todos os experimentos foram realizados em estufa incubadora BOD, com temperatura constante de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e ausência de luz. Os tratamentos controles foram realizados em água ultrapura (CN - controle negativo) e em 10 mg/L de metilmetano sulfonato (MMS, CAS 66-27-3, Sigma-Aldrich) para o controle positivo (CP).

4.2.6.2. Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa*

O teste de Aberrações Cromossômicas (AC) em células meristemáticas de *A. cepa* foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com algumas modificações.

As raízes fixadas foram submetidas à coloração em reativo de Schiff. 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.

Para a análise das AC, diferentes tipos de anormalidades 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 anormalidades encontradas foram reunidas em um só grupo. A análise de micronúcleos (MN), nestas células, foi considerada como outro parâmetro de avaliação, não sendo agrupada junto com as AC. O Índice Mitótico (IM), relacionado com o número de células em divisão, constituiu em um outro parâmetro de avaliação.

A análise de todos estes parâmetros foi realizada pela contagem de cerca de 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina, para um total de 10 lâminas analisadas. As análises estatísticas foram feitas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 0,05 de nível de significância.

4.2.7. Ensaios *in vitro*

4.2.7.1. Determinação das doses testadas das amostras teste

Para todos os bioensaios *in vitro*, exceto aqueles referentes ao teste do MTT, ao ensaio do cometa e ao teste do MN padrão, realizados com as amostras de água brutas em células HepG2, as doses testadas foram determinadas pelas orientações do ensaio de mutagenicidade com *Salmonella* da Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA, 2009). Desta forma, a dose máxima testada para os extratos de água correspondeu a uma concentração de 200 mL equivalentes de amostra teste, de acordo com os valores recomendados para águas brutas ou não

tratadas. Já para os extratos de solo, a dose máxima referiu-se a 500 mg equivalentes da amostra in natura.

Todos os extratos testados foram preparados com o solvente dimetilsulfóxido (DMSO).

4.2.7.2. Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

4.2.7.2.1. Protocolo de Pré-Incubação

Estes ensaios foram realizados segundo o protocolo de pré-incubação (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000), com as linhagens TA98, TA100, TA1535 e TA1537, utilizando 5 doses por extrato, sendo todos os testes realizados em triplicata, na ausência e presença de sistema de ativação metabólica (mistura S9).

Um volume de 100 µL das culturas, provenientes de ampolas de uso rotineiro, foram inoculadas em 20 mL de caldo nutriente e crescidas por 16 horas a 37°C sob agitação. Após crescimento, as culturas foram mantidas sob refrigeração (4°C), até o momento do teste. Foram adicionados, em tubos de ensaio previamente esterilizados, 100 µL de cultura da linhagem testadora (10^9 células/mL), 100 µL das amostras teste, em diferentes doses, e 500 µL de tampão fosfato 0,2 M, para o ensaio na ausência de ativação metabólica ou o mesmo volume da mistura S9 [fração S9 liofilizada de fígado de rato (Moltox), preparada segundo Maron e Ames (1983)], para o ensaio na presença de ativação metabólica. Os tubos de ensaio foram homogeneizados e incubados a 37°C por 30 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados 2,0 mL de agar de superfície em cada tubo e a mistura foi, então, homogeneizada e vertida em placa de Petri com 25 mL de agar mínimo. As placas foram incubadas invertidas, por 66 horas em temperatura de 37°C. Após a incubação das placas por 66 horas, foi avaliado, por contagem manual,

o número de revertentes por placa. A análise estatística foi realizada pelo software Salanal, desenvolvido especificamente para o ensaio *Salmonella*/microsoma, que utiliza o modelo de Bernstein, o qual aplica a ANOVA e regressão linear (BERNSTEIN et al., 1982).

Como CPs utilizou-se: 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO, CAS 56-57-5, Sigma) a 0,05 µg/µL (TA98 e TA100 -S9); 2-aminoantraceno (2AA, CAS 613-13-8, Aldrich) a 0,25 µg/µL (TA98 e TA100 +S9); C₄H₁₀Cl₃N (Ethanamine, CAS 821-48-7, Merck) a 0,001 mg/µL (TA1535 -S9); 2-Aminofluoreno (2-AF, CAS 153-78-6, Merck) a 0,001 mg/µL (TA1535 +S9); 2-Metil-4,6-dinitrofenol (DNOC, CAS 534-52-1, Riedel de Haen) a 0,01 mg/ µL (TA1537 -S9); 2-Acetylaminofluorene (2-AAF, CAS 53-96-3, Merck) a 0,0005 mg/µL (TA1537 +S9). Um volume de 100 µL de DMSO foi utilizado como CN.

Os testes foram realizados acompanhados da avaliação da viabilidade e da taxa de reversão espontânea das linhagens. Para o ensaio de viabilidade, foi transferido para um frasco contendo 90 mL de água de diluição um volume de 100 µL da cultura crescida em caldo (diluição -3). Esta mistura foi homogeneizada 30 vezes em ângulo de 45°. Em seguida, foram adicionados em outro frasco com 90 mL de água de diluição 100 µL desta solução (diluição -6) e o mesmo procedimento foi repetido mais uma vez. 100 µL desse último frasco foram adicionados em uma placa de agar nutriente e espalhados com auxílio de uma Alça Drigalski em movimentos circulares (diluição -7). Este ensaio foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para posterior verificação da viabilidade. A viabilidade a ser obtida deve se enquadrar dentro da faixa desejada de 1 a 2x10⁹ células/mL.

A avaliação da taxa de reversão espontânea foi feita inoculando-se 100 µL de cada cultura em 2,0 mL de agar de superfície mantido em banho seco a 47°C e vertendo a mistura, após homogeneização, sobre uma placa de agar mínimo. Cada cultura foi inoculada em triplicata. A taxa de reversão espontânea foi avaliada após 66 horas de incubação a 37°C, cujo resultado obtido deve estar dentro da faixa esperada para cada linhagem (TA98 de 25-75; TA100 de 75-225; TA1535 e TA1537 de 5-20).

4.2.7.2.2. Ames MPF (*Microplate Fluctuation Protocol*)

O protocolo MPF é uma versão em meio líquido do ensaio *Salmonella* padrão, que utiliza placas de 24-poços para a exposição das amostras e placas de 384-poços para o crescimento dos revertentes e contagem dos resultados. Todos os reagentes necessários para a realização desta técnica, bem como as linhagens testadoras utilizadas (TA98, TA100, TA1535 e TA1537), foram adquiridas da Xenometrix (Suíça). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções de utilização contidas no manual do kit fornecido por esta empresa. Como no ensaio de pré-incubação, os testes foram conduzidos utilizando cinco doses em triplicata, na ausência e presença de sistema de ativação metabólica (mistura S9).

As bactérias foram crescidas por 10 horas a 37°C sob agitação (150 rpm). Após crescimento, a cultura de bactéria foi diluída em meio de exposição e exposta às amostras teste em placas de 24-poços por 90 minutos a 37°C e 150 rpm, tanto na ausência como presença de S9 (preparado igualmente ao mencionado no protocolo de pré-incubação). Decorrido o tempo de exposição, as culturas foram diluídas em meio indicador e o conteúdo foi distribuído em uma placa de 384-poços (50 µL/poço, sendo 48 poços por tratamento). O meio indicador é constituído por um corante de pH que

altera, pelo crescimento bacteriano, a coloração de roxa para amarelo. Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas foram contadas visualmente quanto aos poços amarelos (poços positivos).

O critério utilizado para avaliar esta técnica foi o aumento do número de poços positivos, em relação ao valor base do controle solvente (FIB - *Fold increase over baseline*) e a obtenção de uma resposta dose-dependente. O aumento do número de revertentes, em relação ao solvente controle, foi determinado pela divisão da média de poços positivos de cada dose pelo valor base do controle solvente, que se refere à média dos poços positivos obtidos para este controle somado ao seu desvio padrão (SD – *Standard Deviation*). Foram combinados os resultados dos controles solventes de experimentos com condições idênticas (mesmo dia, mesma cultura bacteriana e mesmas condições de incubação). Os resultados que se apresentaram 2 vezes maior que o valor base foram classificados como positivo para aquela dose. Respostas positivas para mais de uma dose testada, associadas à obtenção de uma resposta dose-dependente, classifica a amostra como positiva.

As avaliações citotóxicas foram procedidas concomitantemente aos ensaios realizadas pela medição da OD₆₀₀ (Tecan GENios Microplate Reader) no início da exposição aos agentes teste (t=0) e após os 90 minutos de incubação (t=90).

Os CPs usados neste procedimento foram: mistura 1:2 v/v de 4-NQO a 2,5 µg/mL e 2-Nitrofluoreno (2-NF, CAS 607-57-8) a 50 µg/mL (TA98 -S9); 4-NOQ a 3333,3 ng/ml (TA100 -S9); N⁴-Aminocytidine (N4-ACT, CAS 57294-74-3) a 2,5 mg/mL (TA1535 -S9); 9-AAc a 375 µg/ml (TA1537 -S9); 2AA a 125 µg/mL (TA98, TA100, TA1535, TA1537 +S9) (todos provenientes da Moltox). Como CN utilizou-se o DMSO.

4.2.7.3. Ensaio com cultura de células de mamíferos

4.2.7.3.1. Cultura Celular

As células CHO-K1, HepG2 e Jurkat foram cultivadas em meio de cultura a 37°C, 5% de CO₂ em câmara úmida. Para as culturas rotineiras, as células Jurkat foram mantidas até 0,5-1,5x10⁶ células/mL e as células CHO-K1 e HepG2 até, aproximadamente, 80% de confluência. O meio RPMI-1640, suplementado com 1% de L-glutamina 200 mM e 10% de soro bovino fetal (SBF), e o meio mínimo essencial EAGLE, suplementado com 1% de L-glutamina 200 mM, 1% de L-prolina e 10% de SBF (todos provenientes da Sigma), foram usados, respectivamente, para as células Jurkat e CHO-K1, HepG2.

4.2.7.3.2. Teste do MTT em cultura de células HepG2

O teste do MTT com células HepG2 foi realizado segundo o protocolo descrito por Mosmann (1983), com algumas modificações.

Em cada poço de uma placa de 96-poços, foram semeadas 2x10⁴ células HepG2, exceto para os poços referentes ao branco, onde se adicionou apenas meio de cultura. A placa foi subsequentemente incubada por 24 horas e, decorrido este período de estabilização, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado e as células expostas, por 24 horas, a diferentes concentrações das amostras brutas de água (2:1 e 1:1 - v/v, utilizando meio de cultura como meio de diluição). Os tratamentos CN e CP foram realizados, respectivamente, com o meio de cultura e Triton X-100 1%. Após a exposição, foram retirados os tratamentos dos poços e adicionados nestes o corante MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, CAS 298-93-1, Sigma), seguido de uma incubação de 4 horas. Decorrido às 4 horas, o corante foi descartado e 100 µL de

DMSO foi adicionado em cada poço da placa de cultura, para a dissolução dos cristais de formazan. Os cristais de formazan resultam da atividade enzimática da enzima mitocondrial succinato desidrogenase presente nas células vivas. Imediatamente após a adição do DMSO, as placas foram submetidas ao leitor de ELISA (filtro de 540 nm), para a realização das medidas espectrofotométricas. Os valores de absorbância obtidos foram comparados estatisticamente com do CN, pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 0,05 de nível de significância.

4.2.7.3.3. Ensaio do cometa em células HepG2

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Tice et al. (2000) e Uhl et al. (1999, 2000), com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em triplicata/tratamento.

Foram semeados em frascos de cultura de 75 cm² 5x10⁵ células. Estes frascos foram incubados por 24 horas a 37°C, 5% de CO₂ em atmosfera úmida, para um período de estabilização. Decorrido este tempo, as células foram expostas por 24 horas a 10 mL das amostras brutas de água (volume estipulado com base nos resultados obtidos pelo ensaio do MTT). Após o tempo de exposição, as células foram coletadas e 20 µL da suspensão celular obtida foram misturadas a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 37°C. Em seguida, esta suspensão celular foi disposta em uma lâmina previamente revestida com agarose normal e recoberta com lamínula. Após breve solidificação da agarose a 4°C, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram incubadas em solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de tampão Tris-HCL, pH 10, 1% de sarcosinato de sódio com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) por, no mínimo, 1 hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas, por 20 minutos, para a cuba de eletroforese

contendo tampão alcalino (pH > 13) e, em seguida, submetidas à eletroforese por mais 20 minutos (40V, 300 mA). Decorrido o tempo da corrida de eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em tampão Tris-HCl (pH 7,5), fixadas em etanol absoluto e guardadas a 4°C, até a realização das análises. A coloração foi realizada com brometo de etídio (0,02mg/mL).

Para cada tratamento, foram analisados, ao acaso, 300 nucleóides (100 nucleóides/lâmina), com a utilização de microscópio de fluorescência Olympus BX51, filtro WG, em aumento de 400x. 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 dano de cada tratamento foram comparados estatisticamente, em relação ao CN, pelo teste de Kruskal-Wallis a 0,05 de nível de significância.

4.2.7.3.4. Teste do MN padrão em células HepG2

O teste do MN em células HepG2 foi realizado segundo protocolo descrito por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em triplicata/tratamento.

Foram semeadas em frascos de cultura de 75 cm² 5x10⁵ células HepG2, que foram incubados por 24 horas a 37°C, 5% de CO₂ em atmosfera úmida. Decorrido o tempo de estabilização, as células foram expostas por 24 horas a 10 mL das amostras brutas de água (volume estipulado com base nos resultados obtidos pelo ensaio do MTT). Após o tempo de exposição, as células foram lavadas com PBS e incubadas novamente, por mais 28 horas, com novo meio de cultura contendo citocalasina B (bloqueador da citocinese) (concentração final 300 µg/mL). Após a colheita, as células

foram tratadas com solução hipotônica de citrato de sódio 0,01% e fixadas em metanol ácido-acético (3:1 - v/v). As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, por 5 minutos, para posterior análise em microscópio de luz.

Para cada tratamento, foi analisada a incidência de MN em 3000 células binucleadas (1000 células binucleadas por lâmina) com citoplasma intacto, selecionadas ao acaso. A análise estatística será realizada pelo teste de Kruskal-Wallis a 0,05 de nível de significância.

4.2.7.3.5. Teste do MN em citometria de fluxo [*in vitro* MicroFlow[®] kit (Litron) assay]

O teste do MN em citometria de fluxo foi realizado com células CHO-K1 e HepG2, sendo aplicado o kit “*in vitro* MicroFlow[®] Kit (Litron)”.

Inicialmente, as células foram tripisinizadas e ajustadas, com meio de cultura, para 2×10^4 células/mL. Posteriormente, alíquotas de 1 mL da suspensão celular obtida foram adicionados em cada poço de uma placa de cultura de 24-poços, a qual foi, subsequentemente, incubada a 37°C, 5% de CO₂, em atmosfera úmida. No dia seguinte, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado e as células foram expostas, usando novo meio de cultura, aos tratamentos [DMSO como controle solvente; Mitomicina C (MMC, CAS 50-07-7, Sigma) a 0,1µg/mL e Vimblastina (VB, CAS 143-67-9, Sigma) a 10 ng/mL como CPs; extratos das amostras de água e solo provenientes das simulações realizadas]. As células expostas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂, em atmosfera úmida, por 24 horas, no caso dos ensaios com CHO-K1, e por 48 horas, para as células HepG2. Os experimentos foram repetidos três vezes.

Após o tempo de exposição aos agentes testes, as células foram primeiramente marcadas com o corante fotoativo brometo de etídio monoazídico (EMA) e, posteriormente, lavadas, lisadas e submetida à marcação por uma solução de lise contendo RNase, um corante de ácido nucléico (SYTOX Green) e microesferas fluorescentes de látex (*counting beads*). As moléculas de DNA de células apoptóticas e necróticas, que apresentam membranas celulares comprometidas, são marcadas por ambos os corantes (EMA e SYTOX Green), o que os distingue dos eventos mutagênicos de interesse.

As amostras obtidas, após a seqüência de coloração, são protegidas da luz e resuspendida, por pipetagem suave, imediatamente antes da análise por citometria de fluxo (BD FACSCalibur™). A aquisição e análise dos dados foi realizado pelo software BD CellQuest Pro v.5.2. As estratégias para a aquisição dos dados pela citometria de fluxo foram obtidas junto à empresa produtora do teste e encontram-se descritas no manual do próprio kit utilizado. A emissão da fluorescência associada ao corante SYTOX Green é coletada pelo canal FL1 (FITC) e a emissão de fluorescência associada ao corante EMA pelo canal FL3 (PerCP).

4.2.7.3.6. Detecção alterações no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

A ativação da via mitocondrial da apoptose é acompanhada pela liberação do citocromo c e o colapso do $\Delta\Psi_m$. Para determinar o $\Delta\Psi_m$, uma suspensão celular de células Jurkat foi ajustada com meio de cultura para $0,3 \times 10^6$ células/mL e alíquotas de 1 mL foram semeadas em uma placa de 24-poços. Em seguida, as células foram expostas aos tratamentos e incubadas por 24 horas a 37°C, 5% CO₂, em atmosfera úmida. Após a exposição, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS - *phosphate*

buffered saline) e incubadas com 25 nM de TMRE (*Tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate*, CAS 115532-52-0, Sigma). TMRE é um marcador catiônico fluorescente permeável a membranas, que é difundido na mitocondrial, onde a fluorescência é perdida. Quando o potencial de membrana é reduzido, TMRE é liberado ao citoplasma e a fluorescência é emitida. Após 10 minutos de incubação a 37°C, as células foram analisadas pelo citometro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biosciences). Foram adquiridos e analisados, com a utilização do programa BD CellQuest Pro v.5.2.1., 10000 eventos selecionados ao acaso. As células marcadas pelo TMRE foram excitadas com laser de argônio 488-nm e analisadas pelo canal FL2 (585 nm). As células com $\Delta\Psi_m$ alterado foram percentualmente contabilizadas, sendo utilizado como critério de avaliação dos resultados positivos o aumento na alteração do potencial de membrana mitocondrial equivalente a duas vezes o valor encontrado para o controle solvente (FI – *fold increase*).

DMSO, na concentração final de 1%, foi utilizado como controle solvente (CN) e Etopósido (CAS 33419-42-0, Sigma) a 0,5 µg/mL (concentração final) como CP. Os experimentos foram realizados em duplicata/dose e repetidos três vezes.

4.2.7.3.7. Detecção de células apoptóticas pelo emprego de Anexina V [*Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I*]

A avaliação da exposição da PS no folheto externo da MP de células apoptóticas foi feita pelo kit “Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I” (BD Pharmigen™). Uma placa de cultura de 24-poços foi preenchida com uma suspensão de células Jurkat a 1×10^6 células/mL e exposta aos tratamentos por 2 horas a 37°C, 5% CO₂, em atmosfera úmida. Após o período de exposição, as células foram lavadas com PBS gelado e

ressuspendidas em um tampão específico diluído 1x [10 mM Hepes/NaOH (pH 7,4); 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂]. 100 µL destas soluções (1x10⁵ cells) foram transferidos para novos tubos de cultura, onde, posteriormente, foram adicionados 5 µL de Anexina V-FITC e de Iodeto de Propídio (PI – *Propidium Iodide*). Os tubos foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente (25°C) e na ausência de luz. Foi adicionado em cada tubo, antes de realizar as medições por citometria de fluxo (FACSCalibur™, BD Biosciences), um volume de 400 µL do tampão (diluído 1 x). Aproximadamente 10000 eventos, selecionados ao acaso, foram adquiridos e analisados pelo programa BD CellQuest Pro v.5.2.1. Marcações Anexina V/PI, Anexina V⁺/PI e Anexina V⁺/PI⁺ indicaram, respectivamente, células viáveis, estágios iniciais de apoptose e morte celular (estágios finais de apoptose e morte). Assim como no ensaio com TMRE, foram considerados neste ensaio como resultados positivos um aumento de marcação Anexina V⁺/PI e Anexina V⁺/PI⁺ superior a duas vezes o valor obtido no controle solvente (FI – *fold increase*).

DMSO, na concentração final de 1%, foi utilizado como controle solvente (CN); 10 µM de Staurosporine (CAS 62996-74-1, Sigma) como CP para indução de apoptose e 10 mM de MnCl₂ (CAS 7773-01-5, Sigma) como CP para necrose. Os experimentos foram realizados com uma única dose/poço e repetidos duas vezes.

4.2.7.3.8. Avaliação da citotoxicidade pelo sistema xCELLigence™

As análises de viabilidade celular por fatores cinéticos em tempo real, foram realizadas pelo sistema xCELLigence™ de acordo com as instruções do fabricante (Roche Applied Science e ACEA Bioscience). As curvas de crescimento foram construídas usando uma placa especial de 96-poços (E-plate 96), a qual contém sensores

de eletrodos integrados. As alterações da integridade celular afetam os eletrodos de impedância, que exibem os resultados em tempos de duplicação celular como indicativo de viabilidade. Foram adicionados nos poços da E-plate 96, 100 μL do meio de cultura das células HepG2. Em seguida, esta placa foi conectada ao sistema para a verificação, por 60 segundos, dos contatos elétricos e do *background* de impedância. Enquanto isso, a suspensão de células HepG2 foi ajustada para 2×10^5 células/mL e alíquotas de 100 μL foram adicionadas a cada poço da placa. A placa foi conectada, novamente, ao sistema e a adesão celular foi medida em intervalos de 1 hora, durante um período de 24 horas. Decorrido este tempo, as células foram expostas aos seus respectivos tratamentos (10 μL de amostra teste/poço) e a E-plate 96 foi conectada ao sistema, para o monitoramento da citotoxicidade, com intervalos de 1 hora por um período de 96 horas.

O teste t foi utilizado para comparar pares de grupos de dados e os valores com $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

DMSO, na concentração final de 1,5%, foi utilizado como CN; 0.25 μM de Staurosporine e 0.63 mM de MnCl_2 como CPs. Foram utilizados para cada tratamento quatro poços da placa de cultura e os experimentos foram repetidos duas vezes.

5. RESULTADO E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados todos os resultados obtidos com a realização deste trabalho. Como nem todos os dados puderam ser organizados na forma de artigos, serão apresentados, primeiramente, os resultados individuais e, em seguida, os artigos científicos que foram ou serão submetidos a periódicos de destaque da área a que se refere esta pesquisa.

5.1. Resultados da análise química de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs)

Os resultados das análises químicas, referentes à quantificação dos PAHs considerados prioritários de investigação pela US EPA, realizadas nas amostras de água e solo provenientes das simulações de vazamento com os combustíveis diesel e biodiesel e suas misturas, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Quantificação dos PAHs presentes nas amostras de água obtidas pelas simulações de vazamento realizadas.

PAHs ($\mu\text{g/L}$)	CA	B5	B20	B50	D100	B100
Naftaleno	0,7 \pm 0,20	344,6 \pm 14,76	313,9 \pm 13,10	287,6 \pm 13,45	365,7 \pm 16,65	2,2 \pm 0,35
Acenafteno	0,2 \pm 0,10	22,6 \pm 3,75	20,7 \pm 3,25	16,9 \pm 2,20	23,3 \pm 2,74	1,4 \pm 0,26
Fluoreno	0,3 \pm 0,10	160,7 \pm 11,40	155,7 \pm 9,65	117,3 \pm 7,15	193,2 \pm 8,20	2,6 \pm 0,20
Fenantreno	1,3 \pm 0,25	221,2 \pm 9,30	217,5 \pm 11,25	168,3 \pm 8,20	232,5 \pm 6,36	9,9 \pm 0,72
Antraceno	0,3 \pm 0,10	2,4 \pm 0,40	2,2 \pm 0,27	2,2 \pm 0,25	3,4 \pm 0,45	2,1 \pm 0,35
Fluoranteno	0,3 \pm 0,15	3,7 \pm 0,55	3,3 \pm 0,40	3,4 \pm 0,30	3,7 \pm 0,50	1,3 \pm 0,30
Pireno	1,1 \pm 0,20	13,3 \pm 1,70	11,8 \pm 1,90	11,8 \pm 1,40	16,2 \pm 1,94	2,8 \pm 0,42
Benzo[a]antraceno	0,2 \pm 0,05	0,9 \pm 0,10	1,7 \pm 0,35	1,7 \pm 0,25	1,9 \pm 0,45	0,4 \pm 0,15
Criseno	nd	0,1 \pm 0,05	0,1 \pm 0,05	0,1 \pm 0,05	0,2 \pm 0,05	0,1 \pm 0,05
Benzo[e]pireno	nd	nd	nd	nd	0,2 \pm 0,05	nd
Benzo[e]acefenantrileno	nd	0,6 \pm 0,25	0,5 \pm 0,20	0,2 \pm 0,07	0,9 \pm 0,07	nd
Benzo[k]fluoranteno	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo[a]pireno	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dibenzo[a,h]antraceno	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo[g,h,i]perileno	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Indeno[1,2,3-cd]pireno	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Σ PAHs	4,4	770,1	706,7	609,5	841,14	22,81

Dados apresentados como Média \pm Desvio Padrão. CA = água controle (água de poço artesiano utilizada nas simulações realizadas); B5 = água contaminada com a mistura B5 (5% de biodiesel+95% diesel); B20 = água contaminada com a mistura B20 (20% de biodiesel+80% diesel); B50 = água contaminada com a mistura B50 (50% de biodiesel+50% diesel); D100 = água contaminada com diesel puro; B100 = água contaminada com biodiesel puro; nd = não detectado (abaixo de limite de detecção).

Tabela 2. Quantificação dos PAHs presentes nas amostras de solo provenientes das simulações de vazamento realizadas.

PAHs (mg/kg)	SC	B5	B20	B50	D100	B100
Naftaleno	2,1±0,32	53,4±6,85	47,8±5,16	41,2±5,44	59,3±6,74	3,4±0,62
Acenafteno	0,1±0,04	1,3±0,25	1,2±0,21	0,9±0,30	1,4±0,35	0,2±0,08
Fluoreno	0,2±0,05	8,8±1,30	7,6±1,46	7,1±1,77	9,8±2,10	0,8±0,20
Fenantreno	1,3±0,15	29,9±2,60	27,1±2,16	24,3±3,10	37,7±4,25	2,1±0,45
Antraceno	0,20±0,05	1,2±0,30	1,1±0,30	1,1±0,42	1,3±0,35	0,7±0,25
Fluoranteno	0,1±0,04	0,6±0,08	0,5±0,05	0,5±0,10	0,6±0,15	0,6±0,10
Pireno	0,1±0,05	4,0±1,10	3,8±1,28	3,2±1,40	4,5±1,70	0,4±0,15
Benzo[a]antraceno	nd	0,3±0,07	0,1±0,05	0,1±0,05	0,3±0,07	0,1±0,05
Criseno	nd	2,4±0,40	2,3±0,25	2,2±0,36	2,7±0,44	0,6±0,30
Benzo[e]pireno	nd	0,2±0,10	0,1±0,06	0,1±0,05	0,2±0,05	0,2±0,05
Benzo[e]acefenantrileno	0,1±0,05	0,8±0,15	0,6±0,08	0,8±0,10	0,8±0,15	0,3±0,10
Benzo[k]fluoranteno	nd	1,0±0,20	0,8±0,15	0,9±0,12	1,1±0,15	0,9±0,27
Benzo[a]pireno	nd	0,4±0,15	0,2±0,05	0,3±0,07	0,4±0,10	0,3±0,09
Dibenzo[a,h]antraceno	nd	0,2±0,07	0,1±0,05	0,1±0,05	0,2±0,05	nd
Benzo[g,h,i]perileno	nd	0,2±0,07	0,1±0,06	0,1±0,06	0,2±0,05	nd
Indeno[1,2,3-cd]pireno	nd	0,5±0,10	0,4±0,05	0,4±0,07	0,6±0,07	0,2±0,08
Σ PAHs	4,2	105,10	93,8	83,3	121,1	10,8

Dados apresentados como Média±Desvio Padrão. SC = solo controle; B5 = solo contaminado com a mistura B5 (5% de biodiesel+95% diesel); B20 = solo contaminado com a mistura B20 (20% de biodiesel+80% diesel); B50 = solo contaminado com a mistura B50 (50% de biodiesel+50% diesel); D100 = solo contaminado com diesel puro; B100 = solo contaminado com biodiesel puro; nd = não detectado (abaixo de limite de detecção).

Uma das preocupações relacionada aos impactos ambientais do setor do biodiesel está justamente relacionada à designação deste biocombustível como um biorremediador de área impactadas por vazamentos de óleos crus (MILLER; MUDGE, 1997; MUDGE; PEREIRA, 1999; PEREIRA; MUDGE, 2004; FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ et al., 2007). Dentro deste contexto, o biodiesel atua como um solvente orgânico não volátil capaz de dissolver tanto o óleo cru como o intemperizado, conferindo a eles maior mobilidade no ambiente (MUDGE; PEREIRA, 1999). Porém, essa maior mobilidade dos hidrocarbonetos de petróleo pode levar a um agravamento das condições ambientais, pois, como a remoção de poluentes de um ambiente não se dá de forma imediata, a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos se instalaria por mais tempo, agravando os efeitos deletérios conferidos à saúde dos organismos expostos.

Assim, considerando o fato de que grande parte do biodiesel produzido atualmente é comercializada em misturas ao óleo diesel, a característica solvente deste biocombustível poderia agravar os impactos gerados em situações de contaminação ambiental com estes produtos. Entretanto, os resultados da análise química aqui obtidos não apontaram aumento significativo nas concentrações totais de PAHs das amostras contaminadas pelas misturas de diesel e biodiesel testadas (B5, B20, B50). Ao contrário, estes dados mostraram que a adição do biodiesel ao óleo diesel contribui para a redução da quantidade de PAHs liberadas ao ambiente (B5>B20>B50).

5.2. Resultados do teste de *Allium cepa* referente às amostras de água

Os resultados obtidos pelo teste de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleo (MN) em *A. cepa*, com a simulação de vazamento em água estão apresentados nas figuras 1 e 2.

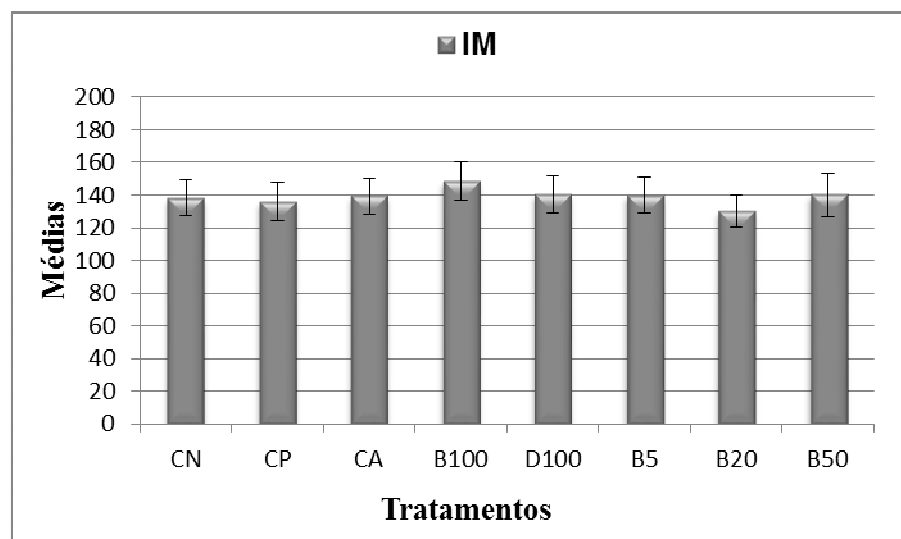


Figura 1. Valores de Índice Mitótico (IM) obtidos pela exposição de células meristemáticas de *A. cepa* às águas impactadas pelos combustíveis diesel e biodiesel e suas misturas. CN = controle negativo; CP = controle positivo; CA = controle água (água de poço artesiano utilizada na realização das simulações de vazamento); B100 = água contaminada com biodiesel puro; D100 = água contaminada com diesel puro; B5 = água contaminada com a mistura B5 (5% de biodiesel+95% diesel); B20 = água

contaminada com a mistura B20 (20% de biodiesel+80% diesel); B50 = água contaminada com a mistura B50 (50% de biodiesel+50% diesel). Valores expresso por Média±Desvio Padrão pela análise de 5000 células por tratamento. *valores significativos em relação ao CN, de acordo com o teste estatístico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

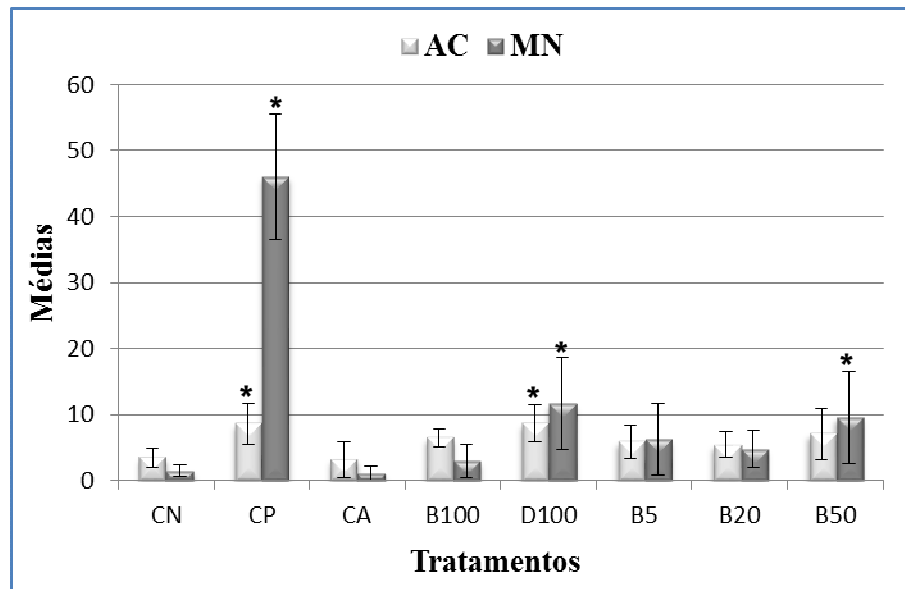


Figura 2. Valores de AC e MN obtidos pela exposição de células meristemáticas de *A. cepa* às águas impactadas pelos combustíveis diesel e biodiesel e suas misturas. CN = controle negativo; CP = controle positivo; CA = controle água (água de poço artesiano utilizada na realização das simulações de vazamento); B100 = água contaminada com biodiesel puro; D100 = água contaminada com diesel puro; B5 = água contaminada com a mistura B5 (5% de biodiesel+95% diesel); B20 = água contaminada com a mistura B20 (20% de biodiesel+80% diesel); B50 = água contaminada com a mistura B50 (50% de biodiesel+50% diesel). Valores expresso por Média±Desvio Padrão pela análise de 5000 células por tratamento. *valores significativos em relação ao CN, de acordo com o teste estatístico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

A não apresentação de um artigo com as avaliações mutagênicas obtidas com os ensaios realizados com as simulações de contaminação em água, junto ao sistema-teste de *A. cepa*, deve-se ao fato de não se ter obtido, com este sistema teste, dados correlacionados entre a mutagenicidade e a genotoxicidade observadas, o que sugere a necessidade de maiores investigações sobre os efeitos dos compostos investigados e de seus subprodutos sobre este sistema biológico.

A avaliação do IM (número de células meristemáticas em divisão celular) em *A. cepa* é geralmente empregada para estimar a citotoxicidade de um determinado agente (LEME; MARIN-MORALES, 2009). No presente trabalho, não foram evidenciadas alterações significativas nos valores de IM, o que indica uma não citotoxicidade para estas amostras. Tanto para as avaliações genotóxicas/mutagênicas como para as citotóxicas, realizadas com amostras de água, os resultados discordaram dos outros sistemas testes utilizados (Teste de Ames e Teste do MN em células CHO-K1).

Contudo, apesar do sistema-teste de *A. cepa* não ter se mostrado sensível na análise das amostras de água, este teste se mostrou adequado na avaliação do potencial genotóxico/mutagênico dos solos contaminados com diesel e biodiesel. Tal fato pode estar relacionado a diversos fatores, como as características das amostras teste e o tipo de exposição aplicada.

Os ensaios com *A.cepae* foram conduzidos em frascos especiais (*clear wide-mouth glass bottles*), diferentemente dos ensaios convencionalmente realizados com sementes, que são realizados em placas de petri, a fim de se evitar perdas de substâncias voláteis derivadas do óleo diesel durante o experimento. No entanto, ao contrário da exposição realizada em placas de petri, onde um papel filtro é levemente umedecido com a amostra teste, a utilização destes frascos requer um volume maior de líquido no seu interior, havendo a necessidade da adaptação de um suporte interno para acomodar o papel de filtro, onde as sementes serão dipostas. Desta forma, este suporte pode interferir no bom contato entre as sementes e a amostra. Já nos ensaios desenvolvidos com as amostras de solo, as sementes foram diretamente expostas ao solo, o que permitiu o estabelecimento de um contato mais estrito entre a semente e a amostra.

5.3. Resultados dos ensaios realizados em células HepG2 com as amostras brutas de água

Os ensaios com células HepG2 foram desenvolvidos com amostras de água obtidas da própria simulação, portanto com o conteúdo total das frações do biodiesel e diesel. Esta iniciativa de realização de ensaios com as amostras brutas das simulações de contaminação se justifica pelo volume de amostra necessário para a realização dos testes. Nas extrações, geralmente, são obtidos volumes limitados, o que poderia inviabilizar a realização de todos os bioensaios propostos. Como outros ensaios *in vitro* necessitam ser conduzidos, exclusivamente, com amostras resultantes de extração, optou-se por realizar o ensaio do cometa e o teste do MN, com estas células, com as amostras brutas de água, uma vez que não haveria grandes problemas na adaptação da metodologia descrita. No entanto, ensaios *in vitro* com amostras brutas podem apresentar problemas, como a indução de falsos negativos, devido à alta dispersão dos poluentes na amostra teste. Outro problema também frequentemente enfrentado é a necessidade de esterilização das amostras. Durante o processo de esterilização, muitos poluentes podem ser perdidos o que, conseqüentemente, pode gerar resultados não confiáveis. Por outro lado, o uso de extratos preparados de forma cuidadosa, com solventes apropriados (e.g. DMSO), podem dispensar a etapa de esterilização da amostra, o que contribui para a diminuição do risco de perda dos agentes químicos de interesse.

Assim, a partir dos resultados não satisfatórios obtidos na avaliação das amostras brutas de água pelos ensaios com células HepG2, consideramos que, para uma acurada análise dos potenciais genotóxicos e mutagênicos dos agentes teste, todos os ensaios *in vitro* deveriam ser conduzidos com as amostras extraídas e não com as brutas.

Entretanto, devido à limitação de material para os ensaios, tivemos que optar pela eliminação de alguns dos testes propostos inicialmente. Como tivemos a oportunidade de realizar o teste de MN em citometria de fluxo, o qual tem sido recentemente destacado na área da Genética Toxicológica, optamos pela não realização do teste do MTT, ensaio do cometa e teste MN padrão em células HepG2, a serem realizados com os extratos.

O teste do MTT teve apenas a função de prever as concentrações não citotóxicas, a serem utilizadas, posteriormente, nos ensaios com as amostras brutas de água em células HepG2.

5.3.1. Teste do MTT

Ensaio para a detecção da citotoxicidade têm sido amplamente utilizados em estudos *in vitro* de avaliação toxicológica. Dentre os ensaios empregados, o teste do MTT tem se destacado na avaliação da toxicidade de agentes químicos (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

O teste do MTT é baseado na conversão de um sal tetrazólico solúvel em água em uma substância insolúvel de coloração púrpura, denominado cristal de formazan, o qual é resultado da clivagem do anel tetrazólico pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase. O cristal de formazan é um produto impermeável às membranas celulares e, por isso, é acumulado nas células saudáveis (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Mosmann (1983) testou a validade do teste do MTT em diversas linhagens celulares, obtendo resultados satisfatórios com elas. Berridge e Tan (1992) sugerem que a redução do MTT pode também ser mediada pelo NADH ou NADPH presente no interior celular e fora das mitocôndrias.

Os resultados obtidos para a análise das amostras brutas de água pelo teste do MTT em células HepG2 estão expressos a seguir na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de absorvância obtidos pelo teste do MTT realizados com as amostras brutas de água em células HepG2.

Tratamentos	Concentrações testadas	
	2:1	1:1
CN	0.508±0.19	0.842±0.53
CP	0.075±0.02*	0.068±0.01*
CA	0.577±0.17	0.611±0.15
B100	0.622±0.23	0.945±0.11
D100	0.700±0.18	0.852±0.14
B5	0.775±0.21	1.063±0.29
B20	0.579±0.15	0.930±0.20
B50	0.457±0.14	1.109±0.73

CN = controle negativo; CP = controle positivo; CA = controle água (água de poço artesiano utilizada na realização das simulações de vazamento); B100 = água contaminada com biodiesel puro; D100 = água contaminada com diesel puro; B5 = água contaminada com a mistura B5 (5% de biodiesel+95% diesel); B20 = água contaminada com a mistura B20 (20% de biodiesel+80% diesel); B50 = água contaminada com a mistura B50 (50% de biodiesel+50% diesel). Valores de absorvância obtidos por leituras espectrofotométricas expressos em Média±Desvio Padrão. *valores significativos em relação ao CN, de acordo com o teste estatístico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

Pela análise dos resultados, não foram observadas diferenças significativas nos valores de absorvância obtidos pelo teste do MTT para as amostras brutas de água, o que as caracterizou como não citotóxicas. Considerando que os poluentes podem estar dispersos nestas amostras e a citotoxicidade não foi verificada para nenhuma das concentrações testadas, a concentração 2:1-v/v, que corresponde a um tratamento de 10 mL da amostra, foi a escolhida para a realização do ensaio do cometa e do teste do MN aplicados nesta linhagem celular.

5.3.2. Ensaio do Cometa

Os resultados obtidos pelo ensaio do cometa com células HepG2, para as amostras brutas de água, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados obtidos pelo ensaio do cometa em células HepG2 expostas as amostras brutas de água provenientes das simulações de vazamento realizadas.

Tratamentos	Escore de Dano
CN	19.00±11.02
CP	301.67±19.73*
CA	34.75±18.87
B100	29.75±7.46
D100	19.75±20.19
B5	25.33±12.10
B20	27.25±16.42
B50	44.25±21.98

CN = controle negativo; CP = controle positivo; CA = controle água (água de poço artesiano utilizada na realização das simulações de vazamento); B100 = água contaminada com biodiesel puro; D100 = água contaminada com diesel puro; B5 = água contaminada com a mistura B5 (5% de biodiesel+95% diesel); B20 = água contaminada com a mistura B20 (20% de biodiesel+80% diesel); B50 = água contaminada com a mistura B50 (50% de biodiesel+50% diesel). 300 nucleóides analisados por tratamento. Valores expressos em Média±Desvio Padrão. *diferença significativa em relação ao controle negativo ($p<0.05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

A comparação dos escores dos danos obtidos pelo ensaio do cometa em células HepG2, expostas as amostras de água contaminadas com diesel e biodiesel, não evidenciaram valores significativos em relação ao controle negativo. Assim, nenhuma das amostras testadas se mostrou genotóxica por este sistema-teste. No entanto, tal resultado pode não ser relevante, uma vez que a execução deste ensaio requer procedimentos prévios de esterilização das amostras, o que pode resultar na eliminação de poluentes de interesse. No caso do presente trabalho, a esterilização das amostras de água, pela filtração em membranas de 0,22 μm , produzidas de uma mistura de ésteres de celulose, provavelmente, acarretou na retenção de alguns químicos de interesse, como os PAHs. Desta forma, a amostra final testada, por não conter poluentes nocivos, pode ter gerado resultados falsos negativo.

5.3.3. Teste do MN padrão

Os resultados obtidos, pelo teste do MN, aplicados em células HepG2 expostas as amostras brutas de água provenientes das simulações de vazamento realizadas, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados obtidos pelo teste do MN em células HepG2 expostas as amostras brutas de água.

Tratamentos	MN (%)
CN	5.60±0.91
CP	17.50±0.91*
CA	5.80±1.05
B100	6.50±0.91
D100	11.20±0.96*
B5	8.00±0.96
B20	7.00±0.75
B50	7.7±1.70

CN = controle negativo; CP = controle positivo; CA = controle água (água de poço artesiano utilizada na realização das simulações de vazamento); B100 = água contaminada com biodiesel puro; D100 = água contaminada com diesel puro; B5 = água contaminada com a mistura B5 (5% de biodiesel+95% diesel); B20 = água contaminada com a mistura B20 (20% de biodiesel+80% diesel); B50 = água contaminada com a mistura B50 (50% de biodiesel+50% diesel). 3000 células binucleadas analisadas por tratamento. Valores expressos por 100 células. *diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0.05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

A comparação dos resultados obtidos pelo teste do MN em células HepG2 expostas as amostras de água contaminadas com diesel e biodiesel evidenciaram valor significativo em relação ao controle negativo, apenas para o tratamento referente a amostra D100, indicando, assim, a mutagenicidade desta amostra. No entanto, assim como o sistema-teste de *A. cepa*, os resultados obtidos pelo teste do MN em células HepG2 não foram concordantes com os dados provenientes dos demais ensaios *in vitro* de mutagenicidade aqui realizados.

Os testes de citotoxicidade aplicados no presente trabalho evidenciaram ação citotóxica para o extrato D100, em decorrência da ação dos PAHs quantificados nesta amostra, os quais são reconhecidos como agentes indutores de citotoxicidade. A

utilização de amostras citotóxicas na avaliação da genotoxicidade/mutagenicidade é muitas vezes problemática, pois efeitos citotóxicos podem mascarar os efeitos genotóxicos/mutagênicos de interesse ou, até mesmo, levar a indução de resultados falsos positivo de mutagenicidade. Como anteriormente mencionado, os ensaios *in vitro* desenvolvidos com amostras brutas são complicados de serem interpretados, por diversos fatores. Uma possível explicação para a mutagenicidade observada na amostra de água D100, pelo teste do MN padrão em células HepG2, pode estar relacionada à dispersão dos poluentes na amostra teste. Em amostras brutas, os poluentes encontram-se dispersos, o que pode acarretar na exposição desigual das células ao agente teste durante a execução de diferentes ensaios conduzidos com a mesma amostra. Assim, as células HepG2 utilizadas para a realização do teste do MN podem ter sido expostas a uma maior concentração dos poluentes que as células utilizadas para o teste do MTT. Caso esta hipótese esteja correta, os efeitos mutagênicos aqui observados podem ser decorrentes de uma ação citotóxica, não caracterizando um verdadeiro evento de mutagenicidade.

5.4. Resultados do teste do MN *in vitro* em citometria de fluxo com células HepG2

A iniciativa da avaliação da incidência de MN por citometria de fluxo utilizando cultura de células HepG2 baseou-se no interesse de avaliação de pró-mutágenos nas amostras teste.

Algumas classes de substâncias químicas, como a dos PAHs e das aminas aromáticas, necessitam ser metabolizados *in vivo* para exercerem seus efeitos mutagênicos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Apesar de cultura de células de mamíferos serem utilizadas, com sucesso, em estudos de avaliação de agentes

mutagênicos, a maioria dos trabalhos é conduzida com linhagens celulares ausentes de enzimas promotoras da ativação metabólica de mutágenos indiretos (CHO, V79, linfócitos), o que torna necessária a adição de um sistema de metabolização exógeno, como a mistura S9 (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003). Cultura de células HepG2, uma linhagem celular derivada de hepatomas humanos, tem sido considerada uma importante ferramenta de avaliação de pró-mutágenos, uma vez que contém grande parte das enzimas necessárias para a ativação do potencial mutagênico destes agentes (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003; KNASMÜLLER et al., 2004).

Os resultados da análise de MN por citometria de fluxo, realizada em células HepG2, estão apresentados nas figuras 3 a 6.

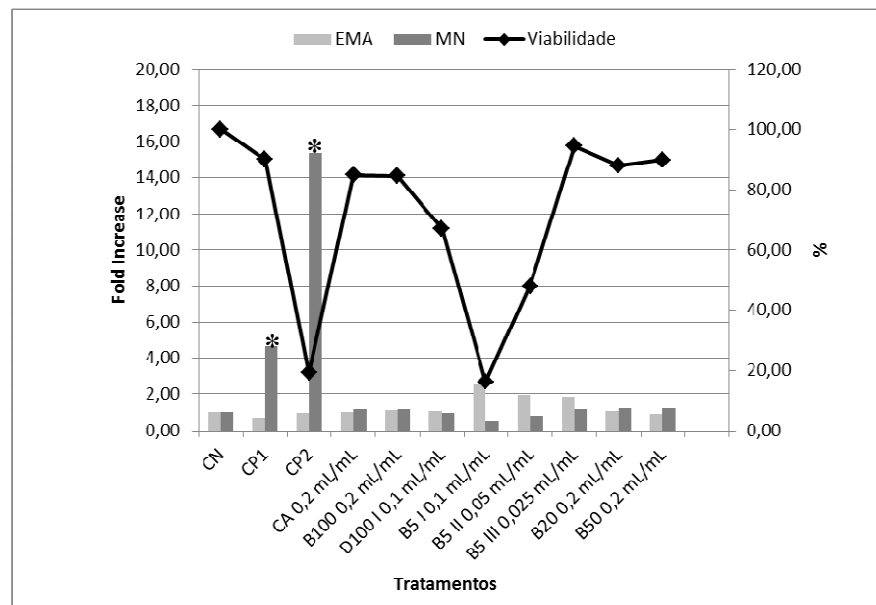


Figura 3. Dados de mutagenicidade e citotoxicidade obtidos pelo teste do MN *in vitro* em citometria de fluxo referente às amostras de água extraídas. O eixo Y mostra os resultados de EMA+ e MN. O eixo YY indica a viabilidade celular. Valores três vezes maiores que o CN são considerados positivos e estão indicados por *. CN = controle solvente (DMSO); CP1 = MMC a 0,1 µg/mL; CP2 = VB a 10 ng/mL.

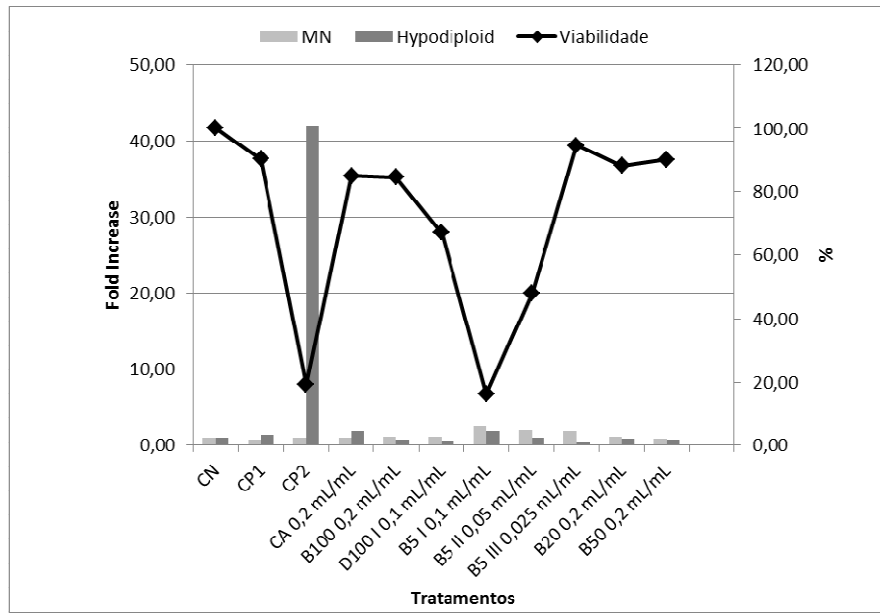


Figura 4. Resultados indicativos de agentes aneugênicos obtidos pelo teste do MN em citometria de fluxo aplicado em células HepG2 expostas as amostras de água extraídas. VB e MMC foram utilizados, respectivamente, como controles positivos aneugênico e clastogênico. O eixo Y mostra a incidência de MN e os eventos de aneugenicidade. O eixo YY indica a viabilidade celular. CN = controle solvente (DMSO); CP1 = MMC a 0,1 µg/mL; CP2 = VB a 10 ng/mL.

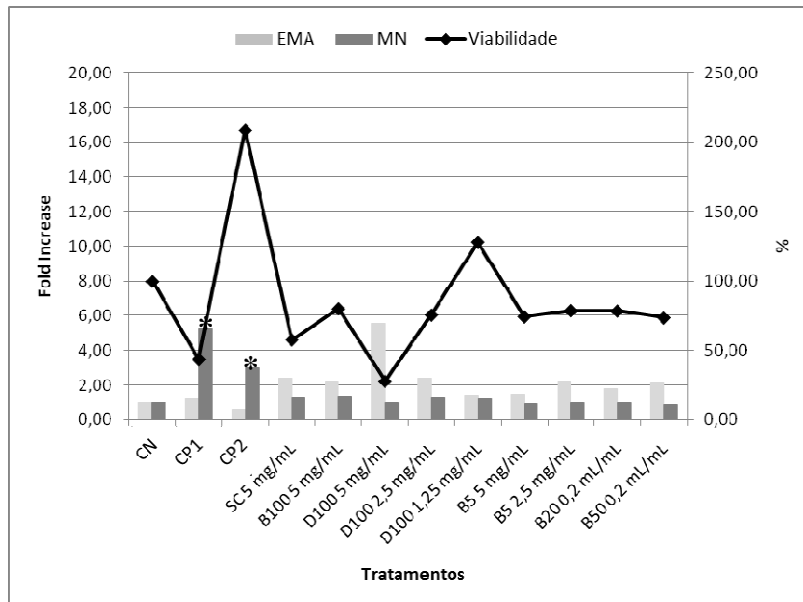


Figura 5. Dados de mutagenicidade e citotoxicidade obtidos pelo teste do MN *in vitro* em citometria de fluxo referente às amostras de solo extraídas. O eixo Y mostra os resultados de EMA+ e MN. O eixo YY indica a viabilidade celular. Valores três vezes maiores que o controle solvente (DMSO) são considerados positivos e estão indicados por *. CN = controle solvente (DMSO); CP1 = MMC a 0,1 µg/mL; CP2 = VB a 10 ng/mL.

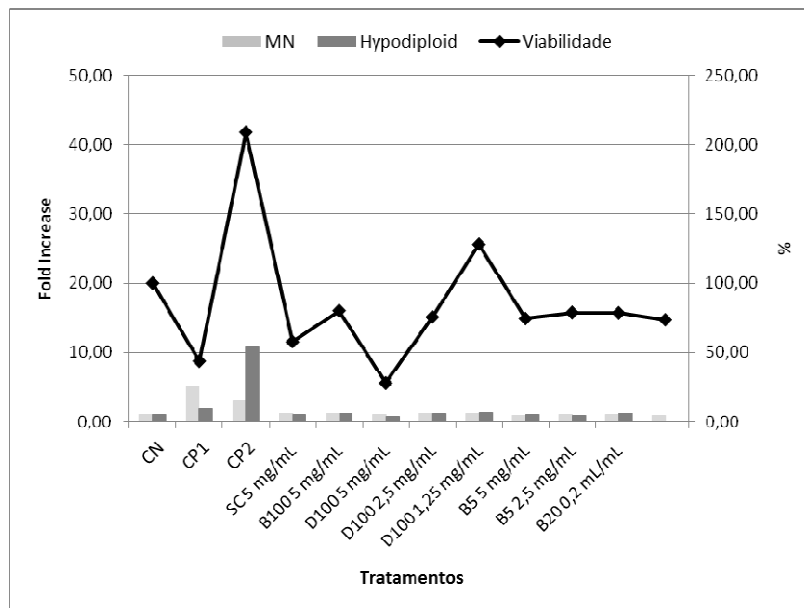


Figura 6. Resultados indicativos de agentes aneugênicos obtidos pelo teste do MN em citometria de fluxo aplicado em células HepG2 expostas as amostras de solo extraídas. VB e MMC foram utilizados, respectivamente, como controles positivos aneugênico e clastogênico. O eixo Y mostra a incidência de MN e os eventos de aneugenicidade. O eixo YY indica a viabilidade celular. CN = controle solvente (DMSO); CP1 = MMC a 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; CP2 = VB a 10 ng/mL .

O teste do MN *in vitro*, realizado pela técnica de citometria de fluxo, foi desenvolvido na Agência de Proteção Ambiental Alemã (UBA - *Umweltbundesamt*), pela parceria estabelecida com a Dr. Tamara Grummt. Nesta agência, a medição de MN por citometria de fluxo tem sido realizada há alguns anos pelo Laboratório de Toxicologia de Água Potável e a metodologia do teste encontra-se totalmente padronizada, para o emprego de células CHO-K1. Entretanto, em relação às células HepG2, poucos ensaios de avaliação da incidência de MN por citometria de fluxo tinham sido realizados até a execução dos testes com nossas amostras. A ausência de uma metodologia definida e a falta de tempo para padronização da mesma levou a não inclusão destes dados nos artigos referentes aos resultados de mutagenicidade (a ser posteriormente apresentado).

Os resultados obtidos pelo teste do MN em citometria de fluxo com células HepG2 não apontaram resultados positivos de mutagenicidade para nenhum dos extratos testados (água e solo). Quanto à análise dos extratos das amostras de água, a avaliação da incidência de MN, pelas células HepG2, não foram concordantes com os resultados obtidos por este mesmo teste, quando realizado com células CHO-K1. Enquanto que os ensaios com CHO-K1 apontaram mutagenicidade para o extrato de água B100, os resultados das células HepG2 não evidenciaram esta ação. Já para as amostras de solo, ambos os ensaios, CHO-K1 e HepG2, não evidenciaram eventos mutagênicos, em nenhum dos tratamentos realizados. Contudo, além da ausência de correlação mencionada entre os dados obtidos para as amostras de água, o fato de problemas com os controles positivos (CP) levou a não confiabilidade dos resultados gerados.

Os ensaios realizados com HepG2 foram realizados com diferentes CP, incluindo agentes mutagênicos diretos (VB - Vimblastina, MMC - Mitomicina c) e indiretos (Ciclofosfamida, 2AAF - 2-Acetylaminofluorene), sendo os experimentos repetidos três vezes. Os resultados dos tratamentos com os CP indiretos não responderam adequadamente, uma vez que a incidência de MN obtida para os mesmos assemelhou-se, em todos os experimentos realizados, ao controle negativo. Já os resultados dos ensaios com CP diretos não promoveram valores significativos de MN, em todos os experimentos realizados. Tais resultados indicam uma deficiente resposta na avaliação de mutágenos diretos/indiretos pelas células HepG2. Apesar desta linhagem celular ser considerada um bom sistema para a detecção de pró-mutágenos, observamos que, no presente estudo, mesmo com um controle rígido das passagens

celulares, as células não responderam ao objetivo proposto, mostrando que elas podem perder, a qualquer momento, a sua capacidade de metabolização.

ARTIGO 1

***Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application**

Daniela Morais Leme, Maria Aparecida Marin-Morales

Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 682 (2009) 71–81.



Review

Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application

Daniela Morais Leme, Maria Aparecida Marin-Morales*

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 March 2009
Received in revised form 18 June 2009
Accepted 23 June 2009
Available online 2 July 2009

Keywords:

Allium cepa
Environmental pollutants
Genotoxicity
Mutagenicity

ABSTRACT

Higher plants are recognized as excellent genetic models to detect environmental mutagens and are frequently used in monitoring studies. Among the plant species, *Allium cepa* has been used to evaluate DNA damages, such as chromosome aberrations and disturbances in the mitotic cycle. Employing the *A. cepa* as a test system to detect mutagens dates back to the 40s. It has been used to this day to assess a great number of chemical agents, which contributes to its increasing application in environmental monitoring. The *A. cepa* is characterized as a low cost test. It is easily handled and has advantages over other short-term tests that require previous preparations of tested samples, as well as the addition of exogenous metabolic system. Higher plants, even showing low concentrations of oxidase enzymes and a limitation in the substrate specification in relation to other organism groups, present consistent results that may serve as a warning to other biological systems, since the target is DNA, common to all organisms. The *A. cepa* test also enables the evaluation of different endpoints. Among the endpoints, chromosome aberrations have been the most used one to detect genotoxicity along the years. The mitotic index and some nuclear abnormalities are used to evaluate cytotoxicity and analyze micronucleus to verify mutagenicity of different chemicals. Moreover, the *A. cepa* test system provides important information to evaluate action mechanisms of an agent about its effects on the genetic material (clastogenic and/or aneugenic effects). In the face of all the advantages that the *A. cepa* test system offers, it has been widely used to assess the impacts caused by xenobiotics, characterizing an important tool for environmental monitoring studies, where satisfactory results have been reported.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Genetic toxicology and environmental monitoring based on the use of higher plants to detect xenobiotics.	72
2. Modifications of the <i>Allium cepa</i> test system to assess environmental contamination	72
3. Analysis of different endpoints by the <i>Allium cepa</i> test	73
3.1. Mitotic index.	73
3.2. Chromosome aberrations	73
3.3. Nuclear abnormalities.	73
3.4. Micronucleus.	73
4. Technical procedure advantages of the <i>Allium cepa</i> test	73
5. The employment of <i>Allium cepa</i> test to detect different classes of environmental pollutants	76
5.1. Metals	76
5.2. Pesticides.	76
5.3. Aromatic hydrocarbons	77
5.4. Textile industry dyes	77
5.5. Products used to disinfect drinking water.	77
5.6. Complex mixtures.	78
5.7. Other agents	78
6. Assessment of promutagens by the <i>Allium cepa</i> test system	79
7. Studies of sensitivity and correlation between the <i>Allium</i> test and other test systems	80

* Corresponding author at: Av. 24 A, 1515, Bela Vista, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 3536 0009.
E-mail address: mamm@rc.unesp.br (M.A. Marin-Morales).

8. Conclusion	80
Acknowledgements	80
References	80

1. Genetic toxicology and environmental monitoring based on the use of higher plants to detect xenobiotics

The increasing discharge of hazardous chemicals into the environment has affected the balance of natural ecosystems and has consequently called the attention of several researchers and governmental agencies to the health of living organisms.

Among the damages caused by chemical agents to exposed organisms, genotoxic and mutagenic effects have shown to be worrying, due to its capacity to induce genetic damage, which can lead to several health problems and also affect future generations, since these alterations can be inheritable [1]. Hence, the necessity to identify compounds that react with DNA in order to assure the environmental quality has led to the development of several genotoxicity and mutagenicity assays in a wide range of organisms.

Test systems can be divided into groups based on the biological system employed and their genetic endpoint detected. Bioassays with prokaryotes enable the detection of agents that induce gene mutation and primary DNA damages. On the other hand, analyses with eukaryotes enable the detection of a greater damage extent, varying from gene mutations to chromosome damages and aneuploidies [2].

Higher plants present characteristics that make them excellent genetic models to assess environmental pollutants, being frequently used in monitoring studies. However, this feature is not only due to the sensitivity to detect mutagens in different environments, but also to the possibility of assessing several genetic endpoints, which range from point mutations to chromosome aberrations (CA) in cells of different organs and tissues, such as leaves, roots and pollen [3].

Presently, among the higher plants species used to evaluate environmental contamination, the most frequent ones are *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris* and *Hordeum vulgare* [3]. Moreover, still among these species, *A. cepa* has been regarded as favorable to assess chromosome damages and disturbances in the mitotic cycle, due to the presence of good chromosome conditions, such as large chromosomes and in a reduced number ($2n = 16$) (Fig. 1) [4]. Furthermore, this test system has shown high sensitivity in detecting environmental chemicals.

Based on the employment of the *A. cepa* test as an assay to assess the environmental quality, the present article offers a review on this test system and its efficiency in evaluating genotoxic and mutagenic agents present in different environments.

2. Modifications of the *Allium cepa* test system to assess environmental contamination

The use of *A. cepa* as a test system was introduced by Levan [5] demonstrating disturbances in the mitotic spindle due to the use of colchicine. Later, the same author showed that different solutions of organic salts induced several CA types in meristematic root cells of *A. cepa* [6]. Since then, technical modifications in the *A. cepa* test have been made in order to enable a more comprehensive assessment of chemicals, as the complex mixtures, which comprehend most of the environmental samples, and the pure substances [4,7–10].

The first adaptations of the *A. cepa* test were made by Fiskesjö [4], aiming at making it a test organism for environmental monitoring. For such purpose, the author proposed modifications that allowed both the evaluation of soluble and insoluble compounds in water and the assessment of the effects of complex mixtures. Later, Rank and Nielsen [11] proposed new modifications to the test, making it even more efficient to analyze complex mixtures. However, all the modifications proposed by the authors were related to the evaluation of CA, which detects potentially genotoxic agents. Ma et al. [9] proposed test modifications to assess the mutagenic effects from observing the micronuclei (MN) induction in F_1 roots cells of *A. cepa* exposed to environmental pollutants.

It is known that CA, such as fragments and chromosome losses, can result in micronucleated cells, since both fragments and entire chromosomes cannot be incorporated into the main nucleus during the cell cycle [12]. According to Ma et al. [9], among all the assessable endpoints, the MN are the most effective and simplest indicator of cytological damages, which makes the analysis of this parameter more efficient to evaluate environmental contamination. Nevertheless, Rank and Nielsen [13] presented a different opinion from the above authors, because for them, the evaluation of CA as an endpoint is not valid only to detect the genotoxic effects, but also to assess the action mechanisms of the tested agents. Thus, the CA analysis, besides estimating the genotoxic effects of tested agents, also enables the evaluation of their clastogenic and aneugenic actions.

Both analyses, CA and MN in meristematic cells and MN in F_1 cells of *A. cepa*, have currently been reported in the literature as efficient indicators of direct action on DNA. According to Leme and Marin-Morales [14], the analysis of CA, together with MN in *A. cepa* meristematic cells, is as accurate as the analysis of MN in F_1 cells in this species. Furthermore, the analysis of CA in *A. cepa* has shown to



Fig. 1. *A. cepa* karyotype, $2n = 16$. Arrow indicating the nucleolus organizer region (NOR) located in the terminal portion of the short arm of pair 6.

be more advantageous, since several authors have demonstrated the efficiency of this one to investigate the action mechanisms of tested agents on DNA, which enables a better understanding of the effects promoted by such agents [15–17].

3. Analysis of different endpoints by the *Allium cepa* test

As previously mentioned, the *A. cepa* test enables the assessment of different genetic endpoints. Following, we discuss the genetic categories that are likely to be analyzed by this test system.

3.1. Mitotic index

The Mitotic index (MI), characterized by the total number of dividing cells in cell cycle, has been used as a parameter to assess the cytotoxicity of several agents. The cytotoxicity levels of an agent can be determined by the increase or decrease in the MI [17]. According to Hoshina [18], MIs significantly lower than the negative control can indicate alterations, deriving from the chemical action in the growth and development of exposed organisms. On the other hand, MIs higher than the negative control are results of an increase in cell division, which can be harmful to the cells, leading to a disordered cell proliferation and even to the formation of tumor tissues.

However, both the reduction and the increase in MI are important indicators in monitoring environmental pollution, especially for the assessment of contaminants that present toxic and cytotoxic potential [18]. Smaka-Kincl et al. [19] showed that the decrease in the MI of *A. cepa* meristematic cells can be considered as a reliable method to determine the presence of cytotoxic agents in the environment and, thus, can be considered as a sensitive test to estimate pollution levels.

Therefore, several studies have used the MI evaluation to detect cytotoxicity and most of them have shown satisfactory results to the proposed analyses [14,17,19–28].

3.2. Chromosome aberrations

CA are characterized by changes in either chromosomal structure or in the total number of chromosomes, which can occur both spontaneously and as a result from exposure to physical or chemical agents [29]. Structural chromosomal alterations may be induced by several factors, such as DNA breaks, inhibition of DNA synthesis and replication of altered DNA. The numeric CA, e.g. aneuploidy and polyploidy, are consequences of abnormal segregation of chromosomes, which can occur either spontaneously or by the action of aneugenic agents [30].

To evaluate chromosome abnormalities by the *A. cepa* test, several types of CA are considered in the different phases of cell division (prophase, metaphase, anaphase and telophase). However, this analysis is not simple to be carried out, since it requires an accurate knowledge of the cell division phases and their possible abnormalities. Due to this problematic issue, Rank and Nielsen [11] adapted the *A. cepa* test in order to facilitate CA analysis for scientists who do not work in the cytology area. Thus, these authors proposed the analysis of abnormalities only in anaphase and telophase. Later, in 2003, Rank [10] published another study describing the *Allium* test also based on the CA analysis in anaphases and telophases.

However, the analysis of the different CA types, in all phases of the cell cycle, initially proposed by Fiskesjö [4], enables a more comprehensive and accurate evaluation, since it promotes a better investigation of the actions of the tested agents, concerning their clastogenic and/or aneugenic effects on the DNA of the test organism and even their possible development [16,17,20,21]. In a simple way, the CA, such as chromosome bridges and breaks, are

indicators of a clastogenic action, whereas chromosome losses, delays, adherence, multipolarity and C-metaphases result from aneugenic effects.

Fig. 2 shows some of the CA that can be observed by the *A. cepa* test after exposure to chemical and physical agents.

3.3. Nuclear abnormalities

Some authors have recently included another endpoint in the CA analysis in *A. cepa* meristematic cells. Such endpoint refers to nuclear abnormalities (NA). NA are characterized by morphological alterations in the interphasic nuclei, as a result from the action of the agent tested. Generally, these alterations are observed in *A. cepa* test as lobulated nuclei, nuclei carrying nuclear buds, polynuclear cells, mini cells, among others [16,17,24,27].

NA evaluation, along with CA, has shown to be a sensitive analysis, for making the investigation of test agent actions even more accurate in relation to their effects on the DNA of exposed organisms. According to Leme et al. [16], the presence of lobulated nuclei and polynuclear cells can indicate a cell death process, since these abnormalities are not observed in the F_1 cells of *A. cepa* roots. In a study to evaluate the action of trifluralin herbicide by the *A. cepa* test, Fernandes et al. [17] showed that nuclear buds may arise as a result of the elimination of exceeding genetic material derived from the polyploidization process.

Fig. 3 shows some NA that can be found in *A. cepa* meristematic cells exposed to chemical and physical agents.

3.4. Micronucleus

MN have been considered by many authors as the most effective and simplest endpoint to analyze the mutagenic effect promoted by chemicals. This is due to the fact that MN result from damages, not or wrongly repaired, in the parental cells [1], being easily observed in daughter cells as a similar structure to the main nucleus, but in a reduced size. Thus, MN arise from the development of some CA, for instance, chromosome breaks and losses. Moreover, MN may still derive from other processes as polyploidization, in which they originate from the elimination of exceeding DNA of the main nucleus in an attempt to restore the normal conditions of ploidy [17].

MN evaluation in *A. cepa* test can be performed both in meristematic and F_1 roots cells of this species. MN analysis in meristematic cells is generally carried out with the CA one, which takes longer to be performed. However, both analyses have shown to be sensitive to detect environmental mutagens [14]. Besides evaluating mutagenic effects, MN analysis also enables an investigation of the action mechanisms of chemical agents. According to Leme et al. [16], MN size can be an effective parameter to assess the clastogenic and aneugenic effects in *A. cepa*, since this species present a symmetric karyotype, which is homogeneous in relation to chromosomal size, with large and few chromosomes ($2n = 16$). Therefore, large MN would indicate an aneugenic effect resulting from a chromosome loss, whereas small MN may indicate a clastogenic action resulting from chromosome break. However, other cytogenetic techniques, such as chromosomal banding (C-banding, NOR and base-specific fluorochromes) and *in situ* hybridization (FISH), should be applied to make the analysis more reliable and accurate.

Figs. 4 and 5, respectively, show MN in the different phases of cell cycle and of different sizes in meristematic cells of *A. cepa* roots.

4. Technical procedure advantages of the *Allium cepa* test

The *A. cepa* test has been considered by many authors as low cost and of easy handling assay, which present some advantages

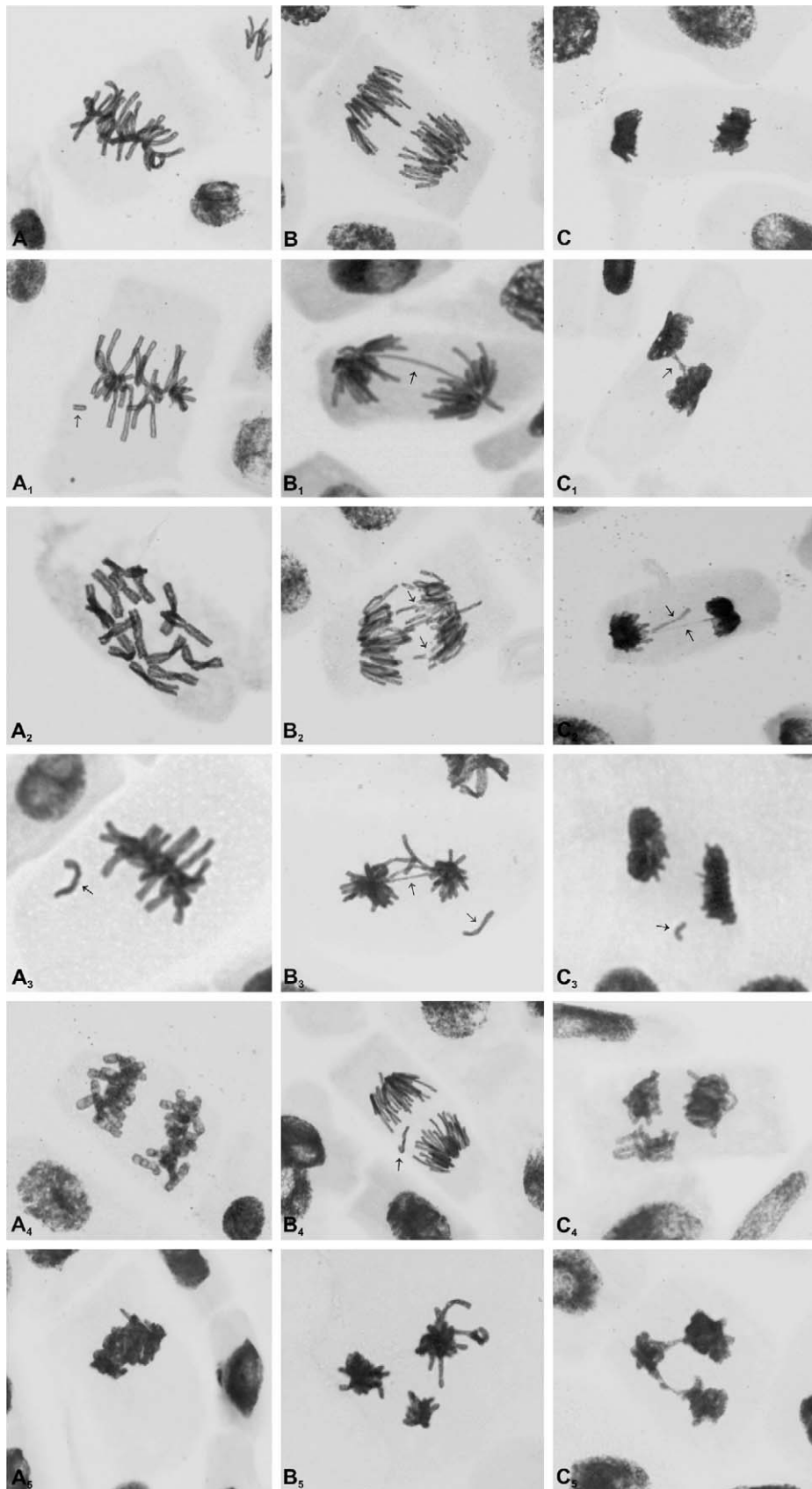


Fig. 2. CA observed in *A. cepa* meristematic cells exposed to chemical agents. (A) Normal metaphase; (A₁) Metaphase with chromosome break; (A₂) C-metaphases; (A₃) Metaphase with chromosome loss; (A₄) Binucleated cell in metaphase; (A₅) Metaphase with chromosome adherence; (B) Normal anaphase; (B₁) Anaphase with chromosome bridge; (B₂) Anaphase with chromosome breaks; (B₃) Anaphase with bridge and chromosome loss; (B₄) Anaphase with chromosome loss; (B₅) Multipolar anaphase; (C) Normal telophase; (C₁) Telophase with chromosome bridge; (C₂) Telophase with bridge and chromosome loss; (C₃) Telophase with chromosome break; (C₄) Multipolar telophase; (C₅) Multipolar telophase with chromosome bridge.

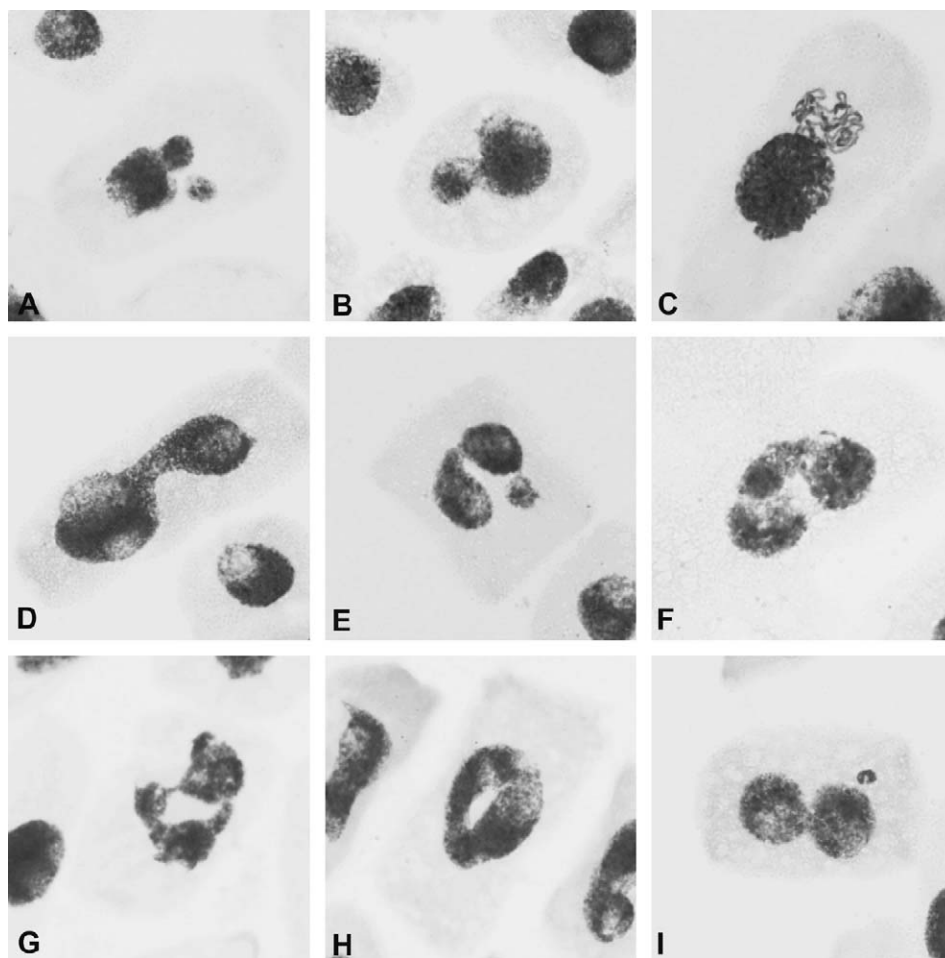


Fig. 3. NA observed in *A. cepa* meristematic cells exposed to chemical agents. (A) Interphasic cell with nuclear bud and MN; (B) Interphasic nucleus with nuclear bud; (C) Prophase with synchronic nuclear bud; (D) Nucleus with nuclear point; (E) Lobulated nucleus with MN; (F–H) Lobulated nucleus; (I) Interphasic nucleus interconnected by nuclear bridge and MN.

over other short-term tests employed in environmental monitoring [10,11,31,32].

According to Rank and Nielsen [11] and Rank [10], one of the advantages of *A. cepa* test is the possibility to expose the test organism directly to complex mixtures without previous treatment of the test sample. For instance, extraction and concentration processes of samples necessary to perform some bioassays like the Ames test.

Another advantage of this test system is the presence of an oxidase enzyme system, which is essential for promutagen evaluations [4]. Thus, while other tests, e.g. the Ames test, require addition of S9 mixture (rat liver S9 fraction), the *A. cepa* presents metabolic capacity for activating promutagens into mutagens without addition of exogenous metabolic system to assess this contaminant class [32]. However, when the oxidase enzyme system of higher plants is compared with the enzymes of mammal

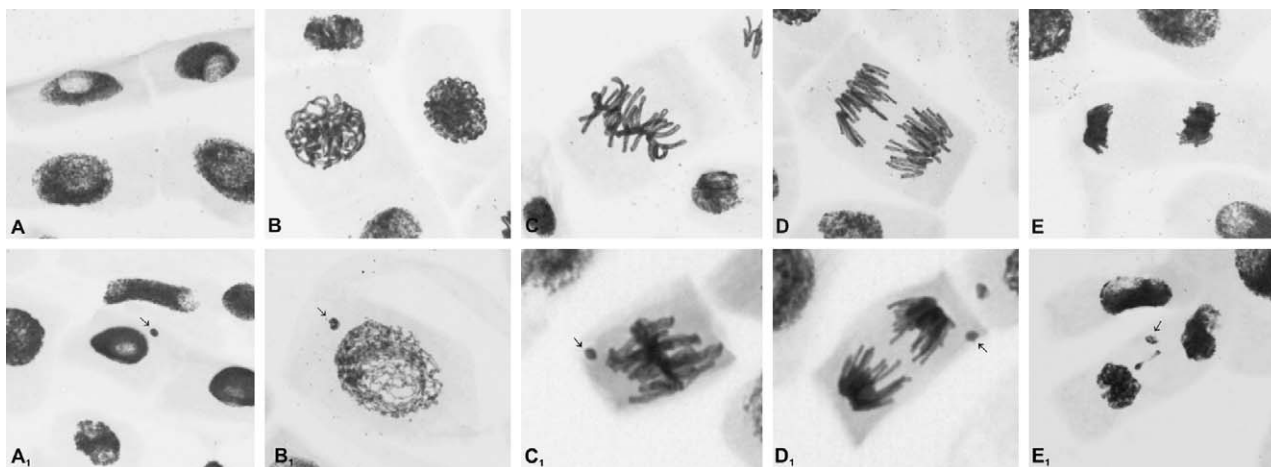


Fig. 4. *A. cepa* meristematic cells carrying MN. (A) Normal interphase; (A₁) Micronucleated cell in interphase; (B) Normal prophase; (B₁) MN in prophase; (C) Normal metaphase; (C₁) MN in metaphase; (D) Normal anaphase; (D₁) Anaphase with MN; (E) Normal telophase; (E₁) Telophase with MN and chromosome loss.

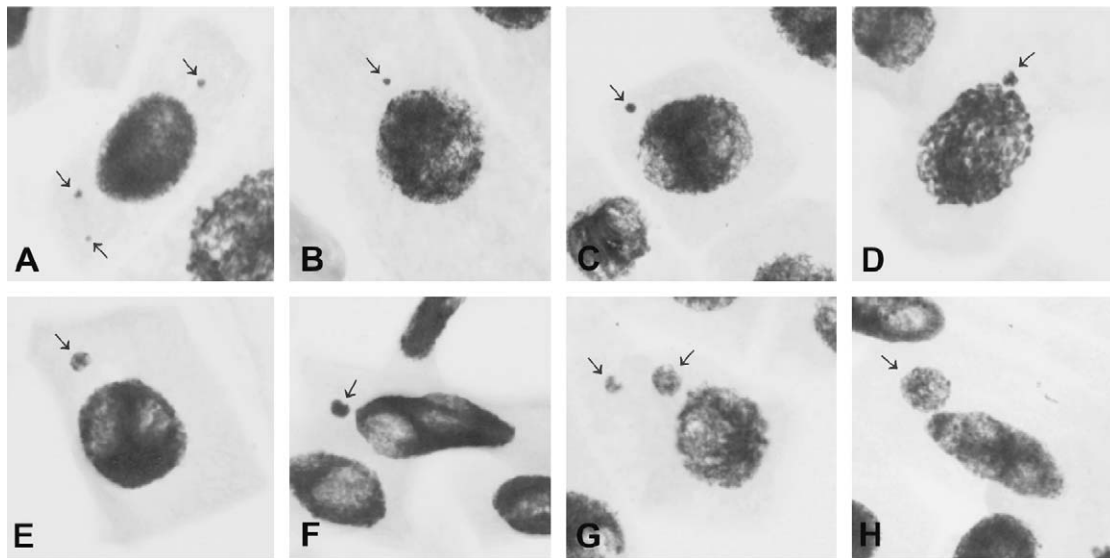


Fig. 5. *A. cepa* meristematic cells carrying MN. (A–C) MN of small size in interphase; (D) MN of small size in prophase; (E–F) MN of large size in interphase; (G–H) MN of large size in prophase.

cytochrome P-450, the enzymatic complex of plants presents low concentration and a limitation in the substrate specification [13]. Nevertheless, according to these authors, the results of higher plants bioassays should not be discarded, considering that a chemical able to induce chromosome damages in plants can also offer risk to other groups of living organisms, since the damaged material is the DNA, which is common to all organisms.

5. The employment of *Allium cepa* test to detect different classes of environmental pollutants

The *A. cepa* test has been used to detect a great variety of environmental pollutants and the results obtained have been satisfactory to the majority of the studies reported. Following are reported some pollutant classes that show to be sensitive to the *A. cepa* test.

5.1. Metals

Fiskesjö in 1981 [33], while studying the contamination of drinking water by copper, showed positive results for this metal in the *A. cepa* test. Later, in 1988 [34], this same author carried out a study with different metal ions (Hg, Cu, Ni, Cd, Be, Al, Mn, Li) and showed that some of them induced specific CA, for example, Ni that induced an atypical form of C-metaphases. However, according to the author, it was not possible to group the tested metals concerning the cytological effects observed. Nevertheless, the most observed abnormalities were C-metaphases and chromosome adherence, being that the former could indicate risks of aneuploidy.

Inceer et al. [35] used the CA test in *A. cepa* root cells to evaluate the cytogenetic effects of copper mine waste in different concentrations (10%, 75% and 100%) prepared in aqueous solution. From the results obtained, the authors showed a dose-dependent relationship with the inhibition of MI, being that the 100% concentration presented the highest cytotoxicity. The authors also reported that chromosome breaks, delays, bridges and adherences were the most frequently CA observed in this study. Finally, the authors concluded that copper wastes can cause deleterious effects on *A. cepa* root cells.

Genotoxicity assessment of the heavy metals Zn²⁺ and Cd²⁺ showed positive results for this parameter by the analysis of

chromosome abnormalities in the *A. cepa* test system, also showing a greater genotoxic effect for Cd²⁺ [36].

In studies of evaluation the genotoxic effects of heavy metals, Steinkellner et al. [37] showed positive results of As³⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ and Zn²⁺ for the MN test in F₁ cells of *A. cepa* roots.

While evaluating the water quality from a river impacted by tanneries, Matsumoto et al. [15] showed significant frequencies of CA and MN in *A. cepa* meristematic cells exposed to water samples that presented contamination by chromium ions.

When assessing the genotoxicity of arsenic, Yi et al. [26] showed positive results for this metal, both for the MN in meristematic and F₁ cells of *A. cepa* species. Additionally, these authors also showed a dose-dependent relationship both for MN induction and MI inhibition and concluded that the MN test in *A. cepa* roots is a sensitive method to detect the genotoxicity of waters contaminated by this metal.

An assessment study of heavy metal phytoremediation (Fe, Pb, Cr, Cu) from an effluent of a fertilizing plant by different algal biofilters showed that the *A. cepa* test was sensitive to the proposed analysis by the reduction of CA and nuclear abnormality frequencies in meristematic cells of this species exposed to effluent samples treated by the phytoremediation process [24].

Significant results of MI inhibition and CA and MN induction were also reported by Seth et al. [28] in evaluation studies of the genotoxic effects of cadmium by the *A. cepa* test.

5.2. Pesticides

Pesticides have been widely tested in bioassays with plants and positive results have generally been obtained. In studies of the genotoxicity of the Roundup herbicide and its active ingredient glyphosate, Rank et al. [8] showed significant CA values for *A. cepa* roots exposed to the product, also indicating an aneugenic effect for it.

In a study to evaluate the deleterious effects of diuron, a substituted urea herbicide, Chauhan et al. [38] reported cytotoxic and genotoxic effects in *A. cepa* meristematic cells exposed to different concentrations of this product. The authors also showed that diuron causes mitotic alterations by inhibiting the polymerization of the tubulin subunits of microtubules.

Chauhan et al. [39] applied the *A. cepa* test to evaluate the cytogenetic effects of commercial formulations of two pyrethroid

insecticides, cypermethrin (CYP) and fenvalerate (FEN). In this study, the authors showed that both insecticides promoted an MI inhibition and induction of CA and other abnormalities, such as binucleated and micronucleated cells, significantly and in a dose-dependent manner. The authors also reported a similarity in the CA types induced by both compounds. However, the frequency of aberrant cells was much higher in the cells treated with CYP than in the ones exposed to FEN. Thus, the authors concluded that both CYP and FEN can induce cytotoxic and genotoxic effects on the *A. cepa* test system, which showed to be sensitive to the proposed analysis.

A study to evaluate the genotoxic effects of the herbicides pentachlorophenol (PCP), 2,4-D and butaclor by the *A. cepa* test showed significant CA values for all the chemicals tested. Furthermore, this study characterized butaclor as an aneugenic agent and PCP as a clastogenic agent [20].

Bolle et al. [21] showed positive CA results and MI inhibition in a study to evaluate the genotoxicity of the atrazine herbicide by the *A. cepa* test. Additionally, this study characterized atrazine as a clastogenic agent, due to the presence of a significant frequency of chromosome breaks.

In order to assess the cytogenetic effects of mixtures of a substituted urea herbicide (isoproturon or diuron) with a synthetic pyrethroid insecticide (deltamethrin), Chauhan and Gupta [40] applied the CA test in *A. cepa* meristematic cells. Significant induction of chromosome breaks and other mitotic aberrations were observed for some of the concentrations of the mixtures tested—*isoproturon + deltamethrin* and *diuron + deltamethrin*. Among the different concentrations analyzed, the combinations containing high concentrations of deltamethrin (0.5 ppm) induced higher frequencies of aberrations than the mixtures containing lower concentrations of this product (0.25 ppm).

In a study to evaluate the action of the trifluralin herbicide in *A. cepa* test system, Fernandes et al. [17] showed the mechanism of MN formation by polyploidization of the genetic material.

Srivastava and Mishra [41] reported MI inhibition and CA and MN induction in a significant and dose-dependent manner in *A. cepa* meristematic cells exposed to atrazine commercial formulation. The results obtained in this work indicated that atrazine can cause genotoxic effects in plants and showed that the *A. cepa* test system is appropriate for this evaluation.

5.3. Aromatic hydrocarbons

Aromatic hydrocarbons are considered hazardous environmental pollutants due to the harmful effects they have on different groups of living organisms. The detection of this class of environmental pollutant by higher plants bioassays is controversial among authors. Some authors state that plant bioassays are relatively insensitive to detect these pollutants, while others have shown a sensitivity of these organisms to assess these chemicals.

In studies to evaluate the genotoxicity of benzo[a]pyrene (B[a]P), Fiskesjö and Lassen [42] showed its positive results in the *A. cepa* test. Rank and Nielsen [31], in a study to evaluate the sensitivity of the *A. cepa* test to detect pollutants in industrial effluents, showed positive CA results for *A. cepa* roots exposed to different concentrations of benzene.

In order to evaluate the genotoxic influence of a Nigeria oil field effluent, Odeigah et al. [43] applied the CA test in the *A. cepa* plant test system. The authors showed that the effluent analyzed was capable of inducing CA in the *A. cepa* meristematic root cells, even after performing several dilutions of the sample.

Recently, a study of a river impacted by petroleum hydrocarbons showed positive CA and MN values in meristematic and F_1 cells of *A. cepa* roots exposed to water samples, in which the presence of these pollutants was detected by chemical analysis

[14]. Additionally, in a complementary study to the previous one, Leme et al. [16] showed that, for being a complex mixture of hydrocarbons, petroleum may present both a clastogenic and aneugenic action or even an inducer of cell death in the *A. cepa* genetic material. Also, the authors suggest that these actions mainly result from the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) detected in the tested sample.

5.4. Textile industry dyes

There are few studies in the literature on the evaluation of the hazards of textile dyes by higher plants bioassays. However, the studies found report sensitivity of the *A. cepa* test to assess this pollutant class.

Sudhakar et al. [44] applied the CA test in *A. cepa* to evaluate the genotoxic potential of a silk dyeing industry effluent. The authors reported MI inhibition and induction of several mitotic abnormalities in roots exposed to the tested effluent, showing that the silk dyeing industry effluents presented a mutagenic potential.

In studies of the genotoxicity of raw effluents of textile industry by the *A. cepa* test, Caritá and Marin-Morales [27] observed that different concentrations of this effluent enabled the induction of CA levels. These authors relate the results to the presence of azo dyes (CI disperse blue 373, CI disperse violet 93 and CI disperse orange 37) and aromatic amines present in the black dye of the tested industrial effluent.

5.5. Products used to disinfect drinking water

Disinfection of drinking water is one of the most important steps in the potabilization process, since it ensures microbiological risk control associated with water consumption. Nevertheless, the use of disinfectants in this process can increase chemical reactions with substances naturally present in the water or with pollutants, generating disinfection by-products – DBPs [45], for which the genotoxic and carcinogenic activities have been reported [46,47].

In order to assess the genotoxicity of the drinking water disinfectants sodium hypochlorite (NaClO), chlorine dioxide (ClO_2) and peracetic acid (PAA, $\text{CH}_3\text{-CO-COOH}$) used in a water treatment pilot station, Monarca et al. [48] applied the CA test in anaphases of *A. cepa*, among other higher plant bioassays. The authors reported genotoxic effects in *A. cepa* root cells exposed to different concentrations of the disinfectants tested.

Among other test systems, Crebelli et al. [49] applied the CA test in anaphases of *A. cepa* to investigate the formation of mutagenic DBPs by the use of PAA and NaClO disinfectants. Negative results were reported for the *A. cepa* test, and a borderline mutagenicity was observed in some samples tested by the other test systems, thus, indicating that, under the tested conditions, PAA and NaClO did not lead to the formation of significant amount of genotoxic DBPs in wastewater disinfection.

Currently, the use of chlorine dioxide (ClO_2) in the potabilization process has increased. When added to water, ClO_2 is reduced to chlorite (ClO_2^-) and to chlorate (ClO_3^-) ions, for which the adverse effects to the exposed organisms are not totally understood. In this way, Feretti et al. [45] applied the MN test in *Tradescantia*, assays to detect damages in the DNA of HepG2 human cells *in vitro* and the CA test in *A. cepa* to evaluate the genotoxicity of the ClO_2^- and ClO_3^- ions and their mixtures. The authors reported positive results for the *A. cepa* test, concerning a significant CA induction by ClO_2^- and ClO_3^- ions, even in concentrations below the limits established by the Italian normative law (0.2 mg/L) and by the World Health Organization (WHO) guidelines (0.7 mg/L), thus showing the sensitivity of this test system to detect this pollutant class.

5.6. Complex mixtures

Complex mixtures characterized most of the environmental samples, since they can suffer the influence of several contamination sources. Thus, several studies have been conducted by using the *A. cepa* test to evaluate environmental samples, as water and soil samples from polluted areas, and most of them have shown positive results [4,11,19,24,32,50–59].

As for water pollution, Smaka-Kincl et al. [19] showed that the *A. cepa* test is a sensitive test to evaluate the water quality in a study to assess the genotoxic potential of industrial and municipal effluents, surface water and groundwater of an industrialized and urban area.

Grover and Kaur [50] reported positive results of MN induction and aberrant anaphases in *A. cepa* meristematic root cells in the assessment of the genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluents, being that the latter was influenced by discharges of textile and paper mill.

El-Shahaby et al. [51] applied the CA and MN test in *A. cepa* to evaluate the genotoxicity of industrial effluents collected in the Sandub area, Dakahlia province, Egypt. High genotoxicity was reported for all the water samples collected, which may be related to the presence of some heavy metals – Pb, Zn, Co, Cd and Cu – detected in the samples by chemical analysis. In this study, the authors concluded that the CA and MN tests in *A. cepa* are recommended for aquatic pollution biomonitoring due to its sensitivity to detect mutagens in wastewater.

In a study of industrial effluents of two cities in India contaminated mainly by heavy metals and pesticides, Fatima and Ahmad [32] showed a significant increase in the CA frequency in *A. cepa* meristematic cells exposed to these samples. While evaluating four different discharges of industrial effluents from different polluting sources, namely paper mill, lemon juice factory, sugar factory and mining company, in a river located in Argentina, Gana et al. [52] reported positive results of genotoxicity for *A. cepa* roots exposed to the tested samples.

As for the assessment of other means, Rank and Nilsen [53] reported low sensitivity of *A. cepa* test to detect the genotoxicity of pollutants present in sludge from municipal treatment stations, which influenced by urban and industrial sewage. However, when Caritá [54] studied sludge from different urban sewage treatment stations located in southeastern Brazil, reported a sensitivity of the *A. cepa* test to assess the genotoxic and mutagenic potentials of the sludge. The different responses may be related to the preparation of the test samples, e.g. solubilization procedures to obtain aqueous extracts, during which some chemicals may be lost or even retained in the raw material, depending on the procedure used. Furthermore, the difference observed may also be related to the type of sewage in each studied region.

An assessment of the vermicompost efficiency, a bioremediation process, used to reduce toxic potential of a municipal sludge sample, in which heavy metals were detected, MI inhibition for raw sludge and an increase of this parameter in the bioremediated sludge were reported by the *A. cepa* test system [55]. The exposition of *A. cepa* roots to raw sludge also induced significant CA frequencies, which was not observed for bioremediated sludge. In this way, the authors showed that vermitechnology can be a good technique to remediate municipal sludge.

Cotelle et al. [56] reported positive results of genotoxicity for the *A. cepa* test in the evaluation of two soil samples, one contaminated by industrial residues and the other by cokework effluents collected in a region of France. In a study of landfarm soils irrigated with industrial effluents, Cabrera and Rodriguez [57] showed significant differences related to the negative control regarding the CA induction for some samples tested by the *A. cepa* test.

To assess the efficiency of a hydrocarbon biodegradation assay, under laboratory conditions, of an oil refinery's landfarm, Souza et al. [58] applied the *A. cepa* test. The authors showed that the raw landfarm sample induced strong clastogenic and mutagenic effects in meristematic cells of *A. cepa* roots, probably due to the presence of petroleum hydrocarbons and heavy metals (Ba, Cr, Ni, Pb). On the other hand, the bioremediated landfarm reduced the MN, CA and nuclear bud frequencies by decreasing the petroleum hydrocarbon concentrations. Finally, the authors concluded that the *A. cepa* test is suitable to evaluate biodegradation process in soils contaminated by petroleum sludge and, albeit, could be routinely required to assess pollutant detoxification in bioremediated soils.

Chandra et al. [59] applied the CA test in *A. cepa* to assess the genotoxic effects of metal waste leachate (MWL) from a metal manufacturer of lantern compounds, and dye waste leachate (DWL) from a dye manufacturer of chromium pigments. The chemical analysis carried out in this work revealed high concentrations of chromium, nickel and iron both for MWL and DWL. Of the biological effects, the authors reported MI inhibition and CA and MN induction in the roots exposed to both leachate extracts, MWL and DWL. The authors reported that the effects observed were concentration dependent and the frequency of aberrations was higher in exposure to MWL than with DWL, which may be related to the higher concentration of heavy metals.

5.7. Other agents

Kovalchuk et al. [60] applied the CA test in *A. cepa* meristematic cells to estimate the impacts of nuclear pollution, in Ukraine areas contaminated mainly by cesium 137 (¹³⁷Cs) and strontium (⁹⁰Sr), as a result of the Chernobyl accident. In this study, the authors showed a dose-dependent relationship between the increase in the percentage of aberrant mitoses and the increase in the radioactive contamination in the soils sampled. However, the same relationship was verified for MI, concerning its inhibition. The authors also showed a strong correlation between the ¹³⁷Cs activity and the cytotoxic and genotoxic action observed. Finally, the authors concluded that the *A. cepa* test is efficient and sensitive to evaluate the genotoxicity of soils impacted by radioactive pollution.

In a study to determine the genotoxicity of boron, Konuk et al. [61] reported positive results regarding the induction of significant CA values in *A. cepa* meristematic root cells.

Chakraborty et al. [62] used the *A. cepa* test system to evaluate the genotoxicity of coal fly ash from a thermoelectric plant located in a region of India. For this evaluation, the authors mixed the fly ash sample with commercial sand in different proportions to obtain the test concentrations of 5%, 10%, 25%, 50%, 75% and 100%. Cytotoxic effects were reported for the 100% concentration and the induction of significant values of binucleated cells was observed at the 10%, 25% and 100% concentrations. The heavy metals Zn, Pb, Cu, Ni, Cd and As were detected by chemical analysis in the fly ash sample and, according to the authors, they may be related to the observed effects.

Tkalec et al. [63] applied CA test in *A. cepa* meristematic cells to assess the exposure effects of radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF). The authors showed that exposure to radiofrequency radiation, under specified conditions, induced a significant increase in MI and mitotic abnormalities in *A. cepa* root tips. Moreover, the authors reported that the observed effects were clearly related to the field frequencies used, besides other parameters as field strength, modulation and exposure time. The authors also showed that the cytogenetic effects of RF-EMF could be owing to mitotic spindle impairment, since the major abnormalities detected were lagging chromosomes, vagrants, disturbed anaphases and chromosome stickiness.

A summary of the *A. cepa* studies reported above are shown in Table 1.

Table 1A summary of the *A. cepa* studies reported above.

Tested agents	Endpoint	Cell type	Results	Reference
Pesticide–herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate	CA	Meristematic cells	Genotoxicity (aneugenic effect)	[8]
Waters impacted by petroleum hydrocarbons	CA, MN	Meristematic and F ₁ cells	Genotoxicity and mutagenicity	[14]
Waters impacted by tanneries (contamination of chromium ions)	CA, MN	Meristematic cells	Genotoxicity and mutagenicity	[15]
Waters impacted by petroleum hydrocarbons	CA, MN, NA	Meristematic cells	Cytotoxicity, clastogenic and aneugenic effects	[16]
Pesticide–trifluralin herbicide	MN, CA	Meristematic cells	Mechanism of MN formation by polyploidization of the genetic material	[17]
Complex mixture – water samples	MI, CA, MN	Meristematic cells	Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity	[19]
Pesticide–herbicides: pentachlorophenol, 2,4-D and butaclor	CA	Meristematic cells	Genotoxicity (butaclor is a aneugenic agent and pentachlorophenol is clastogenic agent)	[20]
Pesticide–atrazine herbicide	MI, CA	Meristematic cells	Cytotoxicity and genotoxicity (clastogenic effect)	[21]
Phytoremediation of heavy metals (Fe, Pb, Cr, Cu)	CA, NA	Meristematic cells	Reduction the frequencies of CA and NA	[24]
Metal (arsenic)	MI, MN	Meristematic and F ₁ cells	Cytotoxicity and mutagenicity	[26]
Raw effluents of textile industry contaminated by azo dyes (CI disperse blue 373, CI disperse violet 93, CI disperse orange 37) and aromatic amines	MI, CA	Meristematic cells	Genotoxicity	[27]
Metal (cadmium)	MI, CA, MN	Meristematic cells	Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity	[28]
Aromatic hydrocarbon – benzeno	CA	Meristematic cells	Genotoxicity	[31]
Complex mixture – industrial effluents contaminated, mainly, by heavy metals and pesticides	CA	Meristematic cells	Genotoxicity	[32]
Drinking water contaminated by copper	CA	Meristematic cells	Genotoxicity	[33]
Metal ions (Hg, Cu, Ni, Cd, Be, Al, Mn, Li)	CA	Meristematic cells	Genotoxicity	[34]
Copper mine waste	MI, CA	Meristematic cells	Cytotoxicity and genotoxicity	[35]
Heavy metals (Zn ²⁺ , Cd ²⁺)	CA	Meristematic cells	Genotoxicity	[36]
Heavy metals (As ³⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺ e Zn ²⁺)	MN	F ₁ cells	Mutagenicity	[37]
Pesticide–diuron, a substituted urea herbicide	MI, CA	Meristematic cells	Cytotoxicity and genotoxicity (aneugenic effect)	[38]
Pesticide–pyrethroid insecticides: cypermethrin and fenvalerate	MI, CA	Meristematic cells	Cytotoxicity and genotoxicity	[39]
Pesticide – mixtures of a substituted urea herbicide (isoproturon or diuron) with a synthetic pyrethroid insecticide (deltamethrin)	CA	Meristematic cells	Genotoxicity	[40]
Pesticide–atrazine herbicide	MI, CA, MN	Meristematic cells	Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity	[41]
PAH–benzo[a]pyrene	CA	Meristematic cells	Genotoxicity	[42]
Oil field effluent	CA	Meristematic cells	Genotoxicity	[43]
Effluents of a silk dyeing industry	MI, mitotic abnormalities	Meristematic cells	Cytotoxicity and genotoxicity	[44]
Chlorite (ClO ₂ ⁻) and chlorate (ClO ₃ ⁻) ions and their mixtures	CA	Meristematic cells	Genotoxicity	[45]
Drinking water disinfectants – NaClO, ClO ₂ , PAA	CA	Meristematic cells	Genotoxicity	[48]
Disinfection by-products by the use of PAA and NaClO disinfectants	CA	Meristematic cells	Negative results	[49]
Complex mixture – sludge from municipal treatment stations	MI, CA	Meristematic cells	Low genotoxicity	[50]
Complex mixture – soil samples	CA	Meristematic cells	Genotoxicity	[52]
Complex mixture – wastewater samples from sewage and industrial effluents	CA, MN	Meristematic cells	Genotoxicity and mutagenicity	[53]
Complex mixture – industrial effluents	CA, MN	Meristematic cells	Genotoxicity	[54]
Complex mixture – river impacted by industrial effluents	MI, CA, MN	Meristematic cells	Genotoxicity and mutagenicity	[55]
Complex mixture – sludge from urban sewage treatment stations	CA, MN	Meristematic cells	Genotoxicity	[56]
Complex mixture – municipal sludge sample before and after bioremediation process	MI, CA, MN, NA	Meristematic cells	Cytotoxicity and genotoxicity for the raw sludge	[57]
Complex mixture – soil sample of oil refinery's landfarming before and after bioremediation process	MI, CA, MN, NA	Meristematic cells	Genotoxicity and mutagenicity (clastogenic effects for the raw landfarm soil)	[58]
Complex mixture – metal waste leachate and dye waste leachate	MI, CA, MN	Meristematic cells	Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity	[59]
Complex mixture – soils sampled contaminated mainly by cesium 137 (¹³⁷ Cs) and strontium (⁹⁰ Sr)	CA	Meristematic cells	Cytotoxicity and genotoxicity	[60]
Boron	CA	Meristematic cells	Genotoxicity	[61]
Coal fly ash	MI	Meristematic cells	Cytotoxicity	[62]
Exposure effects of radiofrequency electromagnetic fields	MI, CA	Meristematic cells	Cytotoxicity and genotoxicity	[63]

MI: Mitotic index; CA: Chromosome aberrations; MN: Micronuclei, NA: Nuclear abnormalities.

6. Assessment of promutagens by the *Allium cepa* test system

Although the *A. cepa* test is widely accepted as a test of environmental monitoring, some authors place certain restrictions

on the use of plant test systems to evaluate some classes of carcinogens, as PAHs, nitrosamines and several other classes [64]. Such fact is due to the complex metabolic system present in mammals and, especially in man, where these substances require it

to activate their genotoxic potential. However, studies of metabolic activation systems in plants have been carried out for years, and the capacity of these organisms activating promutagens into mutagens have been already reported [65–68].

The presence of this metabolic activation system in plants led Fiskesjö to report the importance of the *A. cepa* test system in the evaluation of PAHs genotoxicity in 1985 [4] by using benzo[a]pyrene as test substance. According to the author, *A. cepa* cells present an oxidase enzyme system able to metabolizing polycyclic hydrocarbons and, although other test systems have shown to be more sensitive to this detection, the results of the *A. cepa* test should be taken as a warning to other organisms. More recently, many authors have used the *A. cepa* test system to monitor carcinogens that require specific metabolic pathways to effect their genotoxicity and, for these studies, sensitivity to detect those agents have been reported [14,16,27,32,43,52,58].

7. Studies of sensitivity and correlation between the *Allium* test and other test systems

Studies of sensitivity and correlation among test systems are fundamental for a more accurate evaluation of the environmental risks, as well as extrapolation of data to other target organisms, e.g. man. Tests to detect the risks to human health are conducted using several test systems which use a wide variety of organisms, since the use of human beings for this type of evaluation is inviable for ethic reasons.

Besides all the advantages above mentioned, the *A. cepa* test has shown high sensitivity and good correlation when compared with other test systems, e.g. mammals. According to Grant [7], of 148 chemicals evaluated by the *Allium* test, 76% presented positive results, which led the author to suggest including it as a standard test to determine chromosome damages induced by chemicals. Fiskesjö [4] reported that the sensitivity of the *A. cepa* test was virtually the same as the one observed for algae and human lymphocyte test systems. Subsequently, Rank and Nielsen [31] showed a correlation of 82% of the *A. cepa* test in relation to the carcinogenicity test in rodents. The same authors also showed that, in this comparison, the *A. cepa* test was more sensitive than the Ames and the Microscreen tests.

In a study of cytogenetic effect of pyrethroid insecticides by the *A. cepa* test and comparing the results with the ones from mammal tests (rodents bone marrow and human lymphocytes), Chauhan et al. [39] reported a good correlation of the *A. cepa* test system with those of mammals and its sensitivity to evaluate this pollutant class. Thus, the authors suggest the validation of the *A. cepa* test as an alternative to the mammal test systems to monitor the genotoxic potential of environmental chemicals, such as pesticides.

Feretti et al. [45] showed that the CA test in *A. cepa* was more sensitive than the MN test in *Tradescantia* to analyze the genotoxicity of chlorite and chlorate ions. However, in this study, the authors did not establish a correlation between the results obtained for the plant test systems and HepG2 human cells *in vitro*. According to the authors, this non-correlation may be related to the enzymatic activities of the detoxification process of exogenous substances and DNA repair, which are less relevant in plant cells than in mammals, mainly in the hepatic cells, such as HepG2, and plays a key role in the genotoxicity of chlorite and chlorate ions. However, the authors conclude that using different test systems is important for a more comprehensive assessment of the different aspects of an agent action, thus obtaining a complete overview of its hazard.

8. Conclusion

Based on the information provided in this review, it is concluded that the *A. cepa* test is a fast and sensitive assay to

detect environmental genotoxics and mutagens. Moreover, for the possibility of assessing several genetic endpoints, this test also enables the evaluation of action mechanisms of the tested agents on the exposed organisms' DNA. Thus, this test provides an important method for screening environmental contamination and their results can be used as a warning to other test systems.

9. Conflict of interest

None.

Acknowledgements

We would like to thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – São Paulo/SP, Brazil, for the financial support and the Department of Biology of Universidade Estadual Paulista (UNESP)-Rio Claro, SP, Brazil, for the physical space provided.

References

- [1] L.R. Ribeiro, Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo, in: L.R. Ribeiro, D.M.F. Salvadori, E.K. Marques (Eds.), *Mutagênese Ambiental*, Ulbra, Canoas, 2003, pp. 201–219.
- [2] V.S. Houk, The genotoxicity of industrial wastes and effluents—a review, *Mutat. Res.* 277 (1992) 91–138.
- [3] W.F. Grant, The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens, *Mutat. Res.* 310 (1994) 175–185.
- [4] G. Fiskesjö, The *Allium* test as a standard in environmental monitoring, *Hereditas* 102 (1985) 99–112.
- [5] A. Levan, The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*, *Hereditas* 24 (1938) 471–486.
- [6] A. Levan, Cytological reactions induced by inorganic salt solutions, *Nature* 156 (1945) 751–752.
- [7] W.F. Grant, Chromosome aberration assays in *Allium*, *Mutat. Res.* 99 (1982) 273–291.
- [8] J. Rank, A.-G. Jensen, B. Skov, L.H. Pedersen, K. Jensen, 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, *Mutat. Res.* 300 (1993) 29–36.
- [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, The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay, *Ekologija* (2003) 38–42.
- [11] J. Rank, M.H. Nielsen, A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures, *Hereditas* 18 (1993) 49–53.
- [12] M. Fenech, Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology, *Toxicology* (2002) 411–416.
- [13] J. Rank, M.H. Nielsen, *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on *N*-methyl-*N*-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate, *Mutat. Res.* 390 (1997) 121–127.
- [14] D.M. Leme, M.A. Marin-Morales, Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study, *Mutat. Res.* 650 (2008) 80–86.
- [15] S.T. Matsumoto, M.S. Mantovani, M.I.A. Malagutti, 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.
- [16] D.M. Leme, D.F. Angelis, M.A. Marin-Morales, Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells, *Aquat. Toxicol.* 88 (2008) 214–219.
- [17] T.C.C. Fernandes, D.E.C. Mazzeo, M.A. Marin-Morales, Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide, *Pest. Biochem. Physiol.* 88 (2007) 252–259.
- [18] M.M. Hoshina, Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro – município de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*, Trabalho de conclusão (Bacharel e Licenciatura – Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2002, 52 p.
- [19] 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.
- [20] B. Ateeq, M. Adul Farrah, M.N. Ali, W. Ahmad, Clastogenicity of pentachlorophenol, 2-4-D and butachlor evaluated by *Allium* rot tip test, *Mutat. Res.* 514 (2002) 05–113.
- [21] P. Bolle, S. Mastrangelo, P. Tucci, M.G. Evandri, Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test, *Environ. Mol. Mutagen.* 43 (2004) 137–141.

- [22] M. Kuraš, J. Nowakowska, E. Śliwińska, R. Pilariski, R. Iłasz, 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, *J. Ethnopharmacol.* 107 (2006) 211–221.
- [23] A. Akinboro, A.A. Bakare, Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn., *J. Ethnopharmacol.* 112 (2007) 470–475.
- [24] A.H.M. 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, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66 (2007) 57–64.
- [25] S. Türkoglu, Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L., *Mutat. Res.* 626 (2007) 4–14.
- [26] H. Yi, L. Wu, L. Jiang, Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay, *Sci. Total Environ.* 308 (2007) 232–236.
- [27] R. Caritá, M.A. Marin-Morales, Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes, *Chemosphere* 72 (2008) 722–725.
- [28] C.S. Seth, V. Misra, L.K.S. Chauhan, R.R. Singh, Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (2008) 1, doi:10.1016/j.ecoenv.2008.02.003.
- [29] P.J. Russel, Chromosomal mutation, in: B. Cummings (Ed.), *Genetics*, Pearson Education Inc., San Francisco, 2002, pp. 595–621.
- [30] R.J. Albertini, D. Anderson, G.R. Douglas, L. Hagmar, K. Hemmink, F. Merlo, A.T. Natarajan, H. Norppa, D.E. Shuker, R. Tice, M.D. Water, A. Aitio, IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety, *Mutat. Res.* 463 (2000) 111–172.
- [31] 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.
- [32] R.A. Fatima, 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.
- [33] G. Fiskesjö, *Allium* test on copper in drinking water, *Vatten* 37 (1981) 232–240.
- [34] G. Fiskesjö, The *Allium* test—an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions, *Mutat. Res.* 197 (1988) 243–260.
- [35] H. Inceer, O. Beyazoglu, H.A. Ergul, Cytogenetic effects of wastes of copper mine on root tip cells of *Allium cepa* L., *Pak. J. Biol. Sci.* 3 (2000) 376–377.
- [36] L. Borboa, C. De La Torre, The genotoxicity of Zii(II) and Cd(II) in *Allium cepa* root meristematic cells, *New Phytol.* 134 (1996) 481–486.
- [37] H. Steinkellner, K. Mun-Sik, C. Helma, S. Ecker, T.-H. Ma, O. Horak, M. Kundi, S. Knasmüller, Genotoxicity effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays, *Environ. Mol. Mutagen.* 31 (1998) 183–191.
- [38] L.K.S. Chauhan, P.N. Saxena, V. Sundararaman, S.K. Gupta, Diuron-induced cytological and ultrastructural alterations in the root meristem cells of *Allium cepa*, *Pest. Biochem. Physiol.* 62 (1998) 152–163.
- [39] L.K.S. Chauhan, P.N. Saxena, S.K. Gupta, Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*, *Environ. Exp. Bot.* 42 (1999) 181–189.
- [40] L.K.S. Chauhan, S.K. Gupta, Combined cytogenetic and ultrastructural effects of substituted urea herbicides and synthetic pyrethroid insecticide on the root meristem cells of *Allium cepa*, *Pest. Biochem. Physiol.* 82 (2005) 27–35.
- [41] K. Srivastava, K.K. Mishra, Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*, *Pest. Biochem. Physiol.* 93 (2009) 8–12.
- [42] G. Fiskesjö, C. Lassen, Benzo[a]pireno and nitrosoguanidine in the *Allium* test, *Mutat. Res.* 97 (1982) 188.
- [43] P.G.C. Odeigah, O. Nurudeen, O.O. Amund, Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria, *Hereditas* 126 (1997) 161–167.
- [44] R. Sudhakar, K.N. Ninge Gowda, G. Venu, Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*, *Cytologia* 66 (2001) 235–239.
- [45] D. Ferretti, I. Zerbini, E. Ceretti, M. Villarini, C. Zani, M. Moretti, C. Fatigoni, G. Orizio, F. Donato, S. Monarca, Evaluation of chlorite and chlorate genotoxicity using plant bioassays and *in vitro* DNA damage tests, *Water Res.* 42 (2008) 4075–4082.
- [46] R.L. Melnick, J.K. Dunnick, D.P. Sandler, M.R. Elwell, J.C. Barret, Trihalomethanes and other environmental factors that contribute to colorectal cancer, *Environ. Health Perspect.* 102 (1994) 586–588.
- [47] G.A. Boorman, Drinking water disinfection by-products: review and approach to toxicity evaluation, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 207–217.
- [48] S. Monarca, M. Rizzoni, B. Gustavino, C. Zani, A. Alberti, D. Ferretti, I. Zerbini, Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using *in situ* plant tests, *Environ. Mol. Mutagen.* 41 (2003) 353–359.
- [49] R. Crebelli, L. Conti, S. Monarca, D. Ferretti, I. Zerbini, C. Zani, E. Veschetti, D. Cutilli, M. Ottaviani, Genotoxicity of the disinfection by-products resulting from peracetic acid- or hypochlorite-disinfected sewage wastewater, *Water Res.* 39 (2005) 1105–1113.
- [50] I.S. Grover, S. Kaur, Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays, *Mutat. Res.* 426 (1999) 183–188.
- [51] O.A. El-Shahaby, H.M. Abdel Migid, M.I. Soliman, I.A. Mashaly, Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay, *Pak. J. Biol. Sci.* 6 (2003) 23–28.
- [52] J.M. Gana, R. Ordóñez, C. Zampini, M. Hidalgo, S. Meoni, M.I. Isla, Industrial effluents and surface waters genotoxicity and mutagenicity evaluation of a river of Tucuman, Argentina, *J. Hazard. Mater.* 155 (2008) 403–406.
- [53] 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.
- [54] R. Caritá, Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de lodos provenientes de estações de tratamento de esgotos de grandes centros urbanos do estado de São Paulo, pela metodologia de aberrações cromossômicas em *Allium cepa*, Trabalho de Conclusão (Bacharel e Licenciatura – Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2007, 63 p.
- [55] R. Srivastava, D. Kumar, S.K. Gupta, Bioremediation of municipal sludge by vermitechnology and toxicity assessment by *Allium cepa*, *Bioresour. Technol.* 96 (2005) 1867–1871.
- [56] S. Cotellet, J.-F. Masfarand, J.-F. Férard, Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and *Tradescantia*-micronucleus assays, *Mutat. Res.* 426 (1999) 167–171.
- [57] G.L. Cabrera, D.M.G. Rodriguez, Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays, *Mutat. Res.* 426 (1999) 211–214.
- [58] T.S. Souza, F.A. Hencklein, D.F. Angelis, R.A. Gonçalves, C.S. Fontanetti, The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (2009), doi:10.1016/j.ecoenv.2009.01.009.
- [59] S. Chandra, L.K.S. Chauhan, R.C. Murthy, P.N. Saxena, P.N. Pande, S.K. Gupta, Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test, *Sci. Total Environ.* 347 (2005) 46–52.
- [60] O. Kovalchuk, I. Kovalchuk, A. Arkhipov, P. Telyuk, B. Hohn, L. Kovalchuk, The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident, *Mutat. Res.* 415 (1998) 47–57.
- [61] M. Konuk, R. Liman, İ.H. Cigerci, Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells, *Pak. J. Bot.* 39 (2007) 73–79.
- [62] R. Chakraborty, A.K. Mukherjee, A. Mukherjee, Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the *Allium* test, *Environ. Monit. Assess* 153 (2009) 351–357.
- [63] M. Tkalec, K. Malaric, M. Pavlica, B. Pevalak-Kozlina, Z. Vidakovic-Cifrek, Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of *Allium cepa* L., *Mutat. Res.* 672 (2009) 76–81.
- [64] 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 (Eds.), *Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and Human Health: A Course Manual*, Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego, Katowice, 2003, pp. 11–30.
- [65] K. Higashi, Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants, *Mutat. Res.* 197 (1988) 273–288.
- [66] M.J. Plewa, E.D. Wagner, Activation of promutagens by green plants, *Annu. Rev. Genet.* 27 (1993) 93–113.
- [67] 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.
- [68] 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 (Eds.), *Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and Human Health: A Course Manual*, Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego, Katowice, 2003, pp. 39–60.

ARTIGO 2**Mutagenicity assessment of water systems polluted by biodiesel and its diesel blends using the *Salmonella* assay and the *in vitro* MicroFlow[®] kit (Litron) assay**

Daniela Morais Leme¹, Tamara Grummt², Danielle Palma de Oliveira⁴, Andrea Sehr², Sylvia Renz², Sissy Reinel², Elisa R. A. Ferraz⁴, Mary Rosa Rodrigues de Marchi³, Marcos Canto Machado³, Guilherme Julião Zocolo³, *Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Biology Department, Univ Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, 13506-900, Brazil.

²Federal Environment Agency, Bad Elster Branch, Heinrich-Heine-Str. 12, Bad Elster, 08645, Germany.

³ Institute of Chemistry, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, 14800-900, Brazil.

⁴Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Av. do Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto/SP-Brazil.

*Corresponding author: Av. 24 A, 1515, Bela Vista, 13506-900, Rio Claro/SP-Brazil. e-mail: mamm@rc.unesp.br, TEL. +55 19 35264143, FAX. +55 19 35360009.

Submetido a Water Research (Fator de Impacto 4.355)

Abstract

The designation of biodiesel as an environmental-friendly alternative to diesel oil has improved its commercialization and use. However, most biodiesel environmental safety studies refer only to air pollution. There are still no studies of the impacts to other biotic system, e.g. water, and exposed organisms in cases of accidental releases involving this product. To assess mutagenic potential of water systems polluted with biodiesel and its diesel blends, spill simulations in water were carried out with the tested agents and mutagenic bioassays [*Salmonella* assay and *in vitro* MicroFlow[®] kit (Litron) assay] were accomplished. No mutagenicity was detected by diesel and biodiesel blends, which may be related to types and interaction of PAHs quantified by chemical analyses. Mutagenic effects were observed, in both *Salmonella*/microsome preincubation assay and *in vitro* MN test, on the biodiesel polluted water. This interesting result may be related to the presence of pollutants in biodiesel derived from the raw material source used in its production chain. Additionally, this study compared two different protocols of *Salmonella* assay (microplate fluctuation protocol - MPF - and preincubation procedure) concerning their sensitivity to detect mutagens in environmental samples. In this case, the MPF was not a valid alternative to the standard *Salmonella* assay, which showed more sensitivity in this assessment. The data showed that care while using biodiesel should be taken to avoid harmful effects on living organisms in cases of water pollution.

Keywords: soybean biodiesel, water quality, mutagenic effects, Ames MPF assay, *Salmonella*/microsome preincubation assay, flow cytometry-based *in vitro* MN assay

1. Introduction

Biodiesel is currently considered a notable alternative to diesel oil, since it can be generated by renewable natural sources (e.g. soybean, rapeseed etc.), contributing to a reduced dependence on petroleum-based fuels in countries where it is not produced (Balat and Balat, 2010). Apart from that, the biodiesel sector has also surged owing to the characterization of this biofuel as an environmental-friendly alternative to fossil fuels (Demirbas, 2009; Janaun and Ellis, 2010; Atadashi et al., 2010). However, the assessment of environmental impacts from the biodiesel industry refer mainly to air pollution (Yang et al., 2007; Hu et AL., 2008; Karavalakis et al., 2009; EPA, 2010; He et al., 2010). There are few reports in the literature on its impacts to other biotic systems, such as aquatic environments.

Water polluted with harmful chemicals has constantly been both a current and worrying environmental issue. Such fact is due to better understanding how important water quality is for the health of living beings. In this context, and in view of the great incentive to the biodiesel industry, some factors related to the production and the use of this biofuel must be taken into account in order to evaluate its actual hazard in case of undesirable environmental contamination.

One of the relevant factors behind this issue refers to the use of biodiesel as a cleaning and bioremediation agent of crude oils (Miller and Mudge, 1997; Mudge and Pereira, 1999; Pereira and Mudge, 2004; Fernández-Alvarez et al., 2007) and coal tar (Taylor and Jones, 2001). For this feature, biodiesel acts as a “detergent,” although less efficiently, acting as a dispersing and solubilizing agent, making chemical substances available and, consequently, enabling a more efficient action of degrading microorganisms (Mudge and Pereira, 1999; Taylor and Jones, 2001). Therefore, once

the degrading microorganisms' action is not immediate, this bioavailability induction can cause deleterious effects on organisms by the increases of their exposure to hazardous pollutants. It is known that diesel oil contains about 2000 to 4000 hydrocarbons, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Gallego et al., 2001), the ones which are pointed out as dangerous environmental contaminants due to their noxious effects on living organisms' health (Aina et al., 2006). Considering that a great deal of biodiesel is currently commercialized in diesel blends, the dispersing action of this biofuel may worsen the impacts of diesel water pollution.

Another fact that must be considered in this context refers to biodiesel quality certification. According to both domestic and international standards, biodiesel quality assessment includes only parameters concerning the final quality that a biofuel must have before its use, such as viscosity, water content, ester content, total glycerol, methanol or ethanol residues etc. (ANP, 2008). The presence of some contaminants from the raw material source used in biodiesel production process, and which may negatively impact the environment, is not currently considered when assessing final biodiesel quality.

Genotoxicity and mutagenicity assays are important to assess the safety of both chemical products and environmental samples. Different endpoints must be considered, such as point mutations and chromosome damage, which may be related to both numeric (polyploidy and aneuploidy) and structural alterations (breaks, losses, rearrangements etc.). This way, genotoxic/mutagenic assessments require an elaborate analysis strategy in which *in vitro* assays have played an important role in this process over the last years (Flamand et al., 2006; Speit, 2009; Mun et al., 2009). Among the

several existing tests, the *Salmonella*/microsome assay and the *in vitro* micronucleus (MN) test are the most commonly used (Speit, 2009).

The *Salmonella*/microsome assay, also known as the Ames test, use strains of *S. typhimurium* derived from the parental LT2, histidine auxotroph (his^-), showing different mutations in the operon of this aminoacid, being constructed to detect mutations such as frameshifts or base-pair substitution in the DNA (Umbuzeiro and Vargas, 2003). Since the creation of the Ames test, several changes in the initial protocol have been made in order to facilitate the execution of the method and increase the sensitivity of the test. Among the variations developed, the preincubation protocol has proven to be more sensitive in detecting mutagens compared to plate incorporation assay. One possible reason is the fact that, in this protocol, short-lived mutagenic metabolites have a better chance of reacting with the tester strains in the small volume of the preincubation mixture (Mortelmans and Zeiger, 2000). Recently, the Ames microplate fluctuation protocol (MPF) assay, also known as Ames II, has been pointed out as a valid alternative to standard Ames, once it requires a smaller amount of test samples and reagents to be carried out, in addition to being more automated (Flückiger-Isler et al., 2004; Kamber et al., 2009; Umbuzeiro et al., 2010).

The MN test has been considered a simple and effective tool to estimate mutagenic effects, resulting from chromosome damage, promoted by chemicals (Leme and Marin-Morales, 2009). This is due to the fact that MNs result from damages, unrepaired or wrongly repaired, in parental cells, being easily measured in daughter cells as a similar structure to the main nucleus, but in a reduced size (Ribeiro, 2003). Although microscopy-based scoring of MNs is relatively quick compared to other tests, e.g. chromosome aberration (CA) test, automation of this process has been the focus of

studies (Shi et al., 2010). A flow cytometry-based *in vitro* MN assay has recently been developed to increase the throughput capacity of the test, allowing MN measurements in a large number of cells in a short period of time (Nüsse et al., 1994, Shi et al., 2010). However, problems related to this method have initially been detected, such as false-positive response resulting from cytotoxicity (Nüsse and Mark, 1997; Collins et al., 2008, Shi et al., 2010). Aiming to solve this problem, Litron lab (Rochester, NY, USA) has recently developed the *in vitro* MicroFlow® kit (Litron) assay, which use different stain sequences which allow us to distinguish cytotoxic events of mutagenic effects of interest (Avlasevich et al., 2006; Bryce et al., 2007; Collins et al., 2008; Bryce et al., 2008; Bryce et al., 2010).

Despite the fact that new products were carefully toxicological evaluated before their market introduced to avoid risks on living beings, further evaluations are still necessary to really estimate how dangerous these products are, mainly when it comes to environmental issues. Considering the increase in output and commercialization of biodiesel within the next years, and data shortage about its impacts on living organisms, genotoxicologic evaluation of both biodiesel and its diesel blends, by running spill simulations in water, is made relevant and necessary. Therefore, the purpose of this study was to assess the mutagenic effects of water contaminated with biodiesel and its different diesel blends, using the *Salmonella* and the flow cytometry-based *in vitro* MN test assays. Additionally, as regards the *Salmonella* assay, two different procedures (preincubation and MPF) were used herein with the aim of evaluating their sensitivity in detecting mutagens.

2. Material and Methods

2.1. Experiments and Sample Preparation Procedures

The diesel and biodiesel used in this study were kindly provided by BioVerde (a biofuel company), Taubaté-SP, Brazil.

To evaluate the mutagenic effects of water polluted with biodiesel and its blends of diesel oil, spill simulations in water were performed according to Nicodem et al. (1998) and Vanzella et al. (2007), in laboratory conditions, with some modifications. Briefly, a concentration of 1.5% of the blends B5 (5% biodiesel+95% diesel), B20 (20% biodiesel+80% diesel), B50 (50% biodiesel+50% diesel) and pure fuels B100 (biodiesel) and D100 (diesel) were floated over 40 L of non-impacted water in distinct glass containers. The simulations were submitted to continuous circulation with submersible water pumps and placed in the dark for 13 hours prior to exposure to low-medium solar light for 9 hours, simulating spills in tropical conditions. After that, the upper insoluble phase was discharged and the remaining water phase was collected and stored at 4°C to further sample preparation.

The water samples were extracted according to US EPA method 550.1 (EPA, 1990), as following: samples were submitted to solid phase extraction with C-18 cartridge (500 mg/ 6mL, Phenomenex) and eluted with dichloromethane. The extracts obtained were reduced in a rotary evaporator and dried in a gentle stream of pure nitrogen gas. Two samples were treated in parallel: one for chemical analysis and the other for biological assay. For the former, the dry extract was resuspended in acetonitrile and kept at -20°C until HPLC/Flu analysis. For the latter, the dry extracts were kept at 4°C and resuspended in DMSO just before accomplishing the bioassays.

The water used in the simulations carried out was also extracted and designated as water control (WC) to assure its quality.

2.2. *Salmonella*/microsome Preincubation Assay

Samples were tested in the preincubation *Salmonella*/microsome assay using *S. typhimurium* TA98 (*hisD3052*, *rfa*, Δ *bio*, *uvrB*, pKM101), TA100 (*hisG46*, *rfa*, Δ *bio*, *uvrB*, pKM101), TA1535 (*hisG46*, *rfa*, Δ *bio*, *uvrB*) and TA1537 (*hisC3076*, *rfa*, Δ *bio*, *uvrB*). The assay was performed using five doses and triplicate plates/dose, both in the presence and absence of S9 using 30-minute preincubation at 37°C (Maron and Ames, 1983; Mortelmans and Zeiger, 2000).

The dose-response experiments were conducted with maximum doses of 200 mL equivalent for water samples, according to guidelines of the standard *Salmonella* assay of the Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA, 2010). The S9 mixture was freshly prepared according to Maron and Ames (1983) before each test using lyophilized Araclor-1254-induced rat liver S9 fraction (Moltox, Boone, NC), resulting in 4% v/v of S9 fraction in the mixture. The background was carefully evaluated and the colonies were counted by hand. Results were statistically analyzed by the Salanal computer program, which uses the Bernstein model (Bernstein et al., 1982). A sample was considered positive when there was a significant positive dose response and a significant statistical difference between the tested doses and the negative control (ANOVA). The mutagenic potency was expressed in revertants/mL equivalent of water sample.

The positive controls for TA98 and TA100 were 4-Nitroquinoline-*N*-oxide (4-NQO, CAS No. 56-57-5, Sigma) at 0.05 µg/µL without metabolic activation and 2-

aminoanthracene (2-AA, CAS No. 613-13-8, Aldrich) at 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ with S9. For TA1535, the positive control was Bis-(2-chlorethyl)-amin-hydrochlorid (Ethanamine, CAS 821-48-7, Merck) at 0,001 $\text{mg}/\mu\text{L}$ without metabolic activation and 2-Amino-fluorene (2-AF, CAS 153-78-6, Merck) at 0,001 $\text{mg}/\mu\text{L}$ with S9. For TA1537, the positive control was 2-Methyl-4,6-dinitrophenol (DNOC, CAS 534-52-1, Riedel de Haen) at 0,01 $\text{mg}/\mu\text{L}$ without metabolic activation and 2-Acetylaminofluorene (2-AAF, CAS 53-96-3, Merck) at 0,0005 $\text{mg}/\mu\text{L}$ with S9. DMSO (Sigma) was used both to prepare the positive controls and as negative control.

2.3. Ames MPF Assay

The Ames MPF assay was performed in liquid media in 24-well plates during sample exposure and in 384-well plates for revertant growth and for scoring. Growth, Exposure and Indicator Media, as well as *S. typhimurium* tester strain TA98, TA100, TA1535 and TA1537 were acquired from Xenometrix AG, Allschwil, Switzerland. The test procedure described in the ‘Ames MPF Instructions for Use’ was followed.

Briefly, bacteria were grown overnight, diluted in Exposure Medium and exposed to test samples in 24-microwell plates for 90 min at 37°C with agitation in either the presence or absence of 4.5% Aroclor 1254-induced rat liver S9 (Moltox, Boone, NC). The exposed cultures were then diluted in Indicator Medium and the contents of each 24-well culture were distributed into 48 wells of a 384-well plate (50 μL per well). The Indicator Medium contains a pH indicator dye which changes from purple to yellow on bacterial growth. After 48-hr incubation at 37°C, the plates were scored by eye for yellow wells. Positive and negative controls were included as for the preincubation assay, and all doses were done in triplicate. The criteria used to evaluate

the MPF results were the fold increase in number of positive wells over the solvent control baseline (FIB), and the dose dependency. The fold increase of revertants in relation to the solvent control was determined by dividing the mean number of positive wells at each dose by the solvent control baseline. The solvent control baseline was defined as the mean number of positive wells in the solvent control plus 1 SD. All solvent controls from an experiment with identical conditions (same day, same bacterial culture, solvent and incubation conditions) were combined. An increase of >2-fold in relation to the baseline was classified as positive for that dose. Positive responses of >2-fold in relation to the baseline at more than one dose with a dose-response led the test sample to be classified as positive. A test sample was classified as negative where no response >2-fold the baseline and no dose-response was observed.

The doses tested in MPF were the same as the preincubation assay for further comparison. Cytotoxicity evaluations were performed together with the assays accomplished by measurements of OD₆₀₀ (Tecan GENios Microplate Reader) at the beginning of the treatment exposure (t=0) and after a 90-minute incubation (t=90).

Positive controls used in this procedure were as following: a mixture 1:2 v/v of 4-NQO at 2.5 µg/mL and 2-Nitrofluorene (2-NF, CAS No. 607-57-8) at 50 µg/mL for TA98 without S9; 4-NQO at 3333.3 ng/ml for TA100 without S9; N⁴-Aminocytidine (N⁴-ACT, CAS No. 57294-74-3) at 2.5 mg/mL for TA1535 without S9; 9-Aminoacridine (9-AAc, CAS No. 90-45-9) at 375 µg/ml for TA1537 without S9; 2-AA at 125 µg/mL for TA98, TA100, TA1535, TA1537 with S9 (all from Moltox, Boone, NC). DMSO was used to prepare the positive controls and as negative control.

2.4. *in vitro* MicroFlow[®] Kit (Litron) Assay

Cell Culture

CHO-K1 (Chinese hamster ovary cells; DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany) were grown in culture medium at 37°C, 5% CO₂, in a humidified atmosphere. For routine culturing, cells were maintained up to ~80% of confluence. The culture medium consisted of minimum essential medium EAGLE supplemented with 1% L-glutamine 200 mM, 1% L-proline and 10% of fetal bovine serum (all from Sigma).

Chemical Treatment

One day prior to treatment, logarithmically growing cells were trypsinized, adjusted to 2×10^4 /mL with culture medium and then 1 mL aliquots were plated across 24-well plate. The following day, the culture medium was aspirated and duplicated wells were exposed, using fresh medium, to solvent control (DMSO), positive control [Mitomycin (MMC, CAS No. 50-07-7) at 0.1 µg/mL, Vinblastine (VB, CAS No. 143-67-9) at 10 ng/mL, all from Sigma] and test samples (starting with the highest concentration – 200 mL equivalents of water sample - used in Ames test and in cases of cytotoxic effects lower dilutions were also used). The cells were incubated for 24 hours at 37°C, 5% CO₂ in a humid atmosphere. The experiment was repeated three times.

Flow cytometric MN measurement

A sequential staining method was applied to the treated samples according to the *in vitro* MicroFlow[®] Kit (Litron) manual. Essentially, upon completion of the test chemical treatment, cells were first stained with a photo-activated dye, Dye 1 (EMA),

and then washed, lysed and stained with lysis solutions containing RNase, nucleic acid Dye 2 (SYTOX Green) and the counting beads. DNA from apoptotic/necrotic cells with compromised cell membranes was labeled with both EMA and SYTOX Green, which can be distinguished from EMA-positive and SYTOX Green-positive MN.

Samples were protected from light, resuspended immediately before being measured by gentle pipetting and analyzed with a BD FACSCalibur™ flow cytometer. Data acquisition and analysis were accomplished with BD CellQuest Pro v.5.2.1 software. Strategies for acquiring flow cytometric data, including configuration of regions and gating logic, were as described in the *in vitro* MicroFlow® Kit (Litron) manual. Briefly, SYTOX-associated fluorescence emission was collected in the FL1 (FITC) channel, and EMA-associated fluorescence was collected in FL3 (PerCP) channel. Events were triggered on SYTOX-associated fluorescence.

The percentages of relative survival, EMA-positive, hypodiploid events and MN were determined based on the acquisition of at least 10,000 gated nuclei per sample. The calculations were performed according to Bryce et al. (2007, 2008), using Excel (Microsoft, Seattle, WA). Positive results were expressed herein as mean fold increased related to concurrent solvent control. Significant induction of MN and EMA+ events was taken to be ≥ 3 -fold mean increase over the mean observed for solvent control. A test sample was classified as mutagenic was defined as any one passing (i.e. not overly cytotoxic) concentration resulting in ≥ 3 -fold increase in mean %MN related to the concurrent vehicle control mean value (Bryce et al., 2010).

2.6. Chemical Analysis

Identification and quantification of PAHs were conducted in all water extract according to the US EPA-550.1 Method (EPA, 1990). The analyses herein used a liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-Flu) method, which is able to detect the sixteen PAHs considered as priority by the US. EPA: naphthalene, acenaphthalene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(e)pyrene, benzo(e)acefenantrilene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perilene, indene(123-cd)pyrene.

3. Results

Results of the PAHs chemical analysis are shown in Table 1.

As regards the Ames test, only a simple dose of B100 extract (0.2 mL equivalent/plate) showed >2-fold induction over the baseline for TA1537 in the presence of metabolic activation in the MPF assay. However, no dose-response was observed for B100 sample in this procedure. The Ames MPF assay did not detect mutagenic samples in this study (Table 2). On the other hand, the Ames preincubation protocol showed mutagenic effects only for the B100 extract in TA100 without S9 (Table 3, Fig. 1).

Positive results of mutagenicity were also observed for B100 sample in the MN test performed herein (Fig. 2). As this assay could also be used to evaluate cytotoxic effects, strong cytotoxicity was observed for D100 and B5 extracts at the highest concentration tested, 0.2 mL/mL (all cell death, data not shown). A lower dilution, 0.1 mL/mL, was tested for these samples and for B5, the positive results were observed up

to the concentration 0.5 mL/mL (Fig 2). Hypodiploid events were used to determine the genotoxic action mode of the agents tested. No evident hypodiploidy was observed after treatment with the tested samples (Fig. 3).

4. Discussion

PAHs are the most important, abundant and harmful class of persistent organic contaminants, due to their harmful effects on the exposed organisms, which range from DNA damage to physiological alterations, as well as individuals' mortality (Marin-Morales et al., 2009). Therefore, concerns about accidental release of diesel oil into aquatic environments have mainly been related to impacts of the PAHs present in this fuel. Biodiesel commercialization has currently been done in diesel blends, since the use of neat biodiesel in diesel engines remains a problem yet. As previously mentioned, biodiesel can also act as a dispersing and solubilizing agent, which may aggravate the diesel impacts in aquatic systems by the PAH bioavailability induction. Nevertheless, both the chemical analysis results of PAHs and the biological data obtained did not confirm the proposed hypothesis. On the contrary, the chemical analysis results showed that adding biodiesel to diesel leads to a decrease of the PAH amount as the biodiesel ratio in the tested blends (B5, B20 and B50) increases.

Genotoxic and mutagenic potential are reported in several studies for PAHs. However, in most cases, mainly the ones which refer to the environmental samples, they are about complex mixtures (Marin-Morales et al., 2009). Assessments of complex mixtures require a critical view of synergistic and antagonistic interactions of chemicals present in order to estimate their actual effects (Mumtaz et al., 1996; White, 2002). Results of bioassays performed in the present study did not prove mutagenic action

either for diesel or for its blends of biodiesel (B5, B20 and B50), a fact which may be related to the kinds of PAHs present in the test samples. According to Donnelly et al., (1990), non-mutagenic PAHs, such as anthracene, naphthalene, may modulate, thus increasing or decreasing mutagenicity of mutagenic PAHs, e.g. benzo(a)pyrene. Most of the PAHs detected in the water samples from the spill simulations with diesel and its biodiesel blends refer to non-carcinogenic PAHs (NTP, 2004), such as naphthalene (present in high amounts) and anthracene, a possible explanation for the negative responses herein observed.

The *in vitro* MicroFlow[®] kit (Litron) assay allows us to evaluate not only mutagenicity but also cytotoxicity of the test agent by means of ethidium monoazide bromide (EMA) dye, which label chromatin of necrotic and mid-/late-stage apoptotic cells, distinguishing them from chromatin of healthy cells (Bryce et al., 2008; Bryce et al., 2010). Our data showed a strong cytotoxic effect to D100 and B5 water extracts in the highest dose initially tested (0.2 mL/mL) (all cell death, data not shown). For B5 extract, this effect was still persistent up to dilution 0.5 mL/mL. Such fact may be related to the kinds, concentration and interaction of PAHs present in these samples. Cytotoxicity induction has been reported for some PAHs such as naphthalene, fluorene, acenaphthaline (Schirmer et al., 1998), anthracene (Oris and Giesy, 1985), crysene, fluoranthene, benzo(a)anthracene, pyrene (Babich, 1988), phenanthrene (Shirmer et al., 1998; Babich, 1988; Alkio et al. (2005), among others. It is noticeable that some of the PAHs recognized by their cytotoxic effects were chemically quantified in high concentrations in water samples from the spill simulations performed with diesel and diesel and biodiesel blends. However, a decrease in the PAH amounts were observed in

the tested blends (B5>B20>B50) as the biodiesel rate increases, a reason that may be related to the absence of cytotoxic effects in B20 and B50.

Interestingly enough, mutagenicity was detected for the B100 polluted water by both *Salmonella*/microsome preincubation assay and the *in vitro* MicroFlow[®] kit (Litron) assay. The mutagenic effects observed in the standard *Salmonella* assay were obtained using the TA100 tester strain without metabolic activation (S9). Such result indicates that the water sample contaminated with biodiesel induced mutations by base-pair substitutions. Although the effect observed shows a clear significant dose-response, the mutagenic potency obtained for this sample was not high (5.15 rev/mL-equivalent), which may lead us to take biodiesel as a weak mutagen compared to other environmental pollutants. The fact that it is a weak mutagenic sample may explain the non-correlation data obtained in both *Salmonella* assay protocols used. Despite studies of the literature stating that the Ames MPF assay is an efficient sorting alternative to the standard Ames test (Flückiger-Isler et al., 2004; Kamber et al., 2009; Umbuzeiro et al., 2009), even for weak mutagens (Xenometrix, 2009), the data shown herein did not confirm this statement and showed a higher sensitivity in detecting mutagens for the preincubation procedure. The only positive result obtained in the MPF protocol refers to the dose 0.2 mL equivalent/plate of B100 sample by the TA1537 assay with S9. Nevertheless, this sample was not considered positive, since it did not meet all the necessary classification criteria of a mutagenic agent required in this method.

As for the flow cytometry-based *in vitro* MN assay, a clear increase in MN frequency was observed after CHO-K1 cell exposition to B100 water extract. Additionally, once this test also allows us to tell apart clastogenic and aneugenic agents (Bryce et al., 2010; Shi et al. 2010), the genotoxic mode of action of biodiesel polluted

water can also be assessed. In this test procedure, the differentiation between aneugenic and clastogenic signatures is based on a large increase in hypodiploid nuclei, which is characterized as an aneuploidization event, possibly by a pathway which involves a failure in cytokinesis (Shi and King, 2005; Bryce et al. 2010; Shi et al. 2010). In this study, no increase in the hypodiploid events that could indicate an aneugenic action for the tested sample was observed.

A possible explanation for the mutagenic effects observed to B100 water sample may be related to the presence of contaminants from the raw material used in this biodiesel production chain, which refers to soybean. Soybean is known for its high concentration of phytoestrogens and phytosterols (Paniagua-Pérez et al., 2005; Klein and King, 2007). Currently, phytoestrogens have been indicated as emerging contaminants which must be considered when assessing water quality, due to their estrogenic effects even in nonsignificant concentrations (ppm) in the environment (Kang and Price, 2009; Kuster et al., 2009; Richardson, 2009; Liu et al., 2010). However, besides estrogenicity, phytoestrogens have been indicated as genotoxic and mutagenic agents (Kulling and Metzler et al., 1997; Metzler et al., 1998; Virgilio et al., 2004; Stopper et al., 2005). According to Klein and King, 2007, genistein, an abundant phytoestrogen in soybean, is characterized as a clastogenic agent by *in vitro* cell culture assays. Virgilio et al. (2004) show that genistein causes a clear induction of MN in a dose-dependent manner in V79 cells, being characterized as a clastogenic agent. These same authors showed that daidzein, another phytoestrogen present in high concentrations in soybean, is also capable of inducing MN in V79 cells, although in a lower intensity when compared to the genistein action.

5. Conclusion

The mutagenic potential observed for B100 polluted water indicates greater caution when denoting biodiesel as a safer environmental-friendly alternative to petroleum-based diesel. However, the mutagenicity herein detected does not seem to be related to the biodiesel effects themselves, but to the presence of secondary contaminants in this biofuel resulting from the raw material source used in its manufacturing, which here refers to soybean. Otherwise, further studies must be carried out in order to corroborate the proposed hypothesis. Should this hypothesis come to be confirmed, the screening of these contaminants in the final biodiesel must be considered in order to assure the environmental quality and the health of living organisms should there be accidental biodiesel water pollution. However, considering that most of the world's biodiesel production is sustained by vegetal sources, being soybean the main source (Balat and Balat, 2010), detection and removal processes of these pollutants of the final biodiesel should be a governmental concern.

Contrary to what is expected, both diesel and its blends of biodiesel did not show mutagenic potential in any of the bioassays performed, which may be explained by the types and interactions of PAHs quantified by chemical analysis in these samples. On the other hand, these PAHs and their synergistic effects may be responsible for the strong cytotoxic effect observed in water polluted with D100 and B5 (95% of diesel) by the flow cytometry-based *in vitro* MN assay.

Comparison of the preincubation procedures and the MPF of the *Salmonella* assay indicated a higher sensitivity for the standard Ames test to detect weak mutagens in environmental samples. The *in vitro* MicroFlow[®] kit (Litron) assay was characterized as a valuable tool for environmental mutagen screening, yet providing both the

cytotoxic assessment and the action mechanism of test agents. Additionally, automation of the MN test using flow cytometry-based scoring contributed to shorten the analysis time, a highly relevant factor for environmental assessments.

Finally, this study showed that water contaminated with biodiesel may add mutagenic effects to exposed organisms both by mutation induction of base-pair substitution and by MN induction resulting from a probable clastogenic action. Therefore, it is important to stress that, should these effects be related to the presence in biodiesel of raw material contaminants, not all biodiesel polluted water systems will damage the DNA of exposed organisms.

Acknowledgements

We would like to thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – São Paulo/SP, Brazil, for the financial support (Process No. 2007/04304-3) and the Bioverde (Brazilian Biofuel Company) for having kindly provided us with the fuels used in the present work.

References

- Aina, R., Palin, L., Citterio, S., 2006. Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L. *Chemosphere* 65, 666-673.
- Alkio, M., Tabuchi, T.M., Wang, X., Colón-Carmona, A., 2005. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *J. Exp. Bot.* 56, 2983-2994.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis), 2008. Resolução ANP N° 7, de 19.3.2008 - DOU 20.3.2008, Brasil, 2008.

- Atadashi, I.M., Aroua, M.K., Aziz, A.A., 2010. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. *Renew Sust Energ Rev* 14, 1999-2008.
- Avlasevich, S.L., Bryce, S.M., Cairns, S.E., Dertinger, S.D., 2006. *In vitro* micronucleus scoring by flow cytometry: differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability. *Environ Mol Mutagen.* 47, 56-66.
- Babich, H., Sardana, M.K., Borenfreund, E., 1988. Acute cytotoxicities of polynuclear aromatic hydrocarbons determined *in vitro* with the human liver tumor cell line, HepG2. *Cell Biol Toxicol.* 4, 295-309.
- Balat, M., Balat, H., 2010. Progress in biodiesel processing. *Appl Energ.* 87, 1815-1835.
- Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., Pike, M.C., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from *Salmonella* test. *Mutat Res.* 97, 267-281.
- Bryce, S.M., Avlasevich, S.L., Bemis, J.C., Lukamowicz, M.A., Elhajouji, A., Van Goethem, F., De Boeck, M., Beerens, D., Aerts, H., Van Gompel, J., Collins, J.E., Ellis, P.C., White, A.T., Lynch, A.M., Dertinger, S.D., 2008. Interlaboratory evaluation of a flow cytometric, high content *in vitro* micronucleus assay. *Mutat Res.* 650, 181-195.
- Bryce, S.M., Bemis, J.C., Avlasevich, S.L., Dertinger, S.D., 2007. *In vitro* micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. *Mutat Res.* 630, 78-91.
- Bryce, S.M., Shi, J., Nicolette, J., Diehl, M., Sonders, P., Avlasevich, S., Raja, S., Bemis, J.C., Dertinger, S.D., 2010. High content flow cytometric micronucleus scoring method is applicable to attachment cell lines. *Environ Mol Mutagen.* 51, 260-266.
- Collins, J.E., Ellis, P.A., White, A.T., Booth, A.E.G., Moore, C.E., Burman, M., Rees, R.W., Lynch, A.M., 2008. Evaluation of the Litron In Vitro MicroFlow® Kit for the

- flow cytometric enumeration of micronuclei (MN) in mammalian cells. *Mutat Res.* 654, 76-81.
- Demirbas, A., 2009. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energ Convers Manage.* 50, 14-34.
- Donnelly, K.C., Brown, K.W., Anderson, C.S., Barbee, G.C., Safe, S.H., 1990. Metabolism and bacterial mutagenicity of binary mixtures of benzo(a)pyrene and polychlorinated aromatic hydrocarbon. *Environ Mol Mutagen.* 16, 238–245.
- EPA (Environmental Protect Agency), 1990. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-solid extraction and hplc with coupled ultraviolet and fluorescence detection. Method 550.1, July, 1990.
- EPA (Environmental Protect Agency), 2010. Renewable Fuel Standard Program (RFS2) Regulatory Impact Analysis. EPA-420-R-10-006, February, 2010.
- Fernández-Álvarez, P., Vila, J., Garrido, J.M., Grifoll, M., Feijoo, G., Lema, J.M., 2007. Evaluation of biodiesel as bioremediation agent for the treatment of the shore affected by the heavy oil spill of the Prestige. *J Hazard Mater.* 147, 914–922.
- Flamand, N., Marrot, L., Belaidi, J.-P., Bourouf, L.; Dourille, E., Feltes, M., Meunier, J.-R., 2006. Development of genotoxicity test procedures with Episkin®, a reconstructed human skin model: Towards new tools for *in vitro* risk assessment of dermally applied compounds? *Mutat Res.* 606, 39-51.
- Flückiger-Isler, S., Baumeister, M., Braum, K., Gervais, V., Hasler-Nguyen, N., Reimann, R., Van Gompel, J., Wunderlich, H-G., Engelhardt, G. 2004. Assessment of the performance of the Ames IITM assay: a collaborative study with 19 coded compounds. *Mutat Res.* 558, 181-197.

- Gallego, J.L.R., Loredó, J., Llamas, J.F., Vázquez, F., Sánchez, J., 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation* 12, 325-335.
- He, C., Ge, Y., Tan, J., You, K., Han, X., Wang, J., 2010. Characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons emissions of diesel engine fueled with biodiesel and diesel. *Fuel* 89, 2040-2046.
- Hu, Z., Tan, P., Yan, X., Lou, D., 2008. Life cycle energy, environment and economic assessment of soybean-based biodiesel as an alternative automotive fuel in China. *Energy* 33, 1654-1658.
- Janaun, J., Ellis, N., 2010. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. *Renew Sust Energ Rev* 14, 1312-1320.
- Kado, N.Y., Landley, D., Eisenstadt, E., 1983. A simple modification of the *Samonella* liquidincubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat Res.* 121, 25-32.
- Kamber, M., Flückiger-Isler, S., Engelhardt, G., Jaeck, R., Zeiger, E., 2009. Comparison of the Ames II and tradicional Ames test responses with respect to mutagenicity strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity. *Mutagenesis* 24, 359-366.
- Kang, J., Price, W.E., 2009. Occurrence of phytoestrogens in municipal wasterwater and surface waters. *J Environ Monit.* 11, 1477-1483.
- Karavalakis, G., Stournas, S., Bakeas, E., 2009. Effects of diesel/biodiesel blends on regulated and unregulated pollutants from a passenger vehicle operated over the European and the Athens driving cycles. *Atmosph. Environ.* 43, 1745-1752.

- Klein, C.B., King, A.A., 2007. Genistein genotoxicity: Critical considerations of *in vitro* exposure dose. *Toxicol Appl Pharmacol.* 224, 1-11.
- Kulling, S.E, Metzler, M., 1997. Induction of Micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese Hamster V79 cells by phytoestrogen coumoestrol. *Food Chem Toxicol.* 35, 605-613.
- Kuster, M., Azevedo, D.A., López de Alda, M.J., Aquino Neto, F.R., Barceló, D., 2009. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental water from Rio de Janeiro (Brazil). *Environ Int.* 35, 997-1003.
- Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat Res.* 682, 71-81.
- Liu, Z.-H., Kanjo, Y., Mizutani, S., 2010. A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment. *Water Res.* 44, 567-577.
- Marin-Morales, M.A., Leme, D.M., Mazzeo, D.E.C., 2009. A review of the hazardous effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on living organisms. in: Haines, P.A., Hendrickson, M.D. (Eds.). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Pollution, Health and Chemistry*, Nova Science Publishers Inc., 2009, pp.2-49.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 113, 173-214.
- Metzler, M., Kulling, S.E., Pfeiffer, E., Jacobs, E., 1998. Genotoxicity of estrogens. *Z. Lebensm Unters Forsch A* 206, 367-373.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 455, 29-60.
- Mudge, S.M., Pereira, G., 1999. Stimulating the biodegradation of crude oil with biodiesel preliminary results. *Spill Sci Technol B.* 5, 353-355.

- Mumtaz, M.M., George, J.D., Gold, K.W., Cibulas, W., DeRosa, C.T., 1996. ATSDR evaluation of health effects of chemicals. IV. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): understanding a complex problem. *Toxicol Ind Health* 12, 742-971.
- Mun, G.C., Aardemab, M.J., Hub, T., Barnett, B., Kaluzhnyd, Y., Klausnerd, M., Karetskyd, V., Dahla, E.L., Currena, R.D., 2009. Further development of the EpiDerm™ 3D reconstructed human skin micronucleus (RSMN) assay. *Mutat Res.* 673, 92-99.
- Nicodem, D.E., Guedes, C.L.B., Correa, R.J., 1998. Photochemistry of petroleum. I. systematic study of brazilian intermediate crude oil. *Mar Chem.* 63, 93-104.
- NTP (National Toxicology Program), 2004. 11th Report on Carcinogens. Substances Profiles: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons 15 Listings. <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/toc11.html>.
- Nüsse, M., Beisker, W., Kramer, J., Miller, B., Schreiber, G., Viaggi, S., Weller, E., Wessels, J., 1994. Measurement of micronuclei by flow cytometry. *Methods Cell. Biol.* 42, 149-158.
- Nüsse, M., Mark, K., 1997. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages. *Mutat Res.* 392, 109-115.
- Oris, J.T., Giesy, J.P., 1985. The photoenhanced toxicity of anthracene to juvenile sunfish (*Lepomis* spp.). *Aquat Toxicol.* 6, 133-146.
- Paniagua-Pérez, R., Madrigal-Bujaidar, E., Reyes-Cadena, S., Molina-Jasso, D., Gallaga, J.P., Silva-Miranda, S., Velazco, O., Hernández, N., Chamorro, G., 2005. Genotoxic and Cytotoxic Studies of Beta-Sitosterol and Pteropodine in Mouse. *J Biomed Biotechnol.* 3, 242-247.

- Pereira, M.G., Mudge, S.M., 2004. Cleaning oiled shores: laboratory experiments testing the potential use of vegetable oil biodiesels. *Chemosphere* 54, 297–304.
- Ribeiro, L.R., 2003. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. in: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. (Eds.). *Mutagênese Ambiental*, Canoas, Ulbra, 2003, pp.201-219.
- Richardson, S.D., 2009. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal Chem.* 81, 4645-4677.
- SBMCTA (Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental), 2010. Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella*/microsoma).
- Schirmer, K., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., Bols, N.C., 1998. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology* 127, 129-141.
- Shi, J., Bezabhe, R., Szkudlinska, A., 2010. Further evaluation of flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K₁ cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis* 25, 33-40.
- Shi, Q., King, R.W., 2005. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* 437, 1038-1042.
- Speit, G., 2009. How to assess the mutagenic potential of cosmetic products without animal tests? *Mutat Res.* 678, 108-112.
- Stopper, H., Schimitt, E., Kobras, K., 2005. Genotoxicity of phytoestrogens. *Mutat Res.* 574, 139-155.
- Taylor, L.T., Jones, D.M., 2001. Bioremediation of coal tar PAH in soil using biodiesel. *Chemosphere* 44, 1131-1136.

- Umbuzeiro, G.A., Rech, C.M., Correia, S., Bergamasco, A.M., Cardenette, G.H.L., Flückiger-Isler, S., Kamber, M., 2010. Comparison of the Salmonella/microsome microsuspension assay with the new microplate fluctuation protocol for testing the mutagenicity of environmental samples. *Environ Mol Mutagen.* 51, 31-38.
- Umbuzeiro, G.A., Vargas, V.M.F., 2003. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. in: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. (Eds.). *Mutagênese Ambiental*, Canoas, Ulbra, 2003, pp.81-112.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat Res.* 631, 36-43.
- Virgilio, A.L.D., Iwami, K., Wätjen, W., Kahl, R., Degen, G.H., 2004. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicol Lett.* 151, 151-162.
- White, P.A., 2002. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutat Res.* 515, 85-98.
- Xenometrix, 2009. Newsletter, Issue 4, October 2009. http://www.xenometrix.ch/fileadmin/xenometrics/pdf/Weak_mutagens_in_the_Ames_II_Ames_MPF_assay.pdf.
- Yang, H.-H., Chien, S.-M., Lo, M.-Y., Lan, J. C.-W., Lu, W.-C., Ku, Y.-Y., 2007. Effects of biodiesel on emissions of regulated air pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons under engine durability testing. *Atmosph Environ.* 41, 7232-7240.

Table 1. PAHs detected in water samples from the spill simulations performed.

PAHs ($\mu\text{g/L}$)	WC	B5	B20	B50	D100	B100
naphthalene	0.7	344.6	313.9	287.6	365.7	2.2
acenaphthylene	0.2	22.6	20.7	16.9	23.3	1.4
fluorene	0.3	160.7	155.7	117.3	193.2	2.6
phenanthrene	1.3	221.2	217.5	168.3	232.5	9.9
anthracene	0.3	2.4	2.2	2.2	3.4	2.1
fluoranthene	0.3	3.7	3.3	3.4	3.7	1.3
pyrene	1.1	13.3	11.8	11.8	16.2	2.8
benzo(a)anthracene	0.2	0.9	1.7	1.7	1.9	0.4
chrysene	nd	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
benzo(e)pyrene	nd	nd	nd	nd	0.2	nd
benzo(e)acefenantrylene	nd	0.6	0.5	0.2	0.9	nd
benzo(k)fluoranthene	nd	nd	nd	nd	nd	nd
benzo(a)pyrene	nd	nd	nd	nd	nd	nd
dibenzo(a,h)anthracene	nd	nd	nd	nd	nd	nd
benzo(g,h,i)perilene	nd	nd	nd	nd	nd	nd
indene(123-cd)pyrene	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Σ PAHs	4.4	770.1	706.7	609.5	841.14	22.81

WC = water control; nd = not detected (below detection limit)

Table 2. Results of water samples extracts analyzed by Ames MPF Assay.

MPF protocol																	
Positive wells per microplate																	
Sample	Doses	TA98				TA100				TA1535				TA1537			
		-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
		Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB
WC	0	6.33±2.31		1.00±1.15		3.78±2.82		2.00±2.00		1.00±0.50		1.00±0.58		2.67±2.24		1.00±0.53	
	0.02	7.33±3.06	0.85	1.00±0.00	0.55	1.33±0.58	0.40	2.33±0.58	0.58	1.33±1.15	1.33	0.67±0.58	0.33	2.33±2.31	0.48	0.67±0.58	0.67
	0.2	8.00±1.00	0.93	1.00±1.00	0.55	1.00±0.00	0.25	2.67±3.79	0.67	0.67±1.15	0.67	0.00±0.00	0.33	3.00±1.00	0.61	0.50±0.71	0.50
	2	6.33±1.15	0.73	2.33±1.53	1.28	2.67±2.89	0.40	1.33±1.53	0.33	0.67±0.58	0.67	0.67±0.58	0.67	2.67±1.53	0.54	1.00±1.00	1.00
	20	8.67±4.73	1.00	2.33±2.08	1.28	1.67±0.58	0.25	1.33±1.15	0.33	1.50±0.71	1.50	0.33±0.58	0.00	2.67±1.53	0.54	0.67±0.58	0.67
	200	10.00±1.00	1.16	1.33±1.53	0.73	2.67±0.58	0.40	1.33±1.15	0.33	0.00±0.00	0.00	0.33±0.58	0.67	2.67±0.58	0.54	1.67±0.58	1.67
	PC	37.67±0.58		48.00±0.00		48.00±0.00		39.00±8.66		48.00±0.00		19.33±1.53		42.33±4.04		26.67±3.21	
B100	0	6.33±0.58		2.67±1.15		2.56±2.19		1.33±1.12		1.00±0.50		1.00±0.84		2.67±2.24		1.00±0.53	
	0.02	6.67±1.53	0.96	0.67±0.58	0.17	3.33±1.15	0.70	0.67±1.15	0.27	0.67±0.58	0.67	0.00±0.00	0.00	2.00±1.00	0.41	0.67±0.58	0.67
	0.2	8.33±3.51	1.21	2.67±0.58	0.70	2.67±1.53	0.56	1.00±1.73	0.41	0.33±0.58	0.33	0.00±0.00	0.00	1.67±1.53	0.34	2.67±1.15	2.67
	2	6.33±4.04	0.92	0.67±0.58	0.17	1.67±1.15	0.35	1.00±1.00	0.41	0.67±0.58	0.67	0.00±0.00	0.00	2.33±1.53	0.48	1.00±1.00	1.00
	20	6.67±4.62	0.96	3.33±0.58	0.87	3.67±1.53	0.77	0.33±0.58	0.14	0.33±0.58	0.33	0.33±0.58	0.25	3.00±1.00	0.61	1.33±0.58	1.33
	200	6.67±0.58	0.96	1.33±1.53	0.35	4.00±1.00	0.84	0.67±0.58	0.27	1.33±0.58	1.33	0.33±0.58	0.25	2.00±1.00	0.41	1.00±1.00	1.00
	PC	35.33±5.51		48.00±0.00		45.67±1.15		35.00±3.61		48.00±0.00		16.67±3.21		43.67±2.31		25.67±4.93	
D100	0	5.33±1.15		1.67±1.53		2.56±2.19		1.33±1.12		1.00±0.50		1.00±0.84		2.67±2.24		1.00±0.53	
	0.02	6.33±3.21	0.98	3.00±2.00	0.94	1.33±1.53	0.28	1.33±1.53	0.41	1.33±0.58	1.33	1.33±1.53	1.00	0.33±0.58	0.07	0.33±0.58	0.33
	0.2	3.33±0.58	0.51	0.67±0.058	0.21	1.33±0.58	0.28	1.00±1.00	0.41	1.67±0.58	1.67	0.33±0.58	0.25	0.67±0.58	0.14	0.67±0.58	0.67

	2	3.67±0.58	0.57	4.00±2.00	1.25	1.00±0.00	0.21	0.00±0.00	0.00	1.00±1.00	1.00	0.67±0.58	0.50	0.33±0.58	0.07	0.00±0.00	0.00
	20	6.00±1.73	0.92	3.00±2.00	0.94	2.33±2.08	0.49	1.00±1.00	0.41	0.33±0.58	0.33	0.00±0.00	0.00	4.33±2.31	0.88	0.33±0.58	0.33
	200	9.67±3.79	1.49	1.67±2.08	0.52	3.67±2.08	0.77	1.00±1.00	0.54	0.33±0.58	0.33	0.33±0.58	0.25	3.33±1.53	0.68	0.67±0.58	0.67
	PC	40.00±5.29		48.00±0.00		47.67±0.58		39.00±3.00		48.00±0.00		16.67±3.21		48.00±0.00		25.67±4.93	
B5	0	10.00±1.00		2.33±0.58		2.56±2.19		1.33±1.12		1.00±1.01		1.00±0.82		1.11±1.36		1.00±0.53	
	0.02	6.67±4.51	0.61	1.33±0.58	0.46	5.00±2.65	1.05	0.67±0.58	0.27	0.00±0.00	0.00	0.33±0.58	0.22	0.33±0.58	0.13	0.67±0.58	0.67
	0.2	7.00±2.00	0.64	0.67±0.58	0.57	5.00±4.36	1.05	0.33±0.58	0.14	1.33±0.58	0.91	0.33±0.58	0.22	0.00±0.00	0.00	0.67±0.58	0.67
	2	8.67±1.15	0.79	1.67±0.58	0.23	2.67±2.89	0.56	0.00±0.00	0.00	0.67±0.58	0.46	0.67±0.58	0.45	0.00±0.00	0.00	0.33±0.58	0.33
	20	10.67±2.08	0.97	3.50±0.71	1.20	1.67±1.15	0.35	1.67±0.58	0.68	1.33±0.58	0.91	0.33±0.58	0.22	0.00±0.00	0.00	0.67±0.58	0.67
	200	3.67±1.53	0.33	3.33±1.53	1.15	3.00±3.61	0.63	0.67±0.58	0.27	0.67±1.15	0.46	0.33±0.58	0.22	0.33±0.58	0.13	0.67±1.15	0.67
	PC	40.00±1.00		48.00±0.00		48.00±0.00		34.67±1.15		48.00±0.00		15.33±2.31		48.00±0.00		26.67±3.21	
B20	0	6.67±1.53		2.67±1.15		3.78±2.82		1.00±0.55		1.00±1.01		1.00±0.82		1.11±1.36		1.00±0.53	
	0.02	6.00±1.73	0.73	1.33±0.58	0.35	3.00±2.65	0.45	1.33±0.58	1.27	0.33±0.58	0.23	0.33±0.58	0.22	1.33±1.15	0.54	0.00±0.00	0.00
	0.2	6.00±0.00	0.73	0.67±0.58	0.17	2.00±1.73	0.30	1.00±1.00	0.95	0.67±0.58	0.46	0.00±0.00	0.22	0.00±0.00	0.00	0.67±0.58	0.677
	2	8.00±6.08	0.98	2.00±2.00	0.52	4.67±4.04	0.71	0.33±0.58	0.32	0.00±0.00	0.00	0.33±0.58	0.22	0.33±0.58	0.13	0.33±0.58	0.33
	20	8.67±3.06	1.06	1.00±1.00	0.26	1.67±0.58	0.25	0.33±0.58	0.32	2.00±1.00	1.37	0.00±0.00	0.00	0.33±0.58	0.13	1.00±1.00	1.00
	200	10.00±1.73	1.22	1.00±1.73	0.26	3.33±1.53	0.51	0.33±0.58	0.32	0.67±0.58	0.46	0.33±0.58	0.22	0.33±0.58	0.13	0.33±0.58	0.33
	PC	38.33±3.21		48.00±0.00		48.00±0.00		30.33±4.16		48.00±0.00		19.33±2.31		46.33±2.08		25.67±4.93	
B50	0	6.33±2.31		1.00±1.15		3.78±2.82		1.00±0.55		1.00±1.01		1.00±0.82		1.11±1.36		1.00±0.53	
	0.02	6.67±2.08	0.77	2.33±1.53	1.28	2.67±0.58	0.40	0.33±0.58	0.00	1.67±1.15	1.14	0.67±1.15	0.45	1.33±2.31	0.27	0.33±0.58	0.33
	0.2	6.00±1.73	0.69	2.67±1.15	1.46	2.00±1.00	0.30	1.67±0.58	0.64	0.33±0.58	0.23	0.00±0.00	0.00	1.33±0.58	0.54	0.67±0.58	0.67
	2	8.00±2.65	0.93	2.00±1.00	1.10	1.67±0.58	0.25	0.67±0.58	0.64	2.00±0.00	1.37	0.33±0.58	0.22	1.33±0.58	0.54	0.33±0.58	0.33
	20	7.33±4.04	0.85	0.67±1.15	0.37	3.67±2.08	0.56	0.67±1.15	1.59	0.33±0.58	0.23	0.00±0.00	0.00	0.67±1.15	0.27	0.67±0.58	0.67
	200	6.33±3.06	0.73	2.00±2.65	1.10	4.33±4.04	0.66	0.00±0.00	0.32	0.33±0.58	0.23	0.33±0.58	0.22	0.67±1.15	0.27	0.00±0.00	0.00

PC	37.67±0.58	48.00±0.00	48.00±0.00	36.00±2.65	48.00±0.00	19.33±2.31	42.33±1.15	25.67±4.93
-----------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

FIB = fold induction over baseline (baseline = mean zero-dose control + 1SD). SD = standard deviation. Doses = mL equivalent per plate.

PC = positive controls. Values in bold indicates FIB greater than 2.

Table 3. Results of water sample extracts analyzed by *Salmonella*/microsome preincubation assay.

Preincubation protocol									
Revertants per plate									
Sample	Doses	TA98		TA100		TA1535		TA1537	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
		Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
WC	0	26.80±6.30	33.20±3.63	189.40±9.45	162.33±3.79	8.50±2.12	7.5±0.71	6.50±2.12	7.00±2.83
	0.02	36.00±0.00	26.00±9.54	177.33±7.23	159.33±14.01	9.50±3.54	6.5±3.54	10.00±2.83	8.00±2.83
	0.2	30.33±3.79	21.27±7.57	179.67±14.64	156.00±1.41	13.00±5.66	5.05±0.71	10.00±2.83	7.00±4.24
	2	25.67±10.02	23.67±1.53	184.67±16.65	166.00±1.00	11.00±2.83	7.5±2.12	7.50±0.71	4.00±1.41
	20	37.33±3.51	25.00±4.36	183.33±7.37	160.00±6.56	11.00±1.41	5.00±2.83	5.50±2.12	8.00±4.24
	200	33.33±3.51	24.67±4.51	191.67±13.58	156.67±8.08	15.50±3.54	4.00±0.00	7.00±0.00	10.50±3.54
	PC	668.00±96.16	548.00±130.10	430.00±65.05	1772±96,16	1140.50±37.48	1194.50±21.92	1184.00±124.45	928.00±305.47
B100	0	26.80±6.30	33.20±3.63	129.60±12.78	162.33±3.79	8.50±2.12	7.50±0.71	6.50±2.12	7.00±2.83
	0.02	24.33±2.31	22.27±4.51	182.33±6.51**	149.00±0.00	15.50±4.95	6.00±0.00	7.00±2.83	4.00±1.41
	0.2	25.67±2.52	24.33±5.77	191.67±11.50**	150.00±0.00	16.50±3.54	6.50±0.71	4.00±1.41	3.50±2.12
	2	28.00±6.56	21.00±6.56	201.33±11.50**	150.50±0.71	12.50±6.36	5.00±1.41	6.00±4.24	3.50±2.12
	20	24.00±3.61	22.67±3.06	232.67±22.03**	151.67±2.31	10.50±3.54	8.00±4.24	8.50±0.71	6.50±0.71
	200	25.33±4.93	25.33±7.51	134.00±1.00	151.67±5.13	11.00±9.9	5.50±0.71	7.50±0.71	5.00±2.83
	PC	668.00±96.16	548.00±130.10	824.00±96.70	1772±96,16	1140.50±37.48	1194.50±21.92	1184.00±124.45	928.00±305.47
D100	0	16.00±3.46	21.60±6.15	136.00±13.95	162.33±3.79	8.50±2.12	7.50±0.71	6.50±2.12	7.00±2.83
	0.02	17.67±5.03	19.33±4.16	126.33±3.51	156.00±9.85	6.50±0.71	5.50±3.54	9.50±7.78	4.00±1.41
	0.2	18.33±4.51	15.67±4.51	137.67±15.04	153.33±13.65	9.00±1.41	3.50±0.71	8.50±4.95	6.00±1.41

	2	23.33±5.69	20.00±0.00	130.67±10.07	156.00±0.00	10.00±1.41	7.00±1.41	6.50±0.71	5.50±2.12
	20	16.00±4.58	18.33±3.06	128.67±4.04	165.67±8.02	10.00±1.41	6.00±0.00	5.00±0.00	3.00±0.00
	200	21.67±2.89	22.67±4.62	139.33±11.59	168.00±8.54	11.00±4.24	7.00±2.83	7.50±2.12	4.00±2.83
	PC	408.00±90.51	404.00±39.59	479.00±137.17	1772±96,16	1140.50±37.48	1194.50±21.92	1184.00±124.45	928.00±305.47
B5	0	16.40±4.72	21.60±6.15	118.80±8.93	162.33±3.79	8.50±2.12	7.50±0.71	6.50±2.12	7.00±2.83
	0.02	17.33±8.50	19.67±4.51	117.00±25.98	160.00±5.66	7.50±0.71	6.00±2.83	5.50±0.71	8.50±4.95
	0.2	14.00±2.65	24.33±11.68	130.33±13.28	152.00±0.00	9.00±1.41	7.50±2.12	7.00±2.83	4.50±2.12
	2	7.67±1.15	30.33±6.51	125.00±9.17	170.67±2.08	11.00±4.95	5.50±4.95	8.00±4.24	6.50±0.71
	20	14.33±2.52	30.00±6.24	140.00±0.00	169.00±7.81	8.5±2.12	5.50±2.12	10.50±0.71	7.50±2.12
	200	13.33±4.51	26.00±3.00	124.67±28.88	150.00±4.24	13.00±2.83	8.50±2.12	9.50±2.12	8.50±0.71
	PC	680.00±45.25	404.00±39.59	468.00±96.16	1772±96,16	1140.50±37.48	1194.50±21.92	1184.00±124.45	928.00±305.47
B20	0	28.40±5.73	21.60±6.15	197.80±14.39	156.00±13.04	8.50±2.12	7.50±0.71	6.50±2.12	7.00±2.82
	0.02	54.67±36.59	17.00±4.00	196.00±13.00	161.00±8.49	7.50±2.12	5.50±0.71	11.00±5.66	5.00±4.24
	0.2	28.33±5.86	17.67±6.43	192.67±13.32	136.50±2.12	10.00±1.41	5.50±2.12	8.00±0.00	5.00±2.83
	2	34.00±6.08	19.00±0.00	197.67±29.37	151.00±3.46	17.00±2.83	10.00±1.41	7.00±1.41	5.50±3.54
	20	28.00±7.00	19.67±1.53	206.67±10.69	140.00±1.41	8.50±0.71	9.00±2.83	9.00±0.00	6.50±3.54
	200	27.67±8.33	19.33±1.53	191.67±5.51	132.67±4.73	12.00±1.41	4.50±0.71	8.5±2.12	6.50±2.12
	PC	732.00±16.97	404.00±39.59	406.00±37.77	1772±96,16	1140.50±37.48	1194.50±21.92	1184.00±124.45	928.00±305.47
B50	0	28.40±5.73	33.20±3.63	197.80±14.39	156.00±13.04	8.50±2.12	7.50±0.71	6.50±2.12	7.00±2.83
	0.02	31.33±12.10	23.33±7.02	167.00±25.12	152.00±0.00	5.00±1.41	7.50±0.71	8.50±3.54	9.00±5.66
	0.2	33.33±5.51	25.33±4.73	159.33±9.07	154.50±0.71	11.50±0.71	7.50±2.12	8.00±5.66	7.00±0.00
	2	31.00±6.93	22.33±6.43	149.33±4.51	159.50±4.95	13.50±3.54	6.50±0.71	8.00±0.00	7.00±2.83
	20	22.00±0.00	16.67±14.05	148.33±32.35	154.33±12.01	11.00±4.24	9.00±0.00	10.00±2.83	8.00±1.41
	200	51.33±28.93	19.67±4.04	149.67±9.24	148.00±9.90	15.00±2.83	7.00±4.24	7.00±5.66	12.00±1.41

PC	732.00±16.97	548.00±130.10	406.00±37.77	1772±96,16	1140.50±37.48	1194.50±21.92	1184.00±124.45	928.00±305.47
-----------	--------------	---------------	--------------	------------	---------------	---------------	----------------	---------------

Doses = mL equivalent per plate. PC = positive controls. SD = standard deviation. * p<0.05, ** p<0.01 according to Bernstein model.

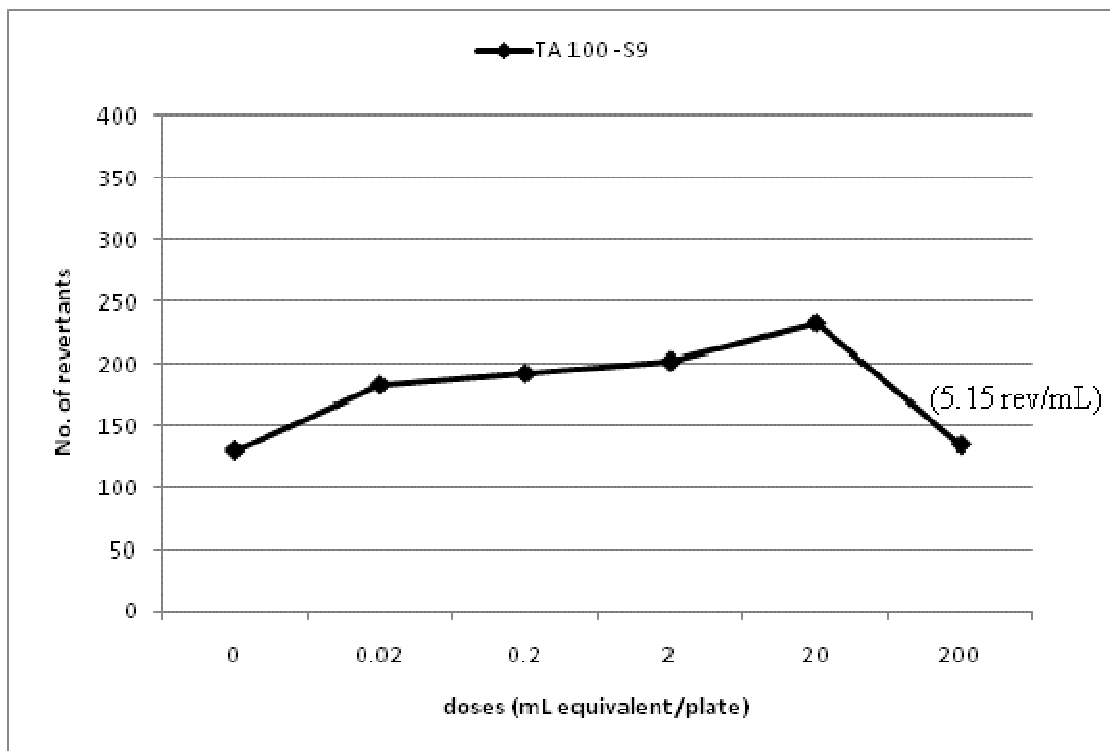


Figure 1. Dose-response curve for B100 water extract tested with the *Salmonella* strain TA100 in the absence of S9 by the preincubation protocol. Number in parenthesis represents the potency of the tested sample, expressed in number of revertants per mL, which was calculated according to De Flora et al. (1984).

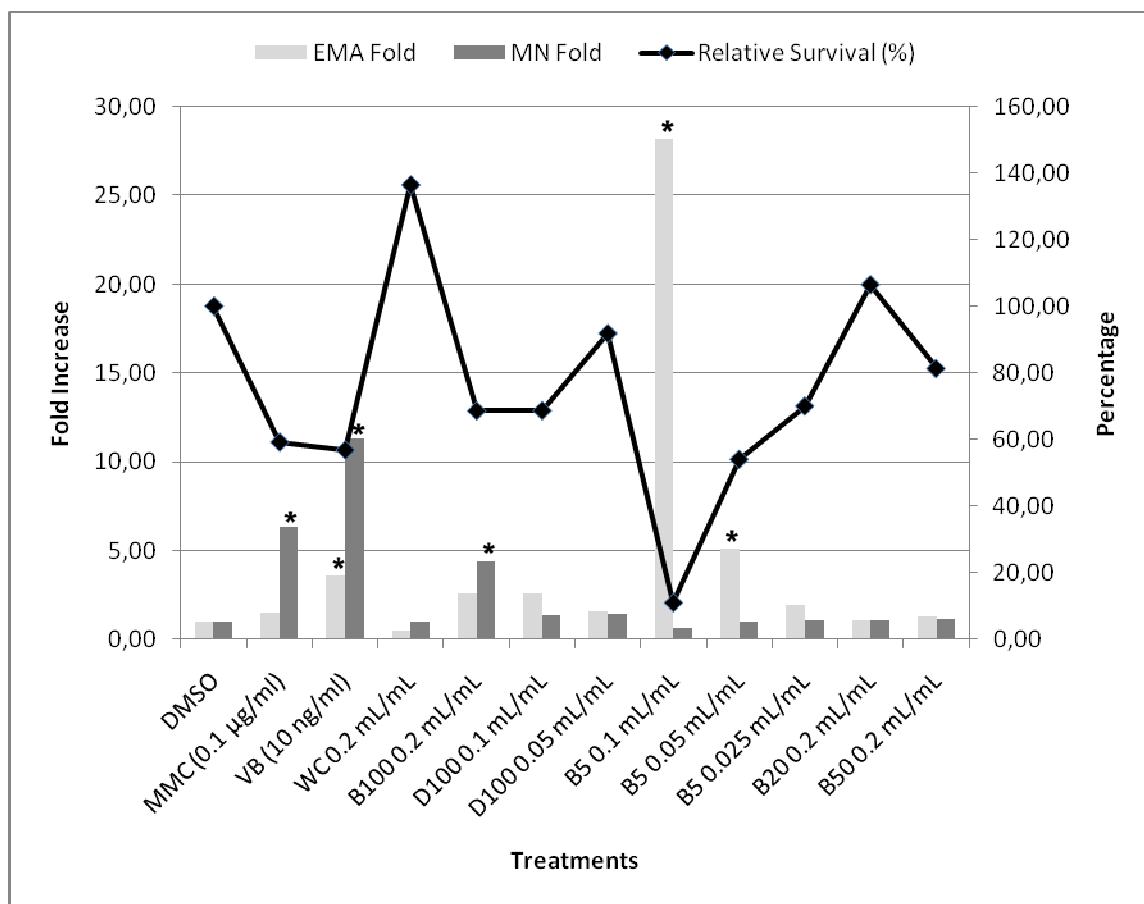


Figure 2. Mutagenicity and cytotoxicity data of flow cytometry-based *in vitro* MN assay are graphed for the samples studied. The Y-axis shows fold increase values of EMA+ and MN. The YY-axis showed the percentage of Relative Survival. * ≥ 3 -fold over the concurrent solvent control value (DMSO).

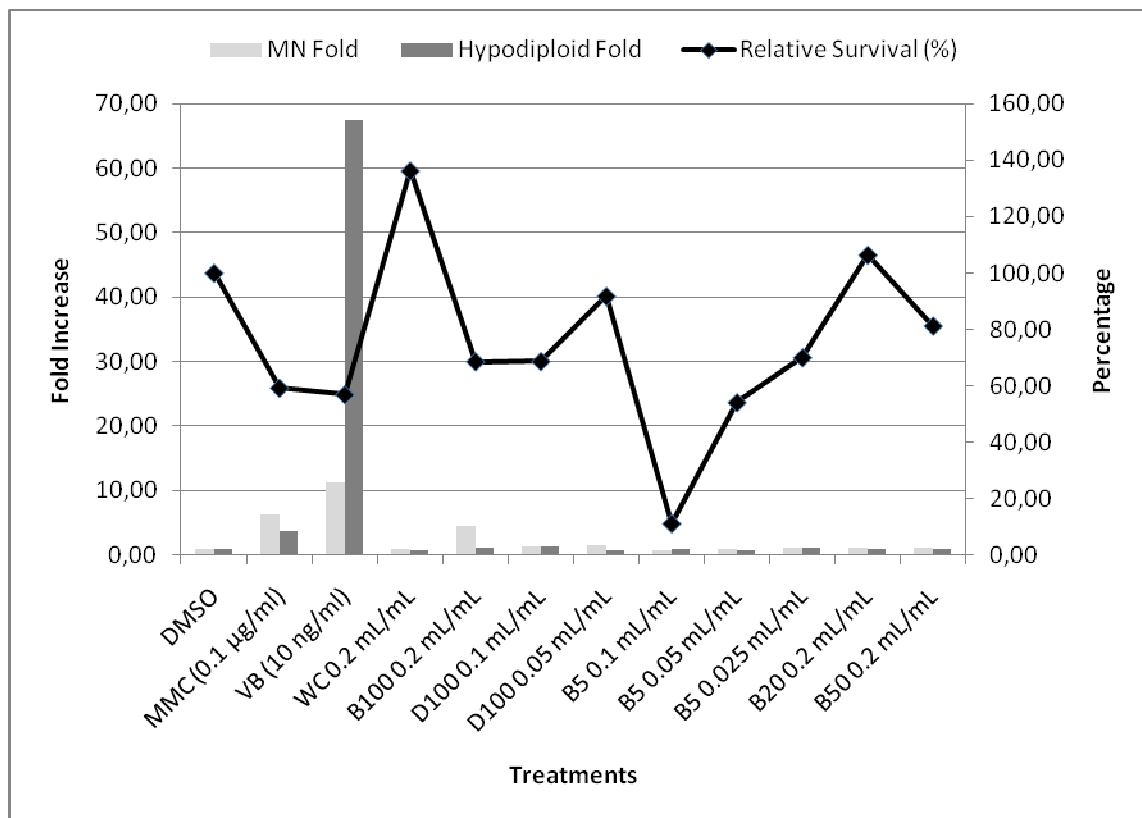


Figure 3. Hypodiploid events as aneugenic signature in flow cytometry-based MN assay. VB and MMC were used as aneugenic and clastogenic positive controls, respectively. The Y-axis shows fold increase values MN and hypodiploid events. The YY-axis showed the percentage of Relative Survival.

ARTIGO 3***In vitro* cytotoxicity assessment of biodiesel and its diesel blends in cases of water pollution**

Daniela Morais Leme¹, Tamara Grummt², Rita Heinze², Andrea Sehr², Matthias Skerswetat², Mary Rosa Rodrigues de Marchi³, Marcos Canto Machado³, Danielle Palma de Oliveira⁴, *Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Biology Department, Univ Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, 13506-900, Brazil.

²Federal Environment Agency, Bad Elster Branch, Heinrich-Heine-Str. 12, Bad Elster, 08645, Germany.

³Institute of Chemistry, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, 14800-900, Brazil.

⁴Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Av. do Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto/SP-Brazil.

*Corresponding author: Av. 24 A, 1515, Bela Vista, 13506-900, Rio Claro/SP-Brazil. e-mail: mamm@rc.unesp.br, TEL. +55 19 35264143, FAX. +55 19 35360009.

Submetido a Environmental and Molecular Mutagenesis (Fator de Impacto 2,868)

Abstract

Biodiesel is viewed as a viable alternative fuel to petroleum-based diesel, since it is categorized as a clean-burning alternative fuel produced from renewable resources. As a green fuel, biodiesel is becoming more and more commercialized and its fate in the environment is an area of concern. Fuel spills constitute a major source of aquatic pollution and, like diesel spills, biodiesel can produce deleterious effects on aquatic environments. The present study assessed cytotoxic effects of water systems contaminated with neat biodiesel and its diesel blends by means of different procedures: detection of changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) using tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE), apoptosis recognition by Annexin V and impedance real-time cell analyzer (xCELLigence™ system). The data obtained showed an agreement among all bioassays accomplished and cytotoxic effects were spotted in a dose-dependent response only for D100 and B5 samples. Based on this, we can hypothesize that diesel is responsible for the harmful effects observed and biodiesel does not worsen the impacts caused by diesel pollution.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, cell proliferation and viability, cell death process, apoptosis, necrosis.

1. Introduction

Man-made products released into the environment are currently a great concern, due to disorders caused to aquatic systems and human health. Several chemicals can reach the aquatic resources every day by different ways, which comprise from routine use to accidental spills. A better understanding between the relationship between water quality and living organisms' life makes the assessment of water impacts to assure its quality essential.

Biodiesel seems to be a reasonable alternative to diesel fuel, since it is produced from renewable resources and has lower exhaust emissions than conventional petroleum diesel (Yang et al., 2007; Hu et al., 2008; Karavalakis et al., 2009; Demirbas, 2009; Janaun and Ellis, 2010; Atadashi et al., 2010; EPA, 2010; He et al., 2010). As a green fuel, biodiesel is becoming more and more commercialized, mainly in diesel blends, since its use in diesel engines is still a problem (Haşimoğlu et al., 2008). However, even though it has been considered an environmental-friendly fuel so far, there are few studies related to biodiesel impacts upon other biotic systems, e.g. aquatic systems. Taking the continuous development of the biodiesel industry into account, the environmental fate and hazard of this biofuel, as well as their diesel blends, should be assessed to avoid deleterious impacts on living beings.

It is well known that hazardous contaminants can damage organisms through multiple mechanisms, including cytotoxic pathways. Cytotoxicity is characterized by induction of damages to cellular structure and/or function, which can lead to cell cycle and physiology disorders, resulting, in some cases, in cell death processes (Marin-Morales et al., 2009). Apoptosis and necrosis are two models of cell death with distinct morphological and biochemical features (Robertson and Orrenius, 2002). Even though

these processes play a transcendental role in removing damaged cells, they are also involved in environment-associated disease, such as Alzheimer, Parkinson, cardiovascular disease etc (Franco et al., 2009).

Several bioassays are employed to cytotoxicity screening of chemical pollutants and assay choices should be related to the purpose of the trial. The disruption of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) marks the point-of-no-return during apoptosis and precedes nuclear DNA degradation (Castedo et al., 2002; Jayaraman, 2005). Assessment of $\Delta\Psi_m$ is a sensitive indicator for the energetic state of mitochondria and cell (Rottenberg and Wu, 1998), besides being an indication of apoptosis induction (Castedo et al., 2002; Jayaraman, 2005). The $\Delta\Psi_m$ has been successfully measured by rhodamine derivatives, such as tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE), in intact cells by flow cytometry (Jayaraman, 2005; King et al., 2007; Jacob et al., 2009; Gupta et al., 2010). TMRE is fluorescent lipophilic cation accumulated by mitochondria in proportion to $\Delta\Psi_m$. Upon accumulation, this dye exhibits a red shift (Scaduto and Grotyohann, 1999) and fluorescence quenching corresponds to depolarization (O'Reilly et al., 2003).

Translocation of phosphatidylserine (PS) from inner to outer leaflet of plasma membrane (PM) is another characteristic event of the apoptosis process at an early stage (Vermes et al., 1995; Engeland et al., 1998). Annexin V is a Ca^{2+} dependent phospholipid-binding protein with high affinity to PS, which allows its use as a sensitive probe for PS externalization (Raynal and Pollard, 1994; Vermes et al., 1995; Engeland et al., 1998). Although PS exposure characterizes an apoptotic event, it is not exclusive and can also occur during necrosis. However, unlike necrosis, at initial stages of apoptosis, the PM remains intact even after PS externalization. To avoid this

problem, measurements of Annexin V binding to cell surface is normally performed in conjunction with a vital dye, e.g. propidium iodide (PI) (Vermees et al., 1995). The combination of Annexin V and PI allows for an accurate analysis as regards quantification of cells undergoing earlier stages of apoptosis and necrotic cells.

Usually, *in vitro* assays for cell proliferation and viability are commonly based on a single endpoint qualitative measure of cell fitness (Urcan et al., 2010), which eventually also require lysis of cells (Schmitz et al., 2009). The xCELLigence™ system (Roche Applied Science and ACEA Biosciences) is a new non-invasive label-free tool used to assess cell proliferation, viability and cytotoxicity in adherent cells by electrical impedance analyses in real-time (Seiler et al., 2009; Schmitz et al., 2009; Keogh, 2010; Urcan et al., 2010). The test is performed in 96-well format and impedance is generated by the interaction of cells with a microelectrode biosensor (Seiler et al., 2009).

The increasing use of both biodiesel and its diesel blends, and possible environmental releases, makes the assessment of their hazardous effects on aquatic systems a major issue. Spill simulations in water containing biodiesel and its diesel blends were carried out in the present study to evaluate the cytotoxic effects of water contaminated with these fuels. For this purpose, the *in vitro* assays TMRE $\Delta\Psi_m$ detection, Annexin V-FITC/PI apoptosis detection and real-time cell impedance analyzer were used.

2. Material and Methods

2.1. Experiments and Sample Preparation Procedures

The diesel and biodiesel used in this study were kindly provided by BioVerde (biofuel company), Taubaté-SP, Brazil.

Spill simulations with diesel and biodiesel and their blends in water were performed according to Nicodem et al. (1998) and Vanzella et al. (2007), in laboratory conditions, with some modifications. Briefly, a concentration of 1.5% of the mixtures B5 (5% biodiesel+95% diesel), B20 (20% biodiesel+80% diesel), B50 (50% biodiesel+50% diesel) and the pure fuels, B100 (biodiesel) and D100 (diesel), were floated over 40 L of non impacted water in distinct glass containers. The simulations were submitted to continuous circulation with submersible water pumps and placed in darkness for 13 h prior to exposure to low-medium solar light for 9 h, simulating spills in tropical conditions. After that, the upper insoluble phase was discharged and the remaining water phase was collected and stored at 4°C to further sample preparation.

The water samples were extracted according to US EPA method 550.1 (EPA, 1990), as following: samples were submitted to solid phase extraction with C-18 cartridge (500 mg/ 6mL, Phenomenex) and eluted with dichloromethane. The extracts obtained were reduced in a rotary evaporator and dried in a gentle stream of pure nitrogen gas. Two samples were treated in parallel: one for chemical analysis and the other for biological assay. For the former, the dry extract was resuspended in acetonitrile and kept at -20°C until HPLC/Flu analysis. For the latter, the dry extracts were kept at 4°C and resuspended in DMSO just before accomplishing the bioassays.

The water used to carry out the simulations was also extracted and designated as water control (WC) to assure its quality.

2.2. *in vitro* Cytotoxicity Bioassays

Cell Culture

Human T cell leukemia (Jurkat) and human hepatocellular carcinoma (HepG2) (all from DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany) were grown in culture medium at 37°C, 5% CO₂, in a humidified atmosphere. For routine culturing, cells were maintained up to 0.5-1.5x10⁶ cells/mL for Jurkat and ~80% of confluency for HepG2. RPMI-1640 medium supplemented with 1% L-glutamine 200 mM and 10% of fetal bovine serum (FBS) and minimum essential EAGLE medium with 1% L-proline and 10% of FBS (all from Sigma) were used, respectively, for Jurkat and HepG2.

Doses sample tested

For all the bioassays carried out in the present study, the tested doses of water extracts were determined based on the highest concentration of 200 mL equivalents of water sample (SBMCTA, 2010). When strong cytotoxicity was observed, lower dilutions were also analyzed.

Determination of $\Delta\Psi_m$

Activation of the mitochondrial apoptosis pathway is accompanied by the release of cytochrome c and breakdown of $\Delta\Psi_m$. To determine the $\Delta\Psi_m$, a cellular suspension of Jurkat was adjusted to 0.3x10⁶ cells/mL with culture medium and then 1 mL aliquots were plated across 24-well plate. Subsequently, the cells were exposed to their respective treatments and incubated for 24 h at 37°C, 5% CO₂ in a humid atmosphere. After the exposure time, cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and incubated with 25 nM of Tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE, CAS No. 115532-52-0, Sigma). The TMRE is membrane permeable and

kationic fluorescent stain, which is diffused into the mitochondria, where fluorescence is quenched. When the membrane potential is reduced, the TMRE also gets in the cytoplasm, and fluorescence is emitted. After a 10-min incubation period at 37°C, cells were analyzed by flow cytometry using FACSCalibur™ (BD Biosciences). In brief, 10000 ungated events were acquired and analyzed using BD CellQuest Pro v.5.2.1 software. Cells loaded with TMRE were excited with a 488-nm argon laser line and analyzed on FL2 channel (585 nm).

The percentage of cells with intact $\Delta\Psi_m$ is given and fold increase over the solvent control (FI) was the criteria used to evaluate these data. FI was determined by dividing the treatment percentage by the percentage obtained to solvent control. A >2-fold increase related to the baseline (solvent control) was classified as positive for that sample treatment, which means that this sample induced changes in $\Delta\Psi_m$.

DMSO at 1% was used as solvent control (negative control) and Etoposide (CAS No. 33419-42-0, Sigma) at 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (final concentration) as positive control. The experiments were carried out in duplicate/dose and repeated three times.

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™)

PS externalization to the outer leaflet of PM of apoptotic cells was assessed using Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™). Briefly, a 24-well plate was filled with 1×10^6 cells/mL of Jurkat cell suspension and exposed to the water sample extracts for 2 h at 37°C, 5% CO_2 , in humid atmosphere. Following the exposure time, cells were washed twice with cold PBS and then resuspended in 1x binding buffer [10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4) 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2]. 100 μL of these solutions (1×10^5 cells) were transferred to new culture tubes and 5 μL of each Annexin

V-FITC and PI were added afterwards. The tubes were incubated for 15 min at room temperature (25°C) in the dark. 400 µL of 1x binding buffer was added to each tube right before flow cytometry (FACSCalibur™, BD Biosciences) measurements were taken. Around 10000 ungated events were acquired and analyzed by BD CellQuest Pro v.5.2.1 software. Annexin V⁻/PI⁻, Annexin V⁺/PI⁻ and Annexin V⁺/PI⁺ indicate, respectively, viable cells, early apoptosis and cell death (end-stage apoptosis and death). The percentages obtained were evaluated according to fold increase over the solvent control (FI). FI was determined by dividing the treatment percentage by the percentage obtained for solvent control of each category. For the parameter Annexin V⁺/PI⁻ a >2-fold increase over the baseline (solvent control) indicates that the sample treatment induced apoptosis. The same holds true to Annexin V⁺/PI⁺, just that now the >2-fold increase shows that the tested sample generates death by necrosis or secondary (late) apoptosis.

DMSO at 1% was used as solvent control (negative control), 10 µM of Staurosporine (CAS No. 62996-74-1, Sigma) as positive control for apoptosis induction and 10 mM of MnCl₂ (CAS No. 7773-01-5, Sigma) as positive control for necrosis. The experiments were performed in a single well/dose and repeated twice.

xCELLigence™ System

The experiments were accomplished using real-time xCELLigence cell impedance system, according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science and ACEA Bioscience). Growth curves were constructed using E-plate 96 containing integrated sensor electrode arrays. Alterations of cell integrity affect electrode impedance and this is displayed as doubling time being an indication of

viability, for instance. Briefly, 100 μL of HepG2 culture medium was added into each well of E-plate 96. Following, E-plate 96 was connected to the system and checked in the cell culture incubator for proper electrical contacts and the background impedance was measured for 60 s. Meanwhile, HepG2 cell suspension was adjusted to 2×10^5 cells/mL and 100 μL was added to each well of microtiter plates. E-plate 96 was connected to the system again and this time cell adhesion was monitored once every 1h for 24 h. After this period, cells were exposed to their respective treatments (10 μL test solution/well) and the microtiter plate was connected to the system to be monitored every 1 h for 96 h (long-term assay).

Student's t-test was performed between pairs of data group and a $p \leq 0.05$ value was considered statistically significant.

DMSO at 1.5% was used as negative control and 0.25 μM of Staurosporine (CAS No. 62996-74-1, Sigma) and 0.63 mM of MnCl_2 (CAS No. 7773-01-5, Sigma) as positive controls.

2.3. Chemical Analysis

Identification and quantification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) were conducted in all water extracts according to EPA-550.1 Method (EPA, 1990). The analyses herein used a liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-Flu) method, which allows for detecting the following PAHs: naphthalene, acenaphthylene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(e)pyrene, benzo(e)acefenantrilene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perilene, indene(123-cd)pyrene.

3. Results

Results of PAHs chemical analysis are shown in Table 1.

Changes in $\Delta\Psi_m$ were observed after cell exposition to D100 and B5 water extracts at the highest concentration tested (0.2 mL/mL) (Table 2, Fig. 1). For B5 sample this effect persisted up to dilution 0.1 mL/mL (Fig. 1). The other lower dilutions of D100 and B5 extracts did not show positive effects (Table 2, Fig. 1).

D100 and B5 water extracts also induced apoptosis and cell death in a dose-dependent manner according to Annexin V-FITC assay data (Table 3, Fig. 2). For D100 at 0.2 mL/mL (highest dose tested), apoptosis induction was predominant rather than necrosis. However, at 0.1 mL/mL D100 showed a similar induction of apoptosis and necrosis events (Table 3, Fig 2). While cell death mechanisms were verified for D100 extract up to the 0.1 mL/mL dose, in B5 extract these effects were observed up to the 0.05 mL/mL dose. At 0.2 and 0.1 mL/mL, B5 induced apoptosis and necrosis in a similar intensity and at 0.05 mL/mL apoptotic cell level was higher than that of necrotic cells (Table 3, Fig 2).

Real-time cell impedance analyses showed cytotoxic effects for both D100 and B5 water extracts (Table 4). For these samples, cytotoxicity was detected by the tested doses 0.3, 0.2 and 0.1 mL/mL. Except for B5 sample at 0.3 mL/mL, whose positive effects were observed during all exposition time (96 h), cytotoxic effects were generally observed at the beginning of exposure time (6-12 h of exposition) (Table 4).

4. Discussion

Besides its use as fuel, biodiesel has been designated as a cleaning and bioremediating agent of crude oil (Miller and Mudge, 1997; Mudge and Pereira, 1999;

Pereira and Mudge, 2004; Fernández-Álvarez et al., 2007). According to Mudge and Pereira (1999), biodiesel acts as a non-volatile organic solvent and dissolves both crude oil and weathered oil, making them more mobile in the environment. From a toxicological viewpoint, increasing crude oil mobility can confer deleterious effects to exposed organisms, considering the fact that, in such cases, pollutants are not immediately removed from the environment.

Concern about both biodiesel and its diesel blends released into the environment has been growing as commercialization of such products increases. As for aquatic environment impacts, the dispersing action of biodiesel can worsen diesel water pollution effects, since it can increase the bioavailability of hazardous chemicals, e.g. PAHs, commonly present in diesel oil. However, both chemical analysis and bioassay data obtained herein did not corroborate this hypothesis. On the contrary, the chemical analysis results showed a drop in the amount of PAHs as the biodiesel ratio blended in diesel oil increases (B5>B20>B50).

The relationship between toxicant-induced cell death and necrosis has been a traditional axiom throughout the years in the field of toxicology. Nevertheless, emerging evidence points out that different environmental pollutants can exert their toxicity by triggering apoptosis (Robertson and Orrenius, 2002). Determination of how the cell will demise, i.e. apoptosis or necrosis, is given by the toxicant injury amplitude (dose) (Raffray and Cohen, 1997). The role of mitochondria in chemical-induced apoptosis is a current and widely discussed issue (Robertson and Orrenius, 2002). Apoptosis can be triggered by two different pathways, extrinsic and intrinsic, depending on cell recognition of intra- and extra-cellular signals (López-Hernández et al., 2006). In the intrinsic pathway, mitochondria plays an essential role, since damages

in this organelle lead to its membrane depolarization and permeabilization, resulting in the release of proapoptotic factors into the cytosol, which, generally speaking, activates the downstream caspases cascade (López-Hernández et al., 2006, Blankenberg, 2009).

Our data showed a clear induction of changes in $\Delta\Psi_m$ and PS externalization after cell exposure to D100 and B5 water extracts. The B5 effects observed in the TMRE assay were stronger than D100. Likewise, in the Annexin V assay, although both D100 and B5 samples induced apoptosis in a dose-dependent manner with similar intensity in the highest tested dose (0.2 mL/mL), B5 still presented a strict effect compared to D100 in the lower tested dilutions. Additionally, once the Annexin V assay allows us to distinguish apoptosis and necrosis events, the results point out that D100 exert its cytotoxicity preferentially through the apoptotic pathway. On the other hand, the data obtained for B5 showed that its toxicity is given by activation of both apoptotic and necrotic processes at almost the same rate.

The fact that the cell death events observed herein are related only to D100 and B5 water extracts can be an indication that diesel contaminants, more specifically the PAHs chemically detected, are responsible for those positive responses. Many PAHs are designated as cytotoxicity inducers in both non- and dependent xenobiotic metabolism ways (via cytochrome P450) (Oris and Giesy, 1985; Babich, 1988; Schirmer et al., 1998; Alkio et al. 2005; Topinka et al., 2008). According to Schirmer et al. (1998), the direct cytotoxicity of PAHs is associated to their molecular size, comprising two- and three-ring PAHs, such as naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene and phenanthrene. The PAHs chemically quantified in D100 and B5 water extracts refer to these smaller PAHs, which can explain the direct cytotoxicity observed. However, the difference between D100 and B5 response

intensity and mode of actions can be related to the type, amount and/or interaction of the PAHs detected in these samples. Assessments of complex mixtures require a critical view of synergistic and antagonistic interactions of chemicals present in order to estimate their actual effects (Mumtaz et al., 1996; White, 2002). Donnelly and co-workers (1990) showed that non-mutagenic PAHs, such as anthracene and naphthalene, may modulate, increasing or decreasing, mutagenic activities of mutagenic PAHs, e.g. benzo(a)pyrene. Thus, as in genotoxicity the same can happen here to PAH-induced cytotoxicity, once interactions among the PAHs identified in these samples could be different and their action may be mainly correlated to the quantities detected. Interestingly, a suitable decrease in PAH amount as a result of biodiesel ratio increase was enough to eliminate the cytotoxic effects, as observed for B20 and B50 samples.

Some works have reported that distinct environmental stressors, including PAHs, exert toxic effects by generating reactive oxygen species (ROS) (Hiura et al., 1999, 2000; Xia et al., 2004; Franco et al., 2009). ROS, produced as a result of disrupted mitochondrial electron transport, are important mediators of apoptosis, especially in the intrinsic mitochondria-dependent pathway. Intrinsically-produced ROS result in PS externalization through a cytochrome c- (cyt c) dependent mechanism (Forsberg et al., 2004). Changes in $\Delta\Psi_m$ led to cyt c release, following caspase activation and development of membrane asymmetry (PS externalization) (Goldestein et al., 2000; Hiura et al., 2000; Waterhouse et al., 2001; Blankenberg, 2009). Our data showed that both D100 and B5 water extracts were able to alter $\Delta\Psi_m$ and expose PS to outer leaflet of PM. In the face of this, we can hypothesize that diesel pollutants present in these samples, i.e. PAHs, may trigger apoptosis by mitochondria pathway, which

could be related to ROS generation. However, to assert this assumption, assays to assess mitochondrial cytochrome c release and ROS generation should be employed.

Agreement with the other results above discussed, the doubling time analysis of xCELLigence system, drew attention to significant cytotoxic effects only for D100 and B5 water samples. Once again, in this long-term assay, B5 extract showed a strict effect compared to D100. Analyzing the results by effect time-dependent exposure (6, 12, 24, 48, 72 and 96 h), our data showed that the highest tested doses of D100 (0.3, 0.2 and 0.1 mL/mL) caused cytotoxicity only until the first 12 h and thereafter, no positive responses were observed, showing a cellular recovery and adaptation to the stress suffered. Contrarily, the highest B5 dose (0.3 mL/mL) presented significant effects in all exposure time; meanwhile, this response went down as time went by. The other positive cytotoxic dilutions of B5 (0.2 and 0.1 mL/mL) presented positive effects only in the first times (6-24 and 6-12 h, respectively). Once again, B5 result pointed out that the cells were able to recover from the toxic stress during time exposure. Shortly, both D100 and B5 induced cytotoxicity in a dose-dependent manner preferentially in the first hours of the exposition, indicating acute effects.

5. Conclusion

In short, our data showed that petroleum-based diesel and its main marketed biodiesel blend (B5) can exert cytotoxicity in organisms by contaminating water. However, the noxious effects observed might be related to diesel hydrocarbons, more specifically, to the PAHs contained in this fuel. The action mechanism of the PAHs identified herein refers to a direct cytotoxicity, which can be triggered by both apoptotic and necrotic pathways. The effect intensity and cell death mechanism

activation seem to be a result of synergistic effects of the PAHs quantified in each tested sample. Additionally, the activation of apoptosis by the PAHs present in the toxic samples may be given by the intrinsic mitochondria-dependent pathway. The xCELLigence data pointed out that these toxic pollutants in general exert their harmful effects on the first exposure times, indicating an acute effect. Finally, the present study showed that the diesel contaminants may be responsible for the deleterious effects observed and biodiesel does not worsen the impacts caused by diesel water pollution.

All the assays employed here suited our goal, providing us accurate analyses related to the cytotoxic effects of the tested samples.

Acknowledgements

We would like to thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – São Paulo/SP, Brazil, for the financial support (Process No. 2007/04304-3) and the Bioverde (Brazilian Biofuel Company) for having kindly provided us with the fuels used in the present work.

References

- Alkio, M., Tabuchi, T.M., Wang, X., Colón-Carmona, A., 2005. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *J. Exp. Bot.* 56, 2983-2994.
- Atadashi, I.M., Aroua, M.K., Aziz, A.A., 2010. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. *Renew Sust Energ Rev* 14, 1999-2008.

- Babich, H., Sardana, M.K., Borenfreund, E., 1988. Acute cytotoxicities of polynuclear aromatic hydrocarbons determined *in vitro* with the human liver tumor cell line, HepG2. *Cell Biol Toxicol.* 4, 295-309.
- Blankenberg, F.G., 2009. Imaging the Molecular Signatures of Apoptosis and Injury with Radiolabeled Annexin V. *Proc Am Thorac Soc* 6, 469-476.
- Castedo, M., Ferri, K., Roumier, T., Métivier, D., Zamzami, N., Kroemer, G., 2002. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *Journal of Immunological Methods* 265, 39-47.
- Demirbas, A., 2009. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Convers Manage.* 50, 14-34.
- Engeland, M.V., Nieland, L.J.W., Ramaekers, F.C.S., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P.M., 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9.
- EPA (Environmental Protection Agency), 1990. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-solid extraction and hplc with coupled ultraviolet and fluorescence detection. *Method 550.1*, July, 1990.
- EPA (Environmental Protection Agency), 2010. Renewable Fuel Standard Program (RFS2) Regulatory Impact Analysis. EPA-420-R-10-006, February, 2010.
- Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M., Panayiotidis, M.I., 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutat Res.* 674, 3-22.
- Gupta, S., Cuffe, L., Szegezdi, E., Logue, S.E., Neary, C., Healy, S., Samali, A., 2010. Mechanisms of ER stress-mediated mitochondrial membrane permeabilization. *International Journal of Cell Biology*, doi:10.1155/2010/170215.

- Haşimoğlu, C., Ciniviz, M., Özserta, I., İçingü, Y., Parlaka, A., Salman, M.S., 2008. Performance characteristics of a low heat rejection diesel engine operating with biodiesel. *Renewable Energy* 33, 1709–1715.
- He, C., Ge, Y., Tan, J., You, K., Han, X., Wang, J., 2010. Characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons emissions of diesel engine fueled with biodiesel and diesel. *Fuel* 89, 2040-2046.
- Hu, Z., Tan, P., Yan, X., Lou, D., 2008. Life cycle energy, environment and economic assessment of soybean-based biodiesel as an alternative automotive fuel in China. *Energy* 33, 1654-1658.
- Jacob, C.A., Schiffner, F., Henkel, M., Waibel, M., Stork, B., Daubrawa, M., Eberl, L., Gregor, M., Wesselborg, S., 2009. Effects of bacterial N-acyl homoserine lactones on human Jurkat T lymphocytes-O₆DHL induces apoptosis via the mitochondrial pathway. *International Journal of Medical Microbiology* 299, 509-519.
- Janaun, J., Ellis, N., 2010. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. *Renew Sust Energ Rev* 14, 1312-1320.
- Jayaraman, S., 2005. Flow cytometric determination of mitochondrial membrane potential changes during apoptosis of T lymphocytic and pancreatic beta cell lines: Comparison of tetramethylrhodamineethyl ester (TMRE), chloromethyl-X-rosamine (H₂-CMX-Ros) and MitoTracker Red 580 (MTR580). *Journal of Immunological Methods* 306, 68-79.
- Karavalakis, G., Stournas, S., Bakeas, E., 2009. Effects of diesel/biodiesel blends on regulated and unregulated pollutants from a passenger vehicle operated over the European and the Athens driving cycles. *Atmosph. Environ.* 43, 1745-1752.

- Keogh, R.J., 2010. New technology for investigating trophoblast function. *Placenta* 31, 347-350.
- King, M.A., Eddaoudi, A., Davies, D.C., 2007. A comparison of three flow cytometry methods for evaluation mitochondrial damage during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells. *Cytometry Part A* 71A, 668-674.
- López-Hernández, F.J., Ortiz, M.A., Piedrafita, F.J., 2006. The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are differentially affected by temperature upstream of mitochondrial damage. *Apoptosis* 11, 1339-1347.
- Marin-Morales, M.A., Leme, D.M., Mazzeo, D.E.C., 2009. A review of the hazardous effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on living organisms. in: Haines, P.A., Hendrickson, M.D. (Eds.). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Pollution, Health and Chemistry*, Nova Science Publishers Inc., 2009, pp.2-49.
- Nicodem, D.E., Guedes, C.L.B., Correa, R.J., 1998. Photochemistry of petroleum. I. systematic study of brazilian intermediate crude oil. *Mar Chem.* 63, 93-104.
- O'Reilly, C.M., Fogarty, K.E., Drummond, R.M., Tuft, R.A., Walsh Jr., J.V., 2003. Quantitative Analysis of Spontaneous Mitochondrial Depolarizations. *Biophysical Journal* 85, 3350–3357.
- Oris, J.T., Giesy, J.P., 1985. The photoenhanced toxicity of anthracene to juvenile sunfish (*Lepomis* spp.). *Aquat Toxicol.* 6, 133-146.
- Raynal, P., Pollard, H.B., 1994. Annexins: the problem of assessing the biological role for gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1197, 63-93.
- Raffray, M., Cohen, G.M. 1997. Apoptosis and Necrosis in Toxicology: A Continuum or Distinct Modes of Cell Death? *Pharmacol. Ther.* 75, 153-177.

- Robertson, J.D., Orrenius, S., 2002. Role of mitochondria in toxic cell death. *Toxicology* 181-182, 491-496.
- Rottenberg, H., Wu, S., 1998. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1404, 393-404.
- SBMCTA (Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental), 2010. Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella*/microsoma).
- Scaduto Jr., R.C., Grotyohann, L.W., 1999. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives. *Biophysical Journal* 76, 469–477.
- Schmitz, M., Boess, F., Watzele, M., Suter-Dick, L., Roth, A.B., 2009. *In vitro* assessments of hepatic toxicity using the xCELLigence real-time cell analyzer. *Toxicology Letters* 189S, S74-75.
- Schirmer, K., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., Bols, N.C., 1998. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology* 127, 129-141.
- Seiler, A., Lambernd, S., Ehlich, N., Ehlich, A., Bohlen, H., Watzele, M., 2009. Monitoring of cardiac cytotoxicity in real-time with the xCELLigence system. *Toxicology Letters* 189S, S70.
- Topinka, J., Marvanová, S., Vondráček, J., Sevastyanova, O., Nováková, Z., Krcm' r, P., Pencíková, K., Machala, M., 2008. DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial 'stem-like' cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* 638, 122-132.

- Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H., Reichl, F.X., 2010. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental Materials* 26, 51-58.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat Res.* 631, 36-43.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184, 39-51.
- Yang, H.-H., Chien, S.-M., Lo, M.-Y., Lan, J. C.-W., Lu, W.-C., Ku, Y.-Y., 2007. Effects of biodiesel on emissions of regulated air pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons under engine durability testing. *Atmosph Environ.* 41, 7232-7240.

Table 1. PAHs detected in water samples from the spill simulations carried out.

PAHs ($\mu\text{g/L}$)	WC	B5	B20	B50	D100	B100
naphthalene	0.7	344.6	313.9	287.6	365.7	2.2
acenaphthylene	0.2	22.6	20.7	16.9	23.3	1.4
fluorene	0.3	160.7	155.7	117.3	193.2	2.6
phenanthrene	1.3	221.2	217.5	168.3	232.5	9.9
anthracene	0.3	2.4	2.2	2.2	3.4	2.1
fluoranthene	0.3	3.7	3.3	3.4	3.7	1.3
pyrene	1.1	13.3	11.8	11.8	16.2	2.8
benzo(a)anthracene	0.2	0.9	1.7	1.7	1.9	0.4
chrysene	nd	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
benzo(e)pyrene	nd	nd	nd	nd	0.2	nd
benzo(e)acefenantrylene	nd	0.6	0.5	0.2	0.9	nd
benzo(k)fluoranthene	nd	nd	nd	nd	nd	nd
benzo(a)pyrene	nd	nd	nd	nd	nd	nd
dibenzo(a,h)anthracene	nd	nd	nd	nd	nd	nd
benzo(g,h,i)perilene	nd	nd	nd	nd	nd	nd
indene(123-cd)pyrene	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Σ PAHs	4.4	770.1	706.7	609.5	841.14	22.81

WC = water control; nd = not detected (below detection limit).

Table 2. Folder induction data related to $\Delta\Psi_m$ measurements.

Treatments	FI
DMSO	1
Etoposide 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,54
WC 0.2 mL/mL	0,83
B100 0.2 mL/mL	0,92
D100 0.2 mL/mL	3,54
D100 0.1 mL/mL	0,82
D100 0.05 mL/mL	0,91
D100 0.025 mL/mL	0,73
D100 0.0125 mL/mL	0,87
B5 0.2 mL/mL	8,77
B5 0.1 mL/mL	2,19
B5 0.05 mL/mL	0,94
B5 0.025 mL/mL	0,7
B5 0.0125 mL/mL	0,86
B20 0.2 mL/mL	0,9
B50 0.2 mL/mL	0,98

FI = fold induction over baseline (baseline = % event solvent control - DMSO). Values in bold indicate FI greater than 2. Data obtained by measurements of 60000 ungated events per treatment.

Table 3. Comparison of folder induction results from Annexin V assay.

Treatments	Annexin V ⁺ /PI ⁻	Annexin V ⁺ /PI ⁺
	<i>Early Apoptotic Cells</i>	<i>Late Apoptosis or death</i>
	<i>FI</i>	<i>FI</i>
DMSO	1,00	1,00
Staurosporine 10 µM	7,25	1,99
MnCl ₂ 10 mM	1,17	2,55
WC 0.2 mL/mL	1,18	0,95
B100 0.2 mL/mL	1,10	0,98
D100 0.2 mL/mL	7,80	3,13
D100 0.1 mL/mL	3,90	2,48
D100 0.05 mL/mL	1,58	1,45
D100 0.025 mL/mL	1,15	1,43
D100 0.0125 mL/mL	0,95	1,38
B5 0.2 mL/mL	7,09	5,06
B5 0.1 mL/mL	5,80	4,57
B5 0.05 mL/mL	4,53	2,75
B5 0.025 mL/mL	1,61	1,46
B5 0.0125 mL/mL	1,67	1,53
B20 0.2 mL/mL	1,03	1,24
B50 0.2 mL/mL	0,93	1,07

FI = fold induction over baseline (baseline = events % of solvent control - DMSO). Values in bold indicate FI greater than 2. Data obtained by measurements of 20000 ungated events per treatment.

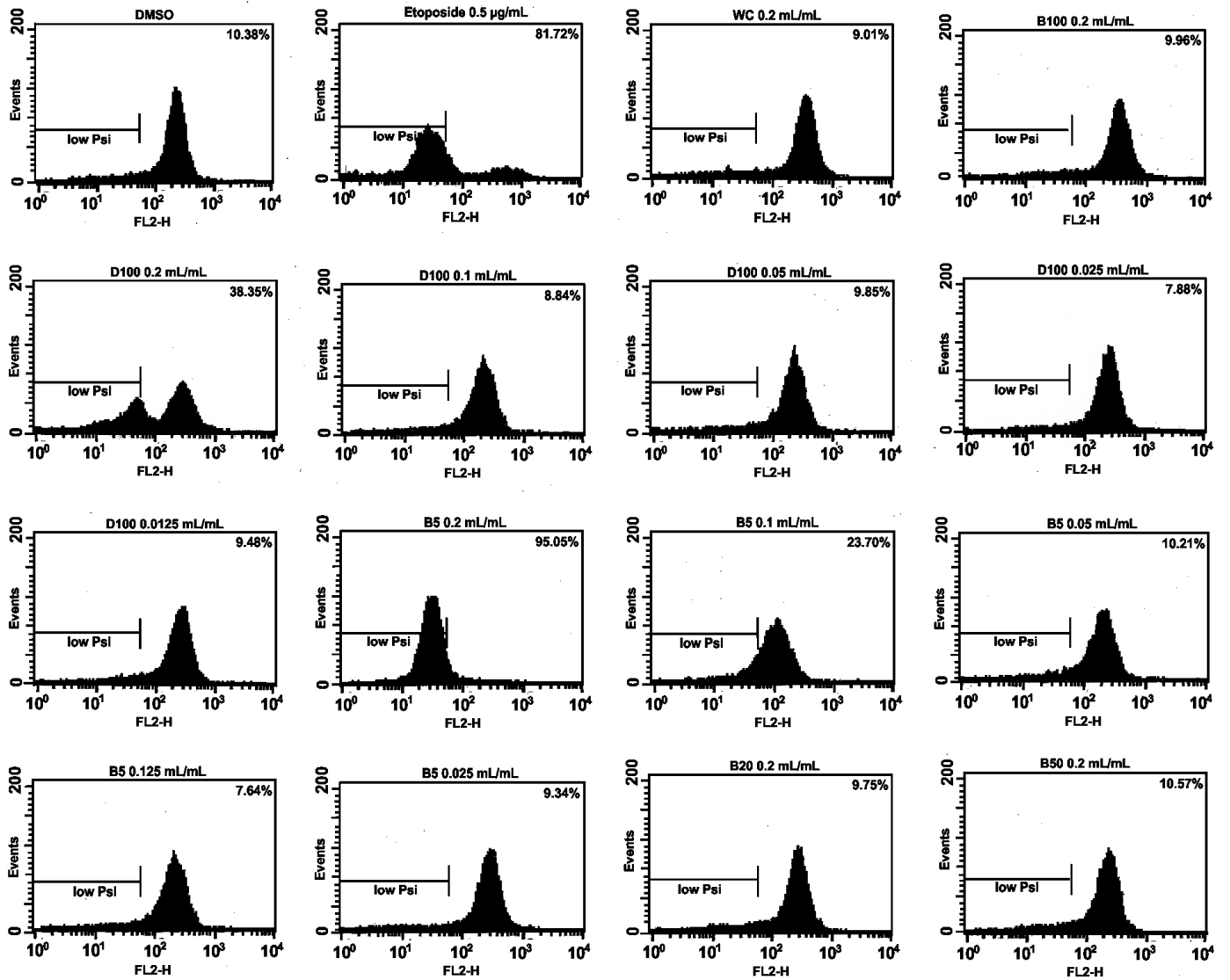
Table 4. Real-time cell impedance analyses (xCELLigence system). Doubling time results of HepG2 cells exposure to water extracts for 96 h.

	Exposure Time					
	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
DMSO	15.51±0.59	16.36±0.28	17.97±0.13	20.96±0.37	27.61±0.82	36.09±1.35
Staurosporine 0.25 µM	12.95±1.49	16.48±0.87	23.56±0.77	32.53±1.59	53.02±3.45*	74.24±4.87*
MnCl ₂ 0.63 mM	20.93±1.73	23.25±0.71	30.92±1.19*	49.68±2.08*	72.05±3.45*	98.93±5.14*
WC 0.3 mL/mL	19.99±1.15	21.41±0.40	21.08±0.08	23.42±0.33	30.46±0.84	39.41±1.39
WC 0.2 mL/mL	21.90±0.97	18.96±0.40	18.79±0.11	22.53±0.41	28.82±0.75	36.15±1.12
B100 0.3 mL/mL	18.92±1.21	20.54±0.43	20.99±0.09	23.46±0.65	30.83±0.89	39.97±1.44
B100 0.2 mL/mL	25.92±1.96	20.12±0.71	17.08±0.28	17.67±0.21	22.15±0.51	28.21±0.89
D100 0.3 mL/mL	36.04±2.48*	30.27±1.35*	20.55±0.47	21.44±0.27	26.69±0.62	34.07±1.08
D100 0.2 mL/mL	28.70±0.50*	25.10±0.54*	23.41±0.13	25.47±0.25	31.33±0.67	39.63±1.19
D100 0.1 mL/mL	29.38±0.70*	24.34±0.72	21.59±0.26	23.76±0.28	29.91±0.73	38.26±1.26
D100 0.05 mL/mL	18.46±0.26	17.17±0.21	17.55±0.14	20.90±0.34	27.35±0.79	35.76±1.32
D100 0.025 mL/mL	17.61±0.28	16.00±0.22	16.01±0.13	19.68±0.39	26.22±0.82	34.75±1.38
B5 0.3 mL/mL	184.65±278.18*	360.30±270.87*	83.45±6.95*	60.77±1.32*	64.2±0.84*	74.84±1.39*
B5 0.2 mL/mL	76.60±26.03*	65.90±8.42*	34.43±1.69*	29.18±0.43	34.91±0.71	42.66±1.10
B5 0.1 mL/mL	57.21±14.47*	46.37±5.28*	28.60±1.08	26.94±0.37	32.86±0.69	40.75±1.13
B5 0.05 mL/mL	18.82±0.24	16.44±0.29	17.09±0.19	22.02±0.51	29.22±0.93	38.39±1.52

B5 0.025 mL/mL	16.94±0.24	15.86±0.16	16.23±0.11	20.07±0.39	26.77±0.85	35.57±1.44
B20 0.3 mL/mL	15.67±0.78	16.54±0.27	17.56±0.13	22.5±0.55	31.55±1.20	42.07±1.84
B20 0.2 mL/mL	23.22±2.06	19.41±0.57	16.98±0.25	17.54±0.21	22.36±0.56	28.78±0.97
B50 0.3 mL/mL	16.65±0.86	18.87±0.47	20.12±0.18	23.22±0.36	30.27±0.85	38.97±1.35
B50 0.2 mL/mL	23.33±1.73	20.04±0.53	17.04±0.29	16.49±0.17	21.22±0.56	28.12±1.06

Data expressed as Mean±SD of doubling time measurements. * p<0.05, according to Student's t-test.

A



B

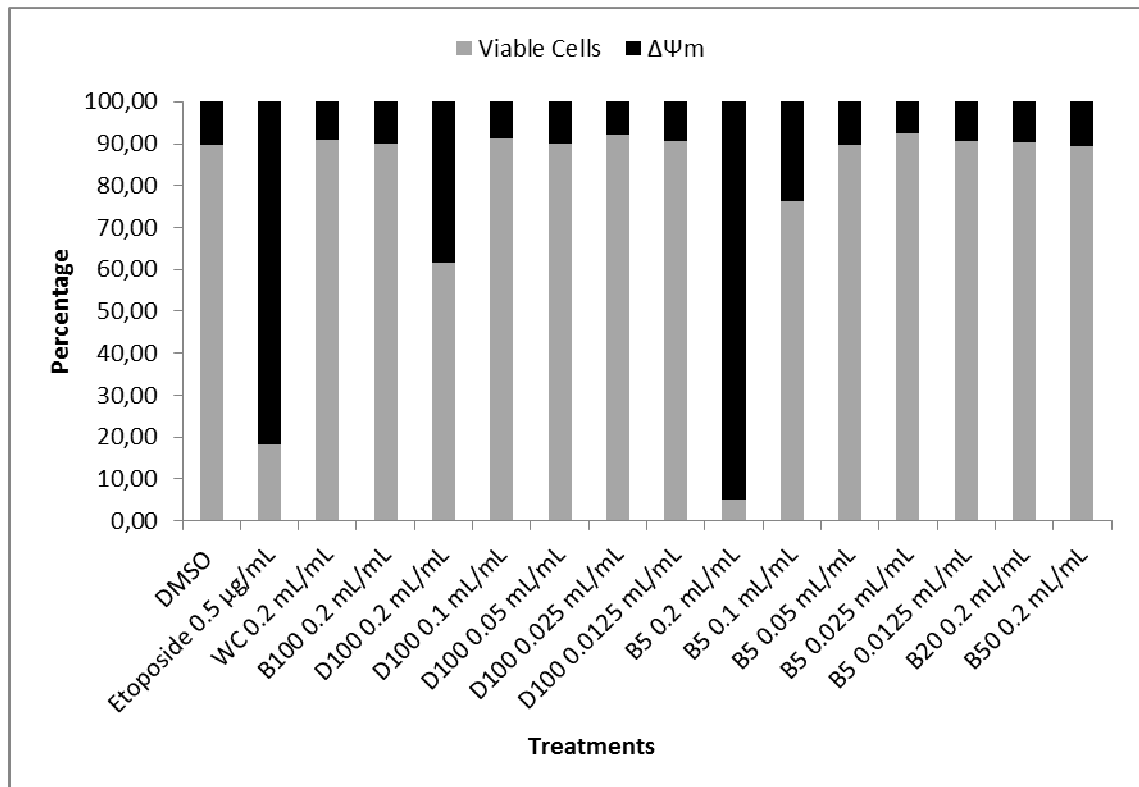
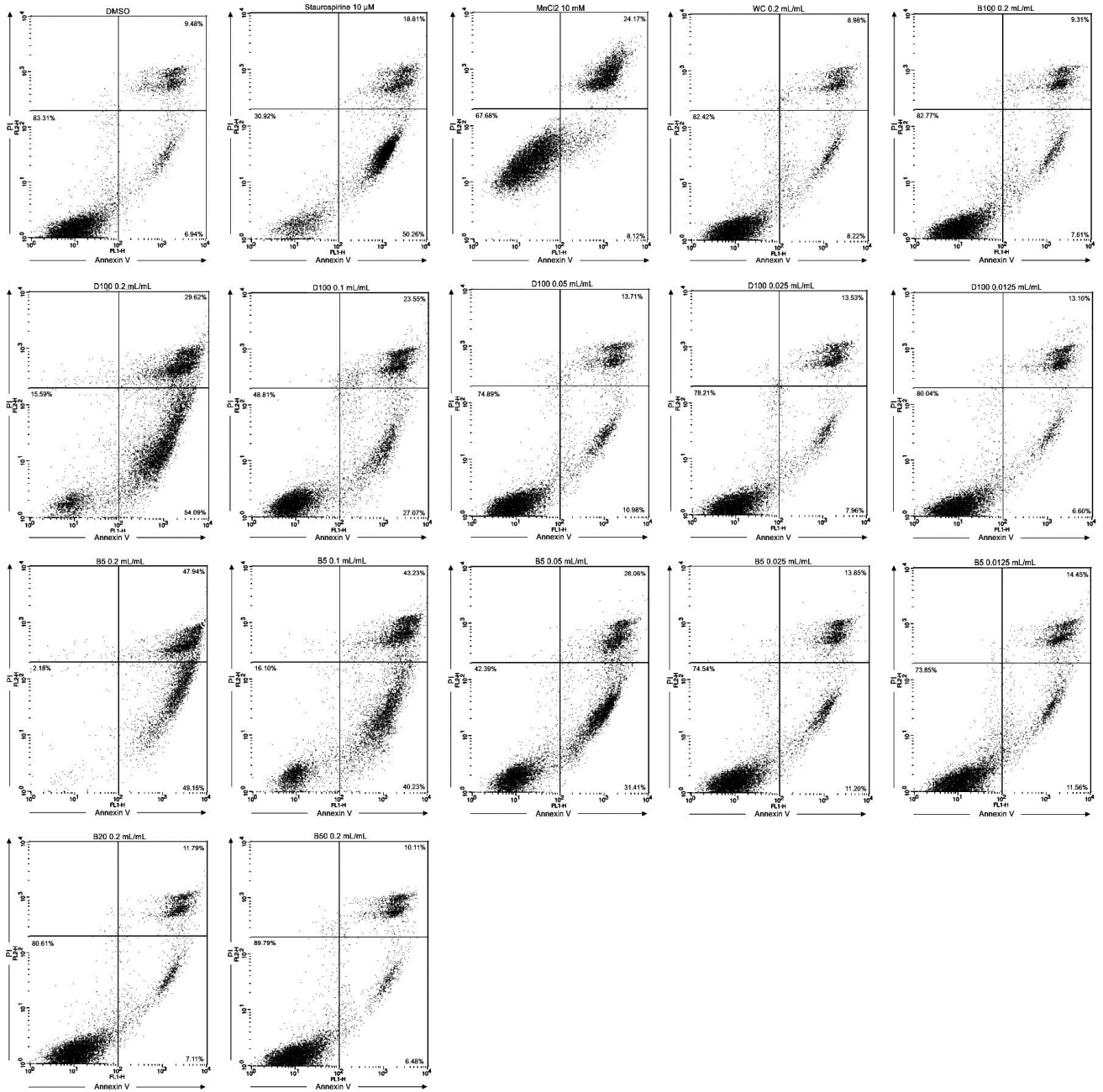


Figure 1. Flow cytometry data related to measurements of $\Delta\Psi_m$ events. (A) One-color flow analysis showing comparison among solvent control (DMSO) and water extracts. (B) Flow data expressed as a stack diagram.

A



B

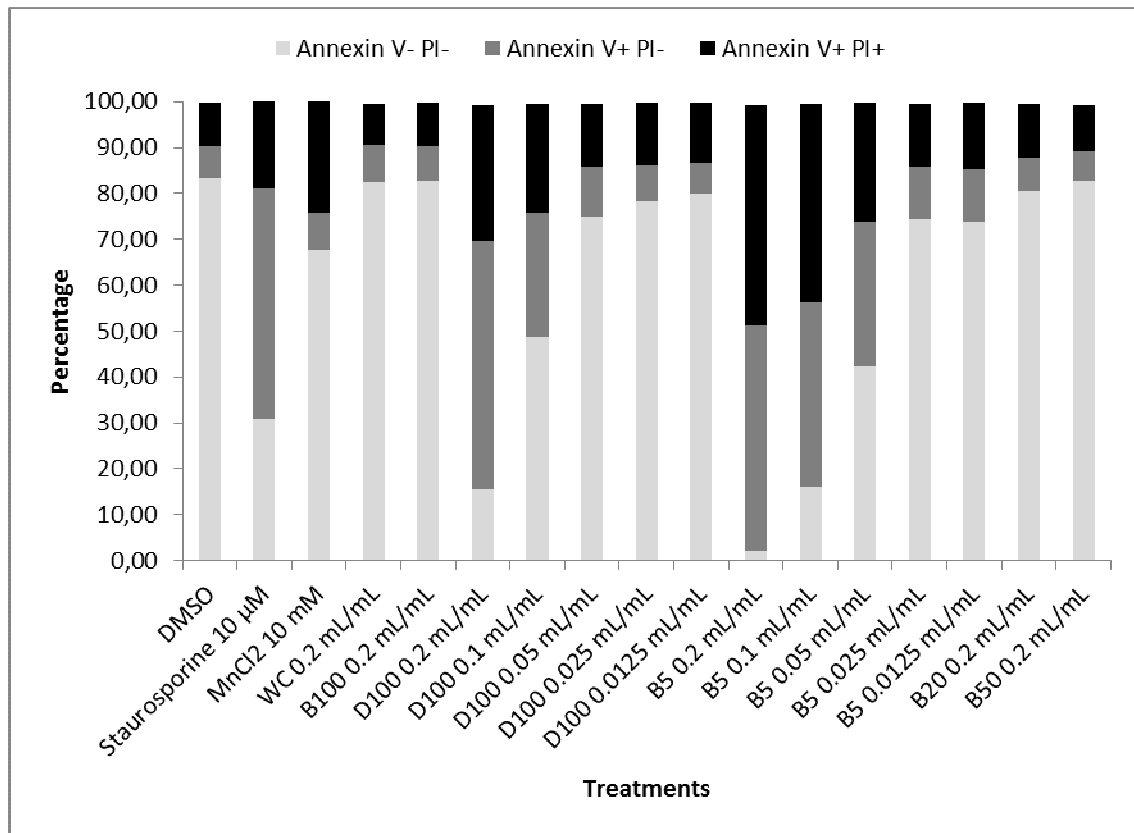


Figure 2. Flow cytometry data of apoptosis detection using Annexin V/PI. (A) Two-color flow analysis showing comparison of the solvent control (DMSO) with the water extracts. (B) Flow data expressed as a stack diagram.

ARTIGO 4**An overview of biodiesel soil pollution: data based on cytotoxicity and mutagenicity assessments**

Daniela Morais Leme¹, Tamara Grummt², Rita Heinze², Andrea Sehr², Sylvia Renz², Sissy Reinel², Matthias Skerswetat², Danielle Palma de Oliveira³, Elisa R. A. Ferraz³, Mary Rosa Rodrigues de Marchi⁴, Marcos Canto Machado⁴, Guilherme Julião Zocolo⁴,
*Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Biology Department, Univ Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, 13506-900, Brazil.

²Federal Environment Agency, Bad Elster Branch, Heinrich-Heine-Str. 12, Bad Elster, 08645, Germany.

³Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Av. do Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto/SP-Brazil.

⁴Institute of Chemistry, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, 14800-900, Brazil.

*Corresponding author: Av. 24 A, 1515, Bela Vista, 13506-900, Rio Claro/SP-Brazil. e-mail: mamm@rc.unesp.br, TEL. +55 19 35264143, FAX. +55 19 35360009.

Será Submetido à revista "Journal of Hazardous Materials" (Fator de Impacto 4,144)

Abstract

Biodiesel production has received considerable attention in the recent past as a nonpolluting fuel. However, this assertion has been based on its biodegradability and reduction in exhaust emissions. Assessments of water and soil biodiesel pollution are still limited. Spill simulation with biodiesel and their diesel blends in soils were carried out, aiming at analyzing their cytotoxic and mutagenic potentials. While the cytotoxicity observed may be related to diesel contaminants, the genotoxic and mutagenic effects can be ascribed to biodiesel pollutants. Thus, taking into account that our data stressed harmful effects on organisms exposed to biodiesel-polluted soils, the designation of this biofuel as an environmental-friendly fuel should be carefully reviewed to assure environmental quality.

Keywords: soybean biodiesel, biodiesel and diesel blends, *Salmonella* mutagenicity assay, flow cytometry-based *in vitro* MN assay, cell proliferation and viability, cell death processes.

1. Introduction

The use of plant oils as a fuel in the compression ignition engine is as old as the engine itself (Knothe, 2001, Swanson et al., 2007). Biodiesel, a mixture of mono-alkyl ester obtained from renewable sources of biologic origin, has gained importance in the recent past for its ability to replace fossil fuels (Ranganathan et al., 2008). The increasing production and consumption of biodiesel has encouraged environmental researchers to assess its hazard and fate in the environment.

The anthropogenic pollution of soil has become an issue of intensive scientific research since the end of the 20 century (Lapinskiene et al., 2006). Genotoxic compounds in soil may affect living organisms' health, including human beings, by exposing them through different pathways, such as ingestion of plants that uptake soil pollutants and leaching of compounds from soil to ground and surface water used as drinking water (Watanabe and Hirayama, 2001). Oil spills, have currently become as frequent as increasing industrialization rate and consumption of energy worldwide (Meniconi et al., 2002). Thus, like other fuels, biodiesel can reach the environment through accidental releases and/or routine losses associated with the use of this biofuel.

Hazard identification of environmental pollutants is measured by employing different biological assays. Assessing the toxic contamination of a solid medium like soil is not a simple task, due to the sterile conditions required by most of the bioassays commonly applied to genotoxic screenings. Assays conducted with plants and bacteria, such as *Salmonella* mutagenicity test and genotoxicity and mutagenicity *Allium cepa* test, are among the most widely used test systems to evaluate soil quality. However, other assays, like *in vitro* tests with cultured mammalian cells, have been successfully used to assess cytotoxic and mutagenic potentials of environmental samples, including soil samples (White and Claxton, 2004).

The analysis of different endpoints is a requirement for an accurate environmental investigation. *Salmonella*/microsome assay is a widely accepted short-term test used to detect agents that can produce genetic damage that leads to gene mutation (Mortelmans and Zeiger, 2000). The *A. cepa* test is a plant test system capable of evaluating chromosomal aberration (CA) and micronucleus (MN) induction (Leme and Marin-Morales, 2009). Since the MN results from acentric fragments or whole

chromosomes that were not incorporated into the main nucleus during the cell division cycle (Fenech, 2002), the MN test is a valid alternative to predict outcomes from the CA test, making the evaluation simpler and faster (Shi et al., 2010). To improve the throughput capacity of the MN test more and more, a flow cytometry-based *in vitro* MN assay has recently been developed, allowing MN measurements in a large number of cells in a short period of time (Nüsse et al., 1994, Bryce et al., 2008; Shi et al., 2010). Cytotoxic evaluations are also important due to both its association with environment-associated disease (Franco et al., 2009) and the fact that cytotoxic effects can mask genotoxic potentials of test agents.

Aiming at predicting the harmful effects of soil contamination with biodiesel and their diesel blends on living organisms' health, the purpose of the present study was to assess the cytotoxic and mutagenic potentials of soil polluted with these fuels using different biological assays, such as detection of changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$); apoptosis recognition by Annexin V; real-time xCELLigence™ impedance analysis; *in vitro* MicroFlow® kit (Litron) assay; *Salmonella* mutagenicity assay and *A. cepa* test.

2. Material and Methods

2.1. Experiments and Sample Preparation Procedures

The diesel and biodiesel used in this study were kindly provided by BioVerde (a biofuel company), Taubaté, SP, Brazil.

Spill simulations with biodiesel and their diesel blends in soil were performed according to Taylor and Jones (2001), with modifications. Briefly, 250 mL of the mixtures B5 (5% biodiesel+95% diesel), B20 (20% biodiesel+80% diesel), B50 (50%

biodiesel+50% diesel) and the pure fuels B100 (biodiesel) and D100 (diesel), were added into distinct plastic containers containing 500 g of dry soil. Hereafter, the polluted soil were moistened with ultrapure water (100 mL) and then placed in darkness for 13 h prior to exposure to low-medium solar light for 9 h, simulating spills in tropical conditions. After that, the polluted soils were collected and stored at 4°C for further sample preparation.

The soil samples were extracted according to a modified version of the protocol described by Pena et al. (2007), which use the matrix solid phase dispersion (MSPD) method. Briefly, this method includes MSPD with aluminum oxide. The mixture is transferred to a column containing anhydrous Na₂SO₄, aluminum oxide and silica gel. 0.5 mL of KOH saturated in methanol is added to this column and, finally, the elution is done using 15 mL hexane:acetone (1:1, v/v). The extracts obtained were reduced in a rotary evaporator and dried in a gentle stream of pure nitrogen gas. Two samples were treated in parallel: one for chemical analysis and the other for biological assay. For the former, the dry extract was resuspended in acetonitrile and kept at -20°C until HPLC/Flu was analyzed. For the latter, the dry extracts were kept at 4°C and resuspended in DMSO just before accomplishing the bioassays.

The soil used to carry out the simulations was also extracted and designated as soil control (SC) to assure its quality.

2.2. Cytotoxicity and Mutagenicity Testing

2.2.1. *in vitro* Assays

Doses sample tested

For all *in vitro* bioassays carried out in the present study, the tested doses of soil extracts were determined based on the highest concentration of 500 mg equivalents of soil sample (SBMCTA, 2010).

2.2.1.2. Cultured Mammalian Cells Assays

Cell culture

Chinese hamster ovary cells (CHO-K1), human hepatocellular carcinoma (HepG2) and Human T cell leukemia (Jurkat) (all from DSMZ GmbH, Germany) were grown in culture medium at 37°C, 5% CO₂, in a humidified atmosphere. For routine culturing, cells were maintained up to 0.5-1.5x10⁶ cells/mL for Jurkat and ~80% of confluence for CHO-K1 and HepG2. RPMI-1640 medium supplemented with 1% L-glutamine 200 mM and 10% of fetal bovine serum (FBS) and minimum essential medium EAGLE with 1% L-glutamine 200 mM, 1% L-proline and 10% of FBS (all from Sigma) were used, respectively, for Jurkat and HepG2, CHO-K1.

Determination of $\Delta\Psi_m$

Changes in $\Delta\Psi_m$ were detected using Tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE, CAS No. 115532-52-0, Sigma). Jurkat cells previous exposed to soil extracts (treatment time 24 h) were washed with phosphate buffered saline (PBS) and incubated with 25 nM of TMRE for 10 min at 37°C. TMRE fluorescence was measured using FL2 channel (585 nm) of FACSCalibur™ flow cytometry (BD Biosciences). The percentage of cells with intact $\Delta\Psi_m$ is given and fold increase over the solvent control (FI) was the criteria used to evaluate these data. FI was determined by dividing the treatment percentage by the percentage obtained for solvent control and

a >2-fold increase over the solvent control value was classified as positive for that sample.

DMSO at 1% and Etoposide (CAS No. 33419-42-0, Sigma) at 0.5 µg/mL (final concentration) were used as negative and positive controls, respectively. The experiments were carried out in duplicate/dose and repeated three times.

Annexin V-FITC apoptosis detection kit I (BD Pharmingen™)

Phosphatidylserine (PS) externalization to the outer leaflet of plasma membrane of apoptotic cells was assessed using Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™). Briefly, Jurkat cells previously exposed to test samples (treatment time 2 h) were washed twice with cold PBS and resuspended in 1x binding buffer [10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4) 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂]. The new solutions were then incubated with 5 µL of each Annexin V-FITC and PI for 15 min at room temperature (25°C) in the dark. 1x binding buffer was added again to each solution right before flow cytometry (FACSCalibur™, BD Biosciences) measurements were taken. Annexin V⁻/PI⁻, Annexin V⁺/PI⁻ and Annexin V⁺/PI⁺ indicate, respectively, viable cells, early apoptosis and cell death. The criteria of FI described above for TMRE assay was also adopted here.

DMSO at 1% was used as negative control, 10 µM of Staurosporine (CAS No. 62996-74-1, Sigma) as positive control for apoptosis induction and 10 mM of MnCl₂ (CAS No. 7773-01-5, Sigma) as positive control for necrosis. The experiments were performed in a single well/dose and repeated twice.

Real-time xCELLigence™ impedance analysis

The cytotoxic effects of soil extracts on HepG2 cells were studied by real-time xCELLigence impedance system (Roche Applied Science and ACEA Bioscience) on disposable E-plates with 96 wells containing integral sensor electrode arrays. Alterations of cell integrity affect electrode impedance and this is displayed as doubling time being indicative of viability, for instance. HepG2 cells (2×10^4 cells/well) were exposed to different concentrations of soil extracts on E-plates 96 for 96 h, being monitored hourly by the xCELLigence system. Student's t-test was performed between pairs of data groups and a $p \leq 0.05$ value was considered statistically significant.

DMSO at 1.5% was used as negative control and 0.25 μM of Staurosporine (CAS No. 62996-74-1, Sigma) and 0.63 mM of MnCl_2 (CAS No. 7773-01-5, Sigma) as positive controls.

***in vitro* MicroFlow[®] kit (Litron) assay**

The flow cytometry-based *in vitro* MN assay was applied to CHO-K1 cells previously exposed to soil extracts (treatment time 24 h) according to the *in vitro* MicroFlow[®] Kit (Litron) manual. Essentially, upon completion of the chemical treatment of the test, the cells were first stained with a photo-activated dye (Dye 1 - EMA) and then washed, lysed and stained with lysis solutions containing RNase, nucleic acid Dye 2 (SYTOX Green) and the counting beads. Samples were protected from light and kindly resuspended right before flow cytometry measurements (FACSCalibur[™], BD Bioscience). The percentages of relative survival, EMA-positive, hypodiploid events and MN were determined based on the acquisition of at least 10,000 gated nuclei per sample. The calculations were performed according to Bryce et al. (2007, 2008), using Excel (Microsoft, Seattle, WA). Positive results were expressed

herein as mean fold increased related to concurrent solvent control. Significant induction of MN and EMA-positive events was taken to be ≥ 3 -fold mean increase over the mean observed for solvent control (Bryce et al., 2010).

DMSO at 1% was used as a negative control and Mitomycin (MMC, CAS No. 50-07-7, Sigma) at 0.1 μ g/mL and Vinblastine (VB, CAS No. 143-67-9, Sigma) at 10 ng/mL as positive controls.

2.2.1.3. Bacterial Assay

Salmonella/microsome preincubation assay

Samples were tested in the preincubation *Salmonella*/microsome assay using *S. typhimurium* TA98 (*hisD3052*, *rfa*, Δ *bio*, *uvrB*, pKM101), TA100 (*hisG46*, *rfa*, Δ *bio*, *uvrB*, pKM101), TA1535 (*hisG46*, *rfa*, Δ *bio*, *uvrB*) and TA1537 (*hisC3076*, *rfa*, Δ *bio*, *uvrB*). The assay was performed using five doses and triplicate plates/dose, both in the presence and absence of S9 using 30-minute preincubation at 37°C (Maron and Ames, 1983; Mortelmans and Zeiger, 2000). The S9 mixture was freshly prepared according to Maron and Ames (1983) before each test using lyophilized Araclor-1254-induced rat liver S9 fraction (Moltox, Boone, NC), resulting in 4% v/v of S9 fraction in the mixture. The background was carefully evaluated and the colonies were counted by hand. Results were statistically analyzed by the Salanal computer program, which uses the Bernstein model (Bernstein et al., 1982). A sample was considered positive when there was a significant positive dose response and a significant statistical difference between the tested doses and the negative control (ANOVA). The mutagenic potency was expressed in revertants/mL equivalent of water sample.

The positive controls were carried out with 4-Nitroquinoline-*N*-oxide (4-NQO, CAS No. 56-57-5, Sigma) at 0.05 µg/µL (TA98 and TA100 -S9); 2-aminoanthracene (2-AA, CAS No. 613-13-8, Aldrich, Seelze, Germany) at 0.25 µg/µL (TA98 and TA100 +S9); Bis-(2-chlorethyl)-amin-hydrochlorid (Ethanamine, CAS 821-48-7, Merck) at 0,001 mg/µL (TA1535 -S9); 2-Amino-fluorene (2-AF, CAS 153-78-6, Merck) at 0,001 mg/µL (TA1535 +S9); 2-Methyl-4,6-dinitrophenol (DNOC, CAS 534-52-1, Riedel de Haen) at 0,01 mg/µL (TA1537 -S9); 2-Acetylaminofluorene (2-AAF, CAS 53-96-3, Merck) at 0,0005 mg/µL (TA1537 +S9). DMSO (Sigma) was used both to prepare the positive controls and as negative control.

Ames microplate fluctuation protocol (MPF) assay

The Ames MPF assay with the tester strains TA98, TA100, TA1535 and TA1537 was performed in liquid media in 24-well plates during sample exposure and in 384-well plates for revertant growth, according to 'Ames MPF Instructions for Use' (Xenometrix AG, Allschwil, Switzerland). Shortly, bacteria were grown overnight, diluted in Exposure Medium and exposed to test samples in 24-microwell plates for 90 min at 37°C with agitation in either the presence or absence of 4.5% Aroclor 1254-induced rat liver S9 (Moltox, Boone, NC). The exposed cultures were then diluted in Indicator Medium and the contents of each 24-well culture were distributed into 48 wells of a 384-well plate (50 µL per well). After 48-hr incubation at 37°C, the plates were scored by eye for yellow wells. The criteria used to evaluate the MPF results were the fold increase in number of positive wells over the solvent control baseline (FIB), and the dose dependency. The fold increase of revertants was determined by dividing the mean number of positive wells at each dose by the solvent control baseline. The

solvent control baseline was defined as the mean number of positive wells in the solvent control plus 1 SD. All solvent controls from an experiment with identical conditions were combined. An increase of >2-fold in relation to the baseline was classified as positive for that dose. Positive responses of >2-fold in relation to the baseline at more than one dose with a dose–response led the test sample to be classified as positive. A test sample was classified as negative where no response >2-fold the baseline and no dose–response was observed.

The positive controls were carried out with a mixture 1:2 v/v of 4-NQO at 2.5 µg/mL and 2-Nitrofluorene (2-NF, CAS No. 607-57-8) at 50 µg/mL (TA98 -S9); 4-NQO at 3333.3 ng/ml (TA100 -S9); N⁴-Aminocytidine (N4-ACT, CAS No. 57294-74-3) at 2.5 mg/mL (TA1535 -S9); 9-Aminoacridine (9-AAc, CAS No. 90-45-9) at 375 µg/ml (TA1537 -S9); 2-AA at 125 µg/mL (for all tester strains used with S9) (all from Moltox, Boone, NC). DMSO was used to prepare the positive controls and as negative control.

2.2.2. *in vivo* Assay

***Allium cepa* test**

Unlike the assays above described, the *A. cepa* test was performed herein with the raw polluted soil, according to a modified version of the Grant's protocol (1982). Onion seeds (same stock and cultivar) were continuously exposed to test samples using distinct glass jars at 25±2°C. After reaching 2 cm in length the roots were collected and fixed in alcohol–acetic acid (3:1 v/v). The control tests were carried out with ultra-pure water (negative control) and methylmethane sulfonate (MMS, CAS No. 66-27-3, Sigma-Aldrich) at 10 mg/L (positive control). The slide preparation followed the

procedure described by Leme and Marin-Morales (2008). 5,000 cells were analyzed per treatment, being 500 cells per slide, totalizing 10 slides. To determine the potential induction of chromosomal aberrations (CA), all the possible chromosomal abnormalities observed in each slide were identified and scored. The mutagenic effects were measured by counting the micronucleated cells in all slides of each treatment. The non-parametric test Kruskal–Wallis ($p < 0.05$) was used.

2.3. Chemical Analysis

Identification and quantification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) were conducted in all water extracts according to EPA-550.1 Method (EPA, 1990). The analyses herein used a liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-Flu) method, which allows for detecting the following PAHs: naphthalene, acenaphthylene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(e)pyrene, benzo(e)acefenantrilene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perilene, indene(123-cd)pyrene.

3. Results

Results of PAHs chemical analysis are shown in Table 1.

The data obtained by the TMRE assay showed that only B50 soil extract at 5 mg/mL induced changes in $\Delta\Psi_m$ (Table 2, Fig. 1). On the other hand, the Annexin V assay showed positive result of apoptosis induction to B5 extract (5 mg/mL) (Table 3, Fig. 2). The real-time cell impedance analyses showed that all soil extract, including the SC, present cytotoxic effects when compared to solvent control (Table 4).

The results of flow cytometry-based *in vitro* MN assay did not reveal mutagenic potential for any tested sample (Fig 3a). However, since this assay could also be used to evaluate cytotoxicity, cytotoxic effects were observed for B5 and B50 at 5 mg/mL, being the response detected for B50 stronger than the one verified for B5 (Fig 3a). A lower dose of B50 extract (2.5 mg/mL) was included in this assay and the cytotoxic effect was then no more observed for this sample (Fig 3a).

As for *Salmonella* mutagenicity assay, only a simple dose of B20 extract (500 mg equivalent/plate) showed >2-fold induction over the baseline for TA1537 in the absence of metabolic activation in the MPF assay. However, no dose-response was observed for B20 sample in this procedure (Table 5). On the contrary, the Ames preincubation protocol showed mutagenic effects for B100, B20 and B50 extracts in TA100 without S9 (Table 6, Fig. 4).

The *A. cepa* test data showed a positive CA induction after exposure of this test organism to B100, B5, B20 and B50 soil samples. No positive MN induction was observed for any treatment accomplished (Fig. 5).

4. Discussion

Despite the fact that the flow cytometry-based *in vitro* MN test showed cytotoxicity for both B5 and B50 extracts, the data obtained by the other cytotoxic bioassays accomplished herein did not show a clear agreement between them. While TMRE assay indicated that B50 extract is capable of causing changes in $\Delta\Psi_m$, the Annexin V assay showed that B5 induces apoptosis by detection of PS externalization. On the other hand, the xCELLigence system was not characterized as a sensitive tool to evaluate cytotoxic potentials of the tested samples, since positive responses were

observed for all treatments carried out. However, the positive effects obtained for B5 and B50 extracts may be an indicative that diesel contaminants are responsible for those cytotoxic effects.

Diesel oil is a complex chemical mixture of hundreds of chemical substances, including the polyaromatic hydrocarbons (PAHs) (Vanzella et al., 2007). PAHs are ubiquitous environmental contaminant recognized by their peril to human health (Marin-Morales et al., 2009). PAHs can cause cytotoxicity directly or after their metabolic activation via cytochrome P450, depending on their molecular size. Two- and three-ring PAHs, such as naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene and phenanthrene, are recognized as direct cytotoxic inducers (Schirmer et al., 1998). The PAHs chemically quantified in B5 and B50 extracts refer to these smaller PAHs, fact that can explain the direct cytotoxicity observed. However, the differences between both response intensity observed in the flow cytometry MN test and mode of action detected by the assessments with TMRE and Annexin V can be related to the amount, interaction and bioavailability of the PAHs present in these samples.

Opposite to the cytotoxic assessment, the genotoxicological evaluation promoted an accurate analysis with agreement among the data obtained. However, unlike what was expected, the positive responses observed were related to the soils contaminated with biodiesel and its diesel blends.

The *Salmonella* mutagenicity assay employed in the present study was conducted by two different protocols, aiming at comparing their sensitivity in detecting mutagens. The preincubation procedure showed clear significant dose-responses for B100, B20 and B50 soil extracts in TA100 assay without metabolic activation, indicating that these samples induced mutations by base-pair substitutions. On the other

hand, the MPF protocol indicated an increase of <2-fold over the solvent control value only for a single dose of B20 extract (500 mg/mL) using TA1537 tester strain in the absence of S9. Nevertheless, as it did not meet all the criteria required by this method to predict the mutagenicity, it was not considered a positive result. The non-correlation data obtained in both *Salmonella* assay protocols used may be related to the mutagenic potentials obtained for these samples (378rev/mg-equivalent to B100, 0.4 rev/mg-equivalent to B20 and 37.4 rev/mg-equivalent to B50), which can be classified as weak mutagens. Thus, despite some studies stating that the Ames MPF assay is an efficient sorting alternative to the standard Ames test (Flückiger-Isler et al., 2004; Kamber et al., 2009; Umbuzeiro et al., 2009), even for weak mutagens (Xenometrix, 2009), the data shown herein did not confirm this statement and showed a higher sensitivity in detecting mutagens for the preincubation procedure.

The evaluation of CA and MN frequencies in meristematic cells of *A. cepa* exposed to the polluted soils revealed a significant CA induction to B100, B5, B20 and B50 soil samples, indicating their genotoxic potentials. However, no significant MN values were observed in this assay, showing that the CA detected did not result, in this case, in MN. Likewise, the flow cytometry-based *in vitro* MN test did not show significant MN induction for any treatment accomplished.

The positive genotoxic/mutagenic results obtained for biodiesel and their diesel blend polluted soils may have an interesting explanation. Unlike cytotoxic effects, which here were related to diesel pollutants, the genotoxicity/mutagenicity observed can be related to biodiesel contaminants. The criteria of biodiesel quality certification established by domestic and international standards comprehend only features that assure its quality as a fuel to use in compression ignition engines (ANP, 2008). The

presence of contaminants from the feedstock used in biodiesel production process, and which may negatively affect the environment, is not currently considered when assessing final biodiesel quality. Soybean, one of the main source of biodiesel production (Canakci and Sanli, 2008), is recognized by its high concentration of phytoestrogens and phytosterols (Paniagua-Pérez et al., 2005; Klein and King, 2007). Phytoestrogen benefits to human health are a vastly discussed issue due to the contradictory researchers' opinions. However, in the environmental field they have been indicated as emerging contaminants, due to their estrogenic activities, which have been disturbing the environment even in non significant concentrations (ppm) (Kang and Price, 2009; Kuster et al., 2009; Richardson, 2009; Liu et al., 2010). Besides estrogenicity, phytoestrogens have also been indicated as genotoxic and mutagenic agents (Kulling and Metzler et al., 1997; Metzler et al., 1998; Virgilio et al., 2004; Stopper et al., 2005). Virgilio et al. (2004) showed that genistein and daidzein, abundant soybean phytoestrogens, are able to induce MN in a dose-dependent manner in V79 cells. Afterwards, Klein and King (2007) characterized genistein as a clastogenic agent by *in vitro* cell culture assays.

The genotoxic/mutagenic results obtained, mainly for B100 treatment, led us to detect and quantify phytoestrogens/phytosterols in the test samples, as well as in the biodiesel used, employing Gas Chromatographic Mass Spectrometry (GC-MS) technique. However, due to the long storage time of the soil extracts, and the fact that they were resuspended in DMSO, this chemical analysis was neither successful nor conclusive. The analysis of the neat biodiesel was also a problematic issue, since it was reaching expiry date (12 months); however, it was still possible to detect the presence of β -sistosterol in this biofuel. Such result may be a sign that phytoestrogens/phytosterols

are not eliminated during the biodiesel production processes and they may be present in the commercialized biodiesel.

Hence, as the soil spill simulations were performed using soybean biodiesel, we hypothesized that the genotoxic/mutagenic effects observed in the present study may be caused by the phytoestrogens derived from the feedstock. However, to confirm this assumption, the analysis of biological effects and phytoestrogens chemical identification should be conducted together.

5. Conclusion

Although biodiesel is considered an eco-friendly alternative to petroleum-based diesel, our data serves as a warning to this assertion. The soil contaminated with biodiesel and their diesel blends promote here genotoxicity and mutagenicity by induction of CA and mutation through base-pair substitution. Withal, these positive responses may be related to contaminants from the feedstock used in the biodiesel production, which here refers to soybean. If this hypothesis becomes true, detection and removal of these pollutants from marketed biodiesel should be considered to warrant environmental quality. Nevertheless, it is important to stress that not all biodiesel will produce DNA damage to exposed organisms; it will depend on the raw material source used in its production. Additionally, the presence and amount of these secondary contaminants are as important as the feedstock kind in the marketed biodiesel.

Except for real-time xCELLigence™ impedance analysis and Ames MPF assay, all the bioassays employed here proved to be valuable tools for environmental mutagen screening. Furthermore, the outcomes agreement among the bioassays used into this

genotoxicological assessment should be highlighted, once the correlation among test systems is fundamental for accurate evaluations of the environmental risks, as well as extrapolation of data to other target organisms.

Acknowledgements

We would like to thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – São Paulo/SP, Brazil, for the financial support (Process No. 2007/04304-3) and the Bioverde (Brazilian Biofuel Company) for having kindly provided us with the fuels used in the present work.

References

- A. Lapinskiene, P. Martinkus, V. Rebzdaite, Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil, *Environ Pollut* 142 (2006) 432-437.
- A.L.D. Virgilio, K. Iwami, W. Wätjen, R. Kahl, G.H. Degen, Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells, *Toxicol Lett.* 151 (2004) 151-162.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis), Resolução ANP Nº 7, de 19.3.2008 - DOU 20.3.2008, Brasil, 2008.
- C.B. Klein, A.A. King, Genistein genotoxicity: Critical considerations of *in vivo* exposure dose, *Toxicol Appl Pharmacol.* 224 (2007) 1-11.
- D.M. Leme, M.A. Marin-Morales, *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application, *Mutat Res.* 682 (2009) 71-81.

- D.M. Leme, M.A. Marin-Morales, Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study, *Mutat Res.* 650 (2008) 80-86.
- D.M. Maron, B.N. Ames, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat Res.* 113 (1983) 173-214.
- EPA (Environmental Protection Agency), 1990. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-solid extraction and hplc with coupled ultraviolet and fluorescence detection. Method 550.1, July, 1990.
- G. Knothe, Historical perspectives on vegetable oil-based diesel fuels, *Ind Oils* 12 (2001) 1103-1107.
- G.A. Umbuzeiro, C.M. Rech, S. Correia, A.M. Bergamasco, G.H.L. Cardenette, S. Flückiger-Isler, M. Kamber, Comparison of the *Salmonella*/microsome microsuspension assay with the new microplate fluctuation protocol for testing the mutagenicity of environmental samples, *Environ Mol Mutagen.* 51 (2010) 31-38.
- H. Stopper, E. Schmitt, K. Kobras, Genotoxicity of phytoestrogens, *Mutat Res.* 574 (2005) 139-155.
- J. Kang, W.E. Price, Occurrence of phytoestrogens in municipal wastewater and surface waters, *J Environ Monit.* 11 (2009) 1477-1483.
- J. Shi, R. Bezabhe, A. Szkudlinska, Further evaluation of flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies, *Mutagenesis* 25 (2010) 33-40.
- K. Mortelmans, E. Zeiger, The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutat Res.* 455 (2000) 29-60.

- K. Schirmer, D.G. Dixon, B.M. Greenberg, N.C. Bols, Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill, *Toxicology* 127 (1998) 129-141.
- K.J. Swanson, M.C. Madden, A.J. Ghio, Biodiesel Exhaust: The Need for Health Effects Research, *Environ Health Perspect* 115 (2007) 496-499.
- L. Bernstein, J. Kaldor, J. McCann, M.C. Pike, An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from *Salmonella* test. *Mutat Res.* 97 (1982) 267-281.
- M. Canakci, H. Sanli, Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties, *J Ind Microbiol Biotechnol* 35 (2008) 431-441.
- M. Fenech, The *in vitro* micronucleus technique, *Mutat Res.* 455 (2000) 81-95.
- M. Kamber, S. Flückiger-Isler, G. Engelhardt, R. Jaeck, E. Zeiger, Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity. *Mutagenesis* 24 (2009) 359-366.
- M. Kuster, D.A. Azevedo, M.J. López de Alda, F.R. Aquino Neto, D. Barceló, Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental water from Rio de Janeiro (Brazil), *Environ Int.* 35 (2009) 997-1003.
- M. Metzler, S.E. Kulling, E. Pfeiffer, E. Jacobs, Genotoxicity of estrogens, *Z. Lebensm Unters Forsch A* 206 (1998) 367-373.
- M. Nüsse, W. Beisker, J. Kramer, B. Miller, G. Schreiber, S. Viaggi, E. Weller, J. Wessels, Measurement of micronuclei by flow cytometry, *Methods Cell. Biol.* 42 (1994) 149-158.
- M.A. Marin-Morales, D.M. Leme, D.E.C. Mazzeo, A review of the hazardous effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on living organisms. in: Haines, P.A.,

- Hendrickson, M.D. (Eds.). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Pollution, Health and Chemistry, Nova Science Publishers Inc., 2009, pp.2-49.
- M.F.G. Meniconi, I.T. Gabardo, M.E.R. Carneiro, S.M. Barbanti, G.C. Silva, C.G. Massone, Brazilian Oil Spills Chemical Characterization-Case Studies, Environmental Forensics 3 (2002) 303-321.
- N.Y. Kado, D. Landley, E. Eisenstadt, A simple modification of the *Samonella* liquid incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine, Mutat Res. 121 (1983) 25-32.
- P.A. White, L.D. Claxton, Mutagens in contaminated soil: a review, Mutat Res. 567 (2004) 227-345.
- M.T. Pena, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, Sample preparation of sewage sludge and soil samples for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on one-pot microwave-assisted saponification and extraction, Anal Bioanal Chem., 387, (2007) 2559-2567.
- R. Franco, R. Sánchez-Olea, E.M. Reyes-Reyes, M.I. Panayiotidis, Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois, Mutat Res. 674 (2009) 3-22.
- R. Paniagua-Pérez, E. Madrial-Bujaidar, S. Reyes-Cadena, D. Molina-Jasso, J.P. Gallaga, A. Silva-Miranda, O. Velazco, N. Hernández, G. Chamorro, Genotoxic and Cytotoxic Studies of Beta-Sitosterol and Pteropodine in Mouse, J Biomed Biotechnol. 3 (2005) 242-247.
- S. Flückiger-Isler, M. Baumeister, K. Braum, V. Gervais, N. Hasler-Nguyen, R. Reimann, J. Van Gompel, H-G. Wunderlich, G. Engelhardt, Assessment of the performance of the Ames IITM assay: a collaborative study with 19 coded compounds, Mutat Res. 558 (2004) 181-197.

- S.D. Richardson, Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues, Anal Chem. 81 (2009) 4645-4677.
- S.E. Kulling, M. Metzler, Induction of Micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese Hamster V79 cells by phytoestrogen coumestrol, Food Chem Toxicol. 35 (1997) 605-613.
- S.M. Bryce, J. Shi, J. Nicolette, M. Diehl, P. Sonders, S. Avlasevich, S. Raja, J.C. Bemis, S.D. Dertinger, High content flow cytometric micronucleus scoring method is applicable to attachment cell lines, Environ Mol Mutagen. 51 (2010) 260-266.
- S.M. Bryce, J.C. Bemis, S.L. Avlasevich, S.D. Dertinger, *In vitro* micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity, Mutat Res. 630 (2007) 78-91.
- S.M. Bryce, S.L. Avlasevich, J.C. Bemis, M.A. Lukamowicz, A. Elhajouji, F. Van Goethem, M. De Boeck, D. Beerens, H. Aerts, J. Van Gompel, J.E. Collins, P.C. Ellis, A.T. White, A.M. Lynch, S.D. Dertinger, Interlaboratory evaluation of a flow cytometric, high content *in vitro* micronucleus assay, Mutat Res. 650 (2008) 181-195.
- S.V. Ranganathan, S.L. Narasimhan, K. Muthukumar, An overview of enzymatic production of biodiesel, Bioresour Technol. 99 (2008) 3975-3981.
- SBMCTA (Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental), 2010. Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella*/microsoma).
- T. Watanabe, T. Hirayama, Genotoxicity of Soil, Journal of Health Science, 47 (2001) 433-438.

- T.P. Vanzella, C.B.R. Martinez, I.M.S. Cólus, Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species, *Mutat Res.* 631 (2007) 36-43.
- L.T. Taylor, D.M. Jones, Bioremediation of coal tar PAH in soil using biodiesel, *Chemosphere* 44 (2001) 1131-1136.
- W.F. Grant, Chromosome aberration assays in *Allium*, *Mutat Res.* 99 (1982) 273-291.
- Xenometrix, Newsletter, Issue 4, October 2009.
http://www.xenometrix.ch/fileadmin/xenometrics/pdf/Weak_mutagens_in_the_Ames_II_Ames_MPF_assay.pdf.
- Z.-H. Liu, Y. Kanjo, S. Mizutani, A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment, *Water Res.* 44 (2010) 567-577.

Table 1. PAHs detected in soil samples from the spill simulations carried out.

PAHs (mg/Kg)	SC	B5	B20	B50	D100	B100
naphthalene	2.1	53.4	47.8	41.2	59.3	3.4
acenaphthylene	0.1	1.3	1.2	0.9	1.4	0.2
fluorene	0.2	8.8	7.6	7.1	9.8	0.8
phenanthrene	1.3	29.9	27.1	24.3	37.7	2.1
anthracene	0.2	1.2	1.1	1.1	1.3	0.7
fluoranthene	0.1	0.6	0.5	0.5	0.6	0.6
pyrene	0.1	4.0	3.8	3.2	4.5	0.4
benzo(a)anthracene	nd	0.3	0.1	0.1	0.3	0.1
chrysene	nd	2.4	2.3	2.2	2.7	0.6
benzo(e)pyrene	nd	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2
benzo(e)acephenanthrylene	0.1	0.8	0.6	0.8	0.8	0.3
benzo(k)fluoranthene	nd	1.0	0.8	0.9	1.1	0.9
benzo(a)pyrene	nd	0.4	0.2	0.3	0.4	0.3
dibenzo(a.h)anthracene	nd	0.2	0.1	0.1	0.2	nd
benzo(g.h.i)perilene	nd	0.2	0.1	0.1	0.2	nd
indene(123-cd)pyrene	nd	0.5	0.4	0.4	0.6	0.2
Σ PAHs	4.2	105.10	93.8	83.3	121.1	10.8

SC = water control; nd = not detected (below detection limit).

Table 2. Folder induction data related to $\Delta\Psi_m$ measurements.

Treatments	FI
DMSO	1
Etoposide 0.5 $\mu\text{g/mL}$	8.14
SC 5 mg/mL	0.89
B100 5 mg/mL	0.92
D100 5 mg/mL	0.84
B5 5 mg/mL	1.65
B20 5 mg/mL	0.92
B50 5 mg/mL	2.47

FI = fold induction over baseline (baseline = % event solvent control - DMSO). Values in bold indicate FI greater than 2. Data obtained by measurements of 60000 ungated events per treatment.

Table 3. Comparison of folder induction results from Annexin V assay.

Treatments	Annexin V ⁺ /PI ⁻	Annexin V ⁺ /PI ⁺
	<i>Early Apoptotic Cells</i>	<i>Late Apoptosis or death</i>
	<i>FI</i>	<i>FI</i>
DMSO	1.00	1.00
Staurosporine 10 μM	7.25	1.99
MnCl ₂ 10 mM	1.17	2.55
SC 5 mg/mL	1.14	1.14
B100 5 mg/mL	1.13	1.26
D100 5 mg/mL	1.27	1.31
B5 5 mg/mL	2.87	1.68
B20 5 mg/mL	1.53	1.19
B50 5 mg/mL	1.02	0.91

FI = fold induction over baseline (baseline = events % of solvent control - DMSO). Values in bold indicate FI greater than 2. Data obtained by measurements of 20000 ungated events per treatment.

Table 4. Real-time cell impedance analyses (xCELLigence system). Doubling time results of HepG2 cells exposure to soil extracts for 96 h.

	Exposure Time					
	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
DMSO	15.51±0.59	16.36±0.28	17.97±0.13	20.96±0.37	27.61±0.82	36.09±1.35
Staurosporine 0.25 µM	12.95±1.49	16.48±0.87	23.56±0.77*	32.53±1.59*	53.02±3.45*	74.24±4.87*
MnCl ₂ 0.63 mM	20.93±1.73*	23.25±0.71*	30.92±1.19*	49.68±2.08*	72.05±3.45*	98.93±5.14*
SC 7 mg/mL	19.85±1.03*	21.99±0.48*	23.74±0.21*	25.57±0.23*	30.90±0.59*	38.19±1.02
SC 5 mg/mL	22.67±1.87*	19.56±0.56*	16.77±0.26	16.80±0.18	21.31±0.53	27.88±0.99*
B100 7 mg/mL	22.83±1.89*	26.99±0.92*	30.18±0.48*	40.36±0.99*	49.39±1.15*	58.95±1.45*
B100 5 mg/mL	57.04±6.39*	30.14±2.62*	20.68±0.68*	20.14±0.21	23.76±0.41	29.61±0.80*
D100 7 mg/mL	18.80±1.27*	21.83±0.67*	23.31±0.29*	25.11±0.23*	29.64±0.50	35.61±0.81
D100 5 mg/mL	18.81±1.69	18.24±0.47*	17.02±0.19	18.15±0.22	22.90±0.55	29.25±0.94
B5 7 mg/mL	28.37±2.01*	27.59±0.60*	22.73±0.44*	21.62±0.21	25.53±0.49	32.60±0.95
B5 5 mg/mL	23.38±0.91*	21.27±0.38*	20.44±0.12*	23.63±0.38*	31.25±0.93*	40.74±1.51*
B5 2.5 mg/mL	21.11±0.59	19.57±0.29*	18.40±0.12*	21.50±0.38	28.85±0.92	37.92±1.49
B5 1.25 mg/mL	19.49±0.28*	18.31±0.23*	18.63±0.13*	22.14±0.35*	27.97±0.69	35.55±1.13
B5 0.625 mg/mL	18.09±0.06*	18.25±0.07*	19.95±0.22*	24.85±0.45*	31.57±0.81*	40.36±1.32*
B20 7 mg/mL	18.66±0.92*	19.25±0.30*	18.07±0.16	18.93±0.21	24.65±0.69	32.99±1.30
B20 5 mg/mL	26.87±1.40*	21.81±0.99*	19.38±0.33*	19.97±0.18	24.77±0.56	31.85±1.04

B50 7 mg/mL	30.09±1.88*	26.73±0.91*	19.83±0.52*	19.33±0.22	24.33±0.60	31.90±1.13
B50 5 mg/mL	53.80±3.20*	27.91±2.04*	21.21±0.46*	21.79±0.23	27.08±0.62	34.61±1.11
B50 2.5 mg/mL	28.33±1.30*	24.13±0.64*	23.04±0.21*	24.71±0.25*	30.25±0.63*	37.71±1.09
B50 1.25 mg/mL	17.13±0.31*	16.06±0.17	16.09±0.08	19.61±0.38	25.96±0.81	34.34±1.38
B50 0.625 mg/mL	14.94±0.12	14.29±0.09	14.90±0.10	19.80±0.55	28.23±1.14	39.14±1.94

Data expressed as Mean±SD of doubling time measurements. *p<0.05, according to Student's t-test.

Table 5. Results of soil sample extracts analyzed by Ames MPF Assay.

MPF protocol																	
Positive wells per microplate																	
Sample	Doses	TA98				TA100				TA1535				TA1537			
		-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
		Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB	Mean±SD	FIB
SC	0	7.25±2.34		1.42±1.15		10.08±3.32		1.67±1.53		1.00±0.97		1.00±0.73		1.22±1.56		1.00±0.87	
	0.05	8.33±2.31	0.87	1.67±1.15	0.60	12.00±0.00	0.90	3.33±3.51	1.04	0.67±0.58	0.38	0.33±0.58	0.26	1.67±0.58	0.60	0.67±0.58	0.43
	0.5	8.00±2.00	0.83	2.33±1.15	0.83	14.33±4.16	1.07	1.67±1.53	0.52	1.33±1.53	0.76	0.33±0.58	0.26	3.00±2.65	1.08	0.00±0.00	0.00
	5	8.67±1.15	0.90	2.33±1.53	0.83	8.00±2.00	0.60	1.00±1.00	0.31	0.33±0.58	0.19	0.00±0.00	0.00	3.33±1.15	1.20	1.33±0.58	0.87
	50	8.00±1.00	0.83	2.67±1.15	0.95	12.33±1.53	0.92	0.33±0.58	0.10	1.33±0.58	0.76	0.33±0.58	0.26	3.67±1.53	1.32	1.33±1.15	0.87
	500	6.00±3.00	0.63	2.67±2.31	0.95	9.33±2.08	0.70	1.67±1.15	0.52	0.33±0.58	0.19	0.33±0.58	0.26	2.00±0.00	0.72	0.33±0.58	0.22
	PC	29.00±4.00		48.00±0.00		48.00±0.00		39.00±3.61		48.00±0.00		14.67±3.06		39.33±4.04		28.33±1.53	
B100	0	7.25±2.34		1.42±1.38		10.08±3.32		2.44±1.42		1.00±0.97		1.00±0.73		1.22±1.56		1.00±0.87	
	0.05	7.33±0.58	0.76	4.67±3.79	1.67	5.67±2.08	0.42	2.33±2.08	0.60	0.67±0.58	0.38	0.00±0.00	0.00	1.67±2.89	0.60	1.00±1.00	0.65
	0.5	6.00±1.00	0.63	1.67±2.08	0.60	10.33±4.04	0.77	3.33±0.58	0.86	1.00±1.00	0.57	0.33±0.58	0.26	1.00±1.00	0.36	1.33±1.53	0.87
	5	8.33±1.15	0.87	1.33±0.58	0.48	12.00±4.58	0.90	1.67±2.08	0.43	1.67±1.53	0.95	0.00±0.00	0.00	1.33±1.53	0.48	0.67±1.15	0.43
	50	7.33±1.15	0.76	5.00±3.00	1.79	12.67±3.06	0.95	3.33±2.08	0.86	0.00±0.00	0.00	0.67±0.58	0.52	1.67±2.89	0.60	0.67±1.15	0.43
	500	1.67±0.58	0.17	3.00±1.00	1.07	12.67±7.09	0.95	5.33±3.21	1.38	1.33±1.15	0.76	0.33±0.58	0.26	1.00±1.00	0.36	0.67±0.58	0.43
	PC	40.67±3.21		48.00±0.00		48.00±0.00		46.33±2.08		48.00±0.00		15.67±2.31		39.33±4.93		28.33±1.53	
D100	0	7.25±2.34		1.42±1.38		10.08±3.32		2.44±1.42		1.00±0.97		1.00±0.73		1.22±1.56		1.00±0.87	
	0.05	8.33±3.06	0.87	2.00±1.00	0.72	9.33±2.52	0.70	3.33±3.21	0.86	0.67±0.58	0.38	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.33±0.58	0.22

	0.5	6.00±1.73	0.63	2.33±0.58	0.83	10.67±3.51	0.80	2.67±2.52	0.69	0.33±0.58	0.19	0.00±0.00	0.00	1.67±2.08	0.60	0.67±0.58	0.43
	5	10.33±2.31	1.08	2.00±1.73	0.72	9.67±4.93	0.72	2.67±0.58	0.69	1.33±1.53	0.00	0.00±0.00	0.00	0.33±0.58	0.12	1.33±0.58	0.87
	50	10.33±3.79	1.08	2.33±1.15	0.83	11.33±3.51	0.85	6.00±4.36	1.55	1.33±1.53	1.14	0.00±0.00	0.00	4.00±3.00	1.44	1.33±1.15	0.87
	500	3.00±2.00	0.31	4.33±1.15	1.55	11.00±3.00	0.82	1.33±1.15	0.34	1.33±1.53	0.76	0.00±0.00	0.00	2.33±2.52	0.84	1.00±1.00	0.65
	PC	40.67±3.21		48.00±0.00		48.00±0.00		43.00±3.61		48.00±0.00		15.33±2.89		44.33±2.52		28.33±1.53	
B5	0	7.08±1.88		1.75±1.60		10.00±3.33		2.83±3.13		1.00±0.44		1.00±0.71		1.00±0.44		1.00±0.73	
	0.05	8.00±2.65	0.89	1.67±0.58	0.50	8.33±4.16	0.63	2.00±1.73	0.34	0.00±0.00	0.00	0.67±1.15	0.49	0.00±0.00	0.00	0.67±1.15	0.57
	0.5	4.00±2.65	0.45	2.33±1.15	0.70	7.33±5.51	0.55	3.33±3.21	0.56	0.67±0.58	0.67	0.33±0.58	0.24	0.33±0.58	0.33	1.00±0.00	0.85
	5	5.33±2.08	0.59	2.33±1.53	0.70	9.33±2.89	0.70	2.67±1.15	0.45	0.33±0.58	0.33	0.33±0.58	0.24	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00
	50	6.67±3.79	0.74	1.00±1.00	0.30	11.00±2.65	0.83	2.00±1.00	0.34	0.33±0.58	0.33	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.67±0.58	0.57
	500	3.37±1.15	0.41	2.67±2.08	0.80	10.00±4.36	0.75	3.00±1.73	0.50	0.33±0.58	0.33	0.67±0.58	0.49	0.00±0.00	0.00	0.67±0.58	0.57
	PC	40.33±4.51		48.00±0.00		48.00±0.00		46.67±0.58		48.00±0.00		17.33±0.58		44.33±2.52		24.33±4.04	
B20	0	7.08±1.88		1.75±1.6		10.00±3.33		2.83±3.13		1.00±0.44		1.00±0.71		1.00±0.44		1.00±0.73	
	0.05	4.33±0.58	0.48	3.00±2.65	0.89	10.00±5.00	0.75	1.00±0.00	0.17	1.33±1.15	1.33	0.33±0.58	0.24	1.00±1.00	1.00	0.33±0.58	0.28
	0.5	5.00±1.73	0.56	2.00±1.00	0.60	12.00±7.81	0.90	2.00±0.00	0.34	1.00±0.00	1.00	0.33±0.58	0.24	0.67±0.58	0.67	1.00±1.00	0.85
	5	7.33±1.53	0.82	2.00±1.00	0.60	7.67±0.58	0.58	3.33±2.08	0.56	0.00±0.00	0.00	0.33±0.58	0.24	0.00±0.00	0.00	0.33±0.58	0.28
	50	5.67±0.58	0.63	1.33±2.31	0.40	8.00±4.36	0.60	2.33±2.31	0.39	1.33±1.15	1.33	0.33±0.58	0.24	0.67±1.15	0.67	1.00±1.00	0.85
	500	7.00±1.00	0.78	1.00±1.00	0.30	11.00±1.73	0.83	5.33±3.21	0.89	0.67±0.58	0.67	1.00±1.73	0.73	2.00±3.46	2.00	0.33±0.58	0.28
	PC	40.33±4.51		48.00±0.00		48.00±0.00		46.67±0.58		48.00±0.00		17.67±0.58		43.00±1.73		28.33±1.53	
B50	0	7.08±1.88		1.75±1.60		10.00±3.33		2.83±3.13		1.00±0.44		1.00±0.71		1.00±0.44		1.00±0.73	
	0.05	7.00±1.00	0.78	2.00±2.00	0.60	9.33±3.21	0.70	0.00±0.00	0.00	1.00±1.00	1.00	0.67±0.58	0.49	0.00±0.00	0.00	0.67±0.58	0.57
	0.5	6.67±5.51	0.74	3.67±1.53	1.09	13.67±4.73	1.03	1.67±1.15	0.28	1.00±1.00	1.00	1.00±1.00	0.73	0.33±0.58	0.33	1.00±1.00	0.85
	5	5.67±2.31	0.63	2.00±1.73	0.60	10.33±6.35	0.78	3.00±2.65	0.50	0.33±0.58	0.33	0.00±0.00	0.00	0.67±1.15	0.67	0.67±0.58	0.57
	50	7.67±5.51	0.86	2.00±1.73	0.60	10.67±3.21	0.80	2.00±0.00	0.34	0.33±0.58	0.33	0.67±0.58	0.49	0.00±0.00	0.00	0.67±0.58	0.57

500	6.00±3.46	0.67	1.67±0.58	0.50	11.00±4.58	0.83	3.00±1.73	0.50	0.00±0.00	0.00	0.33±0.58	0.24	0.67±0.58	0.67	1.00±1.73	0.85
PC	29.00±4.00		48.00±0.00		48.00±0.00		46.33±2.08		48.00±0.00		17.67±0.58		46.67±1.15		28.33±1.53	

FIB = fold induction over baseline (baseline = mean zero-dose control + 1SD). SD = standard deviation. Doses = mL equivalent per plate.

PC = positive controls. Values in bold indicate FIB greater than 2.

Table 6. Results of soil sample extracts analyzed by *Salmonella*/microsome preincubation assay.

		Preincubation protocol							
		Revertants per plate							
Samples	Doses	TA98		TA100		TA1535		TA1537	
		-S9 <i>Mean±SD</i>	+S9 <i>Mean±SD</i>	-S9 <i>Mean±SD</i>	+S9 <i>Mean±SD</i>	-S9 <i>Mean±SD</i>	+S9 <i>Mean±SD</i>	-S9 <i>Mean±SD</i>	+S9 <i>Mean±SD</i>
SC	0	20.75±2.36	41.00±5.29	132.35±15.65	150.20±19.64	8.50±2.12	7.50±0.71	6.50±2.12	7.00±2.83
	0.05	24.67±2.89	38.67±8.02	143.50±3.54	167.67±8.33	9.50±3.54	8.00±5.66	7.50±0.71	6.50±3.54
	0.5	24.00±4.58	43.50±6.36	140.50±9.19	160.33±16.29	11.00±0.00	8.00±2.83	8.00±1.41	7.00±4.24
	5	24.00±3.61	35.33±1.53	139.5±6.36	152.67±7.51	12.00±0.00	9.00±2.83	10.00±0.00	4.00±1.41
	50	22.33±1.15	34.33±2.52	143±5.66	160.67±14.57	10.00±1.41	8.50±6.36	9.00±5.66	8.00±4.24
	500	18.00±7.21	38.67±6.03	134.50±4.95	159.00±10.82	10.00±0.00	5.00±0.00	7.00±0.00	10.50±3.54
	PC	520.00±90.50	1968.00±67.88	492.00±39.59	1410.66±96.44	1140.50±37.48	1194.50±21.92	148.00±15.56	928.00±305.47
B100	0	20.75±2.36	41.00±5.29	125.33±8.96	150.20±19.64	8,50±2.12	7.50±0.71	6.50±2.12	7.00±2.83
	0.01	-----	-----	135.33±15.82	-----	-----	-----	-----	-----
	0.015	-----	-----	142.00±0.00	-----	-----	-----	-----	-----
	0.05	23.00±2.00	40.33±4.93	180.00±3.61**	133.67±1.53	12.50±2.12	11.00±0.00	12.00±7.07	5.00±0.00
	0.5	21.00±5.29	41.67±1.15	175.33±14.01*	147.33±12.10	8.00±1.41	7.50±2.12	10.00±2.83	8.00±0.00
	5	21.33±5.51	40.67±1.53	150.67±4.04*	138.50±4.95	11.00±1.41	10.00±0.00	14.50±3.54	8.00±0.00
	50	26.00±1.73	40.50±14.85	-----	133.67±12.06	9.00±1.41	10.00±5.66	14.00±2.83	5.00±1.41
	500	23.33±0.58	42.33±10.50	-----	156.67±24.99	11.50±0.71	12.00±0.00	17.50±6.36	7.00±0.00
PC	520.00±90.50	1968.00±67.88	507.00±60.81	1410.66±96.44	1140.50±37.48	1194.50±21.92	148.00±15.56	928.00±305.47	

D100	0	20.75±2.36	41.00±5.29	132.25±15.65	150.20±19.64	8.50±2.12	7.50±0.71	6.50±2.12	7.00±2.83
	0.05	19.67±1.15	35.00±7.21	153.50±4.95	140.50±2.12	12.00±4.24	8.00±0.00	13.00±0.00	11.00±1.41
	0.5	15.67±4.16	37.33±1.15	155±13.53	144.00±7.07	13.00±2.83	7.00±2.83	9.50±2.12	4.50±2.12
	5	22.67±2.31	41.33±5.77	158.33±17.79	143.00±4.24	11.00±1.41	6.00±4.24	11.50±0.71	5.00±2.83
	50	24.33±6.03	43.67±3.79	168±0.00	154.00±11.53	11.50±4.95	7.50±0.71	15.00±0.00	7.50±2.12
	500	19.33±6.51	36.00±8.72	159.33±14.64	162.67±8.02	11.00±4.24	5.50±0.71	14.00±0.00	6.00±1.41
	PC	520.00±90.50	1968.00±67.88	492.00±39.59	1410.66±96.44	1140.50±37.48	1194.50±21.92	148.00±15.56	928.00±305.47
B5	0	20.75±2.36	41.00±5.29	132.25±15.65	150.20±19.64	8.50±2.12	7.50±0.71	6.50±2.12	7.00±2.83
	0.05	22.00±2.83	44.00±0.00	151.00±12.12	138.00±12.73	8.00±1.41	7.00±0.00	9.00±1.41	6.50±0.71
	0.5	26.67±7.57	44.00±4.58	148.00±8.49	129.67±11.93	12.00±1.41	10.00±5.66	9.50±0.71	4.00±0.00
	5	24.67±2.08	39.33±5.86	134.33±11.93	135.67±10.02	15.50±3.54	10.50±3.54	9.50±2.12	7.50±0.71
	50	28.33±3.51	39.67±7.23	165.67±9.81	160.00±22.07	13.00±2.83	7.50±3.54	7.00±0.00	7.00±4.24
	500	20.00±0.00	45.67±6.43	147.67±8.96	166.00±3.00	14.00±0.00	5.50±0.71	12.00±1.41	7.00±4.24
	PC	520.00±90.50	1968.00±67.88	507.00±60.81	1410.66±96.44	1140.50±37.48	1194.50±21.92	148.00±15.56	928.00±305.47
B20	0	20.75±2.36	41.00±5.29	125.33±8.96	150.20±19.64	8.50±2.12	7.50±0.71	6.50±2.12	7.00±2.83
	0.05	21.00±3.61	38.00±6.00	161.00±2.83*	129.33±15.01	10.00±0.00	8.00±2.83	11.00±4.24	4.00±1.41
	0.5	22.33±2.31	38.00±0.00	168.00±7.07*	136.67±19.55	11.00±4.24	8.00±0.00	8.50±0.71	5.00±0.00
	5	18.33±2.89	41.33±10.60	174.00±4.24**	138.67±13.28	10.50±0.71	7.00±0.00	12.00±4.24	7.00±1.41
	50	27.33±14.74	44.00±4.00	182.33±4.04**	163.67±3.51	9.00±0.00	10.00±4.24	10.50±6.36	6.00±0.00
	500	22.67±3.79	37.33±1.15	194.33±9.87**	168.33±12.74	8.00±0.00	6.00±1.41	14.00±0.00	7.00±5.66
	PC	520.00±90.50	1968.00±67.88	507.00±60.81	1410.66±96.44	1140.50±37.48	1194.50±21.92	148.00±15.56	928.00±305.47
B50	0	20.75±2.36	41.00±5.29	125.33±8.96	150.20±19.64	8.50±2.12	7.50±0.71	6.50±2.12	7.00±2.83
	0.05	18.33±1.53	33.00±11.27	162.00±5.66*	129.67±4.51	8.50±0.71	10.50±2.12	8.00±5.66	8.50±0.71
	0.5	16.33±3.51	4.67±5.03	166.33±13.58*	138.00±18.52	11.00±4.24	4.50±0.71	7.50±0.71	8.00±0.00

5	17.33±4.16	41.00±1.00	181.00±7.21**	130.00±12.12	11.50±0.71	10.00±1.41	14.00±0.00	9.00±2.83
50	19.67±4.51	43.00±11.53	159.00±4.24*	147.33±14.01	12.00±4.24	7.00±4.24	12.50±4.95	6.00±1.41
500	21.67±1.15	40.67±2.08	145.00±4.24	164.00±9.85	11.50±3.54	7.00±0.00	7.50±0.71	7.00±0.00
PC	520.00±90.50	1968.00±67.88	507.00±60.81	1410.66±96.44	1140.50±37.48	1194.50±21.92	148.00±15.56	928.00±305.47

Doses = mL equivalent per plate. PC = positive controls. SD = standard deviation. *p<0.05, **p<0.01 according to Bernstein model.

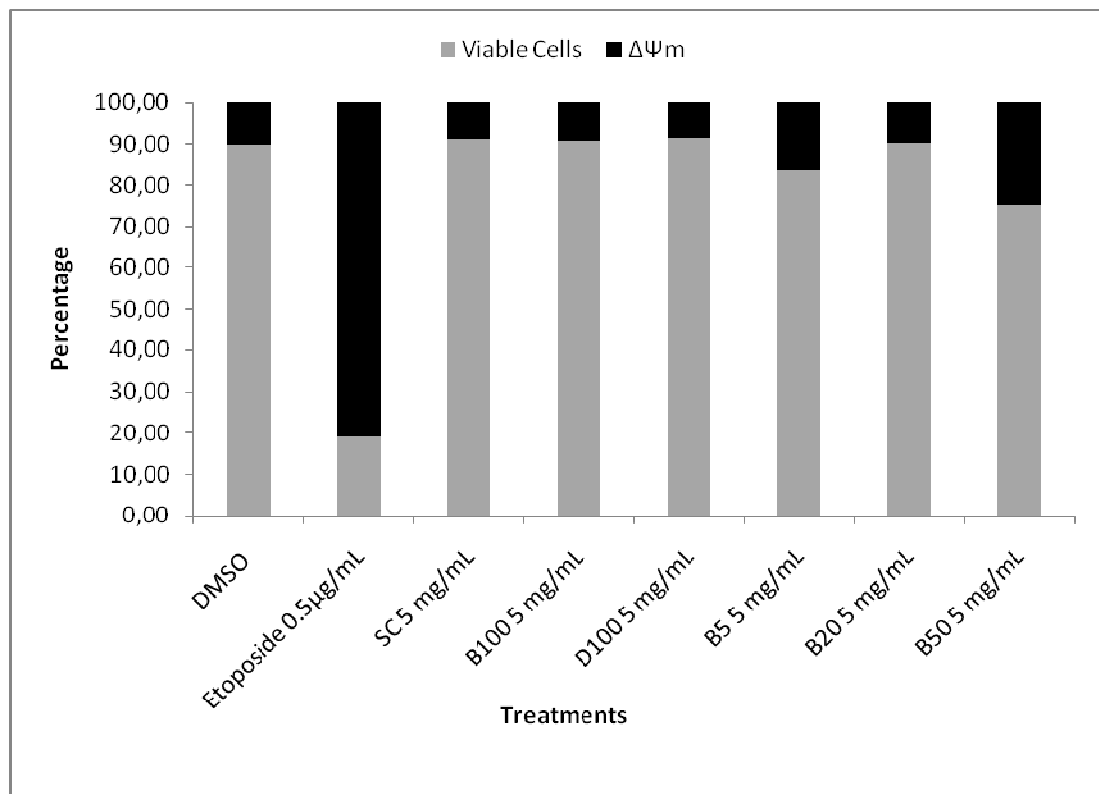


Figure 1. Flow cytometry data related to measurements of $\Delta\Psi_m$ events. Comparison of the results among solvent control (DMSO) and soil extracts expressed as a stack diagram.

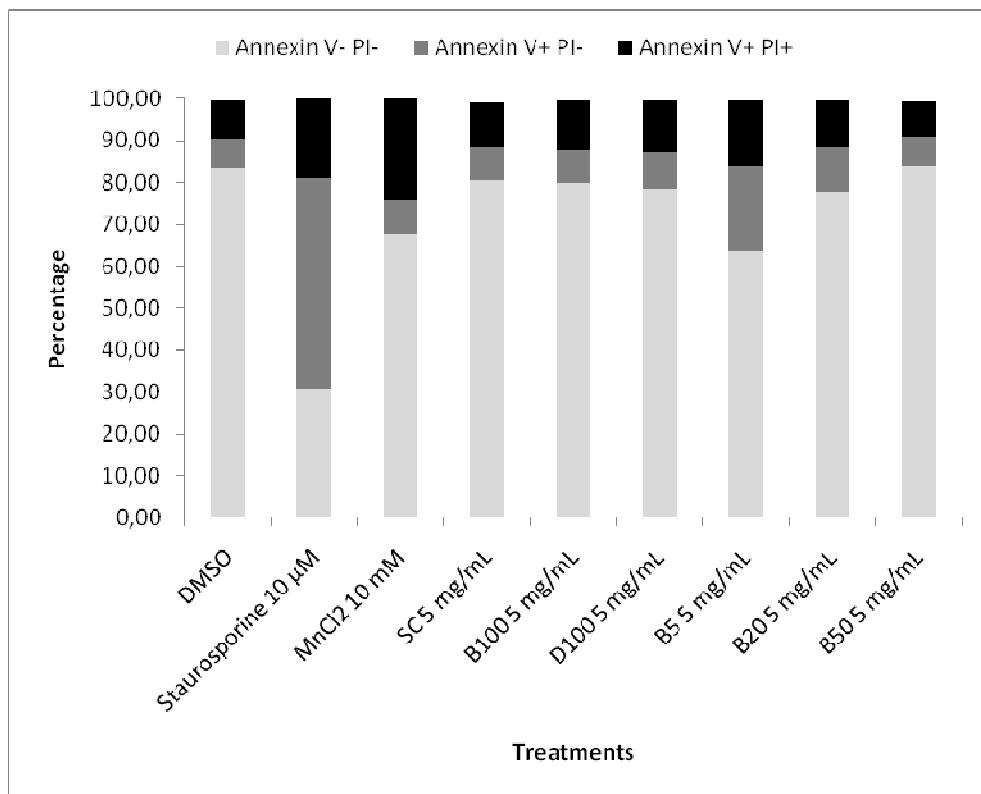


Figure 2. Flow cytometry data of apoptosis detection using Annexin V/PI expressed as a stack diagram.

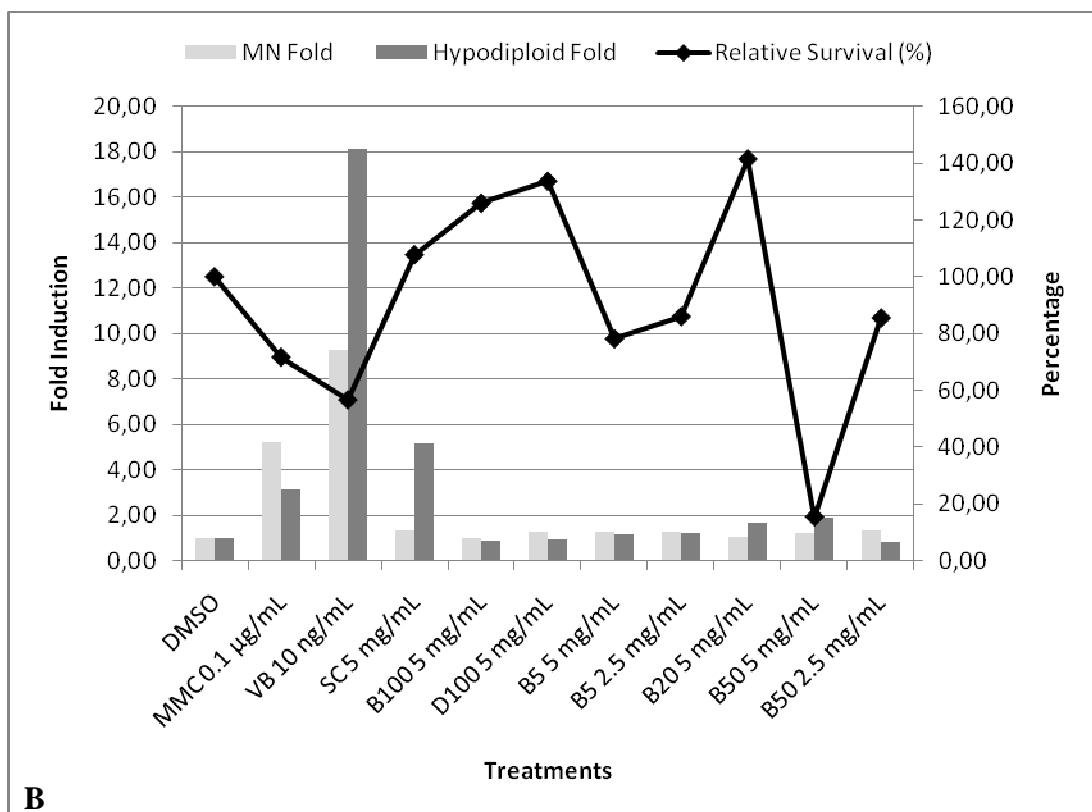
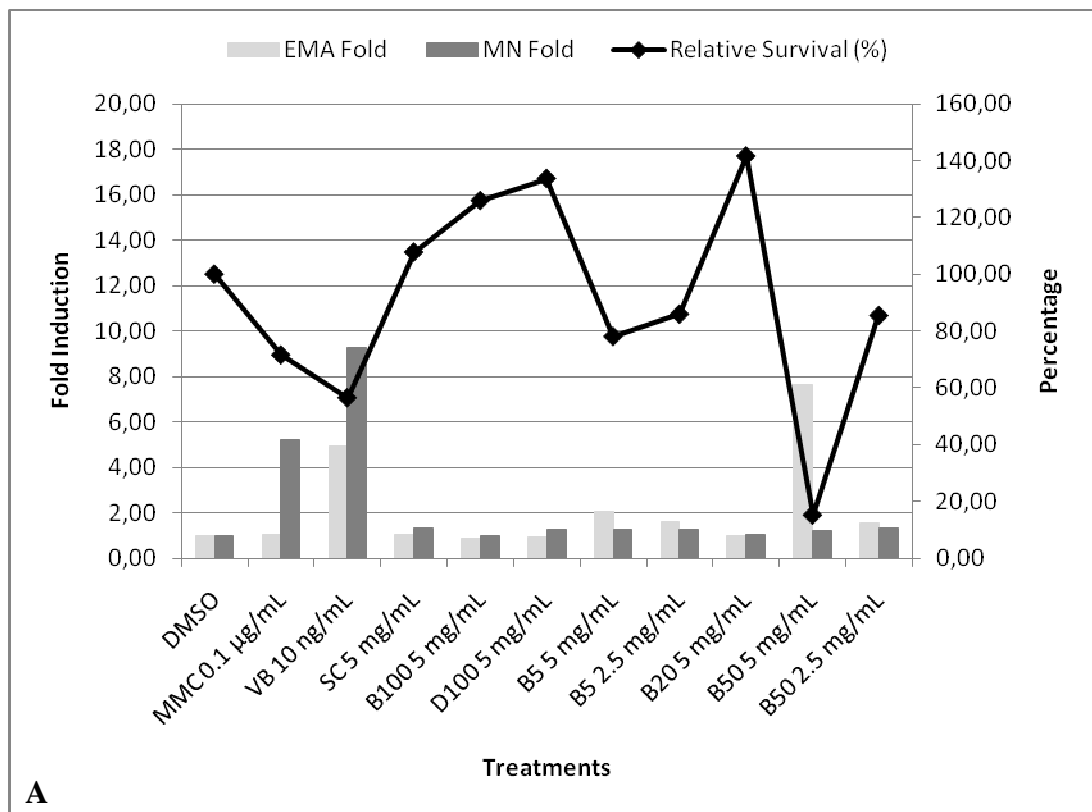
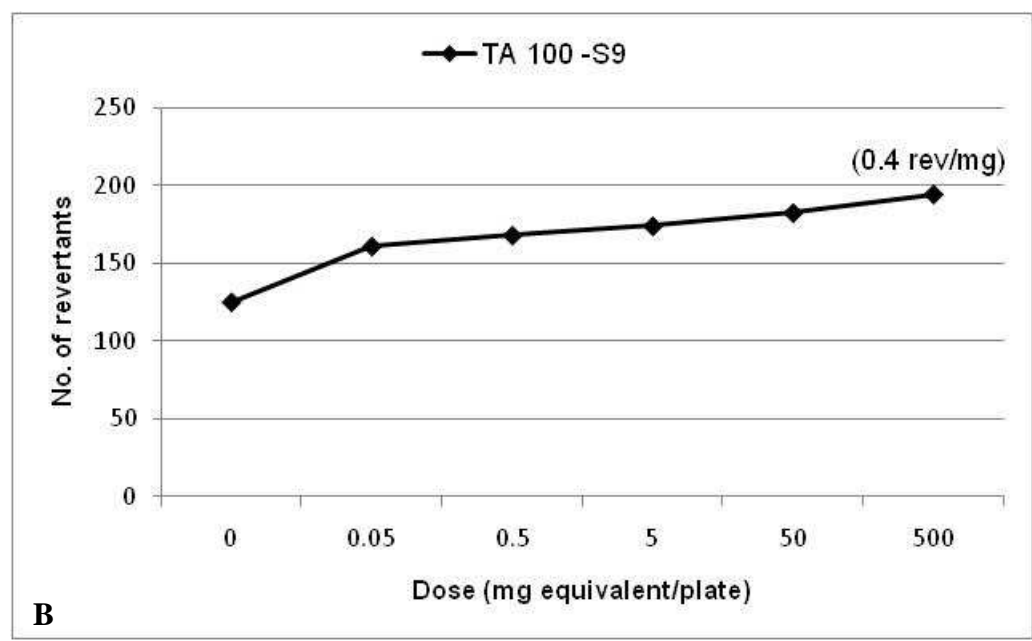
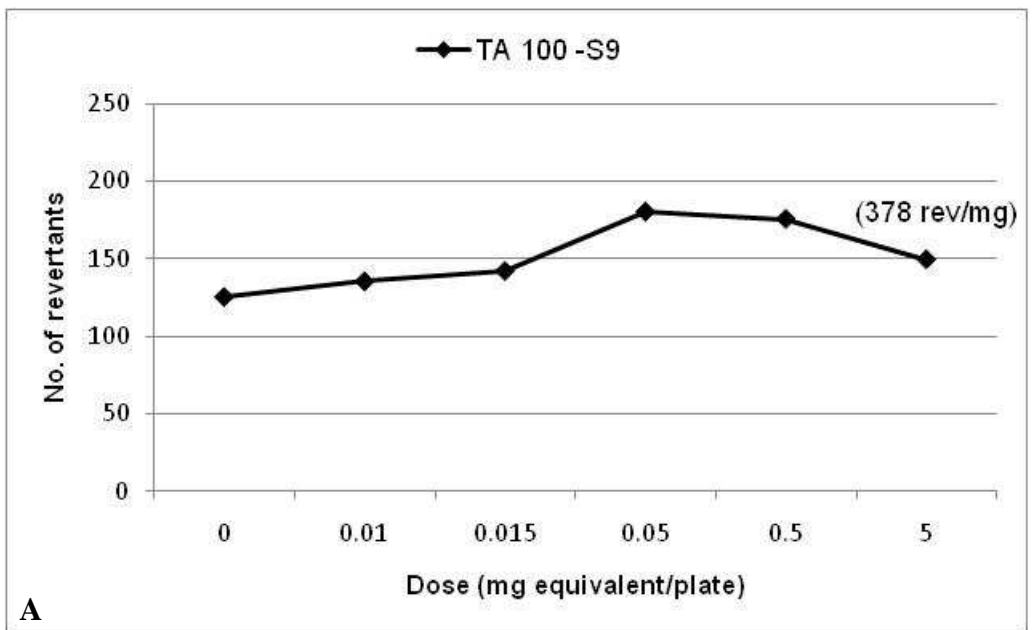


Figure 3. Results of flow cytometry-based *in vitro* MN assay. **A.** Mutagenicity and cytotoxicity data. *Y*-axis shows fold increase values of EMA+ and MN. *YY*-axis showed the percentage of Relative Survival; **B.** Hypodiploid events as aneugenic signature. VB and MMC were used as aneugenic and clastogenic positive controls, respectively. *Y*-axis shows fold increase values MN and hypodiploid events. *YY*-axis showed the percentage of Relative Survival.



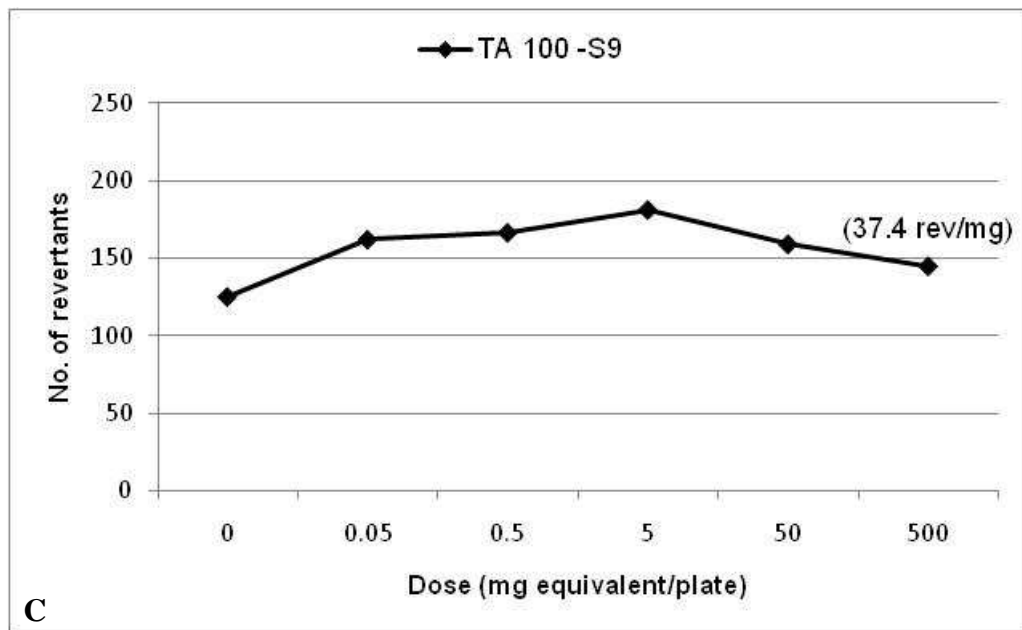


Figure 4. Dose-response curve for B100 (A), B20 (B) and B50 (C) soil extracts tested with the *Salmonella* strain TA100 in the absence of S9 by the preincubation protocol. The number in parenthesis represents the potency of tested sample, expressed in number of revertants per mg, which was calculated according to De Flora et al. (1984).

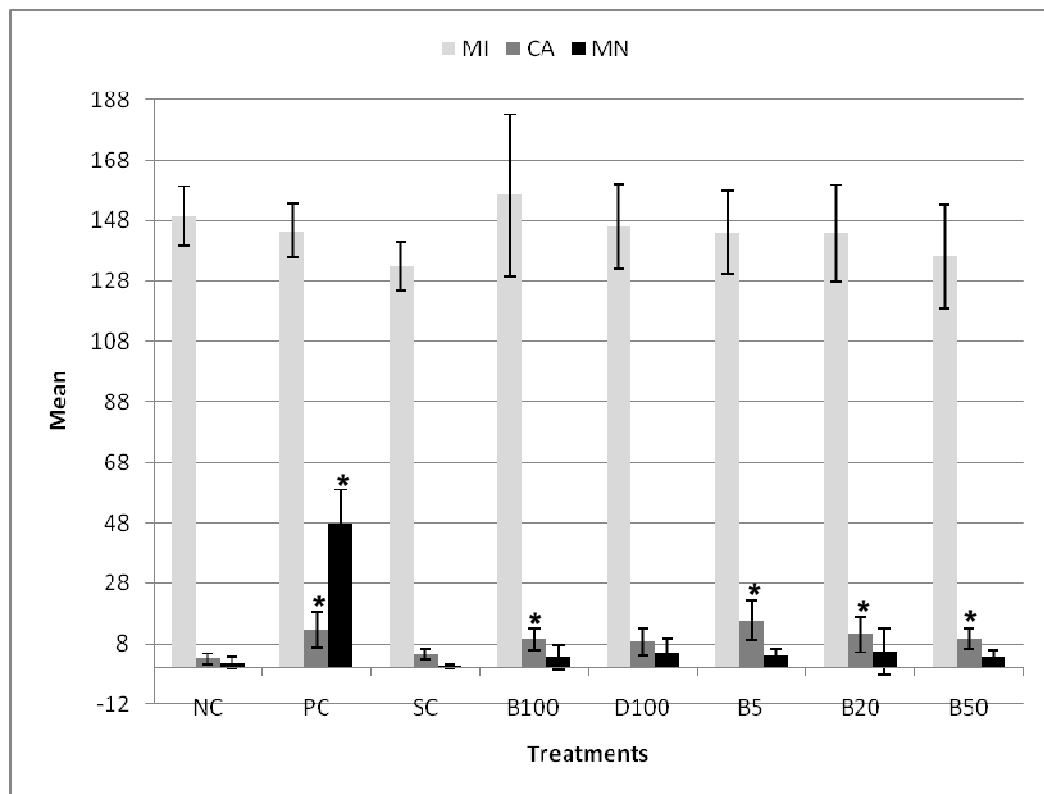


Figure 5. Results of MI, CA and MN in *A. cepa* meristematic cells after treatment with soil extracts from the spill simulations accomplished. 5000 cells analyzed per treatment. Mean \pm S.D. *Significantly different from negative control ($p < 0.05$), according to Kruskal-Wallis test.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

- Águas e solos poluídos com biodiesel podem promover danos no DNA de organismos expostos. No entanto, a mutagenicidade observada pode estar relacionada à presença de constituintes no biodiesel provenientes da matéria-prima utilizada em sua produção, que no presente trabalho refere-se à soja;
- Os resultados positivos de mutagenicidade obtidos no presente trabalho indicam certa cautela na classificação do biodiesel como um biocombustível ambientalmente seguro;
- Futuros experimentos são necessários para corroborar a hipótese de que a escolha da matéria-prima pode ser um fator relevante para a minimização dos impactos do biodiesel em casos de contaminações ambientais;
- Águas e solos contaminados com diesel podem produzir efeitos citotóxicos nos organismos expostos. A citotoxicidade aqui observada, provavelmente, está relacionada aos PAHs detectados nas amostras;

- De uma maneira geral, os ensaios biológicos utilizados no presente estudo se mostraram sensíveis aos objetivos propostos, permitindo uma acurada avaliação dos impactos dos combustíveis diesel e biodiesel nos organismos vivos em casos de contaminações em água e solo;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMES, B.N.; GOLD, L.S. Paracelsus to parasciense: the environmental cancer distraction. **Mutation Research**, v.477, p.3-13, 2000.

AMES, B.N.; LEE, F.D.; DURSTON, W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v.70, p. 782-786, 1973.

AN, Y.; JIANG, L.; CAO, J.; GENG, C.; ZHONG, L. Sudan I induces genotoxic effects and oxidative DNA damage in HepG2 cells. **Mutation Research**, v.627, p.164-170, 2007.

ASSEFA, Z.; VAN LAETHEM, A.; GARMYN, M.; AGOSTINIS, P. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1755, p.90-106, 2005.

ATADASHI, I.M.; AROUA, M.K.; AZIZ, A.A. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.1999–2008, 2010.

AVLASEVICH, S.L.; BRYCE, S.M.; CAIRNS, S.E.; DERTINGER, S.D. *In vitro* micronucleus scoring by flow cytometry: differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.47, p.56-66, 2006.

BALAT, M.; BALAT, H. Progress in biodiesel processing. **Applied Energy**, v.87, p.1815–1835, 2010.

BERNSTEIN, L., KALDOR, J., MCCANN, J., PIKE, M.C.. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from *Salmonella* test. **Mutation Research**, v.97, p.267-281, 1982.

BERRIDGE, V.M.; TAN, S.A. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondria electron transport in MTT reduction. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.303, p.474-482, 1992.

BLAKEY, D.; GALLOWAY, S.M.; KIRKLAND, D.J.; MAcGREGOR, J.T. Regulatory aspects of genotoxicity testing: from hazard identification to risk assessment. **Mutation Research**, v. 657, p.84-90, 2008.

BLANKENBERG, F.G. Imaging the Molecular Signatures of Apoptosis and Injury with Radiolabeled Annexin V. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v.6, p.469-476, 2009.

BOUCHIER-HAYES, L.; NUÑOZ-PINEDO, C.; CONNELL, S.; GREEN, D.R. Measuring apoptosis at the single cell level. **Methods**, v.44, p.222-228, 2008.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. RESOLUÇÃO ANP Nº 7, DE 19.3.2008 - DOU 20.3.2008
Resolução ANP Nº 7 de 19.03.2008. Disponível em:

http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2004/novembro/ranp%2042%20-%202004.xml. Acesso em: junho de 2010.

BRYCE, S.M.; BEMIS, J.C.; AVLASEVICH, S.L.; DERTINGER, S.D. *In vitro* micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. **Mutation Research**, v.630, p.78-91, 2007.

BRYCE, S.M.; AVLASEVICH, S.L.; BEMIS, J.C.; LUKAMOWICZ, M.A.; ELHAJOUJI, A.; VAN GOETHEM, F.; DE BOECK, M.; BEERENS, D.; AERTS, H.; VAN GOMPEL, J.; COLLINS, J.E.; ELLIS, P.C.; WHITE, A.T.; LYNCH, A.M.; DERTINGER, S.D. Interlaboratory evaluation of a flow cytometric, high content *in vitro* micronucleus assay. **Mutation Research**, v.650, p.181-195, 2008.

BRYCE, S.M.; SHI, J.; NICOLETTE, J.; DIEHL, M.; SONNERS, P.; AVLASEVICH, S.; RAJA, S.; BEMIS, J.C.; DERTINGER, S.D. High content flow cytometric micronucleus scoring method is applicable to attachment cell lines. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.51, p.260-266, 2010.

CASTEDO, M.; FERRI, K.; ROUMIER, T.; MÉTIVIER, D.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, v.265, p.39-47, 2002.

[CETESB] COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Setor de Mutagênese e Citotoxicidade – DAMM. Divisão de Análises Microbiológicas Ambientais – DAM. **Bioensaios de mutagenicidade para avaliação de amostras ambientais – Teste de Ames**. São Paulo, 1997.

CHO, Y.S.; PARK, S.Y.; SHIN, H.S.; CHAN, F.K.-M. Physiological consequences of programmed necrosis, an alternative form of cell demise. **Molecules and Cells**, v.29, p.327-332, 2010.

CLAXTON, L.D.; ALLEN, J.; AULETTA, A.; MORTELMANS, K.; NESTMANN, E.; ZEIGER, E. Guide for the *Salmonella typhimurium*/ mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. **Mutation Research**, v.189, p.83 -91, 1987.

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

COLLINS, J.E.; ELLIS, P.A.; WHITE, A.T.; BOOTH, A.E.G.; MOORE, C.E.; BURMAN, M.; REES, R.W.; LYNCH, A.M.; Evaluation of the Litron *In Vitro* MicroFlow® Kit for the flow cytometric enumeration of micronuclei (MN) in mammalian cells. **Mutation Research**, v.654, p.76-81, 2008.

CRAM, L.S. Flow cytometry, an overview. **Methods in Cell Science**, v.24, p.1-9, 2002.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, v.50, p.14-34, 2009.

DENECKER, G.; DOOMS, H.; LOO, G.V.; VERCAMMEN, D.; GROOTEN, J.; FIERIS, W.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. Phosphatidyl serine exposure during apoptosis precedes release of cytochrome *c* and decrease in mitochondrial transmembrane potential. **FEBS Letters**, v.465, p.47-52, 2000.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal National Cancer Institute**, v.66, p.1191-1308, 1981.

DONNELLY, K.C.; BROWN, K.W.; ANDERSON, C.S.; BARBEE, G.C.; SAFE, S.H. Metabolism and bacterial mutagenicity of binary mixtures of benzo(a)pyrene and polychlorinated aromatic hydrocarbon. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.16, p.238-245, 1990.

EHRlichA, V.; DARROUDI, F.; UHL, M.; STEINKELLNER, H.; GANN, M.; MAJER, B.J.; EISENBAUER, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of ochratoxin A in human-derived hepatoma (HepG2) cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.1085-1090, 2002.

ENGELAND, M.V.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v.31, p.1-9, 1998.

[EPA] Environmental Protect Agency. In: **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-solid extraction and hplc with coupled ultraviolet and fluorescence detection**. Method 550.1, July, 1990.

[EPA] Environmental Protect Agency. In: **Renewable Fuel Standard Program (RFS2) Regulatory Impact Analysis**. Disponível em: <http://www.epa.gov/OMS/renewablefuels/420r10003.pdf>. Acesso em: junho de 2010.

FADOK,V.A.; BRATTON, D.L.; FRASCH, S.C; WARNER, M.L.; HENSON, P.M. **Cell Death & Differentiation**, v.5, p.551-562, 1998.

FENECH, M. The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. **Methods in Molecular Biology**, v.410, p.185-216, 2008.

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

FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, P.; VILA, J.; GARRIDO, J.M.; GRIFOLL, M.; FEIJOO, G.; LEMA, J.M. Evaluation of biodiesel as bioremediation agent for the treatment of the shore affected by the heavy oil spill of the Prestige. **Journal of Hazardous Materials**, v.147, p.914-922, 2007.

FERRAZ, E.R.A. **Comparação da mutagenicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 utilizando o teste de mutagenicidade com *Salmonella***. USP, 2008. 105 páginas. Dissertação de mestrado. Programa de pós graduação em Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-SP, 2008.

FERRAZ, E.R.A.; UMBUZEIRO, G.A.; DE-ALMEIDA, G., CALOTO-OLIVEIRA, A.; CHEQUER, F.M.D.; ZANONI, M.V.B.; DORTA, D.J.; OLIVEIRA, D.P. Differential Toxicity of Disperse Red 1 and Disperse Red 13 in the Ames Test, HepG2 Cytotoxicity Assay, and Daphnia Acute Toxicity Test. **Environmental Toxicology**, 2010.

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

FLÜCKIGER-ISLER, S.; BAUMEISTER, M.; BRAUM, K.; GERVAIS, V.; HASLER-NGUYEN, N.; REIMANN, R.; VAN GOMPEL, J.; WUNDERLICH, H-G.; ENGELHARDT, G. Assessment of the performance of the Ames IITM assay: a collaborative study with 19 coded compounds. **Mutation Research**, v.558, p.181-197, 2004.

FORSBERG, A.J.; KAGAN, V.E.; SCHROIT, A.J. Thiol oxidation enforces phosphatidylserine externalization in apoptosis-sensitive and – resistant cells through a $\Delta\Psi_m$ /cytochrome *c* release-dependent mechanism. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.6, p.203-208, 2004.

FOTAKIS, G., TIMBRELL, J.A. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, p.171-177, 2006.

FRANCO, R.; SÁNCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E.M.; PANAYIOTIDIS, M.I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. **Mutation Research**, v.674, p.3-22, 2009.

FUJITA, C. K. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em solo: validação de método e avaliação da influência da queima de cana-de-açúcar na região de Araraquara**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

GALLEGO, J.L.R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J.F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, v.12, p.325-335, 2001.

GEE, P.; MARON, D.M.; AMES, B.N. Detection and classification of mutagens: a set of base-specific Salmonella tester strains. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.91, p.11606-11610, 1994.

GOLDSTEIN, J.C.; WATERHOUSE, N.J.; JUIN, P.; EVAN, G.I., GREEN, D.R. The coordinate release of cytochrome *c* during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. **Nature Cell Biology**, v.2, p. 156-162, 2000.

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**. Canos: Ulbra, 2003. pp.173-200.

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.

GREEN, D.R.; EVAN, G.I. A matter of life and death. **Cancer cell**, v.1, p.19-30, 2002.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. Mutações Gênicas In: **Genética Moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. pp.177-204.

GUPTA, S.; CUFFE, L.; SZEGEZDI, E.; LOGUE, S.E.; NEARY, C.; HEALY, S.; SAMALI, A. Mechanisms of ER stress-mediated mitochondrial membrane permeabilization. **International Journal of Cell Biology**, doi:10.1155/2010/170215, 2010.

HAGIWARA, Y.; WATANABE, M.; ODA, Y.; SOFUNI, T.; NOHMI, T. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. **Mutation Research**, v.291, p.171-180, 1993.

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.

HE, C.; GE, Y.; TAN, J.; YOU, K.; HAN, X.; WANG, J. Characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons emissions of diesel engine fueled with biodiesel and diesel. **Fuel**, v.89, p.2040–2046, 2010.

HELMA, C.; UHL, M. A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. **Mutation Research**, v.466, p.9–15, 2000.

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

HU, Z.; TAN, P.; YAN, X.; LOU, D. Life cycle energy, environment and economic assessment of soybean-based biodiesel as an alternative automotive fuel in China. **Energy**, v.33, p.1654–1658, 2008.

JACOB, C.A., SCHIFFNER, F., HENKEL, M., WAIBEL, M., STORK, B., DAUBRAWA, M., EBERL, L., GREGOR, M., WESSELBORG, S. Effects of bacterial N-acyl homoserine lactones on human T lymphocytes-OddHL induces apoptosis via the mitochondrial pathway. **International Journal of Medical Microbiology**, v.299, p.509-519, 2009.

JANAUN, J.; ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.1312–1320, 2010.

JARVIS, A.S.; HOKEYCETT, M.E.; McFARLAND, V.A.; BULICH, A.A.; BOUNDS, H.C. A comparison of the Ames assay and Mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.33, p.193-200, 1996.

JAYARAMAN, S. Flow cytometric determination of mitochondrial membrane potential changes during apoptosis of T lymphocytic and pancreatic beta cell lines: Comparison of tetramethylrhodamineethylester (TMRE), chloromethyl-X-rosamine (H2-CMX-Ros) and MitoTracker Red 580 (MTR580). **Journal of Immunological Methods**, v.306, p.68-79, 2005.

KADO, N.Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay. **Mutation Research**, v.121, p.25-32, 1983.

KAMBER, M.; FLÜCKIGER-ISLER, S.; ENGELHARDT, G.; JAECK, R.; ZEIGER, E. Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity. **Mutagenesis**, v.24, p.359-366, 2009.

KARAVALAKIS, G.; STOURNAS, S.; BAKEAS, E. Effects of diesel/biodiesel blends on regulated and unregulated pollutants from a passenger vehicle operated over the European and the Athens driving cycles. **Atmospheric Environment**, v.43, p.1745–1752, 2009.

KEOGH, R.J. New technology for investigating trophoblast function. **Placenta**, v.31, p.347-350, 2010.

KING, M.A.; EDDAOUDI, A.; DAVIES, D.C. A comparison of three flow cytometry methods for evaluation mitochondrial damage during staurosporine-induced apoptosis in Jukart cells. **Cytometry Part A**, v.71A, p.668-674, 2007.

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

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

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review of Physiology**, v.67, p.225-257, 2005.

KUMMROW, F.; RECH, C.M.; COIMBRÃO, C.A.; ROUBICEK, D.A.; UMBUZEIRO, G.A. Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. **Mutation Research**, v.541, p.103-113, 2003.

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

LEVIN, D.E.; HOLLSTEIN, M.C.; CHRISTMAN, M.F.; SCHWIERS, E.A.; AMES, B.N. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A:T base pairs at the site of mutation

detects oxidative mutagens. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v.79, p. 7445-7449, 1982b.

LEVIN, D.E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N. A new *Salmonella* tester strain for the detection of frameshift mutagens: a run of cytosines as a mutational hot-spot. **Mutation Research**, v.94, p. 315-330, 1982a.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, F.J.; ORTIZ, M.A.; PIEDRAFITA, F.J. The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are differentially affected by temperature upstream of mitochondrial damage. **Apoptosis**, v.11, p.1339-1347, 2006.

LU, W.Q.; CHEN, X.N.; YUE, F.; JENTER, C.; GMINSKI, R.; LI, X.Y.; XIE, H.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Studies on the in vivo and in vitro mutagenicity and the lipid peroxidation of chlorinated surface (drinking) water in rats and metabolically competent human cells. **Mutation Research**, v.513, p.151-157, 2002.

MARON, D.M; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, p.173-214, 1983.

McCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsoma test: Assay of 300 chemicals. **Medical Science**, v.72, p.5135-5139, 1975.

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.

MILLER, N.J.; MUDGE, S.M. The Effect of Biodiesel on the Rate of Removal and Weathering Characteristics of Crude Oil Within Artificial Sand Columns. **Spill Science & Technology Bulletin**, v.4, p.17-33, 1997.

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, p.97-103, 1995.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v.455, p.29-60, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MUDGE, S.M.; PEREIRA, G. Stimulating the biodegradation of crude oil with biodiesel preliminary results. **Spill Science & Technology Bulletin**, v.5, p.353-355, 1999.

NATARAJAN, A.T., DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagen/carcinogens. **Mutagenesis**, v.6, p.399-403, 1991.

NICODEM, D.E.; GUEDES, C.L.B.; CORREA, R.J. Photochemistry of petroleum. I. systematic study of brazilian intermediate crude oil. **Marine Chemistry**, v.63, p.93-104, 1998.

NTP (National Toxicology Program), 2004. **11th Report on Carcinogens. Substances Profiles: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons 15 Listings.**
<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/toc11.html>.

NUNEZ, R. Flow Cytometry: Principles and Instrumentation. **Current Issues in Molecular Biology**, v.3, p.39-45, 2001.

NÜSSE, M.; MARK, K. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages. **Mutation Research**, v.392, p.109-115, 1997.

OLIVEIRA, D.P.; CARNEIRO, P.A.; SAKAGAMI, M.K.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent – Identification of the mutagenic components. **Mutation Research**, v.626, p.135-142, 2007.

ORMEROD, M. **Flow Cytometry - A Basic Introduction**. 2008. Disponível em: <http://www.denovosoftware.com/site/introtowormerod.shtml>. Acesso em: maio de 2010.

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.

PEREIRA, M.G.; MUDGE, S.M. Cleaning oiled shores: laboratory experiments testing the potential use of vegetable oil biodiesels. **Chemosphere**, v.54, p.297-304, 2004.

PINTO, L.F.R.; FELZENSZWALD, I. Genética do câncer humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p.29-48.

PORWOLLIK, S.; WONG, R.M.Y.; SIMS, S.H.; SCHAAPER, R.M.; DEMARINI, D.M.; MCCLELLAND, M. The *uvrB* mutations in the Ames strains of *Salmonella* span 15 to 119 genes. **Mutation Research**, v.483, p.1-11, 2001.

POTTENGER, L.H.; GOLLAPUDI, B.B. A case for a new paradigm in genetic toxicology testing. **Mutation Research**, v.678, p.148–151, 2009.

PROSKURYAKOV, S.Y.; KONOPLYANNIKOV, A.G.; GABAI, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*, v.283, p.1-16, 2003.

RABELO-GAY, M.N.; RODRIGUEZ, 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.

RAFFRAY, M., COHEN, G.M. Apoptosis and Necrosis in Toxicology: A Continuum or Distinct Modes of Cell Death? **Pharmacology & Therapeutics**, v.75, p.153-177, 1997.

RAYNAL, P.; POLLARD, H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1197, p.63-93, 1994.

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, pp.201-219.

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.

ROTTENBERG, H.; WU, S. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1404, p.393-404, 1998.

SARAF, S.; THOMAS, B. Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality. Process Safety and Environmental Protection. **Trans IChemE**, Part B, v.85, p.360–364, 2007.

[SBMCTA] SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL. São Paulo, 2004. UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F.; FELZENSZWALB, I.; HENRIQUERS, J.A.P.; VARANDA, E. **Orientações básicas de execução de teste de mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente. Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella/microsossoma*)**. (Série de Documentos, 1). Disponível em <<http://www.sbmcta.org.br>>. Acesso em: julho de 2009.

SCADUTO Jr., R.C.; GROTYOHANN, L.W. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives. **Biophysical Journal**, v.76, p.469-477, 1999.

SCHMITZ, M.; BOESS, F.; WATZELE, M.; SUTER-DICK, L.; ROTH, A.B. *In vitro* assessments of hepatic toxicity using the xCELLigence real-time cell analyzer. **Toxicology Letters**, v.189S, p.S74-75, 2009.

SEILER, A.; LAMBERND, S.; EHLICH, N.; EHLICH, A.; BOHLEN, H.; WATZELE, M. Monitoring of cardiac cytotoxicity in real-time with the xCELLigence system. **Toxicology Letters**, v.189S, p.S70, 2009.

SHI, J.; BEZABHIE, R.; SZKUDLINSKA, A. Further evaluation of flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. **Mutagenesis**, v.25, p.33-40, 2010.

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, p.184-191, 1988.

SPAN, L.F.R.; PENNING, A.H.M.; VIERWINDEN, G.; BOEZEMAN, J.B.M.; RAYMAKERS, R.A.P.; WITTE, T. The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin-V/Propidium Iodide and Modified in situ end labeling technique. **Cytometry**, v.47, p.24-31, 2002.

STOPPER, H.; MÜLLER, S.O. Micronuclei as a Biological Endpoint for Genotoxicity: A Minireview. **Toxicology in Vitro**, v.11, p.661-667, 1997.

TAYLOR, L.T.; JONES, D.M. Bioremediation of coal tar PAH in soil using biodiesel. **Chemosphere**, v.44, p.1131-1136, 2001.

TEJS, S. The Ames test: a methodological short review. **Environmental Biotechnology**, v.4, p.7-14, 2008.

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.

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

THYBAUD, V.; AARDEMA, M.; CLEMENTS, J.; DEARFIELD, K.; GALLOWAY, S.; HAYASHI, M.; JACOBSON-KRAM, D.; KIRKLAND, D.; MACGREGOR, J.T.; MARZIN, D.; OHYAMA, W.; SCHULER, M.; SUZUKI, H.; ZEIGER, E. Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing. **Mutation Research**, v.627, p.41-58, 2007.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. **Mutation Research**, v.468, p.213-225, 2000.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. **Mutation Research**, v.441, p.215-224, 1999.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.; WARREN, S.H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product C.I. Disperse Blue 291 using different protocols of the *Salmonella* assay. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p. 49-56, 2005.

UMBUZEIRO, G.A.; RECH, C.M.; CORREIA, S.; BERGAMASCO, A.M.; CARDENETTE, G.H.L.; FLÜCKIGER-ISLER, S.; KAMBER, M. Comparison of the *Salmonella*/microsome microsuspension assay with the new microplate fluctuation protocol for testing the mutagenicity of environmental samples. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.51, p.31-38, 2010.

UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003.p.81-112.

URCAN, E.; HAERTEL, U.; STYLLOU, M.; HICKEL, R.; SCHERTHAN, H.; REICHL, F.X. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. **Dental Materials**, v.26, p.51-58, 2010.

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

VANZELLA, T.P. **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.

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

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v.184, p.39-51, 1995.

WANG, Y.; HAMMES, F.; DE ROY, K.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. **Trends in Biotechnology**, v.28, p.416-424, 2010.

WATERHOUSE, N.J.; GOLDESTINE, J.C.; VON AHSEN, O.; SCHULER, M.; NEWMAYER, D.D.; GREEN, D.R. Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *The Journal of Cell Biology*, v.153, p.319-328, 2001.

WINTER, H.K.; EHRLICH, V.A.; GRUSCH, M.; LACKNER, A.; SCHULTE-HERMANN, R.; GRASL-KRAUPP, B.; MIKULITS, W.; KNASMÜLLER, S. Use of four new human-derived liver-cell lines for the detection of genotoxic compounds in the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. **Mutation Research**, v.657, p.133-139, 2008.

YANG, H.-H.; CHIEN, S.-M.; LO, M.-Y.; LAN, J. C.-W., LU, W.-C.; KU, Y.-Y. Effects of biodiesel on emissions of regulated air pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons under engine durability testing. **Atmospheric Environment**, v.41, p.7232–7240, 2007.

ZAKERI, Z.F.; AHUJA, H.S. Cell death/apoptosis: normal, chemically induced, and teratogenic effect. **Mutation Research**, v.396, p.149-161, 1997.