

---

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

---

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS,  
GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DE  
EFLUENTES DE REFINARIA DE  
PETRÓLEO, POR MEIO DOS SISTEMAS  
TESTES DE *Allium cepa* E *Oreochromis  
niloticus*.**

**MÁRCIA MIYUKI HOSHINA**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales**



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

Outubro - 2005

Dedico este trabalho aos meus pais Yukio  
e Yolanda e ao meu irmão Hélio.

“Tudo no fim dá certo, se não der certo,  
é porque não chegou ao fim”.  
**(Fernando Sabino)**

## AGRADECIMENTOS

---

Gostaria de agradecer ao meu pai por todos os ensinamentos e lições de vida, as quais vou levar sempre comigo, por me ensinar a nunca desistir de lutar, mesmo que a vida nos imponha os mais difíceis obstáculos, por me ensinar a ser uma pessoa correta, a me ensinar valores importantíssimo.

À minha mãe, que sempre me ensinou a ter garra e lutar pelo que quero, que me ensinou que mesmo nos momentos mais difíceis aprendemos coisas importantíssimas, obrigada pela educação que me deu e pelo apoio nos estudos, mesmo não entendendo muito bem o que eu fazia. Obrigada por ser sempre um exemplo de educação, de conduta, de vida, de amizade, de perseverança, de cumplicidade, de amor. Pena que você e o meu pai não estão presentes para ver mais esta etapa vencida, mas sei que onde quer que estão, vocês torcem por mim.

Ao meu "pequeno" grande irmão, por sempre estar ao meu lado, me apoiando em todas as minhas decisões, por segurar na minha mão e andar comigo lado a lado, por ser meu confidente, meu pai, meu filho, meu amigo, meu psicólogo, por ser o meu maior torcedor, por me querer bem, por não me fazer desistir dos meus sonhos.

À minha orientadora Marin, que mais uma vez se mostrou minha "Mãerin", por sempre acreditar no meu potencial como profissional e como pessoa, por não desistir de mim, por todas as broncas merecidas, por todos os conselhos, as dicas, o carinho, a preocupação.

Aos meus amigos Zé, Tati, Thaís e Bruna por sempre me ajudarem quando eu precisei, principalmente durante a realização do cometa. (a técnica mais chata do mundo!)

Ao Flávio por me apoiar nos momentos em que mais precisei, por ser meu ombro amigo nas horas em que queria desistir de tudo, pelas "broncas", pelas conversas, por me fazer rir quando queria chorar, por ser enérgico e compreensivo ao mesmo tempo.

A Thaís e Tatão pelos desabafos e pelos conselhos, pelos bate-papos de madrugada, pelo bom humor e por sempre estar presente na minha vida, vocês são minhas irmãs de coração.

A Rê Carmona e Milene por sempre se preocuparem comigo.

A Mari por sempre ser essa pessoa animada e maravilhosa que é, pelas viagens, brincadeiras, mensagens de madrugada.

À minha tia Elcídia, minha prima Celi, meu primo Jaime e meu primo Celso, por sempre torcerem por mim e sempre me ajudarem, por me mostrar que uma das coisas mais importantes da vida é a família.

À Milena por sempre estar presente na minha vida, por me mostrar que a loucura nem sempre é ruim, por ser esta pessoa engraçada e especial que você é.

Ao Fred, Bixão, Matheus pelos momentos mais bizarros e hilários, por me fazerem esquecer dos meus problemas de vez em quando, que o diga o Cotoco, o Ananias, a garagem....

Ao Zé por sempre estar disposto a me ajudar, por me apoiar, por me ajudar a fazer a bibliografia (coisa mais chata!), por entender os meus mau-humores, por me emprestar a sua família.

À Sílvia pelas dicas, toques, pela amizade.

Aos marinzetes: Du, Jana, Jaque, Dani, Dânia, Rê Caritá

Ao PRH-05 pela concessão do auxílio financeiro

Ao Dimas, coordenador do PRH-05. Ao Zé Maria, por sempre me ajudar nas partes burocráticas.

À Refinaria de Paulínia (REPLAN) pela permissão concedida para a realização de todas as coletas.

À Prof<sup>o</sup> Dejanira e ao Zito pelas coletas e por todo o auxílio que me deram, pela disponibilidade e por sempre me ajudarem no que precisava.

À Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Lúcia Ribeiro pela amizade, pelas dicas profissionais, pela preocupação, pela disponibilidade em ajudar no que fosse necessário.

À Rogilene, a técnica mais divertida do mundo.

À Cris por todas as ajudas no computador.

Aos meus amigos: Emílio, Milla, Heleninha, Shurato, Davi, Lye, Êlcior, Jordan, Cadu, Michel, Leandro e Roberta, Leandro, Léo e Ira, Maína, Salada, Bota, Marina, Fofô, Luci, Luciene, Fer B., Ângela.

Aos colegas de departamento: Douglas, Marielle, Reinaldo, Bombeiro, Anita, Gislaíne, Andriago, Silvana, Ju, Izabela, Sandra, Fábio, Érica, Giselly, Jaú,

Aos professores do Departamento, em especial as Prof<sup>o</sup> Carmem, Sanae e Dora.

Enfim, a todos que me ajudaram de algum modo na realização desse trabalho, se eu esqueci de alguém me desculpe, mas é que no final da dissertação, quando tudo fica pronto, você acaba ficando um pouco mais louco e esquecido, você acaba queimando metade dos seus neurônios e a outra metade você queima na apresentação.

## ÍNDICE

	Páginas
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TEMA.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Sistema-teste vegetal: <i>Allium cepa</i> .....	6
2.2. Peixes como sistema teste animal.....	8
2.3. Teste de aberrações cromossômicas.....	9
2.4. Morte celular: Apoptose e necrose.....	11
2.5. Teste de micronúcleo e anormalidades nucleares.....	18
2.6. Ensaio do cometa.....	20
2.7. Localização e caracterização da área de estudo.....	21
2.8. Classificação das águas dos rios Atibaia e Jaguari.....	22
<b>3. ARTIGO 1.....</b>	<b>24</b>
Mutagenicidade de Efluentes de Refinaria, Avaliada pelo Teste de Aberrações Cromossômicas, em <i>Allium cepa</i> .	
<b>4. ARTIGO 2.....</b>	<b>54</b>
Efeito Mutagênico de Efluentes de Refinaria, Evidenciado por meio do Teste de Micronúcleo e de Anormalidades Nucleares em <i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia).	
<b>5. ARTIGO 3</b>	<b>78</b>
Avaliação da Genotoxicidade de Efluentes de Refinaria, pelo Ensaio do Cometa, em <i>Oreochromis niloticus</i> .	
<b>6. ARTIGO 4</b>	<b>94</b>
O Uso da Técnica de Corantes Vitais, sob Sistema teste de <i>Allium cepa</i> , para Identificação do Potencial Citotóxico de Xenobiontes	

<b>7. RESULTADOS GERAIS E DISCUSSÃO</b>	115
7.1. Sistemas teste	115
7.2. Análises físicas e químicas das amostras coletadas nos rios e na refinaria	116
7.3. Análise dos efeitos genotóxicos	125
7.4. Análise dos efeitos mutagênicos	126
<b>8. CONCLUSÃO</b>	131
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	133
<b>10. ANEXO</b>	158



## RESUMO

---

Atualmente, a degradação dos recursos hídricos é uma das maiores preocupações do homem, uma vez que pode causar danos diretos ou indiretos à biota associada, bem como à saúde e à sobrevivência desses organismos expostos. Um dos fatores que contribui para a alteração da qualidade das águas é a emissão de efluentes, seja ela industrial, doméstica ou de outra origem. Dentre os processos industriais que são considerados preocupantes para o meio ambiente, temos a indústria petrolífera, ligadas ao refino de petróleo. Os efluentes destas indústrias podem causar drásticas alterações nos recursos hídricos, devido à emissão de hidrocarbonetos, podendo comprometer corpos d'água que são utilizados em abastecimento de muitas cidades. O presente estudo teve como objetivo investigar os possíveis efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico de efluentes de refinaria de petróleo, que são lançados no rio Atibaia, município de Paulínia/SP. Para isso, foram coletadas amostras de água de seis pontos distintos: 1) Montante do Rio Jaguarí (acima da captação da água utilizada pela refinaria); 2) Entrada da lagoa de estabilização da REPLAN; 3) Saída da lagoa de estabilização (água destinada aos despejos no Rio Atibaia); 4) 1Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia; 5) 1 Km a jusante do ponto 3; 6) Após o tratamento físico-químico e antes do tratamento bacteriológico. Foram empregadas as metodologias de aberrações cromossômicas e de Corantes Vitais em *Allium cepa* (cebola) e teste de micronúcleo e ensaio de cometa em *Oreochromis niloticus* (tilápia). A partir dos dados obtidos, pode-se inferir que as águas do ponto 1 apresentaram baixo potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico. O ponto 6 apresentou o mais alto índice de citotoxicidade, genotoxicidade e de mutagenicidade. As águas dos pontos 2 e 3 apresentaram níveis inferiores aos observados para o ponto 6. Foi observado que o efluente lançado no rio Atibaia (ponto 3) apresentou um índice mais baixo que os dos pontos 4, 5 e 6, o que indica que os tratamentos realizados pela empresa foram eficazes para minimizar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos seus efluentes. Porém, os índices do ponto 5 (jusante do despejo) foram mais elevados que os observados para o ponto 4 (montante do despejo do efluente), o que indica que, apesar da eficiência dos tratamentos realizados pela refinaria de petróleo, deve haver alguns efeitos sinérgicos entre os compostos existentes no efluente final da refinaria com

outros compostos existentes no rio Atibaia, visto que esse rio recebe efluentes domésticos e de outras indústrias, a montante do lançamento do efluente da refinaria.

Palavras-chave: efluentes de refinaria de petróleo, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus*.

## ABSTRACT

---

The degradation of the hydric resources is one of the man's main preoccupation, because it can cause direct or indirect damages to health and to the survival of the exposed organisms. One factor that can contribute for the alteration of the water quality is the effluents emissions, such as industrial, domestic or of other origin. These effluents can cause drastic alterations in the hydric resources, due to the emission of hydrocarbons, which can compromise the water that is used in the supplying of many cities. The present work had the objective to investigate the possible citotoxic, genotoxic and mutagenic effects of these petroleum refinery effluents, that are discharged in the Atibaia river, municipality of Paulínia/SP. Water samples were collected in six different sites: 1) Jaguarí river upstream (above the site were the water is collected by the industry); 2) entrance of the stabilization lake of REPLAN; 3) exit of the stabilization lake (water that is destined to be discharged in the Atibaia river); 4) 1 Km upstream of site 3, in the Atibaia river; 5) 1 Km downstream of site 3; 6) after the physic-chemical treatment and before the biological treatment. The methodologies of chromosome aberrations, and vital staining were used in the *Allium cepa* (onion) and the micronucleus test and comet assay were applied in *Oreochromis niloticus* (tilápia). From the results observed, we can suggest that the waters of site 1 has low citotoxic, genotoxic and mutagenic potentials. Site 6 had shown the highest citotoxic, genotoxic and mutagenic rates. The waters from sites 2 and 3 presented inferior levels from those observed in the site 6. It has been observed that the effluent that is discharged in the Atibaia river (site 3) had a lower level when compared with sites 4, 5 and 6, wich means that the treatments used by the company are efficient in minimizing the citotoxic, genotoxic and mutagenic effect of these effluents. However, rates of site 5 (downstream of the discharge) were higher than those observed in site 4 (upstream of the discharge), which means that, despite the efficiency of the treatments performed by the petroleum refinery, there must be some synergistic effects between the compounds of the final refinery effluents and other compounds that exist in the Atibaia river, since this river receive other industrial and domestic effluents, in the upstream of the discharge of the refinery effluent.

Key-words: petroleum refinery effluents, cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus*.

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

---

O homem, assim como todos os outros organismos, está exposto a diversos agentes, sejam eles químicos, físicos e biológicos, que podem causar, direta ou indiretamente, sérios danos à saúde e à sobrevivência. Atualmente, é crescente a preocupação do homem com relação à poluição ambiental pois, a cada dia, são produzidas e lançadas no meio ambiente, novas substâncias químicas capazes de promover danos e até mesmo a morte dos organismos vivos.

A formação de grandes aglomerados urbanos e industriais e a crescente necessidade de água para o seu abastecimento, além da agricultura e atividades de lazer, fazem com que hoje a quase totalidade das atividades humanas seja cada vez mais dependente da disponibilidade e qualidade das águas continentais. A dependência do homem moderno para com os ecossistemas aquáticos é ainda mais evidente nas regiões altamente industrializadas, nas quais a demanda de água, *per capita*, tem se tornado cada vez maior (SILVA et al., 2003).

A água é um recurso mineral finito e um dos fatores indispensáveis à manutenção da vida, sendo que, por essa razão, o seu uso racional, bem como a conservação da sua qualidade, devem ser incentivados.

Após a revolução industrial, um grande número de substâncias químicas tem sido lançadas nos ambientes terrestre, aquático e na atmosfera. Estas substâncias podem ser transportadas e transformadas, por diferentes processos, em subprodutos que podem causar efeitos adversos ao homem, assim como danos aos ecossistemas terrestres e aquáticos (BERTOLETTI, 1996).

Os corpos hídricos de muitas regiões brasileiras, como por exemplo as que abrigam pólos industriais e as áreas de concentração agrícola, onde são utilizados diversos tipos de biocidas para o controle das pragas das lavouras, vêm sofrendo uma degradação ambiental contínua causada pelos efluentes industriais, domésticos e pelas águas remanescentes das aplicações de biocidas (CETESB, 1987).

Com a crescente industrialização, diversas substâncias químicas são produzidas e lançadas nos corpos d'água, sendo que essas substâncias podem ter efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos sobre diferentes organismos, além de poderem induzir efeitos teratogênicos.

Dentre as diversas indústrias que lançam seus efluentes nos recursos hídricos pode-se citar a indústria de refino de petróleo. Após o processo de refino, uma grande quantidade de água é despejada, juntamente com diversas outras substâncias derivadas do processo, em corpos d'água, comprometendo a qualidade desses recursos hídricos.

Diversos organismos são utilizados como bioindicadores para se avaliar e monitorar a qualidade dos ecossistemas aquáticos. Dentre estes organismos, pode-se citar as espécies *Allium cepa* (Asparaginales, Alliaceae) e *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), amplamente utilizados em estudos para esse fim.

A interação entre diferentes métodos de avaliação do potencial tóxico, genotóxico e mutagênico pode fornecer uma visão mais global e abrangente sobre os efeitos de determinada substância sobre os organismos vivos. Desse modo, para o presente estudo foram realizados, em *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*, ensaios para se avaliar o possível potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de águas do rio Atibaia, que recebem derivados de resíduos de efluentes da refinaria de petróleo (Refinaria de Paulínia - REPLAN), município de Paulínia-SP.

Para melhor apresentação, os resultados obtidos no presente trabalho, bem como a discussão de cada tema abordado, foram subdivididos em capítulos, escritos em forma de artigo a serem submetidos em periódicos especializados na área.

Após a apresentação dos referidos artigos, foram realizadas a discussão e a conclusão geral de todos os dados apresentados, a fim de correlacioná-los entre si, para se obter uma visão mais holística dos efeitos dos efluentes de refinaria, sobre os organismos teste utilizados.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

---

A água é um solvente versátil amplamente usado para transportar produtos residuais para longe do local de produção. Infelizmente, os produtos residuais transportados são freqüentemente tóxicos e sua presença pode degradar, seriamente, o ambiente do rio, lago ou riacho receptor (WHITE & RASMUSSEN, 1998).

Um aumento significativo no número de compostos químicos industriais, agrícolas e comerciais no ambiente aquático levam a vários efeitos deletérios nos organismos aquáticos (LIVINGSTONE, 2001). Muitos desses químicos podem exibir atividades genotóxicas, levando a desordens genéticas, a doenças e a mortalidade de organismos expostos (NEHLS & SEGNER, 2001). Em baixas concentrações, estas substâncias podem não ter efeitos agudos detectáveis nos organismos, mas podem, a longo prazo, reduzir a sua sobrevivência. Tais efeitos podem ser manifestados por um dano maior ou menor nas células somáticas ou germinativas, e pelo aparecimento de desordens como, por exemplo, o câncer, que requer períodos longos e latentes antes de tornar-se clinicamente detectável (WHITE & RASMUSSEN, 1998).

O aumento da contaminação do ambiente aquático, por vários resíduos de compostos químicos, tem causado efeitos diretos e indiretos na saúde humana (AL-SABTI et al., 1994). A poluição ambiental aquática é um problema sério e crescente e embora exista uma legislação pertinente, ela ainda ocorre. Algumas vezes, agentes tóxicos são emitidos diretamente no ambiente aquático, tornando-se genotóxicos pelas transformações biológicas ou químicas sofridas pós-emissão (CLAXTON et al., 1998).

A toxicologia aquática estuda as interferências que os compostos químicos e outros xenobióticos podem causar nos organismos aquáticos, com ênfase especial aos efeitos adversos ou danosos. Inúmeros testes toxicológicos são utilizados para avaliar as concentrações e o tempo de exposição necessários para que esses agentes tóxicos possam produzir efeitos sobre os organismos. Assim, um teste toxicológico é desenvolvido para mensurar o grau da resposta produzida por um nível específico de estímulo-concentração do composto em estudo (RAND & PETROCELLI, 1985).

As atividades humanas têm provocado, ao longo dos anos, grandes impactos nos ecossistemas aquáticos, sendo que os despejos de efluentes industriais e domésticos constituem-se, indiscutivelmente, a maior fonte antrópica de compostos químicos que são lançados nos corpos d'água (JUNGCLAUS et al., 1978; STAHL, 1991; VEGA et al., 1996). Muitos desses efluentes contêm misturas tóxicas, tais como agrotóxicos, metais pesados, produtos industriais e uma variedade de outras substâncias que, conjuntamente, podem agravar ainda mais as condições ambientais e, conseqüentemente, toda a vida do ecossistema.

Problemas decorrentes dos efeitos tóxicos nos ecossistemas aquáticos não se restringem, apenas, aos desequilíbrios ecológicos provocados nos corpos d'água, mas como podem, a longo prazo, afetar a saúde humana, se considerada a possibilidade da ocorrência dos fenômenos de persistência e bioacumulação de poluentes tóxicos, ao longo da cadeia alimentar (ALVES, 1990; HOUK, 1992).

Várias evidências de efeitos de substâncias genotóxicas à saúde, tais como anomalias reprodutivas, defeitos congênitos e câncer, têm sido citadas. Aumento de incidência de carcinomas gastro-intestinais, de bexiga, anomalias reprodutivas e malformações congênitas têm sido encontradas em populações que vivem próximas a depósitos de despejos perigosos. Os danos genéticos mais citados são as induções de lesões cromossômicas estruturais e numéricas específicas, decorrentes dos danos provocados no DNA. Segundo Houk (1992), três grandes classes de danos podem ser descritas: mutagênicos (ou de ponto), referentes às mutações no gene, que são alterações do DNA dentro de seqüências gênicas; clastogênicos, referentes às alterações na estrutura cromossômica, usualmente resultando em ganho, perda, ou rearranjo de peças cromossômicas; e aneugênicos, referentes ao ganho ou perda de cromossomos inteiros no complemento cromossômico.



Segundo Schull (1962), as mutações são alterações na seqüência normal de nucleotídeos de um organismo. Deste modo, a mutagenicidade é um efeito tóxico que danifica, especificamente, o material genético da célula, causando uma mudança no DNA ou no cromossomo.

Uma substância pode causar mutações por diversos modos de ação e, conseqüentemente, diferentes tipos de componentes estranhos podem ser considerados mutagênicos. Os efeitos dos agentes mutagênicos podem ser diversos, tais como reação direta com o DNA nuclear; incorporação do DNA durante a replicação celular; interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisão incorreta da célula (TIMBRELL, 1999; MATSUMOTO et al., 2000).

O petróleo é uma fonte energética não renovável derivada da decomposição orgânica animal e vegetal, composto por uma mistura de hidrocarbonetos e uma pequena quantidade de impurezas como enxofre, nitrogênio e metais. A partir do refino do petróleo são extraídos diversos produtos como gasolina, diesel, querosene, gás de cozinha, óleo combustível, lubrificante, além de produzir diversos compostos químicos que são utilizados como matéria prima por várias indústrias.

Com o aumento acelerado da produção de petróleo, houve também um aumento concomitante deste produto e de seus derivados em recursos hídricos (FELLENBERG, 1980).

Os hidrocarbonetos (HC) podem originar-se de fontes naturais ou antropogênicas. As fontes naturais são vegetação, decomposição microbiana, queima espontânea de florestas e formação natural de gás. As fontes antropogênicas resultam da combustão incompleta dos combustíveis fósseis evaporados. Entre os hidrocarbonetos oriundos da queima incompleta dos combustíveis de petróleo, da evaporação de combustíveis líquidos e solventes durante sua estocagem, refino ou manuseio, destacam-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), substâncias estas com reconhecido potencial mutagênico (SILVA et al., 2003).

É fato conhecido que os efluentes lançados pela indústria de petróleo pode conter uma grande variedade de poluentes orgânicos e metálicos, incluindo fenóis, óleo e graxa, sulfetos, amônia nitrogenada e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (DASGUPTA & ZDUNEK, 1992). Alguns desses compostos são utilizados ou produzidos durante o processo de refino do petróleo, mas muitos deles estão contidos no

óleo bruto (PORTE & ALBAIGÉS, 1993). Os contaminantes, como os HPAs, são descritos como carcinogênicos, enquanto outros são conhecidos pelo seu potencial oxidante (PAGLIA & VALENTINE, 1967).

O processamento dos hidrocarbonetos é uma prática que requer grandes quantidades de água. Desse modo, a indústria de petróleo utiliza-se de grandes volumes de água e descarta grandes volumes de efluentes nas águas superficiais. Embora muitos dos contaminantes sejam tratados e recuperados para serem reutilizados na refinaria, uma grande quantidade de compostos tóxicos pode estar presente no efluente final a ser descartado pela indústria (AVCI et al., 2005).

Apesar de ser de suma importância para a sociedade atual, a utilização do petróleo traz riscos potenciais para o meio ambiente, desde o processo de extração, transporte, refino, até o consumo de seus produtos, com a produção de gases poluentes. No entanto, algumas medidas foram e estão sendo tomadas para minimizar esses riscos. Dentre essas medidas, o monitoramento ambiental é uma importante estratégia para se avaliar os impactos ambientais que o petróleo e seus derivados possam promover no ambiente.

## **2.1. Sistema-teste vegetal: *Allium cepa***

A avaliação da genotoxicidade de químicos perigosos/danosos tem sido feita há anos, por meio de testes com vegetais superiores (RANK et al., 2002). Durante a década de 30, Levan (1938) demonstrou que a colchicina poderia causar distúrbios no fuso mitótico, levando a uma poliploidização em células meristemáticas de raízes de *Allium*. Posteriormente, Levan (1945) demonstrou que várias soluções de sais inorgânicos induziam diferentes tipos de aberrações cromossômicas, nestas mesmas células de meristemas radiculares de *Allium* (*A. cepa*). Desde então, muitos novos testes de mutagenicidade, utilizando microorganismos, linhagens celulares de mamíferos e outros sistemas biológicos, têm sido desenvolvidos, mas os testes com vegetais ainda são utilizados, rotineiramente, em muitos laboratórios de todo mundo, como indicadores de potencial mutagênico de diversos agentes. Além disso, ensaios com vegetais são úteis para se testar amostras ambientais complexas como esgotos industriais e domésticos (GROVER & KAUR, 1999; HOSHINA, 2002; MATSUMOTO, 2004), águas de rios

(RANK & NIELSEN, 1998; HOSHINA, 2002; MATSUMOTO, 2004), e solos contaminados (CHANG et al., 1997; KOVALCHUCK et al., 1998; COTELLE et al., 1999).

Alguns dos ensaios vegetais realizados com *Allium cepa*, *Vicia faba* e *Tradescantia paludosa*, que foram utilizados nos estudos dos efeitos mutagênicos das radiações ionizantes e mutágenos químicos, são hoje empregados para se avaliar a mutagenicidade/clastogenicidade de poluentes ambientais. Estudos realizados por GROVER & KAUR (1999) mostraram que os ensaios com vegetais apresentam resposta positiva, com relação aos poluentes. Grover et al. (1990) avaliaram os efeitos genotóxicos de pesticidas, utilizando vegetais (teste de aberrações cromossômicas) e mamíferos (teste de micronúcleo) como organismos testes e observaram a existência de uma correlação significativa (91,5%) entre os dois sistemas testados. A eficácia dos sistemas teste vegetais foi também registrada por Constantin & Owens (1982), Matsumoto (2004), Ventura (2004) e Fernandes (2005).

Como já citado, os testes utilizando-se *Allium* são realizados desde o final da década de 30, sendo padronizados por Fiskejõ em 1985. Esse teste constitui um ensaio muito sensível e confiável para monitoramento ambiental e é baseado na avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de substâncias químicas em espécies do gênero *Allium*, onde se registra as alterações na atividade mitótica (exemplo: mudanças no índice mitótico); anormalidades mitóticas e aberrações cromossômicas em células meristemáticas das raízes de plantas deste gênero (VIDAKOVIC-CIFREK et al., 2002). A espécie mais freqüentemente utilizada é *Allium cepa*, devido ao conhecimento da duração do seu ciclo celular e da sua reação a muitos agentes mutagênicos conhecidos (EVSEEVA et al., 2003). O teste de *Allium cepa* tem sido aplicado para a determinação de efeitos citotóxicos e/ou genotóxicos de várias substâncias (GRANT, 1982; FERNANDES, 2002; HOSHINA, 2002; VENTURA, 2002; 2004; MATSUMOTO, 2004). É considerado como um procedimento padrão para testes rápidos e para se determinar a toxicidade e os níveis de poluição no meio ambiente. Os efeitos tóxicos e genotóxicos podem ser avaliados pela análise macroscópica (diminuição do crescimento radicular) ou também por parâmetros citológicos (tipos e freqüência de aberrações e divisões celulares anormais), respectivamente. Resultados provenientes do teste de *Allium cepa* podem indicar a presença de certas substâncias citotóxicas, genotóxicas ou

mutagênicas no ambiente, que representam riscos, diretos ou indiretos, para os organismos vivos expostos (SMAKA-KINCL et al., 1997).

Segundo Fiskejő (1985), a espécie *Allium cepa* tem sido indicado como um eficiente organismo-teste de citotoxicidade e genotoxicidade, devido às características que possui na sua cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, pela sua disponibilidade durante o ano todo e pelo seu fácil manuseio. A essas características somam-se número reduzido de cromossomos ( $2n=16$ ), além do grande tamanho dos mesmos (QUINZANI-JORDÃO, 1987). Testes com *Allium cepa* são adequados para a avaliação de parâmetros microscópicos como anáfases prematuras, aderências cromossômicas, pontes e fragmentação cromossômica, C-mitoses e micronúcleos, que são indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético celular.

O teste de mutagenicidade com *Allium* tem recebido grande atenção depois de ter sido adaptado para examinar poluentes no solo e na água, como os ácidos clorofenoxiacéticos e os clorofenóis (FISKEJÖ et al., 1981), alumínio (BERGGREN & FISKEJÖ, 1987), sais de metais pesados (LIU et al., 1995; MATSUMOTO, 2004) e outros rejeitos químicos industriais (VIDAKOVIC et al., 1993), bem como de agrotóxicos (FRANEKIC et al., 1994; GROVER et al., 1988; VENTURA, 2004; FERNANDES, 2005).

A sensibilidade do teste de mutagenicidade com *Allium* foi calculada como sendo superior aos resultados obtidos com roedores, em 82% (RANK & NIELSEN, 1993). Os testes com *Allium cepa*, como já foi citado, também apresentam uma alta correlação com os resultados obtidos com outros sistemas teste em mamíferos (GRANT, 1982).

## **2.2. Peixes como sistema teste animal**

O acúmulo de substâncias químicas em peixes pode se dar através da exposição direta aos químicos presentes nas águas dos rios e mares, ou através da cadeia alimentar do ecossistema de maneira indireta (ATEEQ et al., 2002).

Segundo Powers (1989) e Ateeq et al. (2002), os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática,

em que são, particularmente, utilizáveis, pois alertam sobre o potencial de perigo de novas substâncias químicas introduzidas no ambiente ou para a possibilidade da poluição ambiental.

De acordo com Harshbarger & Clark (1990), os peixes constituem bons organismos-teste para monitoramento toxicológico, especialmente espécies pequenas de aquário, pois podem ser mantidos em laboratório e, facilmente, expostos a substâncias tóxicas, de maneira similar aos vertebrados superiores, podendo ser usados para a avaliação da presença de substâncias que tenham o potencial de causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos.

De acordo com Alves-Costa (2001), as espécies *Oreochromis niloticus* (tilápia) e *Hoplias malabaricus* (traíra) são excelentes sistemas-teste para ensaios laboratoriais, realizados com o objetivo de investigar a toxicidade de substâncias contaminantes em ecossistemas aquáticos. *Oreochromis niloticus* é uma importante espécie de peixe comercializável do sudeste do Brasil, particularmente do estado de São Paulo. É também uma espécie comumente encontrada em estuários pelo mundo todo, conhecida por responder, rapidamente, a alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996).

### **2.3. Teste de aberrações cromossômicas**

Devido a sua grande dimensão, a molécula de DNA acaba sendo alvo permanente de danos causados por poluentes (KOVALCHUCK et. al., 1998). Segundo Kirsch-Volders et. al. (1998) se esses danos não forem reparados, ou se forem reparados de forma incorreta, eles podem acarretar em mutações.

As lesões no DNA podem promover alterações no conteúdo genético dos organismos. Segundo Kirsch-Volders (2002), mutações no material genético podem ser de dois tipos: mutações gênicas (que ocorrem nos genes) e mutações cromossômicas (visualizadas pela presença de aberrações cromossômica).

Testes citogenéticos são úteis para identificar os efeitos danosos de uma substância particularmente conhecida, em suas várias concentrações e após diferentes tempos de exposição. Estes testes também são importantes para avaliar influência dos xenobiontes sobre os organismos (AL-SABTI & KURELEC, 1985; AL-SABTI, 1989; ABDOU et al., 1989; ARRIGONI et al., 1989; KAK & KAUL, 1989; KUMAR &

SINHA, 1989; RAO, 1989; CHAUHAN & SUNDERARAMAN, 1990; EL-KHODARY et al., 1990; PANDA et al., 1990; SINGH et al., 1990; KUMAR et al., 1991; DE-SERRES, 1992). Desta forma, são comumente usados para se biomonitorar a extensão da poluição e avaliar o efeito combinado que todas as substâncias tóxicas e mutagênicas, presentes no meio ambiente, causam nos organismos expostos (DEGRASSI e RIZZONI, 1982; AL-SABTI & KURELEC, 1985; DIXIT & NERLE, 1985; FISKEJÖ, 1988; DE MARCO et al., 1988; AL-SABTI, 1989). Testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são, segundo Moraes (2000), indispensáveis para se avaliar as reações dos organismos vivos à poluição ambiental e para indicar os possíveis efeitos sinérgicos de vários poluentes, enquanto que as análises físicas e químicas determinam a presença ou a concentração de diferentes poluentes presentes no meio ambiente.

Uma das mais antigas e utilizadas ferramentas para se realizar estudos de avaliação de genotoxicidade e de mutagenicidade é o teste de aberrações cromossômicas. Esse teste, baseado na citogenética clássica, é um dos poucos métodos diretos usados para mensurar mutações em sistemas expostos a mutágenos ou carcinógenos potenciais (RANK et al., 2002).

O teste de aberrações cromossômicas com *Allium cepa* fornece um rápido exame dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de substâncias químicas dispostas no meio (GRANT, 1982; GRANT, 1994; FISKEJÖ, 1985; FISKEJÖ, 1988; FISKEJÖ, 1993a; FISKEJÖ, 1993b; NIELSEN & RANK, 1994). Este teste tem sido amplamente utilizado para se monitorar os efluentes de rios (FISKEJÖ, 1993b; RANK & NIELSEN, 1994; SMAKA-KINCL et al., 1997).

A contagem da incidência de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células de meristemas radiculares constitui um método fácil para se estudar os efeitos de diferentes agentes mutagênicos, como, por exemplo, os compostos de mercúrio, selênio, zinco e cádmio, bem como de muitos pesticidas (FISKEJÖ, 1988; FISKEJÖ, 1979; BORBOA & DE LA TORRE, 1996; GULATI et al., 1994). Os resultados obtidos com este teste estão de acordo com os resultantes de outros sistemas teste, como os de células V79 do hamster chinês e de linfócitos humanos (PAVLICA et al., 1991; FISKEJÖ, 1995; GRANT, 1994). Curiosamente, foi observada uma maior eficiência do

teste de micronúcleo com células de raízes de *Allium cepa* do que com células de *Vicia faba* (MA et al., 1995), quando se avaliou a clastogenicidade do raio-X.

Devido à sua simplicidade, ao seu relativo baixo custo, à sua versatilidade e as mínimas facilidades requeridas, estes ensaios se tornaram indicados para a avaliação dos efeitos de xenobiontes e para o monitoramento da poluição (GROVER & KAUR, 1999).

Testes citogenéticos são adequados para identificação de efeitos perigosos de substâncias, em suas diversas concentrações sobre diferentes tempos de exposição, e para avaliação da sua influência nos organismos. Estes testes também permitem a compreensão dos efeitos de agentes físicos e químicos sobre os organismos-teste e são, comumente, usados no biomonitoramento da extensão da poluição, bem como para a avaliação dos efeitos combinados de todas as substâncias tóxicas e mutagênicas sobre os organismos no ambiente natural (MORAES, 2000).

Resultados provenientes de bioensaios genéticos são, segundo Houk (1992), relevantes à saúde humana porque o alvo toxicológico é o DNA, o qual existe em todas as formas celulares vivas. Portanto, pode ser extrapolado que compostos que se mostram reativos com o DNA de uma espécie têm o potencial para produzir efeitos semelhantes em outras espécies. Em geral, perturbações do material genético são deletérias para o organismo e podem conduzir a severas e irreversíveis conseqüências à saúde.

As aberrações cromossômicas têm sido largamente reconhecidas como importantes conseqüências de ações genotóxicas de agentes químicos, aos quais muitos organismos, inclusive o homem, estão expostos. Tanto as aberrações estruturais como numéricas têm sido associadas com alterações da saúde humana, como nos casos de neoplasias e de anormalidades congênitas de recém-nascidos (NATARAJAN, 2002).

#### **2.4. Morte celular: Apoptose e necrose**

De acordo com Mello et al. (2001), agentes indutores de estresse, tais como: radiação, drogas, choques térmicos, metais pesados, álcoois, hipóxia, jejum, inibidores metabólicos, agentes oxidantes e infecções virais, dentre outros, podem induzir a morte celular. Segundo Kaioumova et al. (2001), a perturbação de células por agentes

químicos pode levar a uma seqüência complexa de eventos, levando a morte celular, tanto por apoptose como por necrose.

A definição de apoptose foi primeiramente baseada em uma seqüência distinta de eventos morfológicos observados por microscopia eletrônica, descrita por Kerr et al. (1972) e depois por vários outros autores como Wyllie (1980), Gavrieli et al. (1992), Lazebnik et al. (1993), Solary et al. (1993), Kerr et al. (1994); MacCarthy et al. (1997), Messam & Pittmam (1998), Brunet et al. (1998), que observaram uma mudança na morfologia do núcleo (condensação), bem como uma condensação da célula.

A apoptose pode ser induzida no curso normal de crescimento e desenvolvimento de tecidos e, além disso, por uma variedade de compostos químicos e condições ambientais específicas. A apoptose, considerada a principal via natural de morte celular, é necessária para a manutenção da cinética e do equilíbrio de tecidos saudáveis. A apoptose tem sido descrita como um tipo fisiológico de morte celular, com pouco ou nenhum impacto para os tecidos vizinhos. Evidências indicam que a apoptose pode representar um mecanismo para a deleção seletiva de células, cuja sobrevivência prejudicaria o organismo como um todo (STEINERT, 1996).

De acordo com Raff et al. (1998), a apoptose não é um processo exclusivo de células animais. A morte programada da célula também pode ocorrer em plantas durante o desenvolvimento, na senescência de flores e folhas e em resposta às injúrias e infecções.

O início da apoptose se caracteriza pela diminuição da célula e do núcleo, bem como pela condensação da cromatina nuclear em massas bem definidas que começam a se deslocar para as membranas nucleares (MAENO et al., 2000). Logo depois, o núcleo se condensa, progressivamente, e se quebra (cariorrhexis). A célula se desprende do resto do tecido e o seu contorno começa a se deformar e a formar extensões (DARZYNKIEWICZ et al., 1992). As extensões celulares, chamadas de brotos, se formam por um processo de migração do material nuclear que se despreendem do núcleo e migram para a periferia da célula, até que haja a completa independência dessas porções. Esse material é envolvido por membranas e recebem o nome de corpos apoptóticos. Esses corpos apoptóticos estão repletos de organelas celulares, altamente condensadas, e dos já citados fragmentos nucleares. As estruturas finas, incluindo as membranas e a mitocôndria, ficam bem preservadas dentro desses corpos. Os corpos



apoptóticos são, rapidamente, fagocitados em células vizinhas, incluindo macrófagos e células parenquimáticas (STALDEMANN & LASSMANN, 2000). Os corpos apoptóticos podem ser reconhecidos dentro dessas células, mas, eventualmente, elas começam a se degradar (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980). Se a célula fragmentada não é fagocitada ela passa por um processo de degradação que se assemelha ao processo de necrose (KERR et al., 1972; WYLLIE, 1980; GAVRIELI et al., 1992; LAZEBNIK et al., 1993; SOLARY et al., 1993; KERR et al., 1994; MAcCARTHY et al., 1997; MESSAM & PITTMAM, 1998; BRUNET et al., 1998).

O processo de morte celular por apoptose tem sido baseada em características específicas da morfologia celular e pela detecção de fragmentação de DNA, visualizadas pela aplicação de técnicas bioquímicas e histoquímicas (HUPPERTZ et al., 1999; WILLINGHAM, 1999).

A apoptose é um tipo de morte celular associado a alterações funcionais e a eventos bioquímicos que incluem a perda do potencial transmembrana da mitocôndria (PETIT et al., 1995; KROEMER et al., 1997), peroxidação da cardiolipina, ativação das caspases (ZHENG e FLAVELL, 2000), fragmentação do DNA em fragmentos oligonucleotídicos (WALKER et al., 1995) e perda da assimetria lipídica pela translocação de resíduos da fosfatidilserina para a camada externa da membrana plasmática (MORRIS et al., 1984; FADOK et al., 1992; KOOPMAN et al., 1994; VERMES et al., 1995).

Verhoven et al. (1995) propuseram que a exposição da fosfatidilserina seria resultante tanto da diminuição da regulação da aminofosfolipídio translocase, quanto do aumento da saída dos fosfolipídios da membrana, o que facilita a movimentação bidirecional da bicamada de todos os fosfolipídios. Zhao et al. (1998) demonstraram que a saída dos fosfolipídios interfere na redistribuição dos fosfolipídios da membrana plasmática em células ativadas, em células em necrose ou em apoptose.

Está bem estabelecido que os fosfolipídios das membranas biológicas estão arranjadas de forma assimétrica entre a bicamada lipídica (DEVAUX, 1991; SHROIT & ZWAAL, 1991; ZACHOWSKI, 1993). Em membranas plasmáticas de seres eucarióticos, os aminofosfolipídios, como fosfatidilserina, residem, predominantemente, na camada externa da membrana plasmática. Embora pouco se saiba sobre a função fisiológica da assimetria da membrana lipídica, há evidências de que um aumento do

$\text{Ca}^{2+}$  intracelular, devido a ativação celular, necrose, ou apoptose, promove um rápido movimento bidirecional dos fosfolipídios da superfície celular, resultando numa exposição da fosfatidilserina na superfície celular (ZHAO et al., 1998). O movimento transmembrana dos fosfolipídios pode ser importante para regular outras enzimas da membrana ou para regular o movimento dinâmico das membranas, tais como a fusão e tráfego de vesículas, embora não haja nenhuma evidência experimental que comprovem esses fatos. Estudos realizados por Umeda & Emoto (1999) mostraram que a redistribuição dos fosfolipídios na bicamada atua como um regulador da reorganização dos filamentos de actina e desempenha um papel crucial em mediar o movimento coordenado entre a membrana plasmática e o citoesqueleto, para atingir, com sucesso, uma divisão celular. Os autores ainda sugerem que a completa perda da distribuição assimétrica dos fosfolipídios da membrana plasmática pode ocorrer durante o processo de apoptose, resultando na exposição de aminofosfolipídios. Os mesmos autores observaram que a redistribuição da fosfatidilserina na bicamada da membrana plasmática foi especificamente aumentada nos “brotos” de células apoptóticas, o que implica que a fosfatidilserina presente na membrana plasmática deve desempenhar algum papel regulatório na formação dos “brotos” na membrana de células apoptóticas. Outras estruturas que parecem estar relacionadas com a formação dos “brotos” são os filamentos de miosina II (MILLS et al., 1998).

Até hoje, os eventos que levam a ativação da morte celular por apoptose permanecem desconhecidos. Consideráveis mudanças morfológicas ocorrem na apoptose e tem sido proposto que o citoesqueleto deve estar envolvido neste processo. Estudos realizados por Cotter et al. (1992) indicaram que a actina está, diretamente, relacionada ao processo de apoptose e particularmente, nos corpos apoptóticos. Pittman et al. (1997) focaram seus estudos na tubulina e demonstraram que ela se reorganiza de forma congruente, com as mudanças características da apoptose. Esses autores ainda demonstraram que a apoptose pode ser induzida por drogas que despolimerizam ou estabilizam os microtúbulos.

Estudos recentes indicam que quebras proteolíticas de uma série de proteínas chave, como por exemplo a actina, espectrina, lamina A e B, por proteases ativadas por caspases, desempenham um papel importante na morfologia da apoptose (MARTIN & GREEN, 1995). Embora o exato mecanismo de como a degradação dessas proteínas

resultam na morfologia das células apoptóticas permaneça desconhecido, muitas proteínas alvo das caspases participam na formação e na regulação do microfilamento cortical, associado a membrana do citoesqueleto, que é muito importante para a determinação da morfologia celular. A expressão excessiva das formas clivadas, pelas caspases, de Gas2 e gelsolin resultam em mudanças dramáticas na morfologia celular, assemelhando-se a apoptose. Outras proteases, como a calpaína, têm sido associadas com a sinalização de mudanças apoptóticas no citoesqueleto (KAYALAR et al., 1996; VANAGS et al., 1996; BRANCOLINI et al., 1997; BROWN et al., 1997; MASHIMA et al., 1997; RUDEL e BOKOCH, 1997).

Duas proteína-quinases localizadas nos sítios de ligação entre célula-célula e entre célula-matriz também são alvos das caspases. A sua clivagem pelas caspases resulta num aumento da sinalização pró-apoptótica (CARDONE et al., 1997) e no possível desligamento da célula do tecido (WEN et al., 1997). A desorganização da lâmina nuclear, estrutura de suporte do envelope nuclear, também é uma característica importante da desestruturação nuclear durante a apoptose, uma vez que a lâmina nuclear é uma das responsáveis pela manutenção da morfologia do núcleo. A desestruturação da lâmina pode afetar, também, o correto funcionamento do núcleo (LAZEBNIK et al., 1993). Esse processo depende da degradação das lâminas nucleares A e B, mediadas pela caspase (ORTH et al., 1996). Proteínas envolvidas com a regulação da estrutura da cromatina (NICHOLSON & THORNBERRY, 1997) ou proteínas envolvidas com a interação entre a cromatina e a matriz nuclear (CASIANO et al., 1996) também são clivadas pelas caspases. As caspases proteases também têm sido associadas com a externalização da fosfatidilserina, que promovem o reconhecimento dos corpos apoptóticos pelas células vizinhas (FADOK et al., 1992; MARTIN et al., 1996; VANAGS et al., 1996).

A necrose, ao contrário da apoptose, parece ser um tipo acidental de morte celular que ocorre como consequência de uma grave injúria celular. Uma célula em apoptose passa por uma seqüência de eventos bem definidos, enquanto que na necrose, embora inicialmente passe pela condensação da cromatina, as organelas incham e as membranas celulares perdem, rapidamente, a sua integridade (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; WYLLIE, 1980).

A necrose primária, ou morte celular acidental (DARZYNKIEWICZ et al., 1997), é um processo passivo, catabólico e degenerativo, que geralmente representa uma resposta a injúrias graves e que pode ser induzida, tanto por uma overdose de agentes citotóxicos, quanto por injúrias sérias ou por patógenos intracelulares (OSHIMI et al., 1996; LEIST et al., 1997, DARZYNKIEWICZ et al., 1997; PALOMBA et al., 1999).

A necrose é um tipo de morte celular, antigamente considerada como descontrolada. Para Zakeri e Lockshin (2002), se uma célula encontra qualquer insulto ou injúria grave à sua existência, seus mecanismos de geração de ATP, ou de integridade e permeabilidade de membrana, ficam comprometidos. A necrose pode ocorrer pela presença de toxinas ou componentes químicos tóxicos, os quais promovem a lise celular, cujas funções mitocondriais e dos canais iônicos do sistema de membranas das células tornam-se, totalmente, comprometidos. A necrose não é determinada por fatores intrínsecos da própria célula, mas por perturbações do meio ambiente, injúrias estas que causam uma agressão letal, por ser grave, intensa, contínua ou não, ultrapassando o nível de habilidade homeostática da célula. Os agentes agressores podem ser agrupados em agentes físicos (ação mecânica, temperatura, radiação, efeitos magnéticos, eletricidade), químicos (substâncias tóxicas e não tóxicas), e biológicos (toxinas, infecções viróticas, bacterianas, micóticas, parasíticas, etc). Esses agentes provocam um comprometimento da integridade das membranas celulares e da manutenção da capacidade de multiplicação celular, por interferências no RNA e no DNA. A ação dos agentes agressores sobre os sistemas biológicos provoca a perda da homeostase e da morfostase celular, de tal forma que a célula perde a sua viabilidade (KAIUOMOVA et al., 2001).

Diferentemente da apoptose, que é um fenômeno ocorrente em células únicas, a necrose tem sido, freqüentemente, descrita como um fenômeno multicelular. Estudos moleculares têm demonstrado que o primeiro evento observado na necrose é a alteração na bomba de sódio e potássio da membrana celular, provocando edema intracelular. Quando as enzimas lisossomais digerem as organelas citoplasmáticas, o citoplasma adquire um aspecto vacuolizado, podendo ocorrer um processo associado de calcificação nas células mortas. As alterações nucleares ocorrem, reversivelmente, até a etapa de condensação da cromatina, formando blocos nucleares ligados à membrana

nuclear e ao nucléolo (cariorrhexis). Entretanto, quando as alterações degenerativas progridem, pode aparecer retração do núcleo, que se transforma em uma massa densa e enrugada de cromatina (com reação picnótica positiva). Esta cromatina sofre uma dissolução progressiva (cariólise), aparentemente, como resultado da ação hidrolítica das DNAses de origem lisossomal. O citoplasma perde a basofilia e o limite celular se torna indistinto. Observa-se que a perda da homeostase compromete o sistema enzimático (comprometimento dos lisossomos) e o sistema de membranas, o que leva a lesões irreversíveis para a célula (ZAKERI & LOCKSHIN, 2002).

Dados recentes indicam que, em contraste com a necrose que é causada por condições muito extremas, a apoptose é um tipo de morte celular caracterizado por um evento fisiologicamente normal e regulado (programado). Atualmente, sabe-se que tanto a apoptose como a necrose, possuem caminhos de sinalização, como receptores de morte celular, cascatas de quinases e eventos mitocondriais. Pela modulação desses caminhos de sinalização, em ambos os processos de morte celular, é possível identificar e distinguir a apoptose da necrose (WOODLE & KULKARNI, 1998; HUPERTZ et al., 1999; STADELMAN & LASSMANN, 2000; PROSKURYAKOV et al., 2003).

O aumento da permeabilidade de membrana pode ser evidenciado pela incorporação de um corante fluorescente, intercalante de DNA, como por exemplo Hoescht 33342 (ORMEROD et al., 1993) e iodeto de propídio (ORMEROD et al., 1993; ZAMAI et al., 2001).

O Hoescht 33342 é um marcador que apresenta baixa citotoxicidade e se intercala entre as regiões A-T do DNA (TAS & WESTERNENG, 1981). A exclusão do corante fluorescente iodeto de propídio tem sido comprovada como, particularmente, útil para estudos de morte celular. A natureza altamente polar dessa molécula faz com que ela seja também altamente impermeável em células íntegras. No entanto, ela consegue penetrar na célula, quando esta apresenta uma membrana plasmática com comprometimento da sua integridade. Uma vez dentro da célula, o iodeto de propídio se combina com o DNA, conferindo ao núcleo uma coloração vermelha altamente fluorescente (BRANA et al., 2002), evidenciando assim as células em processo de morte celular. As células “vivas”, ou seja, com a sua membrana plasmática íntegra apresentam núcleos com coloração azulada.

## 2.5. Teste de micronúcleo e anormalidades nucleares

Para Landolt & Kocan (1983) e Heddle et al. (1983), uma das mais promissoras, baratas e rápidas técnicas de avaliação genotoxicológica é o teste do micronúcleo. Micronúcleos são massas de cromatina com aparência de um pequeno núcleo, resultante da condensação de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que atrasaram sua migração para os pólos na anáfase (SCHMIDT, 1976; AL-SABTI & METCALFE, 1995). Durante a telófase, um envelope nuclear se forma ao redor do cromossomo ou do fragmento cromossômico perdido, que então se descondensa e, gradualmente, assume a morfologia de um núcleo interfásico, com a exceção ao tamanho, pois este é bem menor que o núcleo principal, razão pela qual é chamado de micronúcleo (FENECH, 2000).

Segundo Fenech (2000), para uma estrutura ser considerada um micronúcleo ela deve ser morfológicamente semelhante ao núcleo principal, porém com tamanho menor, cujo diâmetro esteja entre 1/16 até 1/3 do núcleo principal; além de outras características como não ser refringente, não estar ligado ou conectado ao núcleo principal e possuir a mesma intensidade de coloração do núcleo principal, embora às vezes possa apresentar coloração um pouco mais intensa.

Hayashi et al. (1998), descrevem o teste do micronúcleo como uma técnica vantajosa, pelo fato de poder ser usada em qualquer população celular em proliferação, sem que seja necessário o conhecimento prévio do cariótipo do organismo teste utilizado.

Embora o micronúcleo possa se originar espontaneamente, a sua indução é, comumente, usada para se detectar danos genotóxicos, resultantes de exposição a um agente mutagênico (HEDDLE et al., 1983). O teste do micronúcleo foi, originalmente, desenvolvido como um teste que utilizava eritrócitos policromáticos de medula óssea de roedores (SCHMIDT, 1976), e mais tarde estendido a eritrócitos circulantes (MACGREGOR et al, 1980). Hooftman & Raat (1982) modificaram a técnica original desenvolvida para roedores, para a aplicação laboratorial em peixes. Essa modificação, conhecida como o “teste do micronúcleo písceo”, tem sido recentemente proposta como uma técnica, potencialmente, rápida e barata, a ser usada como indicadora de contaminação ambiental (HOSE et al., 1987). Os eritrócitos de peixes são especialmente

preferidos para esse teste, pois, sendo nucleados, os seus micronúcleos podem ser indicativos seguros de atividade clastogênica (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

O teste de micronúcleos em eritrócitos de peixes tem sido utilizado largamente para detectar os efeitos genotóxicos de mutágenos no meio ambiente e sua frequência é considerada o reflexo dos danos genotóxicos nas células, principalmente nos cromossomos (ATEEQ et al., 2002).

O teste de micronúcleo é um teste também indicado para aplicação em biomonitoramento da qualidade da água. Muitos estudos usando o teste de micronúcleos em anfíbios e em peixes têm sido descritos na literatura (BURGEOT et al., 1995; GRISOLIA & STARLING, 2001; MATSUMOTO, 2004; VENTURA, 2004; FERNANDES, 2005; SOUZA, 2005). Testes de micronúcleo, realizado em eritrócitos de sangue periférico de *Oreochromis niloticus*, têm sido utilizados para detectar a presença de mutágenos ambientais por Grisolia e Starling (2001), Matsumoto (2004), Ventura (2004), Fernandes (2005), Souza (2005). A técnica de micronúcleos em eritrócitos de peixes tem, convencionalmente, sido utilizada devido à facilidade de obtenção dessas células, à taxa mitótica relativamente alta do tecido hematopoiético, características estas que oferecem uma rápida resposta genotóxica, em relação à exposição a xenobióticos (SCHMID, 1976; TICE & IVETT, 1985).

Al-Sabti et al. (1994) investigaram os efeitos citotóxicos causados pelo Cromo (tri e hexavalente) em carpas da Prússia (*Carassius auratus gibelio*), empregando o teste do micronúcleo. Os autores observaram que, tanto em laboratório como no campo, a exposição dos animais a vários níveis de concentração desta substância levou a um aumento na frequência de micronúcleos, quando comparados com o grupo controle.

Minissi et al. (1996) utilizaram o teste do micronúcleo em *Barbus plebejus* para monitorar, *in situ*, dois rios italianos caracterizados por diferentes níveis de poluição por compostos químicos. Os autores verificaram que a frequência de micronúcleos parecia estar, fortemente, relacionada com a qualidade da água dos locais examinados, corroborando assim na indicação do teste para este fim (monitoramento ambiental).

Hose et al. (1987), por sua vez, usando o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes (*Genyonemus lineatus* e *Paralabrus clathratus*) de um rio do sul da Califórnia, mostraram que a presença de pesticidas como o DDT e o PCB no ambiente não resultou em um aumento significativo na frequência de micronúcleos. Outros estudos realizados

por Hose et al. (1984) e Das & Nanda (1986) constataram que muitos agentes clastogênicos e mutagênicos, tais como o benzo(a)pireno e a mitomicina C, induzem a formação de micronúcleos.

Segundo Ateeq et al. (2002), o aumento da frequência de micronúcleos e de células alteradas foi significativo, quando eritrócitos do peixe-gato *Clarias batrachus* foram analisados, após a exposição aos herbicidas 2,4-D e butacloro. Houve uma relação positiva de dose-resposta em todas as exposições realizadas para os dois herbicidas e em todos os tempos testados (ATEEQ et al., 2002).

Os ensaios de anormalidades nucleares e de micronúcleos, realizados com peixes, têm sido largamente aplicados para a investigação dos efeitos de genotoxicidade ambiental (AL-SABTI, 1986; HOSE et al., 1987; CARRASCO et al., 1990; HUGHES & HEBERT, 1991).

## **2.6. Ensaio do cometa**

No curso dos estudos de danos e reparo de DNA, o ensaio cometa se mostrou uma técnica capaz de detectar danos citotóxicos de DNA, resultante de uma conseqüente ação apoptótica (WYLLIE et al., 1980).

Considerada, atualmente, como uma das mais eficientes ferramentas no biomonitoramento ambiental, o ensaio do cometa pode ser utilizado para se avaliar danos em células em proliferação ou não, *in vivo* ou *in vitro* e podem ser aplicadas com o propósito de análises genotoxicológicas (MONTEITH & VANSTONE, 1995).

O ensaio do cometa, por ser considerado sensível, rápido, econômico, além de requerer poucas células para a sua execução (MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998; SASAKI et al., 1997; KOSZ-VNENCHAK & ROKOSZ, 1997), tem sido indicado como um método para detectar mudanças muito pequenas na estrutura do DNA célula a célula, tais como as atividades de reparo, o modo de seu empacotamento e sua integridade (KOPPEN et al., 1999).

O método do ensaio do cometa foi desenvolvido por Singh et al. (1988), que adaptaram outras metodologias já utilizadas, desenvolvendo uma técnica de eletroforese de célula única (SCGE-single-cell gel electrophoresis), sob condições alcalinas. Essa técnica evidencia a ocorrência de quebras em cadeias simples do DNA. A visualização



subseqüente da mobilidade dos fragmentos de DNA nuclear tornou-se um meio bastante adequado para se detectar os danos no DNA em células únicas. Os protocolos para o ensaio do cometa variam entre laboratórios. Porém, 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 demonstraram-se similares àqueles previamente reportados, quando utilizaram o ensaio de cometa convencional.

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

Mitchelmore & Chipman (1998), concluíram que o ensaio do cometa é um método adequado como biomarcador não específico de genotoxicidade em peixes e outros organismos aquáticos, destacando a sensibilidade das células sanguíneas destes animais aos efeitos genotóxicos.

## **2.7. Localização e caracterização da área de estudo**

Os rios Atibaia e Jaguarí, pertencentes a bacia do Piracicaba, Capivari e Jundiá (PCJ), passam pelo município de Paulínia-SP, região esta que abriga 51.242 habitantes, 107 indústrias, dentre elas a Refinaria de Paulínia (REPLAN).

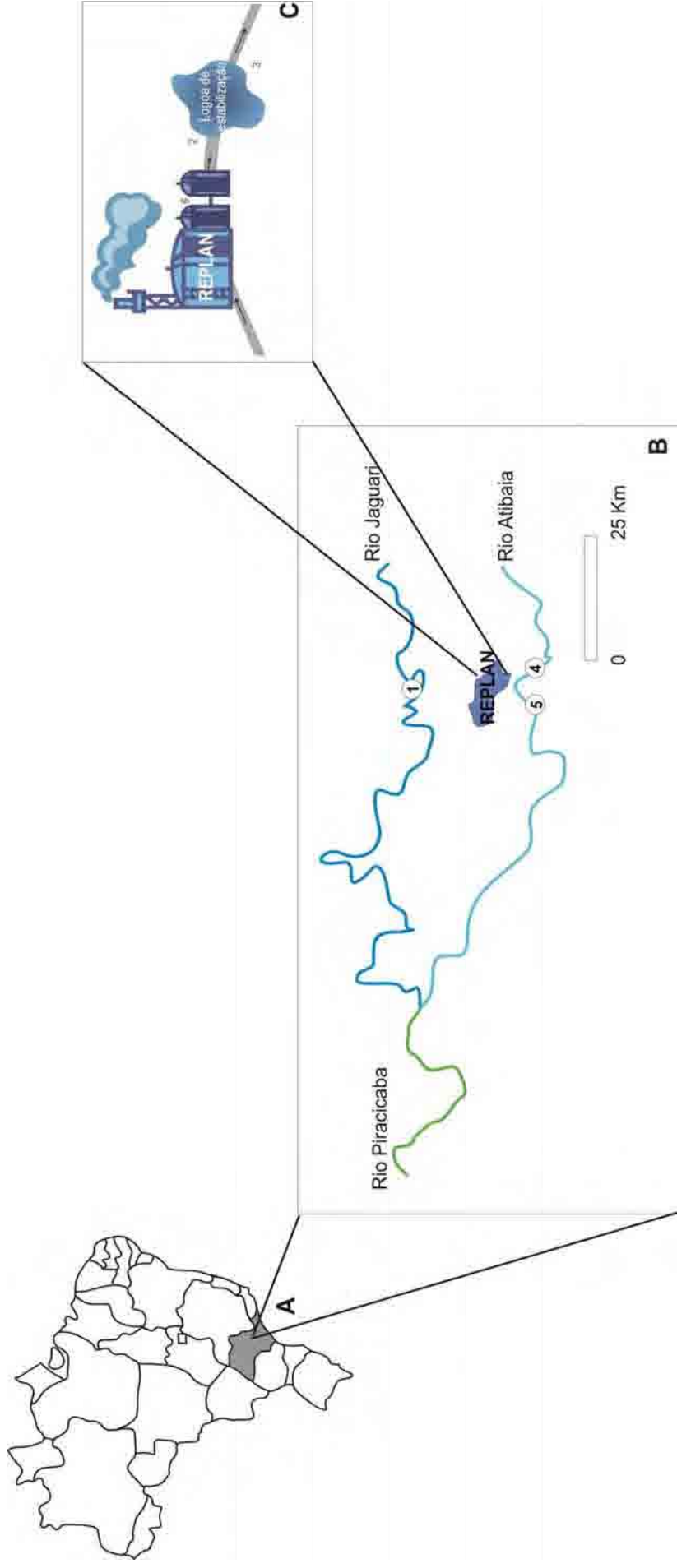
A REPLAN capta água do rio Jaguarí, para o desenvolvimento de suas atividades e despeja, após passagem por tratamentos (físico-químicos, biológicos e lagoa de estabilização), os seus efluentes no rio Atibaia (Fig. 1)

A REPLAN possui uma área de 9.125 milhões de m<sup>2</sup> e é a maior refinaria de petróleo do sistema PETROBRÁS, responsável pelo refino de cerca de 20% do petróleo no Brasil.

## **2.8. Classificação das águas dos rios Atibaia e Jaguarí.**

A resolução CONAMA 20 - decreto 8468 estabelece e limita alguns parâmetros específicos indicadores para cada classe, a serem considerados (como oxigênio dissolvido, coliformes fecais, pH, turbidez, entre outros), para avaliação das condições de qualidade das águas (ANEXO 1).

Segundo o comitê das Bacias Hidrográficas do Piracicaba, Capivari e Jundiaí e regiões; na situação atual, o rio Jaguarí encontra-se como de Classe 2 e o rio Atibaia de classe 4. Posteriormente, esses dois rios se unem para formar o rio Piracicaba, que segundo a mesma classificação, é caracterizado como pior que classe 4.



Figural : A. Localização da cidade de Paulínia (latitude  $22^{\circ}48'45''S$ , longitude  $47^{\circ}11'15''W$ ); B. Curso do rio Jaguarí e do rio Atibaia e distribuição dos pontos de coleta nestes rios (1, 4 e 5); C. Distribuição dos pontos de coleta na refinaria REPLAN (2, 3 e 6).

### **3. ARTIGO 1**

---

**MUTAGENICIDADE DE EFLUENTES DE REFINARIA, AVALIADA  
PELO TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS, EM *ALLIUM*  
*CEPA*.**

Márcia M. Hoshina<sup>1</sup> e \*Maria A. Marin-Morales<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista, IB-Campus de Rio Claro, Av. 24 A, 1515, CEP:  
13506-900, Rio Claro/SP-Brasil

\*Autor responsável pela correspondência: fone (19)3526-4143; Fax: (19) 3536-0009.

Agência de Fomento: ANP/PRH-05.

## RESUMO

A emissão de efluentes de indústrias em ecossistemas aquáticos faz com que ocorra, a cada dia, um aumento no comprometimento na qualidade desse recurso mineral e isso acaba refletindo na sobrevivência dos seres vivos, visto que o consumo direto ou indireto de águas contaminadas podem constituir certo perigo à saúde do homem e de todos os outros seres vivos expostos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar se os efluentes de refinaria de petróleo que são lançados no rio Atibaia, município de Paulínia/SP, apresentam potencial mutagênico sob células meristemáticas de *Allium cepa*. Para isso, foram coletadas amostras de água à Montante do Rio Jaguarí, (antes da captação da refinaria), na entrada da lagoa de estabilização da REPLAN, na saída da lagoa de estabilização (água de despejos no Rio Atibaia), a 1Km a montante do ponto de despejo, no rio Atibaia, a 1 Km a jusante do ponto de despejo e após o tratamento físico-químico (antes do tratamento biológico). Sementes de *Allium cepa* foram colocadas para germinar nas águas derivadas dos diferentes pontos de coleta, em água milli-Q (controle negativo) e em metilmetano sulfonato (controle positivo). Os meristemas foram coletados e analisados citologicamente. A análise do potencial mutagênico foi feita pela metodologia de avaliação de indução de aberrações cromossômicas, de presença de micronúcleos e de avaliação da indução de morte celular. Da análise dos resultados pode-se inferir que as amostras de águas coletadas após a utilização pela empresa e antes do tratamento biológico apresentaram as mais altas taxas de mutagenicidade e citotoxicidade. Índices menores foram observados para as outras amostras analisadas. Pelos nossos resultados podemos sugerir que, mesmo passando por tratamentos, o efluente final da refinaria da cidade de Paulínia ainda possui em sua composição substâncias químicas capazes de promoverem mutagenicidade em células meristemáticas de *Allium cepa*. Os efluentes da refinaria também apresentam substâncias químicas como os HPAs, que promoveram a morte celular em meristemas de *Allium cepa*, decorrente da desestruturação do envoltório celular.

Palavras-chave: mutagenicidade, aberrações cromossômicas, *Allium cepa*, micronúcleos, efluentes de refinaria, morte celular.

## 1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental aquática é um problema sério e crescente. Embora exista uma legislação pertinente, este tipo de poluição, decorrente da emissão de resíduos tóxicos, ainda ocorre.

Os efeitos tóxicos de diversas substâncias em ecossistemas aquáticos não se restringem apenas aos desequilíbrios ecológicos observados em corpos d'água, mas podem afetar, a longo prazo, a saúde humana, se considerada a possibilidade da ocorrência dos fenômenos de persistência e bioacumulação de poluentes tóxicos, ao longo da cadeia alimentar (ALVES, 1990; HOUK, 1992).

As atividades humanas têm provocado, ao longo dos anos, grandes impactos nos ecossistemas aquáticos, sendo que os despejos de efluentes industriais e domésticos constituem-se, indiscutivelmente, a maior fonte antrópica de compostos químicos que são lançados nos corpos d'água (JUNGCLAUS e col. 1978; STAHL, 1991; VEGA et al., 1996). Muitos desses efluentes contêm misturas tóxicas, tais como agrotóxicos, metais pesados, produtos industriais e uma variedade de outras substâncias que, conjuntamente, podem agravar ainda mais as condições ambientais e, conseqüentemente, todo o ecossistema.

Os efluentes industriais podem conter substâncias potencialmente mutagênicas e que causam efeitos diretos ou indiretos à saúde e à sobrevivência dos seres vivos, incluindo o homem. Dentro dessas substâncias, pode-se citar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que são reconhecidamente mutagênicos (RANK & NIELSEN, 1998). Os efluentes industriais derivados de atividade de refinaria de petróleo contêm quantidades variadas de HPAs, o que os caracterizam como substâncias complexas, quanto à constituição. Poucos estudos foram realizados com o intuito de se investigar os efeitos dos HPAs em misturas complexas, sendo comumente avaliados os efeitos de compostos isolados (WHITE, 2002).

Com o aumento acelerado da produção de petróleo, houve também um aumento de seus derivados encontrados nos corpos d'água (FELLENBERG, 1980) e, segundo Houk (1992), as refinarias de petróleo possuem efluentes com um alto potencial mutagênico. No entanto, algumas medidas foram e estão sendo tomadas para minimizar estes riscos. Dentre essas medidas, o monitoramento ambiental é uma importante

ferramenta para se avaliar os eventuais impactos causados pelo petróleo e seus derivados.

A avaliação da genotoxicidade de químicos perigosos/danosos tem sido feita, há anos, por meio de testes com vegetais superiores (RANK et al., 2002). Ensaio com vegetais são úteis para se testar amostras ambientais complexas como esgotos industriais e domésticos (GROVER & KAUR, 1999; HOSHINA, 2002; MATSUMOTO, 2004), águas de rios (RANK & NIELSEN, 1998; HOSHINA, 2002; MATSUMOTO, 2004), e solos contaminados (CHANG et al., 1997; KOVALCHUCK et al., 1998; COTELLE et al., 1999).

Testes de mutagenicidade utilizando-se *Allium* são realizados desde o final da década de 30 e foram padronizados por Fiskejö (1985). Esse teste constitui um ensaio muito sensível e confiável para monitoramento ambiental. Ele é baseado na avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de substâncias químicas em espécies do gênero *Allium*, onde se registra as alterações na atividade mitótica (mudanças no índice mitótico); anormalidades mitóticas e aberrações cromossômicas em células meristemáticas das raízes dessa planta (VIDAKOVIC-CIFREK et al., 2002; HOSHINA, 2002; MATSUMOTO, 2004; VENTURA, 2004; FERNANDES, 2005).

Diferentes espécies de *Allium* têm sido utilizadas como sistemas testes biológicos para se estudar poluições ambientais por substâncias químicas (GRANT, 1982; FISKEJÖ, 1988; HOSHINA, 2002; MATSUMOTO, 2004; VENTURA, 2004; FERNANDES, 2005), bem como efeitos da radioatividade (KOVALCHUCK et al., 1998; EVSEEVA & KHRAMOVA, 2002). A espécie mais freqüentemente utilizada deste gênero é *Allium cepa*, devido ao conhecimento da duração do seu ciclo celular e da sua reação a muitos agentes mutagênicos conhecidos (EVSEEVA et al., 2003). Esta espécie é considerada eficiente para testes de citotoxicidade e genotoxicidade (FISKEJÖ, 1985), devido às características que possui na sua cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, pela sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ( $2n=16$ ) e de grande tamanho (QUINZANI-JORDÃO, 1987). Os testes realizados com *Allium cepa* são adequados para a avaliação de parâmetros microscópicos como anáfases prematuras, aderências cromossômicas, pontes e fragmentação cromossômica,



C-mitoses e micronúcleos, que são indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético celular.

Uma das mais antigas e utilizadas ferramentas para se realizar estudos de avaliação de genotoxicidade e de mutagenicidade é o teste de aberrações cromossômicas. Esse teste, baseado na citogenética clássica, é um dos poucos métodos diretos usados para mensurar mutações em sistemas expostos a mutágenos ou carcinógenos potenciais (RANK et al., 2002).

O teste de aberrações cromossômicas com *Allium cepa* fornece um rápido exame dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de substâncias químicas dispostas no meio (GRANT, 1982; GRANT, 1994; FISKEJÖ, 1985; FISKEJÖ, 1988; FISKEJÖ, 1993a; FISKEJÖ, 1993 b; NIELSEN & RANK, 1994). Este teste tem sido amplamente utilizado para se monitorar os efluentes de rios (FISKEJÖ, 1993b; RANK & NIELSEN, 1994; SMAKA-KINCL et al., 1996; HOSHINA, 2002; MATSUMOTO, 2004).

De acordo com Mello et al. (2001), agentes indutores de estresse, tais como: radiação, drogas, choques térmicos, metais pesados, álcoois, hipóxia, jejum, inibidores metabólicos, agentes oxidantes e infecções virais, dentre outros, podem induzir a morte celular. Segundo Kaioumova et al. (2001), a perturbação de células por agentes químicos pode levar a uma seqüência complexa de eventos, levando a morte celular, tanto por apoptose como por necrose.

Está bem estabelecido que os fosfolipídios das membranas biológicas estão arrançadas de forma assimétrica entre a bicamada lipídica (DEVAUX, 1991; SHROIT e ZWAAL, 1991; ZACHOWSKI, 1993). Em membranas plasmáticas de seres eucarióticos, os aminofosfolipídios como fosfatidilserina residem, predominantemente, na camada externa da membrana plasmática. Verhoven et al. (1995) propuseram que a exposição da fosfatidilserina seria resultante tanto da diminuição da regulação da aminofosfolipídio translocase, quanto do aumento da saída dos fosfolipídios da membrana, o que facilita a movimentação bidirecional da bicamada de todos os fosfolipídios. Zhao et al. (1998) demonstraram que a saída dos fosfolipídios mediam a redistribuição dos fosfolipídios da membrana plasmática em células ativadas, em células em necrose ou em apoptose.

Consideráveis mudanças morfológicas ocorrem durante a morte celular e tem sido proposto que o citoesqueleto deve estar envolvido neste processo. Estudos

realizados por Cotter et al. (1992) indicaram que a actina está, diretamente, relacionada ao processo de morte celular. Pittman et al. (1997) focaram seus estudos na tubulina e demonstraram que ela se reorganiza de forma congruente, com as mudanças características da morte celular. Esses autores ainda demonstraram que a morte celular pode ser induzida por drogas que despolimerizam ou estabilizam os microtúbulos.

Estudos recentes indicam que quebras proteolíticas de uma série de proteínas chave, como por exemplo a actina, espectrina, lamina A e B, por proteases ativadas por caspases, desempenham um papel importante no processo da morte celular (MARTIN e GREEN, 1995).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar se os efluentes de refinaria de petróleo, que são lançados no rio Atibaia, município de Paulínia/SP, continham substâncias potencialmente mutagênicas, pelo teste de aberrações cromossômicas, realizados com o sistema teste de *Allium cepa*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta das amostras**

Amostras de água foram coletadas, sazonalmente, durante os anos de 2003 e 2004, em seis pontos distintos: 1) Montante do Rio Jaguarí (acima da captação da água utilizada pela refinaria); 2) Entrada da lagoa de estabilização da REPLAN; 3) Saída da lagoa de estabilização (água destinada aos despejos no Rio Atibaia); 4) 1Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia; 5) 1 Km a jusante do ponto 3; 6) Após o tratamento físico-químico e antes do tratamento biológico (Fig.1)

### **2.2. Material biológico**

O material biológico utilizado como sistema-teste, para se avaliar os efeitos mutagênicos das águas coletadas nos diversos pontos de coleta, constituiu-se de sementes de *Allium cepa* ( $2n=16$  cromossomos) de um mesmo lote (variedade Baía periforme), estocadas em local escuro e acondicionadas a temperatura de  $6-10^{\circ}$  C.

A utilização de sementes de *Allium cepa* para o desenvolvimento dos ensaios, justifica-se pela necessidade de repetições em períodos diferentes do ano, o que poderia levar ao uso de diferentes variedades, pela disponibilidade variada de mercado. Segundo Leme et al. (2005), os ensaios utilizados com bulbo e com sementes de *Allium*

*cepa* apresentam resultados estatisticamente similares, quanto às potencialidades da espécie em responder a xenobiontes observáveis pelos testes de aberrações cromossômicas.

Cinquenta sementes de *Allium cepa* foram colocadas para germinar em placas de Petri, diretamente expostas às águas dos pontos de coleta estudados (um para cada ponto). Para os testes controle, as sementes foram expostas a germinação em água milli-Q (controle negativo) e em metilmetano sulfonado, concentração de  $4 \times 10^{-4} \text{M}$  (controle positivo).

As sementes permaneceram nas placas de Petri até que as raízes atingissem um tamanho médio de 2 cm de comprimento. Posteriormente, essas raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (três partes de etanol para uma parte de ácido acético).

Para a realização das análises citológicas, os meristemas foram submetidos a uma hidrólise ácida em HCl 1 N a 60° C, durante 8 minutos e, posteriormente, submetidas ao reativo de Schiff, por 2 horas em local escuro, conforme metodologia de Feulgen & Rossenbeck (1924) com modificações. As pontas das raízes foram seccionadas, em lâmina, para a extração das suas regiões meristemáticas. Para intensificar a coloração e promover um melhor contraste das células, foi adicionada aos meristemas uma gota de carmin acético (1%). O material foi recoberto por lamínula, onde, com o auxílio de um estilete de madeira, foi feita uma leve pressão, somente para proporcionar um melhor espalhamento das células sobre a lâmina.

As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas em Enthelan, para serem, posteriormente, observadas. O material foi analisado em microscopia de luz (Germany, Carl Zeiss) no aumento de 40X10 vezes. Os melhores registros foram fotodocumentados.

Os índices das anormalidades foram obtidos pela relação entre pelas células portadoras de alterações e total de células observadas, segundo a fórmula:

$$\text{Índice de alterações cromossômicas (IAC)} = \frac{\text{Número total de células alteradas}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo método Kruskal-Wallis. Este é um teste não-paramétrico, conhecido como teste H, destinado a comparar 3 ou

mais amostras independentes de mesmo tamanhos ou desiguais, cujos escores devem ser mensurados, pelo menos, a nível ordinal.

### 3. RESULTADOS

Os resultados observados nas análises estão reunidos na Tabela 1 e nas Figuras 2, 3 e 4.

Pelas análises realizadas, foi possível observar a presença de aberrações dos tipos: quebras cromossômicas e micronúcleos (aberrações cromossômicas mutagênicas – Tabela 1, Figura 2), C-metáfases, metáfases poliplóides, metáfases com aderências cromossômicas, anáfases multipolares, anáfases e telófases com atrasos, perdas e pontes cromossômicas, células polinucleadas e células poliplóides (aberrações cromossômicas potencialmente mutagênicas – Tabela 1, Figura 3), além de células em processo de morte celular (núcleos heteropícnóticos, células com fragmentação nuclear e células com citoplasma vacuolizado - Tabela 1, FIGURA 4).

Os micronúcleos e quebras cromossômicas foram reunidas em uma mesma categoria, nomeada de aberrações cromossômicas mutagênicas, por caracterizar alterações consideradas efetivamente mutagênicas. As demais aberrações (C-metáfases, metáfases poliplóides, metáfases com aderências cromossômicas, anáfases multipolares, anáfases e telófases com atrasos, perdas e pontes cromossômicas, células polinucleadas, células poliplóides) foram reunidas na categoria de aberrações cromossômicas potencialmente indutoras de mutagenicidade, por serem apenas indicativos de possível efeito citotóxico.

Pela análise dos dados, podemos observar que o controle negativo não apresentou índice de células portadoras de aberrações cromossômicas mutagênicas e nem de células em processo de morte celular, apresentando, somente, células portadoras de aberrações potencialmente mutagênicas, porém com índices muito baixos ( $0,12\% \pm 0,046$ ), como pode ser visto na Tabela 1, Figuras 2, 3 e 4. O controle positivo (MMS) apresentou índice de aberrações mutagênicas igual a  $0,36\% \pm 0,14$ , de aberrações cromossômicas potencialmente mutagênicas igual a  $0,87\% \pm 0,1$  e de células em processo de morte celular de  $0,05\% \pm 0,1$ .

O ponto 1 (montante do Rio Jaguarí - acima da captação da água utilizada pela refinaria), apesar de apresentar o menor índice de aberrações cromossômicas

potencialmente mutagênicas ( $0,06\% \pm 0,11$ ), apresentou índices de aberrações cromossômicas mutagênicas igual a  $0,135\% \pm 0,045$  e de células em morte celular igual a  $0,22\% \pm 0,07$  (Tabela 1, Figuras 2, 3 e 4).

O ponto 2 (entrada da lagoa de estabilização da REPLAN) apresentou valores de  $0,2\% \pm 0,14$  para células portadoras de aberrações cromossômicas mutagênicas. O índice observado para as aberrações cromossômicas potencialmente mutagênicas foi de  $0,73\% \pm 0,085$  e de células em processo de morte celular igual a  $0,3\% \pm 0,52$ .

O ponto 3 (saída da lagoa de estabilização - água destinada aos despejos no Rio Atibaia) apresentou um índice de células em morte celular com valor de  $0,069\% \pm 0,086$ , uma frequência de células portadoras de aberrações cromossômicas mutagênicas de  $0,135\% \pm 0,15$  e uma frequência de células com aberrações cromossômicas potencialmente mutagênicas de  $0,415\% \pm 0,24$  (Tabela 1, Figuras 2, 3 e 4).

O ponto 4 (1Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia) apresentou células com aberrações cromossômicas mutagênicas com um índice de  $0,067\% \pm 0,086$ . O valor observado para células portadoras de aberrações cromossômicas potencialmente mutagênicas foi de  $0,34\% \pm 0,23$  e não apresentou células em processo de morte celular.

O ponto 5 (1 Km a jusante do ponto 3) também não apresentou células em processo de morte celular, porém apresentou uma frequência de células com aberrações cromossômicas mutagênicas de  $0,31\% \pm 0,45$  e um índice de aberrações cromossômicas potencialmente mutagênicas igual a  $0,32\% \pm 0,36$  (Tabela 1, Figuras 2, 3 e 4).

O ponto 6 (após o tratamento físico-químico e antes do tratamento biológico) apresentou índice de células portadoras de aberrações cromossômicas mutagênicas igual a  $0,36\% \pm 0,27$ . O índice observado para células portadoras de aberrações cromossômicas potencialmente mutagênicas foi de  $0,99\% \pm 0,44$  e de células em processo de morte celular de  $1,31\% \pm 0,74$  (Tabela 1, Figuras 2, 3 e 4).

#### **4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

O teste de aberrações cromossômicas com *Allium cepa* caracteriza-se como um instrumento que fornece um rápido exame dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de substâncias químicas presentes no meio (GRANT, 1982; GRANT, 1994; FISKEJÖ, 1985; FISKEJÖ, 1988; FISKEJÖ, 1993a; FISKEJÖ, 1993b; NIELSEN & RANK, 1994).

Este teste tem sido, amplamente, utilizado para se monitorar os efluentes de rios (FISKEJÖ, 1993b; RANK & NIELSEN, 1994; SMAKA-KINCL et al., 1997).

Os dados referentes à análise de células portadoras de alterações cromossômicas, observadas nos ensaios realizados com meristemas radiculares de *Allium cepa* foram divididos em duas categorias: as alterações cromossômicas mutagênicas e as alterações potencialmente mutagênicas.

Essa classificação se explica pela característica da informação que se pode inferir, em cada tipo de anormalidade observada. As anormalidades cromossômicas envolvendo alterações como C-metáfases, metáfases poliplóides, metáfases com aderências, anáfases multipolares, anáfases e telófases com atrasos, perdas de cromossomos inteiros e pontes cromossômicas, não foram consideradas mutagênicas, pois muitos desses efeitos são derivados da atuação do xenobionte sobre estruturas celulares e não, diretamente, sobre o material genético. Embora essas alterações possam, indiretamente, levar ao comprometimento do material genético, não podemos nos certificar se a célula, após essa ação, poderá permanecer viável e assim portadora de uma alteração genética. Desta forma, consideramos estas anormalidades como aberrações cromossômicas potencialmente mutagênicas.

As células portadoras de micronúcleos e de fragmentos cromossômicos nos sugerem uma ação mutagênica, pois decorre em um efeito sobre o material genético da célula, podendo então ser considerada como aberrações cromossômicas mutagênicas. Desse modo, os micronúcleos foram considerados como aberrações cromossômicas mutagênicas, porque são observáveis em células em interfase (células estas que já passaram por um ciclo completo de divisão) confirmando a persistência da alteração, pois o evento não foi suficiente para promover a inviabilidade celular (morte celular). As quebras cromossômicas foram classificadas como aberrações mutagênicas, pois evidenciam uma ação direta de um dado xenobionte sobre a molécula de DNA, promovendo assim a fragmentação do mesmo. Esses fragmentos resultantes, por não serem portadores de centrômeros, não se ligaria ao fuso, podendo assim se organizar em pequenas estruturas, caracterizando os chamados micronúcleos.

Apesar dos micronúcleos poderem se originar de perda de cromossomos inteiros, as perdas cromossômicas não podem ser classificadas como mutagênica, mas sim como potencialmente mutagênica. Quando cromossomos inteiros são perdidos, eles podem,

em algum momento, readquirir a sua capacidade em se ligar aos fusos de um dos pólos e assim se segregar normalmente, se reincorporando ao núcleo principal.

Todas as demais aberrações cromossômicas (C-metáfases, metáfases poliplóides, metáfases com aderências cromossômicas, anáfases multipolares, anáfases e telófases com atrasos e pontes cromossômicas, células polinucleadas, células poliplóides) foram reunidas em aberrações potencialmente mutagênicas porque as células portadoras destas alterações podem desencadear efeitos adversos à célula, levando-a à morte e não a mudanças.

A análise dos resultados mostrou um alto índice de células portadora de C-metáfases, para os pontos 6, 2 e 3. A C-metáfase (células com cromossomos condensados e distribuídos aleatoriamente e com ausência de fuso) foi, originalmente, observada após o tratamento das células com concentração, suficientemente, alta de colchicina. Esse tipo de anormalidade mitótica pode, às vezes, levar a formação de núcleos poliplóides, embora o resultado mais freqüente seja a formação de vários micronúcleos (KIRSCH-VOLDERS, 2002; FERNANDES, 2005).

Nas C-metáfases ou C-mitoses, o fuso nuclear é completamente inativado, o que significa que nenhuma placa equatorial torna-se organizada e, conseqüentemente, a divisão do centrômero é atrasada ou ausente. Desta forma, um tratamento C-metafásico contínuo conduzirá a uma duplicação do número de cromossomos das células que passam por mitose (FERNANDES, 2005). Como efeito da C-metáfase, também temos a produção de números cromossômicos variáveis, decorrendo na produção de células com números superiores ou inferiores aos originais. Então, um desvio muito grande em relação ao número normal induziria um desbalanço cromossômico, com perda da viabilidade, inativação parcial ou completa do fuso nuclear e o aumento da contração cromossômica. A C-metáfase deve ser referida como um mecanismo causador de sérios danos, podendo ser incluída entre os parâmetros utilizados para avaliação dos efeitos genotóxicos (FISKEJÖ, 1985; FISKEJÖ, 1993c).

Foram também observadas a presença de células portadoras de anáfases multipolares, cromossomos perdidos ou com atrasos de segregação, anáfases com ponte, aderências cromossômicas, além de células poliplóides, sendo os mais altos índices observados, decrescentemente, para os pontos 6, 2 e 3.

Anáfases multipolares e com cromossomos perdidos são consequências de C-metáfases fracas e podem levar a aneuploidia (KOVALCHUCK et al., 1998; FERNANDES, 2005).

C-metáfases, anáfases multipolares, cromossomos perdidos, atrasos cromossômicos e poliploidia são fenômenos que podem ser derivados de problemas com os microtúbulos (microtúbulos interrompidos ou desenvolvidos de forma incompleta), uma vez que essas estruturas são importantes componentes do fuso mitótico e os fusos são os responsáveis pela segregação correta dos cromossomos para as células filhas (VIDAKOVIC-CIFREK et al., 2002; FERNANDES, 2005).

De acordo com Fiskejö & Levan (1993), Marcano & Del Campo (1995) e por Marcano et al. (1999), aderência cromossômica é um sinal comum da influência tóxica nos cromossomos e decorre, provavelmente, em um efeito irreversível para a célula. A aderência é um tipo de anormalidade que envolve a matriz protéica do material cromatínico e não, propriamente, a molécula de DNA. Por ser um processo irreversível, geralmente promove a morte da célula (FISKEJÖ, 1988; FISKEJÖ, 1995; FISKEJÖ, 1997; FERNANDES, 2005).

A formação de pontes anafásicas, rupturas nos cromossomos, cromossomos perdidos (não migração das cromátides) e cromossomos que não sofreram disjunção (cromátides que não se separaram) são fenômenos que podem ocorrer como consequência da aderência (MARCANO et al., 2004). Neste caso, os cromossomos permanecem unidos e, quando separados, podem levar a ruptura ou a perda dos cromossomos (MARCANO et al., 1999), bem como a aneuploidia e a poliploidia (FISKEJÖ, 1985; MATSUMOTO, 2004; FERNANDES, 2005). Quando as pontes cromossômicas resultam de rearranjos estruturais, são acompanhadas de fragmentos cromossômicos (GIACOMELLI, 1999).

Os fragmentos cromossômicos, segundo Fiskejö (1993a), podem ser derivados de quebras cromossômicas que aparecem em decorrência de pontes anafásicas. Essas pontes podem ser originadas de translocações cromossômicas coesivas.

Segundo Rank & Nielsen (1997) e Fernandes (2005), a presença de anáfases multipolares ocorre devido ao mau funcionamento do fuso mitótico, que distribui os cromossomos irregularmente, encaminhando-os para mais de dois pólos das células, contrariamente ao que ocorre em células de divisão celular normal.



A poliploidia pode ser induzida pela ausência de fuso mitótico funcional e a conseqüente falha na migração dos cromossomos filhos para os pólos. Esse processo também é conhecido como atraso mitótico (ELHAJOUJI et al., 1998).

Também foi observado em nossas análises a presença de células portadoras de micronúcleos, sendo, novamente, as mais altas freqüências observadas para os pontos 6, 2 e 3 respectivamente. Micronúcleos podem aparecer em células que passaram pelo processo de divisão, onde houve a ocorrência de fragmentos cromossômicos, derivados de quebras cromossômicas e/ou de cromossomos inteiros que não foram conduzidos pelos fusos aos pólos celulares, durante a divisão celular. Na telófase, esses fragmentos ou cromossomos inteiros são envolvidos por membranas, formando um núcleo menor, separado do núcleo principal, razão pela qual recebe o nome de "micronúcleo" (SUDHAKAR et al., 1998; KIRSCH-VOLDERS, 2002).

Da análise dos nossos resultados pudemos observar uma alta incidência de células meristemáticas de *Allium cepa* com comprometimento na sua morfologia. Estas células, quando observadas ao microscópio óptico, se apresentavam desestruturadas, aparentando fragilidade do envoltório celular e, muitas vezes, com o seu conteúdo citoplasmático excedendo os limites celulares. Após inúmeras repetições, pudemos descartar a hipótese de artefato de técnica. Esse fato pode ser indicativo de morte celular, pois, segundo Cristea & Esposti (2004), células em processo de morte celular, especificamente em necrose, apresentam o seu volume aumentado, o que leva a uma ruptura da membrana plasmática, o que acaba expondo o seu conteúdo intracelular ao meio externo.

Segundo Doneli et al. (2003), mudanças no volume celular são conseqüências diretas na mudança de permeabilidade da membrana celular, que parecem estar associadas às mudanças no citoesqueleto. Esse aumento da permeabilidade da membrana celular pode ser explicado pela translocação da fosfatidilserina da superfície interna da membrana plasmática para a superfície externa (SHOUNAN et al., 1998). Outra explicação para o aumento da permeabilidade seria a de que compostos lipofílicos, como os derivados de petróleo, podem se intercalar entre a membrana plasmática, fazendo com que ocorra uma desestruturação dessa membrana, levando assim a um aumento da sua permeabilidade e a uma conseqüente perda da sua função protetora (THAKKAR et al., 2000).

Além de atuar na membrana plasmática, o aumento da permeabilidade celular poderia ser ocasionado por mudanças na estrutura do citoesqueleto. Alguns PAHs podem induzir um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e essas EROs podem afetar, diretamente, o citoesqueleto pela mudança do estado redox de algumas enzimas regulatórias ou até mesmo da actina (elemento presente no citoesqueleto), fazendo com que ocorra uma desestruturação desse citoesqueleto (GÓMEZ-MENDIKUTE & CAJARAVILLE, 2003). Este fato poderia explicar a existência de células em processo de morte celular, devido a exposição aos compostos do petróleo, visto que os efluentes da refinaria em estudo possuem, em sua composição, os HPAs.

Além disso, foram observadas em nossas análises, células com o seu citoplasma vacuolizado. Segundo Zakeri & Lockshin (2002), durante o processo de necrose as enzimas lisossomais podem digerir as organelas citoplasmáticas, dando ao citoplasma um aspecto vacuolizado. Desse modo, podemos afirmar que as células observadas estão em processo de morte celular, comprovado pela vacuolização do citoplasma, decorrente da digestão de suas próprias organelas.

Através da análise dos resultados, podemos observar que o ponto 6 (após o tratamento físico-químico e antes do tratamento biológico) apresentou um índice de aberrações mutagênicas igual ao observado para o controle positivo (tratamento com MMS - substância conhecidamente mutagênica), e um índice de aberrações cromossômicas potencialmente mutagênicas superiores ao encontrado para o mesmo controle. Desse modo, as águas coletadas no ponto 6 podem ser classificadas como altamente mutagênicas. O índice de células em processo de morte celular, para esse mesmo ponto, foi o mais alto observado, uma vez que o controle positivo não apresentou índices elevados desse tipo de alteração. Isto pode ser explicado pela própria característica da substância usada para o teste controle positivo (MMS) que é uma substância de ação mutagênica e não citotóxica. Desse modo, as águas do ponto 6 podem ser classificadas como, além de mutagênica, altamente citotóxica.

O ponto 2 (entrada da lagoa de estabilização da REPLAN) apresentou índices de anormalidade inferiores aos observados para o ponto 6. No ponto 2, a água já passou pelo tratamento biológico, mostrando que este tratamento parece ser, relativamente, efetivo, pois estas águas ainda possuem certa potencialidade mutagênica e citotóxica.

Pelas análises realizadas com as águas do ponto 3 (saída da lagoa de estabilização - água destinada aos despejos no Rio Atibaia), que já passaram pelos tratamentos físico-químicos, biológicos e pelo tratamento na lagoa de estabilização, podemos sugerir que esses tratamentos se mostraram efetivos, pois houve uma acentuada diminuição dos índices de aberrações mutagênicas, de aberrações potencialmente mutagênicas e de células em processo de morte celular, quando comparados com as amostras dos pontos 6 e 2. As águas do ponto 3 apresentam baixos índices de aberrações mutagênicas, tendo seus valores foram superiores somente aos observados para as águas do ponto 1 (montante do Rio Jaguarí - acima da captação da água utilizada pela refinaria). As águas do ponto 1 são consideradas, pelos órgãos competentes, como uma água de excelente qualidade. Comparando-se ainda as águas do ponto 3 com as águas do ponto 1, pode-se observar que o índice de células em processo de morte celular do ponto 3 foi menor que o observado para o ponto 1. No entanto, o índice de aberrações potencialmente mutagênicas observado para o ponto 3 foi superior ao observado para o ponto 1.

As águas do ponto 4 (1 Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia) apresentaram índices elevados de aberrações cromossômicas potencialmente mutagênicas, provavelmente, pelo fato destas águas receberem, previamente aos efluentes da refinaria de Paulínia, efluentes de diversas outras indústrias, o que pode estar comprometendo ainda mais a qualidade da água do rio Atibaia. No entanto, após o despejo do efluente da refinaria (ponto 5 - 1 Km a jusante do ponto 3), observa-se um aumento na frequência de aberrações cromossômicas mutagênicas, fazendo com que a qualidade da água deste rio apresente um comprometimento ainda maior, embora as águas do efluente final da refinaria não tenham apresentado características citotóxicas consideráveis.

Esses dados nos levam a crer que os efluentes de refinaria, analisados nesse estudo, possuem em sua composição substâncias e/ou compostos químicos que são capazes de atuar nos microtúbulos, no fuso mitótico, na matriz protéica da célula e no material genético, o que podemos inferir que esses efluentes apresentam um potencial citotóxico e mutagênico. Esses efluentes também devem possuir substâncias capazes de alterar a permeabilidade da membrana plasmática das células meristemáticas de *Allium*

*cepa* ou substâncias ainda capazes de atuar no citoesqueleto dessas células, levando as mesmas à morte.

A amostra do ponto 6 mostra um maior comprometimento, quando comparada com amostras de outros pontos de coleta. A medida em que vão se processando os tratamentos, vai se observando uma melhoria na qualidade das amostras, e uma conseqüente diminuição dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos mesmos. Porém, foi observado que, quando os efluentes são lançados no rio Atibaia, os índices de aberrações cromossômicas mutagênicas voltam a aumentar, fato este, possivelmente, resultante do efeito sinérgico com os outros poluentes já existentes neste recurso hídrico.

Os tratamentos empregados pela refinaria de petróleo parecem ser efetivos, porém outros impactos sofridos pelo rio Atibaia podem estar aumentando a potencialidade mutagênica de suas águas.

## **5. AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro, à Prof<sup>o</sup> Dejanira de Franceschi de Angelis do Laboratório de Toxicologia de Águas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biologia da UNESP-Rio Claro, ao programa PRH-05 (Programa de Recursos Humanos-05 da ANP) pelo apoio financeiro.

Tabela 1: Frequência de aberrações cromossômicas (%) observadas para células de *Allium cepa*, após germinação em água milli-Q (controle negativo), em MMS-metilmetano sulfonato (controle positivo) e em águas dos pontos de coleta.

	Controle negativo	Controle positivo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Aberrações cromossômicas mutagênicas (micronúcleos e quebras cromossômicas)	0	0,36±0,14*	0,135±0,045	0,2±0,14	0,135±0,15	0,067±0,086	0,31±0,45	0,36±0,27*
Aberrações potencialmente mutagênicas (outras aberrações)	0,12±0,046	0,87±0,1*	0,06±0,11	0,73±0,085	0,415±0,24	0,34±0,23	0,32±0,36	0,99±0,44*
Células em processo de morte celular	0	0,05±0,1	0,22±0,07	0,3±0,52	0,069±0,086	0	0	1,31±0,74*
Número total de células analisadas	21435	21829	21870	20792	21275	21579	21021	21426

Nota: os valores seguidos por \* diferiram significativamente (0,5%) em relação ao controle, pelo teste de Kruskal-Wallis.

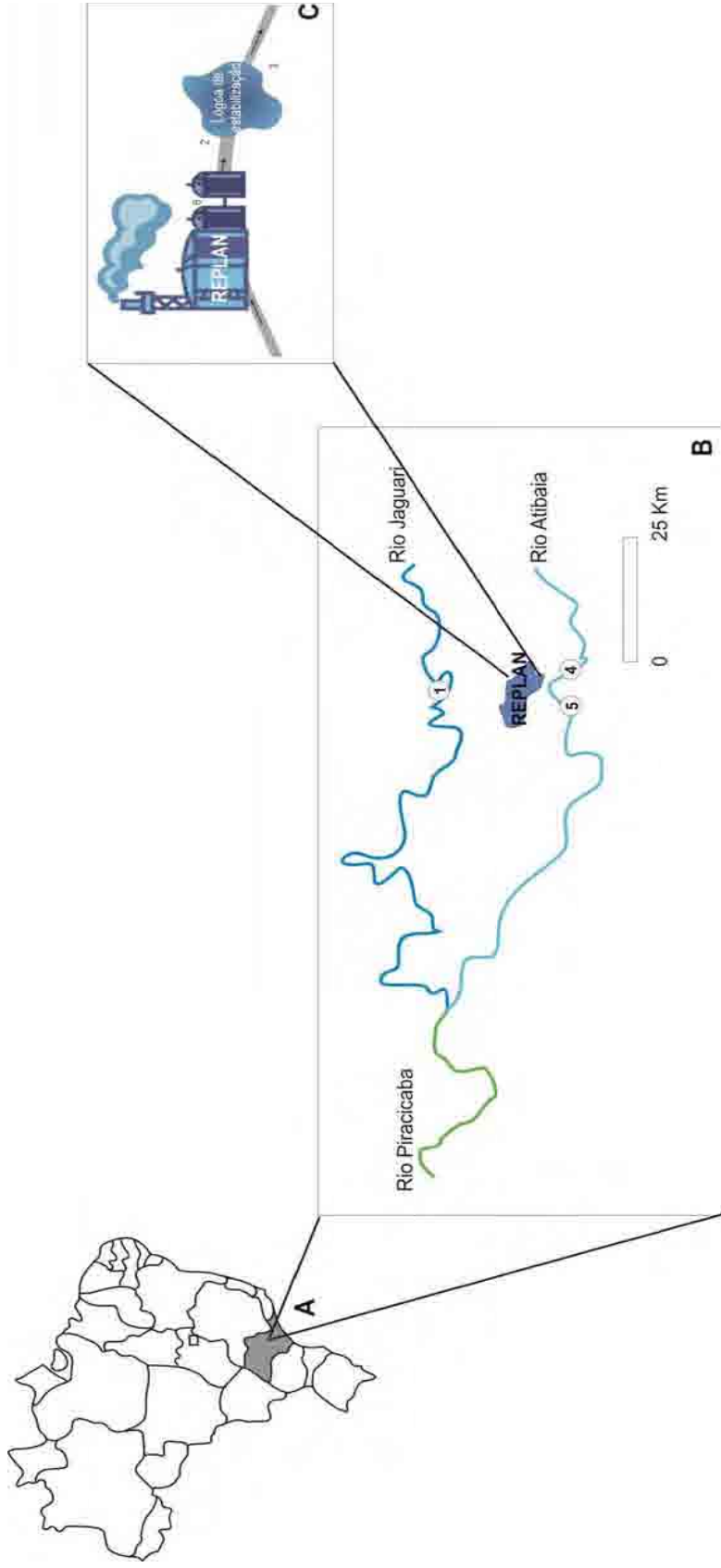


Figura 1: A. Localização da cidade de Paulínia (latitude  $22^{\circ}48'45''S$ , longitude  $47^{\circ}11'15''W$ ); B. Curso do rio Jaguarí e do rio Atibaia e distribuição dos pontos de coleta nestes rios (1, 4 e 5); C. Distribuição dos pontos de coleta na refinaria REPLAN (2, 3 e 6).

Figura 2. Média e desvio padrão de células de *Allium cepa*, portadoras de aberrações cromossômicas mutagênicas.

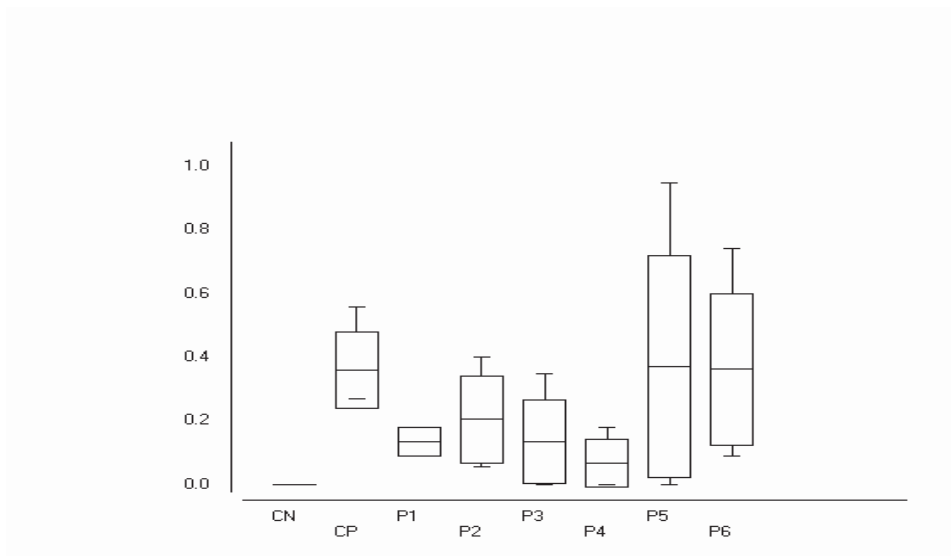
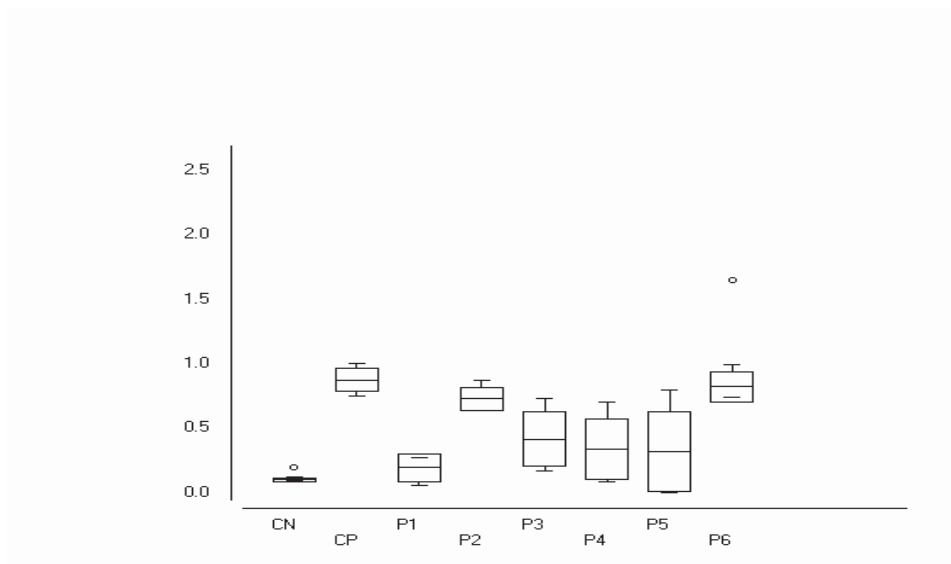
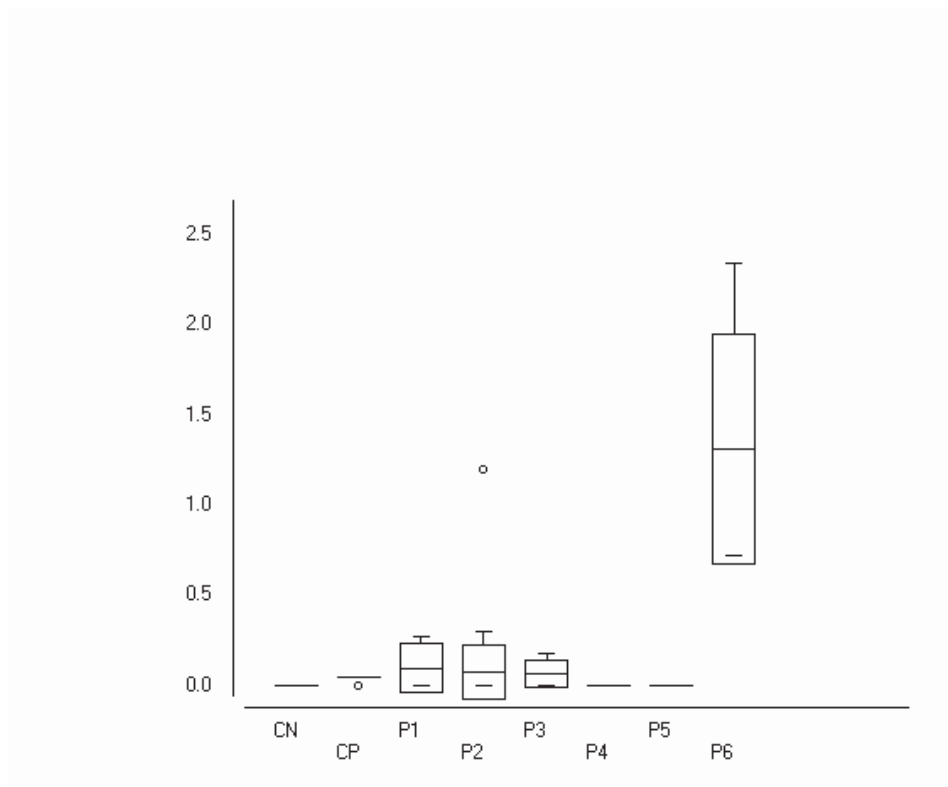


Figura 3. Média e desvio padrão de células de *Allium cepa*, portadoras de aberrações cromossômicas potencialmente/possivelmente mutagênicas.



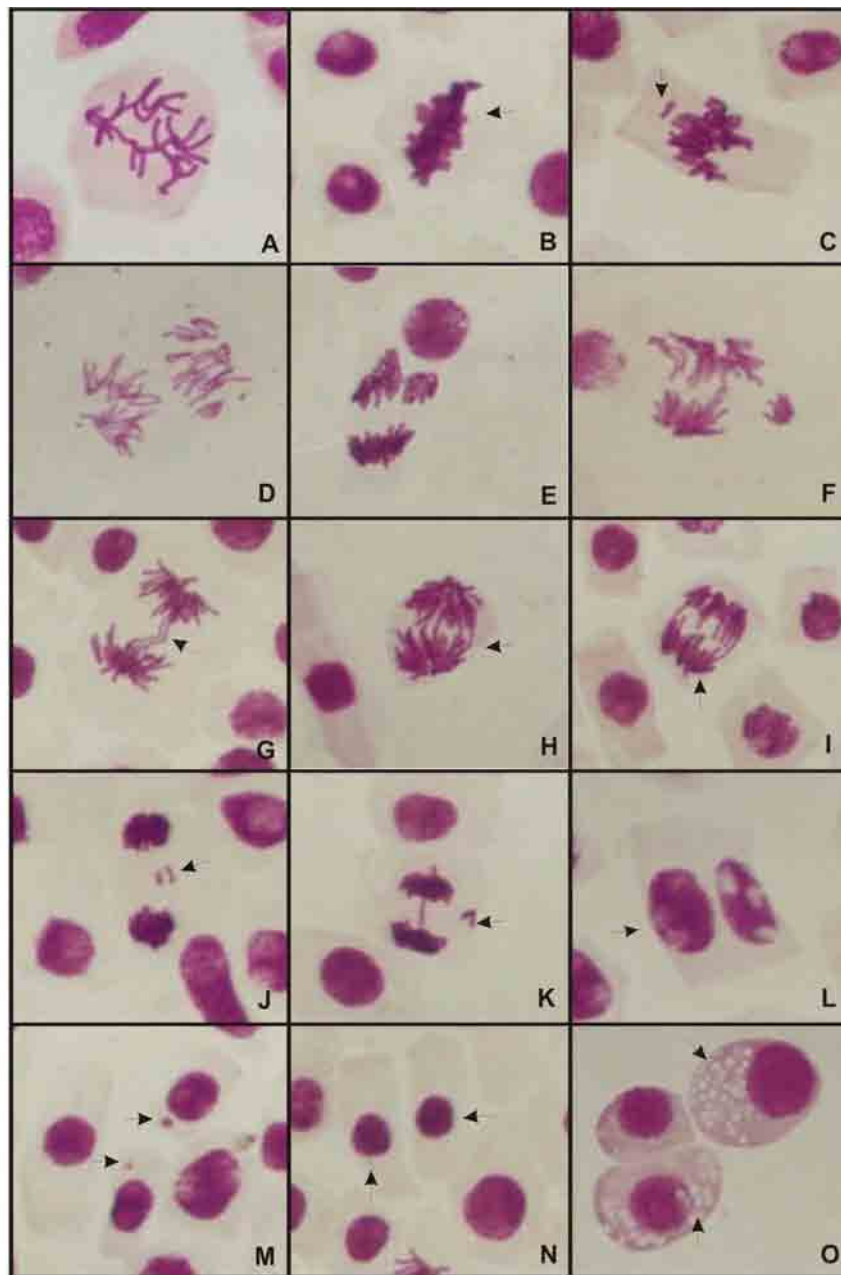
Obs: O símbolo “o” presente no gráfico representa um dado “outlier”.

Figura 4. Média e desvio padrão de células de *Allium cepa*, em processo de morte celular.



Obs: O símbolo “o” presente no gráfico representa um dado “outlier”.





**Figura 5: Alterações encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa*:** A. C-metáfase; B. Metáfase com aderência cromossômica; C. Perda cromossômica; D, E e F. Anáfase multipolar; G. Anáfase com ponte anafásica; H. Anáfase poliplóide; I. Anáfase com atraso e ponte; J. Telófase com quebra cromossômica; K. Telófase com ponte e perda cromossômica; L. Célula binucleada; M. Micronúcleo; N. Célula com núcleo heteroploid; O. Células em processo de morte celular.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.N. **Aplicação de bioensaios bacterianos para determinação da toxicidade aguda de efluentes industriais e corpos de água receptores.** 1990. [s.n]. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHANG, L.W.; MEIER, J.R.; SMITH, M.K. Application of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of a lead-contaminated soil. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, v. 32, p. 166-171.1997.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J-F.; FÉRARD, J-F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*- micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, p. 161-171, 1999.

COTTER, T.G.; LENNON, S.V.; GLYNN, J.M.; GREEN, D.R. Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. **Cancer Research**, Baltimore, v. 52, p. 997, 1992.

CRISTEA, I.M.; ESPOSTI, M.D. Membrane lipids and cell death: na overview. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 129, p. 133-160, 2004.

DEVAUX, P.F. Static and dynamic lipid assimetry in cell membranes. **Biochemistry**, v. 30, p. 1163-1173. 1991.

DONELI, G.; FIORENTINI, C.; MATARRESE, P.; FALZANO, L.; CARDINES, R.; MASTRANTONIO, P.; PAYNE, W.P.; TITBALL, R.W. Evidence for cytoskeletal chages secondary to plasma membrane functional alterations in the in vitro cell response to *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Diseases**, v. 26, p. 145-156, 2003.

ELHAJOUJI, A.; CUNHA, M.; KIRSCH-VOLDERS, M. Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. **Mutagenesis**, New York, v. 13, p. 193-198, 1998.

EVSEEVA, T.I., KHRAMOVA, E.S. Action of low concentration of  $^{232}\text{Th}$  on *Tradescantia* (clone 02) and meristematic root tip cells of *Allium cepa*. In: **Proceedings of the Fifth International Conference on High Levels of Natural Radiation and Radon Areas**, Munich, pp. 489-491, 2002.

EVSEEVA, T.I.; GERAS'KIN, S.A. SHUKTOMOVA, I.I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 68, p. 235-248, 2003.

FELLENBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental**. São Paulo, EDUSP, 1980, 196 p.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. **Hoppe Seyler Z Physiol Chem.**, v. 135, p. 203–248, 1924.

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

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

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

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

FISKEJÖ, G. The *Allium* test – a potential standard for the assessment of environmental toxicity, in : J.W. Gorsuch, (Ed.), ASTM (American Society of Testing Materials) Special Technical Publication 1216. **Environ. Toxicol. Risk Assessment**, pp. 331-345. 1993 a.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 8, p. 291-298, 1993 b.

FISKEJÖ, G. Technical Methods Section. *Allium* test I: A 2-3 Day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal**, New York, v. 8, p. 461-470, 1993 c.

FISKEJÖ, G. (Ed.). *Allium* test. Meth. Mol. Biol., Vol. 43, In vitro toxicity testing protocols. Pp. 119-127. 1995.

FISKEJÖ, G. *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters, in: WANG, W.; GORSUCH, J.W.; HUGHES, J.S. (Eds.). **Plants for Environmental Studies**, CRC, Lewis Publishers. Pp. 307-333. 1997. Nova Iorque.

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

GÓMEZ-MENDIKUTE, A.; CAJARAVILLE, M.P. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[*a*]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 17, p. 539-546, 2003.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, p. 273-291, 1982.

GRANT, W. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 310 (2), p. 175-85, 1994.

GROVER, I.S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, p. 183-188, 1999.

HOSHINA, M.M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro – município de Rio Claro, pertencente à bacia do Rio Corumbataí, por meio de testes de mtagenicidade em *Allium cepa***. Monografia (Bacharel e Licenciado), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2002.

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

JUNGCLAUS, G.A.; LOPEZ-ÁVILA, V.; HILTERS, R.A. Organic compounds in an industrial wastewater: a case study of their environmental impact. **Environ. Sci. Technol.**, v. 12, p. 88-96. 1978.

KAIUOMOVA, D.; SÜSAL, C.; OPELZ, G. Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Human Immunology**, Heidelberg, Germany, v. 62, p. 64-74, 2001.

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

KOVALCHUCK, O., KOVALCHUCK, I., ARKHIPOV, A., TELYUK, P., HOHN, B., KOVALCHUCK, I. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soil of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 415 (1-20), p. 47-57, 1998.

LEME, D.M; VENTURA, B.C; ROBERTO, M.M; ANGELIS, D.F; MARIN-MORALES, M.A. Comparação das respostas de sistemas testes de *Allium cepa*, utilizando sementes e bulbos para obtenção de meristemas radiculares, frente à exposição a metilmetano sulfonato, a trifluralina e a diferentes tratamentos de controle negativo. IN: 51º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia/SP, 2005.

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

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

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

MARTIN, S.J.; GREEN, D.R. Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts? **Cell**, v. 82, p.349-352. 1995.

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

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; MARIA, S.S. In: **CARVALHO, F.H.; RECCO-PIMENTEL, S.M. (EDS.) A célula 2001**, Brasil: Manole, 2001, 275p.

NIELSEN, M.N.; RANK, J. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of *Allium* test. **Hereditas**, Lund, v. 121, p. 249-254, 1994.

PITTMAN, S. GEYP, M.; FRASER, M.; ELLEM, K.; PEASTON, A.; IRELAND, C. Multiple centrosomal microtubule organizing centers and increased microtubule stability are early features of VP-16 induced apoptosis in CCRF-CEM cells. **Leukemia Research**, v. 21, n. 6, p. 491-499, 1997.

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercambios entre cromátidas hermanas.** 1987. 276 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade de Complutense, Madrid.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 312 (1), p. 17-24, 1994.

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

RANK, J., NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 418 (2-3), p. 113-119, 1998.

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

SHOUNAN, Y.; FENG, X.; O'CONNELL, P.J. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantification of cell-mediated cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 217, p. 61-70, 1998.

SHROIT, A.J.; ZWAAL, R.F.A. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, **1071** :313-329. 1991.

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

STAHL, R.G. JR. The genetic toxicology of organic compounds in natural water and wastewater. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 22, p. 94-125. 1991.

SUDHAKAR, D.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Biomonitoring of low levels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 203, p. 11-21, 1998.

THAKKAR, R.R.; WANG, O-L.; ZEROUGA, M.; STILLWELL, W.; HAQ, A.; KISSSLING, R.; PIERCE, W.M.; SMITH, N.B.; MILLER, F.N.; EHRINGER, W.D. Docosahexaenoic acid reverses cyclosporin A-induced changes in membrane structure and function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1474, p. 183-195, 2000.

VEGA, M.M., FERNANDEZ, T.B., TARAZONA, J.V., CASTAÑO, A. Biological and Chemical Tools in the Toxicological Risk Assessment of Jarama River, Madrid, Spain. **Environmental Pollution**, v. 93, p.135-139. 1996.

VENTURA, B.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2004.



VERHOVEN, B.; SCHLEGEL, R.A.; WILLIAMSON, P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 182, p.1597-1601. 1995.

VIDAKOVIC-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPES, D. Cytogenetic Damage in Shallot (*Allium cepa*) Root Meristems Induced by Oil Industry "High-Density Brines". **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 43, p. 284-291, 2002.

WHITE, P. A. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 515, p. 85-98, 2002.

ZACHOWSKI, A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: Transverse asymmetry and movement. **Biochem. J.**, v. 294, p.1-14. 1993.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R.A. Cell death during development. **Journal of Immunological Methods**, [S.1], v. 265, p. 3-20, 2002.

ZHAO, J.; ZHOU, Q.; WIEDMER, T.; SIMS, P.J. Level of expression of phospholipid scramblase regulates induced movement of phosphatidylserine to the cell surface. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 6603-6606. 1998.

## **4. Artigo 2**

---

**EFEITO MUTAGÊNICO DE EFLUENTES DE REFINARIA,  
EVIDENCIADO POR MEIO DO TESTE DE MICRONÚCLEO E DE  
ANORMALIDADES NUCLEARES EM *OREOCHROMIS NILOTICUS*  
(TILÁPIA).**

Márcia M. Hoshina<sup>1</sup>, Dejanira de Franceschi de Angelis<sup>1</sup>, Eliane Gonçalves de Freitas<sup>2</sup>,  
\*Maria A. Marin-Morales<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista, IB-Campus de Rio Claro, Av. 24 A, 1515, CEP:  
13506-900, Rio Claro/SP-Brasil

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista, IBILCE- Campus de São José do Rio Preto, Rua  
Cristóvão Colombo, 2265, CEP:15054-000, São José do Rio Preto/SP-Brasil

\*Autor responsável pela correspondência: fone (19)3526-4143; Fax: (19) 3536-0009.

Agência de Fomento: ANP/PRH-05.

## **RESUMO**

Atualmente, com a crescente urbanização e industrialização é cada vez maior a quantidade de substâncias químicas que são lançadas nos corpos d'água. Uma das principais fontes de emissão desses poluentes são as industriais, na qual se inserem as refinarias de petróleo. O presente estudo teve como objetivo avaliar, por meio do teste de micronúcleo e de outras anormalidades nucleares, em *Oreochromis niloticus*, o possível efeito mutagênico de efluentes de refinaria, que são lançados no rio Atibaia, município de Paulínia/SP. Para isso, foram coletadas amostras de água de seis pontos distintos: Montante do Rio Jaguari, (acima da captação da água utilizada pela refinaria); Entrada da lagoa de estabilização da REPLAN; Saída da lagoa de estabilização (água destinada aos despejos no Rio Atibaia); 1Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia; 1 Km a jusante do ponto 3, também no rio Atibaia; Após o tratamento físico-químico e antes do tratamento biológico. O organismo teste foi exposto às águas coletadas e em água de poço artesiano (controle). Foram observados eritrócitos portadores de micronúcleo, de anormalidades nucleares e de células em processo de morte celular. O ponto 6 foi o que apresentou os mais altos índices de alterações, seguido do ponto 2 e 3. O teste controle apresentou os menores índices de anormalidade, seguido do ponto 1. Os pontos 4 e 5 apresentaram índices intermediários de micronúcleo, anormalidades nucleares e de células em processo de morte celular.

Palavras-chave: efluentes de refinaria de petróleo, mutagenicidade, micronúcleo, anormalidades nucleares, *Oreochromis niloticus*, morte celular.

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das principais preocupações do homem, atualmente, é a poluição dos ambientes aquáticos, pois tem sido registrado um aumento significativo no número de compostos químicos, derivados de atividades industriais, agrícolas e urbanas, que são lançados nos recursos hídricos e que apresentam potencialidade em induzir efeitos deletérios diversos nos organismos expostos (LIVINGSTONE, 2001), inclusive no homem.

Dentre as diversas indústrias que lançam seus efluentes em ambientes aquáticos pode-se citar as refinarias de petróleo, pois o processo de refino requer grandes quantidades de água para acontecer. Após ser utilizada nestas indústrias, essas águas são despejadas, acrescidas de outras substâncias derivadas do próprio processo de refino, em corpos d'água.

Os efluentes lançados pela indústria de petróleo pode conter uma grande variedade de poluentes orgânicos e metálicos, incluindo fenóis, óleo e graxa, sulfetos, amônia nitrogenada, e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (DASGUPTA e & ZDUNEK, 1992). Alguns contaminantes presentes no petróleo, como os HPAs, são conhecidamente carcinogênicos, enquanto outros apresentam ação oxidante (PAGLIA & VALENTINE, 1967).

O teste de micronúcleo tem sido utilizado, com grande sucesso, para se avaliar a mutagenicidade de poluentes ambientais e de diferentes compostos químicos, desde o final da década de 80 (KLOBUCAR et al., 2003). Para Landolt & Kocan (1983) e Heddle et al. (1983), uma das mais promissoras, baratas e rápidas técnicas de avaliação genotoxicológica é o teste do micronúcleo.

O teste de anormalidades nucleares (AN) e o teste de micronúcleos (MN) realizados em peixes, têm sido amplamente utilizados nas investigações dos efeitos mutagênicos de substâncias presentes no meio ambiente (AL-SABTI, 1986; HOSE et al., 1987; CARRASCO et al., 1990; HUGHES & HEBERT, 1991). Micronúcleos são estruturas formadas por cromossomos inteiros ou por frações cromossômicas que não foram incorporados ao núcleo da célula filha, durante a divisão celular, e que aparece como uma estrutura circular pequena, com coloração semelhante ao núcleo principal da célula (BOMBAIL et al, 2001).

O teste de micronúcleo, por ser um teste simples e rápido, é indicado para ser usado em monitoramento da qualidade da água. Estudos usando o teste de micronúcleos em anfíbios e peixes têm sido descritos na literatura (BURGEOT et al., 1995). Eritrócitos de sangue periférico de *Oreochromis niloticus* têm sido utilizados para detectar a presença de mutágenos ambientais, através do teste de micronúcleos, por vários autores (GRISOLIA e STARLING, 2001; MATSUMOTO, 2004; VENTURA, 2004; FERNANDES, 2005; SOUZA, 2005). A técnica de micronúcleos em peixes tem, convencionalmente, utilizado eritrócitos devido à facilidade de obtenção dessas células, à taxa mitótica relativamente alta do tecido hematopoiético, o que oferece uma rápida resposta genotóxica em relação à exposição a xenobióticos e à facilidade na preparação de lâminas, por meio de esfregaço sanguíneo (SCHMID, 1976; TICE & IVETT, 1985)

O teste de MN oferece vantagens pela simplicidade de realização, sensibilidade e confiabilidade dos resultados. Esse teste foi, originalmente, desenvolvido para ser aplicado em ratos e modificada para aplicação em peixes (AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2000).

A espécie *Oreochromis niloticus*, espécie de água doce conhecida popularmente, como tilápia do Nilo, é um peixe comercializável do sudeste do Brasil, particularmente no estado de São Paulo. É também uma espécie, comumente, encontrada em estuários do mundo todo, conhecida por responder, rapidamente, às alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996).

De acordo com ALVES-COSTA (2001), a espécie *Oreochromis niloticus* é um excelente sistema-teste para ensaios laboratoriais realizados para a investigação de substâncias contaminantes de ecossistemas aquáticos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a potencialidade de efluentes de refinaria de petróleo, que são lançados no rio Atibaia, município de Paulínia/SP, em induzir efeitos mutagênicos sobre o sistema teste de *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo). Para esta avaliação, foram realizados o teste de micronúcleos e de anormalidades nucleares de eritrócitos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta das amostras**

Foram coletadas, sazonalmente, amostras de água durante os anos de 2003 e 2004, em seis pontos distintos relacionados à refinaria de petróleo de Paulínia - SP: 1) Montante do Rio Jaguari, (acima da captação da água utilizada pela refinaria); 2) Entrada da lagoa de estabilização da REPLAN; 3) Saída da lagoa de estabilização (água destinada aos despejos no Rio Atibaia); 4) 1Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia; 5) 1 Km a jusante do ponto 3; 6) Após o tratamento físico-químico e antes do tratamento biológico (Fig 1).

### **2.2. Material biológico**

O material biológico utilizado como sistema-teste para se avalia a mutagenicidade dos efluentes de refinaria de petróleo foi *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), mantidos em piscicultura e com cerca de 15 cm de comprimento. As técnicas utilizadas para esta avaliação foram o teste de micronúcleo e o teste de anormalidades nucleares.

Para a avaliação da metodologia, antes do início dos experimentos, os animais foram trazidos para ao laboratório para serem aclimatados em tanque, sob condições controladas e com sistema de filtração e aeração adequados.

Para a realização do experimento foram utilizados sete aquários, sendo um para o controle negativo (água de poço) e os demais destinados um para cada ponto de coleta. O aquário destinado ao controle negativo foi preenchido com 12 litros de água de poço artesiano, sendo os aquários restantes preenchidos com 12 litros das águas dos pontos de coleta. Essas águas foram, primeiramente, aeradas por 24 horas. Decorrido esse tempo, foram colocados em cada aquário 5 espécimes, que aí permaneceram por 72 horas, para serem assim estimados os efeitos das águas sobre os organismos testados.

### **2.3. Coleta do material**

Para a confecção das lâminas, foi retirado, de cada animal, cerca de 0,3cc de sangue, por meio de punção cardíaca. Essa punção foi realizada com seringas heparinizadas. Logo após a punção, a agulha foi limpa com papel absorvente, e a primeira gota descartada, para evitar a contaminação do sangue com líquido corporal

e/ou muco. As gotas posteriores foram então usadas na confecção das lâminas, por meio da técnica de esfregação (extensões sangüíneas).

Foram realizadas três extensões sangüíneas, no mínimo, para cada indivíduo. O material foi fixado, durante 10 minutos, em metanol absoluto. Após secagem por 24 horas, as lâminas foram coradas com reativo de Schiff (reação de Feulgen), no escuro por 2 horas.

Foram analisadas cerca de 3.000 células sangüíneas de cada peixe do estudo, totalizando 60.000 células analisadas para as quatro coletas. As análises foram realizadas em microscopia de luz com o aumento de 10x100 vezes. Foram quantificadas, além de células micronucleadas, outras anormalidades nucleares.

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com as amostras coletada para o estudo foram comparados com os resultados do controle, pelo teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis (Teste H).

### **3. RESULTADOS**

Para a primeira coleta, todas as amostras coletadas, em todos os pontos, foram utilizadas sem diluição. Dos cinco peixes expostos à água coletada no ponto 6, três morreram, inviabilizando o estudo pela limitação do número de células analisadas. Desse modo, para as coletas posteriores foi realizada uma diluição da amostra deste ponto, na proporção de 3:1 (três partes de água de poço para uma da água do ponto 6), pois as diluições de 1:1 e de 2:1 também mostraram-se tóxicas, causando a morte de peixes.

Nossos resultados apontaram para uma potencialidade das águas coletadas nos diversos pontos estudados em induzir a morte celular, como pode ser visto nas Tabelas 1, 2 e 3; Figuras 2, 3 e 4.

Foram observadas algumas alterações nucleares tais como: células binucleadas, células com núcleo do tipo “blebbed”, células com núcleo do tipo “lobed”, células com núcleo do tipo “notched”, células com núcleo do tipo “broken-egg” e células em cariólise, segundo a classificação de Carrasco (1990) (Figura 5). As células consideradas como em processo de morte celular foram as que apresentaram núcleo



heteropicnótico, núcleo periférico, células com citoplasma vacuolizado e células com degeneração do material nuclear.

Os ensaios realizados com os peixes submetidos à água de poço artesiano (controle) apontam para uma frequência de  $0,006\pm 0,008$  de micronúcleo;  $0,07\pm 0,036$  de alterações nucleares e  $0,016\pm 0,018$  de morte celular (Tabelas 1, 2 e 3). As anormalidades nucleares registradas nesse ensaio foram células com núcleo “lobed” ( $0,006\pm 0,008$ ), células com núcleo “notched” ( $0,019\pm 0,008$ ) e cariólise ( $0,045\pm 0,038$ ).

O ponto 1 apresentou frequência de micronúcleo igual a  $0,032\pm 0,05$  (Tabela 1) e de células em processo de morte celular igual a  $0,31\pm 0,31$  (Tabela 3). A frequência total de alterações nucleares foi de  $0,45\pm 0,29$  (Tabela 2), sendo que as alterações nucleares observadas foram: células binucleadas ( $0,003\pm 0,01$ ), células com núcleo “lobed” ( $0,07\pm 0,07$ ), células com núcleo “notched” ( $0,28\pm 0,12$ ), cariólise ( $0,086\pm 0,11$ ), células com núcleo “blebbed” ( $0,01\pm 0,01$ ).

O ponto 2 apresentou índice de micronúcleos de  $0,28\pm 0,06$  (Tabela 1). O índice geral de anormalidades nucleares observadas para esse ponto foi de  $0,9\pm 0,08$  (Tabela 2), sendo que as anormalidades encontradas foram: células binucleadas ( $0,02\pm 0,01$ ), células com núcleo “lobed” ( $0,074\pm 0,03$ ), células com núcleo “notched” ( $0,56\pm 0,15$ ), cariólise ( $0,14\pm 0,06$ ), células com núcleo “broken-eggs” ( $0,04\pm 0,01$ ), células com núcleo “blebbed” ( $0,06\pm 0,06$ ). Esse ponto apresentou índice de células em processo de morte celular igual a  $1,12\pm 0,62$  (Tabela 3).

No ponto 3 foi registrado um índice de  $0,23\pm 0,29$  para eritrócitos micronucleados (Tabela 1) e um índice de células em processo de morte celular igual a  $0,88\pm 0,14$  (Tabela 3). O índice geral apresentado para as anormalidades nucleares foi de  $0,88\pm 0,3$  (Tabela 2). As anormalidades encontradas nesse ponto foram: células binucleadas ( $0,036\pm 0,05$ ), células com núcleo “lobed” ( $0,23\pm 0,32$ ), células com núcleo “notched” ( $0,27\pm 0,21$ ), cariólise ( $0,32\pm 0,14$ ), células com núcleo “broken-eggs” ( $0,0016\pm 0,05$ ) e células com núcleo “blebbed” ( $0,02\pm 0,02$ ).

O ponto 4 apresentou índice de micronúcleos igual a  $0,043\pm 0,04$  (Tabela 1). As anormalidades nucleares encontradas para esse ponto foram células binucleadas

(0,15±0,2), células com núcleo “lobed” (0,008±0,01), células com núcleo “notched” (0,34±0,32), cariólise (0,25±0,22), células com núcleo “broken-eggs” (0,01±0,02) e células com núcleo “blebbed” (0,036±0,08), sendo o índice geral de anormalidades nucleares igual a 0,88±0,43 (Tabela 2). Nesse ponto também foram encontradas células em processo de morte celular, sendo o seu valor igual a 0,6±0,56 (Tabela 3).

O índice de micronúcleos observado para o ponto 5 foi de 0,16±0,25 (Tabela 1). Foram observadas células em processo de morte celular com um índice de 0,84±0,95 (Tabela 3). O índice geral de anormalidades nucleares, observadas para esse ponto, foi igual a 1±0,95 (Tabela 2), sendo as anormalidades nucleares do tipo: células binucleadas (0,01±0,01), células com núcleo “lobed” (0,04±0,02), células com núcleo “notched” (0,34±0,06), cariólise (0,2±0,2), células com núcleo “broken-eggs” (0,0032±0,01) e células com núcleo “blebbed” (0,0032±0,02).

O ponto 6 apresentou índice de micronúcleos de 0,35±0,04 (Tabela 1). O índice geral de anormalidades nucleares registrado para esse ponto foi igual a 1,64±0,049 (Tabela 2) e o de células em processo de morte celular 2,5±0,086 (Tabela 3). As anormalidades nucleares observadas para esse ponto foram células binucleadas (0,07±0,016), células com núcleo “lobed” (0,25±0,0048), células com núcleo “notched” (0,52±0,029), cariólise (0,73±0,0062), células com núcleo “broken-eggs” (0,024±0,006) e células com núcleo “blebbed” (0,04±0,007).

#### **4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

As descrições das anormalidades nucleares observadas neste estudo seguiram a classificação de Carrasco et al. (1990), como segue: micronúcleos, núcleos “blebbed”, núcleos “lobed”, núcleos “notched” e núcleos “broken-eggs”.

Da análise dos resultados obtidos com *Oreochromis niloticus*, podemos observar que as frequências de micronúcleos, anormalidades nucleares e de células em processo de morte celular foram mais altas quando os peixes foram expostos às águas do ponto 6 (após o tratamento físico-químico e antes do tratamento biológico), mesmo depois de testá-los na diluição de 3:1, seguidos dos pontos 2 (entrada da lagoa de estabilização da REPLAN) e do ponto 3 (saída da lagoa de estabilização- água destinada aos despejos no

Rio Atibaia). O ponto 1 (montante do Rio Jaguarí - acima da captação da água utilizada pela refinaria) apresentou o segundo menor índice de micronúcleos, de anormalidades nucleares e de células em processo de morte celular, sendo apenas superiores aos observados para o teste controle (água de poço artesiano). O ponto 4 (1 Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia) apresentou índices intermediários de micronúcleos e de células em processo de morte celular. Os índices de anormalidades nucleares observados para as águas deste ponto foi semelhante ao observado para o ponto 3. Apesar das águas do ponto 4 serem derivadas de coleta realizada em rio ( rio Atibaia), elas apresentam índices superiores aos observados para o ponto 1, que também é derivado de coleta em rio (rio Jaguarí). Este resultado pode ser explicado pelo fato das águas do rio Atibaia receberem, antes do despejo dos efluentes da refinaria de petróleo REPLAN, efluentes de várias outras indústrias da região. Deste modo, as águas desse ponto já foram impactadas por outros emissários industriais, o que promove um comprometimento da sua qualidade. As águas derivadas do ponto de coleta número 5 (1 Km a jusante do ponto 3) apresentaram índices de micronúcleo, de anormalidades nucleares e de células em processo de morte celular superiores aos observados para o ponto 4, o que indica que os efluentes da refinaria de petróleo contribuíram para o aumento do comprometimento da qualidade das águas do rio Atibaia.

Assim como na maior parte dos efluentes industriais, os efluentes de refinaria devem ser constituídos de uma mistura complexa de diversos compostos químicos, porém neles são somadas as substâncias utilizadas, especificamente, no refino de petróleo. Pelos ensaios realizados neste trabalho, podemos inferir que apesar dos tratamentos realizados pelas refinarias para a melhoria dos seus efluentes, muitos compostos devem ainda persistir no efluente final (AVCI et al., 2005), promovendo alterações no DNA dos organismos expostos.

A indução de micronúcleos, segundo Schmid (1976), Al-Sabti & Metacalfe (1995) e Fernandes (2005), pode estar relacionada com atrasos cromossômicos durante a anáfase, caracterizados por um mau funcionamento do fuso, ou devido à presença de fragmentos acêntricos, derivados de quebras cromossômicas (MATSUMOTO, 2004).

Os micronúcleos derivados da aneugênese, geralmente estão associados a drogas cuja ação se dá sobre a estrutura do fuso, como pode ser visto nos trabalhos de Fernandes (2005). Os micronúcleos derivados de fragmentos cromossômicos são

decorrentes da ação de compostos clastogênicos sobre o material genético das células (MATSUMOTO, 2004).

A partir dessas afirmações podemos concluir, a partir dos resultados obtidos no presente estudo, que as águas dos pontos 2, 3 e 6 possuem em sua composição substâncias ou compostos químicos com ação aneugênica e/ou clastogênica. A atividade aneugênica desses efluentes pode ser confirmado pela presença de células binucleadas, pois, segundo Canevari (1996) e Fernandes (2005) as células binucleadas podem ser derivadas de mau funcionamento ou inativação do fuso mitótico, efeito este dado pela ação aneugênica de compostos químicos.

A observação de eritrócitos com núcleos “lobed”, “notched”, “broken-eggs” e “blebbed”, de peixes expostos às águas coletadas no âmbito da refinaria, pode ser indicativo da presença de substâncias ou de compostos químicos capazes de promover alterações nucleares, embora essa ação seja ainda pouco conhecida. Para elucidação deste efeito, serão necessários estudos mais específicos para que se possa compreender melhor a natureza dessas alterações.

As águas coletadas nos pontos 2, 3 e 6 também apresentaram um índice alto de indução de morte celular, o que pode indicar que estas águas apresentam substâncias que comprometem a sua qualidade e que devem caracterizar condições estressantes para os organismos expostos, por apresentarem esse alto potencial citotóxico. Segundo Evans et al. (2001), a presença de células em processo de morte celular representa uma proteção do organismo contra as primeiras fases de estresse/injúria aguda, visto ser observada essas respostas em grande número de peixes que estão sob condições de intenso estresse. Segundo esse mesmo autor, as células de teleósteos que estão em processo de morte celular apresentam características bem definidas, tais como condensação da cromatina, presença de núcleos periféricos, desintegração do núcleo (formação de corpos apoptóticos), vacuolização do citoplasma, características essas observadas também em nossos ensaios.

A cariólise, ainda segundo Evans et al. (2001), é resultante do desaparecimento do material nuclear, conferindo ao núcleo um aspecto de “fantasma”. Essas estruturas também foram observadas em nossas análises, embora o mecanismo de indução do desaparecimento do material nuclear ainda não tenha sido devidamente esclarecido.

Pudemos observar, que os índices de micronúcleos, de anormalidades nucleares e de células em processo de morte celular das águas dos efluentes da refinaria sofreram uma diminuição significativa, nos ensaios realizados com águas que passaram pelos tratamentos físico-químico, biológico e pela lagoa de estabilização da empresa. No entanto, apesar da diminuição desses índices, o efluente que é lançado no rio Atibaia ainda apresenta potencial mutagênico e citotóxico, uma vez que, após o seu lançamento, houve um aumento na indução dessas alterações (micronúcleos, anormalidades nucleares e células em processo de morte celular) nos organismos expostos às suas águas.

As águas do ponto 6 mostraram ser altamente tóxicas, pois induziram até mesmo a morte de alguns peixes, quando usadas sem diluição. Isto fez com que fosse realizada diluição da água dessa coleta, para que o experimento pudesse transcorrer sem a perda de qualquer espécime a ser usado no estudo. Assim, pudemos inferir que as águas desse ponto apresentaram características de citotoxicidade, devido a indução de uma grande frequência de células em processo de morte celular. Essas águas também apresentaram características mutagênicas, detectáveis pelos registros de indução de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares nos organismos testados.

Após o tratamento biológico (Ponto 2), houve uma diminuição dos índices de micronúcleos, de anormalidades nucleares e de morte celular, se comparados com o ponto 6. Porém, os índices dessas alterações continuaram relativamente altos, havendo apenas uma maior diminuição quando se utilizou águas que passaram pelo tratamento no tanque de estabilização. Esses resultados indicam que o tratamento utilizado pela refinaria está, de certa maneira, minimizando os possíveis impactos que seus efluentes possam causar nos recursos hídricos onde são lançados.

Com os nossos dados, pudemos concluir que as águas do ponto 5 apresentam um índice mais alto que o observado para o ponto 4, o que indica que, apesar do tratamento da refinaria diminuir bastante os efeitos citotóxicos e mutagênicos do efluente final, ainda deve persistir nesse efluente algumas substâncias ou compostos químicos capazes de promover danos aos organismos expostos. O aumento do potencial citotóxico e mutagênico que estes efluentes promovem nas águas do rio Atibaia, deve estar relacionado às substâncias que potencializam a sua ação tóxica e mutagênica, quando em sinergia com outras substâncias já presentes neste recurso hídrico. Esta conclusão se

deve às características de mutagenicidade muito semelhante entre o ponto 3 (o próprio efluente) e o ponto 4 (água do rio acima do despejo). Como o ponto 5 apresenta um maior comprometimento da sua água, inferimos a então ação de efeito sinérgico ocorrente neste ponto.

Segundo Claxton et al. (1998), os efluentes industriais possuem uma natureza química muito complexa. Desse modo, segundo White (2002), é muito difícil identificar as substâncias tóxicas e genotóxicas existentes em amostras complexas, como por exemplo nos efluentes industriais. Por essa razão, a caracterização dos compostos ou substâncias químicas presentes no efluente final da refinaria, capazes de induzir a citotoxicidade e a mutagenicidade, é de difícil determinação.

## **5. AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro, à Profª Dejanira de Franceschi de Angelis do Laboratório de Toxicologia de Águas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biologia da UNESP-Rio Claro, ao programa PRH-05 (Programa de Recursos Humanos-05 da ANP) pelo apoio financeiro e ao IBILCE (São José do Rio Preto) por nos ter cedido os exemplares de *Oreochromis niloticus*.

Tabela 1. Incidência de micronúcleos em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição em água de poço artesiano (controle) e em amostras de água coletadas em locais relacionados à indústria de petróleo (1 a 6).

Pontos de coleta	Total de eritrócitos analisados	Total de micronúcleos encontrados	Frequência de micronúcleos (média e desvio padrão)
Controle	61936	4	0,006±0,008
Ponto 1	61418	20	0,032±0,05
Ponto 2	62257	177	0,28±0,06*
Ponto 3	62633	143	0,23±0,29
Ponto 4	62541	27	0,043±0,04
Ponto 5	62602	101	0,16±0,25
Ponto 6	53673	190	0,35±0,04*

Nota: valores seguidos por \* diferiram significativamente (0,5%), em relação ao controle, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 2. Incidência de alterações nucleares (média e desvio padrão) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição a água de poço artesiano (controle) e aos pontos de coleta (1 a 6)

	Controle	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Células binucleadas	0	0,003±0,01	0,02±0,01	0,036±0,05	0,15±0,2	0,01±0,01	0,07±0,016
Células com núcleo "lobed"	0,006±0,008	0,07±0,07	0,074±0,03	0,23±0,32	0,008±0,01	0,04±0,02	0,25±0,0048
Células com núcleo "notched"	0,019±0,008	0,28±0,12	0,56±0,15	0,27±0,21	0,34±0,32	0,34±0,06	0,52±0,029
Cariólise	0,045±0,038	0,086±0,11	0,14±0,06	0,32±0,14	0,25±0,22	0,2±0,2	0,73±0,0062
Células com núcleo "broken-eggs"	0	0	0,04±0,01	0,0016±0,05	0,01±0,02	0,0032±0,01	0,024±0,006
Células com núcleo "blebbed"	0	0,01±0,01	0,06±0,06	0,02±0,02	0,036±0,08	0,0032±0,02	0,04±0,007
% do total de alterações nucleares observadas	0,07±0,036	0,45±0,29	0,9±0,08	0,88±0,3	0,88±0,43	1±0,95	1,64±0,049*
Nº total de alterações nucleares	44	281	563	556	553	626	882
Número total de células analisadas	61936	61418	62257	62633	62541	62602	53673

Nota: valores seguidos por \* diferiram significativamente (0,5%), em relação ao controle, pelo teste de Kruskal-Wallis.



Tabela 3. Incidência de eritrócitos de *Oreochromis niloticus* em processo de morte celular, após exposição após exposição em água de poço artesiano (controle) e em amostras de água coletadas em locais relacionados à indústria de petróleo (1 a 6).

Pontos de coleta	Total de eritrócitos analisados	Total de células em processo de morte celular observadas	Frequência de células em processo de morte celular (média e desvio padrão)
Controle	61936	10	0,016±0,018
Ponto 1	61418	194	0,31±0,31
Ponto 2	62257	697	1,12±0,62*
Ponto 3	62633	550	0,88±0,14
Ponto 4	62541	385	0,6±0,56
Ponto 5	62602	529	0,84±0,95
Ponto 6	53673	1344	2,5±0,086*

Nota: valores seguidos por \* diferiram significativamente (0,5%), em relação ao controle, pelo teste de Kruskal-Wallis.

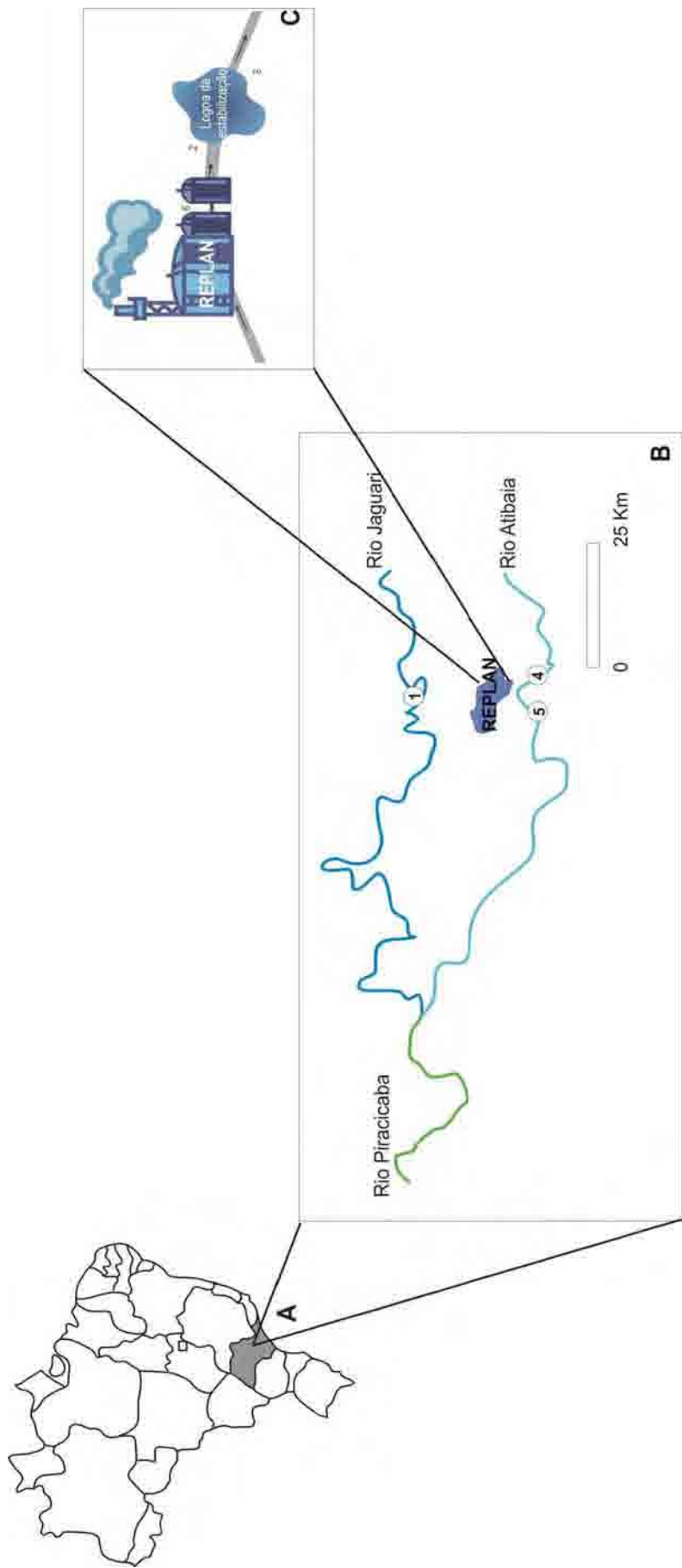


Figura 1 : A. Localização da cidade de Paulínia (latitude  $22^{\circ}48'45''S$ , longitude  $47^{\circ}11'15''W$ ); B. Curso do rio Jaguarí e do rio Atibaia e distribuição dos pontos de coleta nestes rios (1, 4 e 5); C. Distribuição dos pontos de coleta na refinaria REPLAN (2, 3 e 6).

Figura 2. Frequência, média e desvio padrão de micronúcleos em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição aos pontos de coleta e em água de poço artesiano (controle).

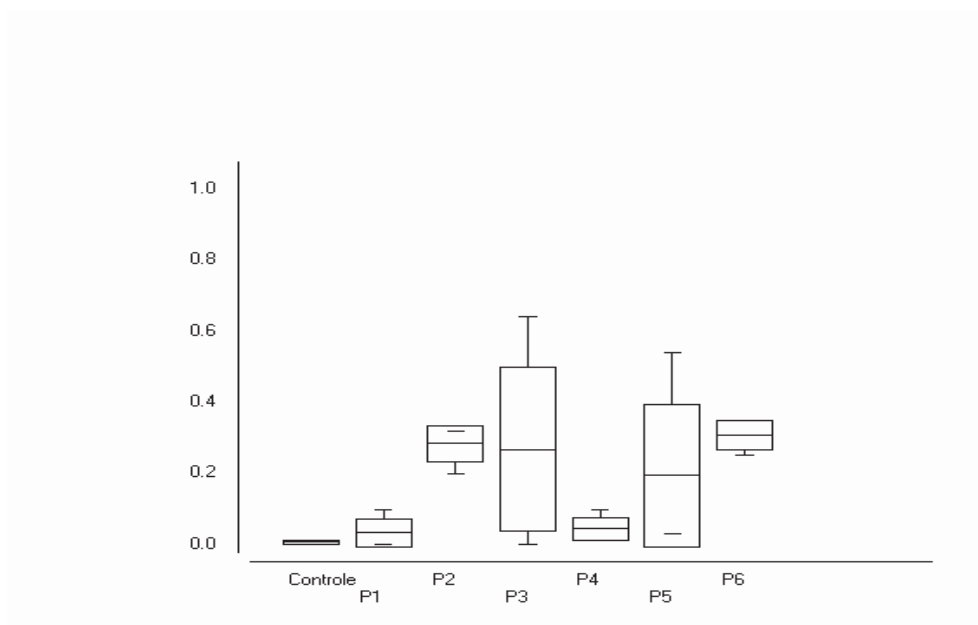
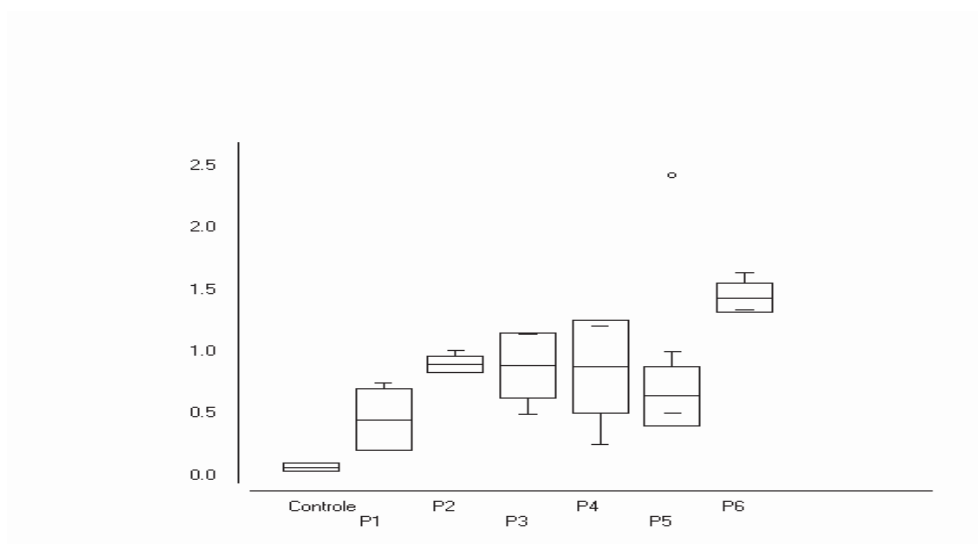
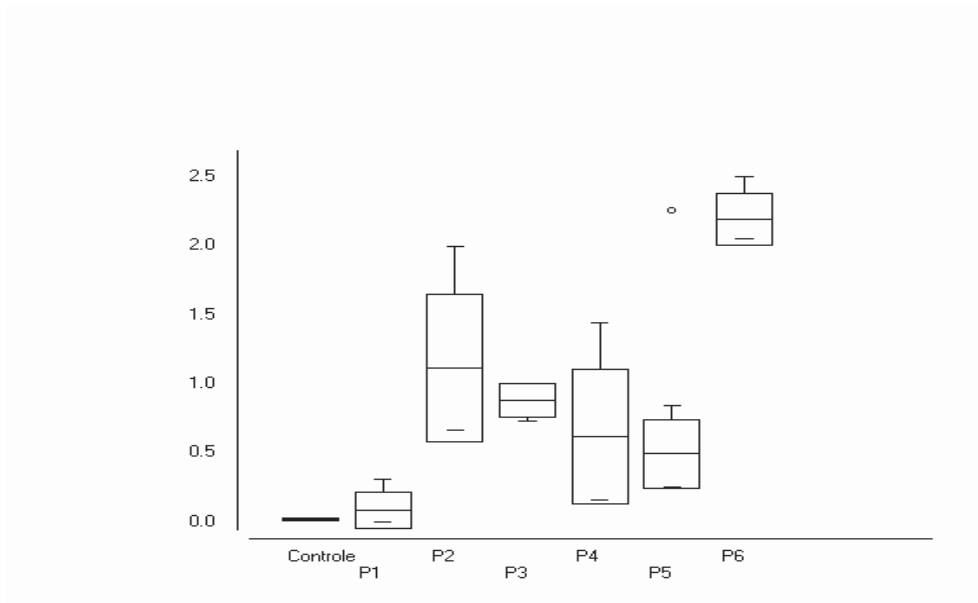


Figura 3. Frequência, média e desvio padrão de eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, portadores de outras anormalidades nucleares, após exposição aos pontos de coleta e em água de poço artesiano (controle).

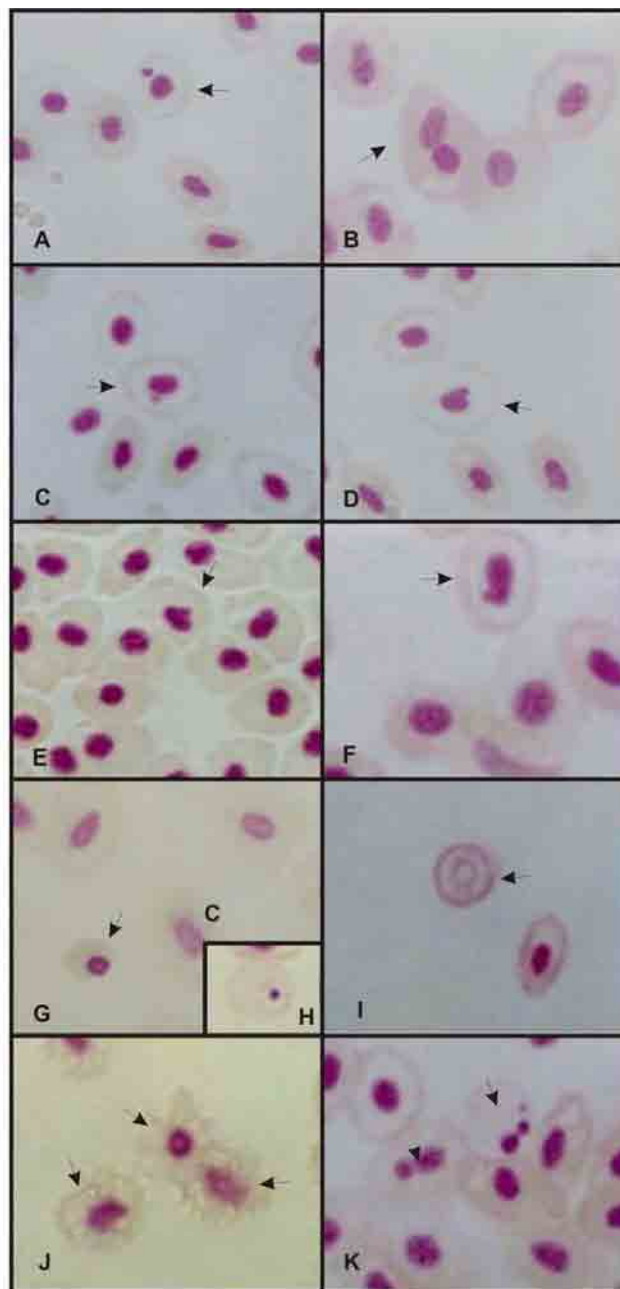


Obs: O símbolo “o” presente no gráfico representa um dado “outlier”.

Figura 4. Frequência, média e desvio padrão de eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, em processo de morte celular, após exposição aos pontos de coleta e em água de poço artesiano (controle).



Obs: O símbolo “o” presente no gráfico representa um dado “outlier”.



**Figura 5 - Alterações nucleares observadas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*: A.** Micronúcleo; **B.** Célula binucleada; **C.** Célula com núcleo “broken-egg”; **D.** Célula com núcleo “blebbed”; **E.** Célula com núcleo “lobed”; **F.** Célula com núcleo “notched”; **G.** Núcleo heteroploid; **H.** Núcleo heteroploid em estado mais avançado; **I.** Cariólise; **J.** Células em processo de morte celular; **K.** Célula com degeneração do núcleo (Seta) e com broto nuclear (cabeça de seta).

## 6. BIBLIOGRAFIA

AL-SABTI, K. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. **Cytobios**, Cambridge, v. 47, p. 147-154. 1986.

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

ALVES-COSTA, J.R.M. **Biomarcadores de contaminação em peixes d água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus***. 2001. [s.n]. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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

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

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

BURGEOT, T.; HIS, E.; GALGANI, F. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 345, p. 1-16, 1995.

CANEVARI, R.A. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e diâmetro dos micronúcleos obtidos em *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) submetidos a tratamentos agudos com o inseticida azodrin e o herbicida trifluralina.** 1996. n.f. Monografia (Bacharelado em Biologia Geral) - Universidade Estadual de Londrina., Londrina.

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

CLAXTON, L. D.; HOUK, V. S.; HUGHES, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 410, n. 3, p. 237-243, 1998.

DASGUPTA, A.; ZDUNEK, T. In vitro lipid peroxidation of human serum catalyzed by cupric ion: antioxidant rather than prooxidant role of ascorbate. **Life Sci.**, v. 50, p. 875-882, 1992.

EVANS, D.L.; LEARY III, J.H.; JASO-FRIEDMANN, L. Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: regulation by programmed cell death. **Development and Comparative Immunology**, v.25, p.791-805, 2001.

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

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

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; IRKHART, B.; MACGREGOR, J. T. E.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity – a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.

HOSE, J. R.; CROSS, J. N.; SMITH, S. G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of Southern California. **Marine Environmental Research**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 167-176, 1987.

HUGHES, J.B.; HEBERT, A.T. Erythrocyte micronuclei in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and in Long Island Sound. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 20, p. 474-479. 1991.

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

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

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Bulletin of Marine Pollutants**, v. 42, p. 656-666. 2001.

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



PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 70, p. 158-169, 1967.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLANDER, A. **Chemical Mutagens: Principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, 1976, p. 31-53.

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

TICE, R.R.; IVETT, J.L. Cytogenetic analysis of bone marrow damage. In: **Toxicology of the blood and bone marrow**, 1 ed. Estados Unidos: Raven Press of New York, 1985, 140 p.

VENTURA, B.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2004.

VIJAYAN, M.M.; MORGAN, J.D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E.G.; IWAMA, G.K. Food deprivation affects sewerage acclimation in Tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal Experimental Biology**, [S.l.], v. 199, p. 2467-2475, 1996.

WHITE, P.A. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 515, p. 85-98, 2002.

## **5. ARTIGO 3**

---

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE EFLUENTES DE  
REFINARIA, PELO ENSAIO DO COMETA, EM *OREOCHROMIS  
NILOTICUS*.**

Márcia M. Hoshina<sup>1</sup>, Eliane Gonçalves de Freitas<sup>2</sup>, Dejanira de Franceschi de Angelis<sup>1</sup>,  
\*Maria A. Marin-Morales<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista, IB-Campus de Rio Claro, Av. 24 A, 1515, CEP:  
13506-900, Rio Claro/SP-Brasil

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista, IBILCE- Campus de São José do Rio Preto, Rua  
Cristóvão Colombo, 2265, CEP:15054-000, São José do Rio Preto/SP-Brasil

\*Autor responsável pela correspondência: fone (19)3526-4143; Fax: (19) 3536-0009.

Agência de Fomento: ANP/PRH-05.

## RESUMO

O aumento da contaminação dos recursos hídricos por efluentes industriais, incluindo as refinarias de petróleo, tem causado grande preocupação, pelo conseqüente risco à saúde e à sobrevivência que possa caracterizar para os organismos vivos. O presente estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos genotóxicos de efluentes de refinaria que são lançados no rio Atibaia, município de Paulínia/SP. Para isso, foi realizado o ensaio do cometa, sob eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos às águas coletadas em diferentes pontos do rio Atibaia e rio Jaguarí, águas coletadas antes ao tratamento biológico, águas coletadas antes e após lagoa de estabilização, bem como em água de poço artesiano (controle). Foi observado um maior número de nucleóides com dano nos núcleos de peixes expostos às águas da refinaria que ainda não passaram pelo tratamento biológico, seguidos das águas antes e após a lagoa de estabilização. Foi registrado para o teste controle os menores índices de nucleóides com dano, seguido do ponto de coleta do rio Jaguarí, rio este utilizado para captação de água a ser utilizada pela refinaria, cujas águas são consideradas de excelente qualidade pelos órgãos ambientais competentes. As águas do rio Atibaia apresentaram índices intermediários de nucleóides com dano, quando comparados com os observados para as águas do rio Jaguarí e para o teste controle.

Palavras-chave: efluentes de refinaria de petróleo, genotoxicidade, ensaio de cometa, *Oreochromis niloticus*

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, uma das maiores preocupações do homem é a contaminação dos recursos hídricos, uma vez que é crescente a agressão neste recurso mineral por ação antrópica. Os efluentes industriais e domésticos são os principais responsáveis pela contaminação dos ambientes aquáticos (CLAXTON et al., 1998; WHITE & RASMUSSEN, 1998).

As refinarias de petróleo utilizam grande volume de água nos processos de lavagem de óleo cru, refino do petróleo bruto, resfriamento das torres de destilação e produção de vapor em caldeiras. Posteriormente, aplicam tratamento químico e biológico nos efluentes. Cada etapa do processo de refino do petróleo pode acrescentar, no efluente final, complexas misturas de substâncias químicas (WIECZOREK, 2003). Dentre essas substâncias podem estar os HPAs, que possuem alto potencial genotóxico, representando então um grande risco para os ecossistemas e, conseqüentemente, em toda a biota associada.

Uma das formas de se avaliar o potencial genotóxico de agentes físicos, químicos e biológicos é pela utilização do ensaio do cometa. O ensaio do cometa é um método que permite a investigação de danos no DNA (quebras em fita simples, quebras na dupla fita e sítios álcali lábeis) de células individuais (SINGH et al., 1988).

Por ser considerado sensível, rápido, econômico, além de requerer poucas células para a sua execução (MITCHELMORE & CHIPMAN, 1988; SASAKI et al., 1997; KOSZ-VNENCHAK & ROKOSZ, 1997), este teste tem sido indicado como um método para detecção de mudanças muito pequenas na estrutura do DNA, célula a célula, tais como atividade de reparo, o modo de seu empacotamento e a integridade do material genético (KOPPEN et al., 1999).

Organismos aquáticos, como por exemplo os peixes, acumulam poluentes presentes em água contaminada ou, indiretamente, pela via trófica, pela alimentação por organismos aquáticos contaminados. Desse modo, sistemas-modelo como os peixes são importantes para determinar a distribuição dos efeitos tóxicos de contaminantes químicos no ambiente aquático (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

O ensaio do cometa tem sido aplicado, com grande sucesso, em eritrócitos de várias espécies de peixes (NACCI et al., 1996; BELPAEME et al., 1996; MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998; MATSUMOTO, 2004; MATSUMOTO et al.,

2005), expostas à diversos agentes genotóxicos, permitindo avaliar o potencial dessas substâncias em causar danos no DNA, passíveis de serem detectáveis por eletroforese alcalina .

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito genotóxico de efluentes da refinaria de petróleo de Paulínia – estado de São Paulo - Brasil. Para este estudo foram analisadas as águas coletadas nos rios Jaguarí (captação de água pela refinaria) e Atibaia (lançamento dos efluentes e pontos a montante e a jusante do despejo) além do próprio efluente da refinaria (antes e após o tratamento biológico).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta das amostras**

Amostras de água foram coletadas a montante do Rio Jaguarí, (acima da captação da água utilizada pela refinaria) – ponto 1; entrada da lagoa de estabilização da REPLAN – ponto 2; saída da lagoa de estabilização (água destinada aos despejos no Rio Atibaia) – ponto 3; 1Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia - ponto 4; 1 Km a jusante do ponto 3 – ponto 5 e após o tratamento físico-químico e antes do tratamento biológico – ponto 6 (Fig 1).

### **2.2. Material biológico**

Para a realização dos ensaios de genotoxicidade, foi utilizado o organismo-teste *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae). Os peixes foram obtidos de piscicultura mantida pela Unesp – São José do Rio Preto (IBILCE), sendo selecionados espécimens com um tamanho médio de 15 cm. Os animais foram trazidos para ao laboratório a fim de serem aclimatados em tanque, sob condições controladas e com sistema de filtração e aeração adequados.

### **2.3. Metodologia**

Para a realização do experimento foram utilizados sete aquários, sendo um para o controle negativo (água de poço) e os demais aquários para cada um dos pontos de coleta. Em cada aquário foram colocados cinco espécimens, que aí permaneceram por

72 horas, para assim serem estimados os efeitos genotóxicos das águas coletadas nos diferentes pontos de coleta.

Foram colhidas amostras de sangue dos peixes expostos, por meio de punção cardíaca, com seringas heparinizadas. Uma amostra de 10 µL de sangue foi diluída em 1000µL de soro bovino fetal. As lâminas foram montadas com 10µL da suspensão celular + 120µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), a 37°C. As lâminas permaneceram em uma solução de lise (1mL de Triton X-100, 10mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução de lise estoque: NaCl 2,5M; EDTA 100mM; Tris 10 mM, ~8,0g de NaOH sólido, 10g de lauril sarcosinato sódico para 1L) em geladeira por 1 hora. Após a lise, as lâminas permaneceram em tampão NaOH 300 mM+ EDTA 1 mM (pH>13) por 20 minutos, para denaturação do DNA, sendo logo após submetidas a uma corrida de eletroforese a 25 V, 300 mA, por 20 minutos. As lâminas foram então neutralizadas com Tris 0,4M, por 15 minutos, e fixadas em etanol por 10 minutos.

As lâminas foram coradas com brometo de etídeo (0,02 mg/mL). A análise foi feita em microscopia de epifluorescência (Leica DMLB), com filtro de excitação 420-490nm e de barreira  $\lambda=520$ nm, em objetiva de 40x. Foram analisados 100 nucleóides para cada amostra de cada um dos indivíduos expostos. Os nucleóides foram classificados visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos de acordo com a classificação proposta por Kobayashi et al. (1995) em, classe 0 (sem dano, ou seja, com nucleóides que não apresentam cauda); classe 1 (dano pequeno, ou seja, com nucleóides apresentando um tamanho de cauda inferior ao diâmetro da cabeça); classe 2 (dano médio, ou seja, com nucleóides apresentando um tamanho de cauda equivalente a uma ou duas vezes o tamanho do diâmetro da cabeça); classe 3 (dano grande, ou seja, com nucleóides apresentando o tamanho da cauda superior a 2 vezes o tamanho do diâmetro da cabeça). Também foram verificados os scores de cada amostra, multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3). Para a análise estatística, foi utilizado o teste do  $\chi^2$ , segundo indicação de PEREIRA (1991).

### 3. RESULTADOS

Os resultados obtidos pela técnica do ensaio do cometa estão reunidos na Tabela 1, Figura 2 e 3.

O teste controle apresentou um número de 28 nucleóides com dano e 472 nucleóides sem dano, ou seja, uma frequência de 5,6% de nucleóides com dano para 94,4% nucleóides sem dano, sendo que a maior parte dos nucleóides com dano foram classificados como da classe 1 (5%).

O ponto 1 (montante do rio Jaguarí) apresentou 160 nucleóides com dano e 340 nucleóides sem dano, sendo as frequências observadas de 68% de nucleóides sem dano e 32% de nucleóides com dano. O maior índice de nucleóides com dano foi classificado como sendo da classe 1. Este ponto foi o que apresentou menor número de nucleóides com dano dentre todas as amostras de água analisadas.

O ponto 2 (entrada da lagoa de estabilização da REPLAN) apresentou um total de 16 nucleóides sem dano e 484 nucleóides com dano, sendo as suas frequências de 3,2% e de 96,8% respectivamente. No entanto, o maior índice de nucleóides com dano observado foi classificado como da classe 2.

O ponto 3 (saída da lagoa de estabilização - água destinada aos despejos no Rio Atibaia) apresentou um índice de nucleóides com dano menor que o observado para o ponto 2, tendo um valor igual a 85% (425 nucleóides), sendo os nucleóides mais observados os pertencentes à classe 1. A frequência de nucleóides sem dano foi de 15% (75 nucleóides).

O ponto 4 (1Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia), apresentou índices menores que os observados para os pontos 2 e 3, mas maiores que o observado para o ponto 1. O número de nucleóides com dano foi de 264 (52,8%) e de sem dano foi de 236 (47,2%), sendo os da classe 1 os mais observados.

O ponto 5 (1 Km a jusante do ponto 3) apresentou índices maiores que os observados para o ponto 4. Os valores encontrados para nucleóides com dano, no ponto 5 foi igual a 62,2% (311 nucleóides) e de nucleóides sem dano 37,8% (189 nucleóides). Dentre os nucleóides com dano observados, os da classe 1 foram predominantes.

Os valores observados para o ponto 6 (após o tratamento físico-químico e antes do tratamento biológico) foram os mais altos registrados entre todas as análises. O número de nucleóides sem dano foi de 6 e os de nucleóides com dano foi de 494. Os



índices foram, respectivamente, de 1,2% e de 98,8%, sendo os nucleóides com dano mais observados os pertencentes à classe 3.

#### **4. DISCUSSÃO**

A partir dos ensaios realizados com a técnica do cometa, pudemos inferir que o ponto 6 apresentou alto índice de genotoxicidade, pelos altos valores de nucleóides com danos registrados. Estes nucleóides também apresentaram a classificação mais comprometida, pois a maior parte deles foi classificada como sendo da classe 3. Nossos resultados são concordantes com Hamoutene et al. (2002), pois segundo esse autor, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), presentes no efluente de refinarias, são descritos como os principais componentes capazes de causar danos no DNA, pois possuem propriedades mutagênicas e carcinogênicas.

O ponto 2 foi o que apresentou o segundo maior índice de genotoxicidade, seguido do ponto 3, o que indica que o tratamento do efluente parece ter sido eficaz, uma vez que antes de sofrer tratamento biológico, o efluente apresentou um alto índice de genotoxicidade. Após esse tratamento (ponto 2), o índice observado foi inferior. Porém, a genotoxicidade observada continuou relativamente alta, para os pontos subsequentes. O efluente a ser despejado no rio Atibaia, ao sair da lagoa de estabilização (ponto 3), apresentou um índice inferior de genotoxicidade, quando comparado com o ponto 2, o que indica que o tratamento realizado foi eficiente.

Da análise dos resultados obtidos para o ponto 4 (montante do despejo), pode-se inferir que o rio Atibaia (em que é realizado o despejo do efluente da refinaria) já apresenta um certo comprometimento de suas águas, uma vez que seus índices de genotoxicidade foram relativamente altos. O ponto 5, localizado após o despejo do efluente, apresentou índices mais elevados de genotoxicidade, quando comparados ao ponto 4, porém esses valores não diferiram, significativamente, e isso nos faz sugerir que mesmo após o recebimento do efluente da refinaria, as águas do rio Atibaia não tem seu potencial genotóxico aumentado. Desse modo, sugerimos que a genotoxicidade observada para as águas do rio Atibaia deve ser proporcionada pelo recebimento de outros efluentes, que são lançados antes do despejo dos efluentes da refinaria, uma vez que as águas desse rio recebem efluentes de diversas indústrias, o que colabora para o comprometimento da qualidade das águas deste rio.

Nossos estudos são concordantes com os observados por Lubianca et al. (2004), que avaliaram o Arroio Bom Jardim, afluente do rio Caí em Triunfo/RS, que sofre influência do Pólo Petroquímico do Sul, através do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo em *Loricariichthys anus* (cascudo). Os resultados obtidos pelos autores apontaram comprometimento da qualidade das águas do rio, resultante das atividades da indústria petroquímica.

Souza (2005) também realizou estudos, utilizando o ensaio do cometa, em áreas sob influência de refinaria de petróleo. A autora observou um aumento de nucleóides com danos da classe 2 e 3 para os pontos em que havia o despejo do efluente da refinaria, demonstrando o potencial genotóxico dos mesmos.

Nossos resultados confirmaram a utilização do ensaio do cometa, utilizando eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, como uma ferramenta bastante sensível para a detecção de genotoxicidade no meio aquático, corroborando com os resultados obtidos por Padrangì et al. (1995), Matsumoto (2004), Matsumoto et al. (2005), Russo et al. (2004), Ventura (2004), Fernandes (2005) e Souza (2005).

## **5. AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro, à Profª Dejanira de Franceschi de Angelis do Laboratório de Toxicologia de Águas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biologia da UNESP-Rio Claro, ao programa PRH-05 (Programa de Recursos Humanos-05 da ANP) pelo apoio financeiro e ao IBILCE (São José do Rio Preto) por nos ter cedido os exemplares de *Oreochromis niloticus*.

Tabela 1. Análise dos eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos as amostras de águas de diferentes pontos de coleta e a água de poço artesiano (controle negativo), por 72 h, pela técnica do ensaio do cometa.

Pontos de coleta	Total de células analisadas	Total de células com cometa	Número de nucleóides da classe 0	Número de nucleóides da classe 1	Número de nucleóides da classe 2	Número de nucleóides da classe 3	Scores
Controle Negativo	100	12	88	12	0	0	12
	100	5	95	4	0	1	7
	100	2	98	2	0	0	2
	100	4	96	4	0	0	4
	100	5	95	3	2	0	7
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>28</b>	<b>472</b>	<b>25</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>X=4,4</b>
Ponto 1	100	34	66	34	0	0	34
	100	33	67	30	3	0	36
	100	49	51	49	0	0	49
	100	19	81	10	5	4	32
	100	25	75	20	3	2	32
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>160*</b>	<b>340</b>	<b>143</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>X=36,6</b>
Ponto 2	100	100	0	11	58	31	161
	100	93	7	34	27	32	184
	100	99	1	19	47	33	212
	100	98	2	42	30	26	180
	100	94	6	15	57	22	195
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>484*</b>	<b>16</b>	<b>121</b>	<b>219</b>	<b>144</b>	<b>X=186,4</b>
Ponto 3	100	88	12	41	37	10	145
	100	85	15	50	29	6	126
	100	91	9	51	36	4	135
	100	79	21	39	27	13	132
	100	82	18	43	28	11	132
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>425*</b>	<b>75</b>	<b>224</b>	<b>157</b>	<b>44</b>	<b>X=134</b>
Ponto 4	100	50	50	32	16	2	70
	100	54	46	31	20	3	80
	100	51	49	30	17	4	76
	100	58	42	29	23	6	93
	100	51	49	27	18	6	81
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>264*</b>	<b>236</b>	<b>149</b>	<b>94</b>	<b>21</b>	<b>X=80</b>
Ponto 5	100	70	30	40	22	8	108
	100	63	37	32	21	10	104
	100	60	40	35	18	7	92
	100	56	44	36	15	5	81
	100	62	38	33	23	6	97
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>311*</b>	<b>189</b>	<b>176</b>	<b>99</b>	<b>36</b>	<b>X=96,4</b>
Ponto 6	100	99	1	14	20	65	249
	100	100	0	22	24	54	232
	100	96	4	20	24	52	224
	100	99	1	8	30	61	251
	100	100	0	10	30	60	250
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>494*</b>	<b>6</b>	<b>74</b>	<b>128</b>	<b>292</b>	<b>X=241,2</b>

Valores seguidos de \* diferiram significativamente (0,5%) em relação ao controle, pelo teste de  $\chi^2$ .

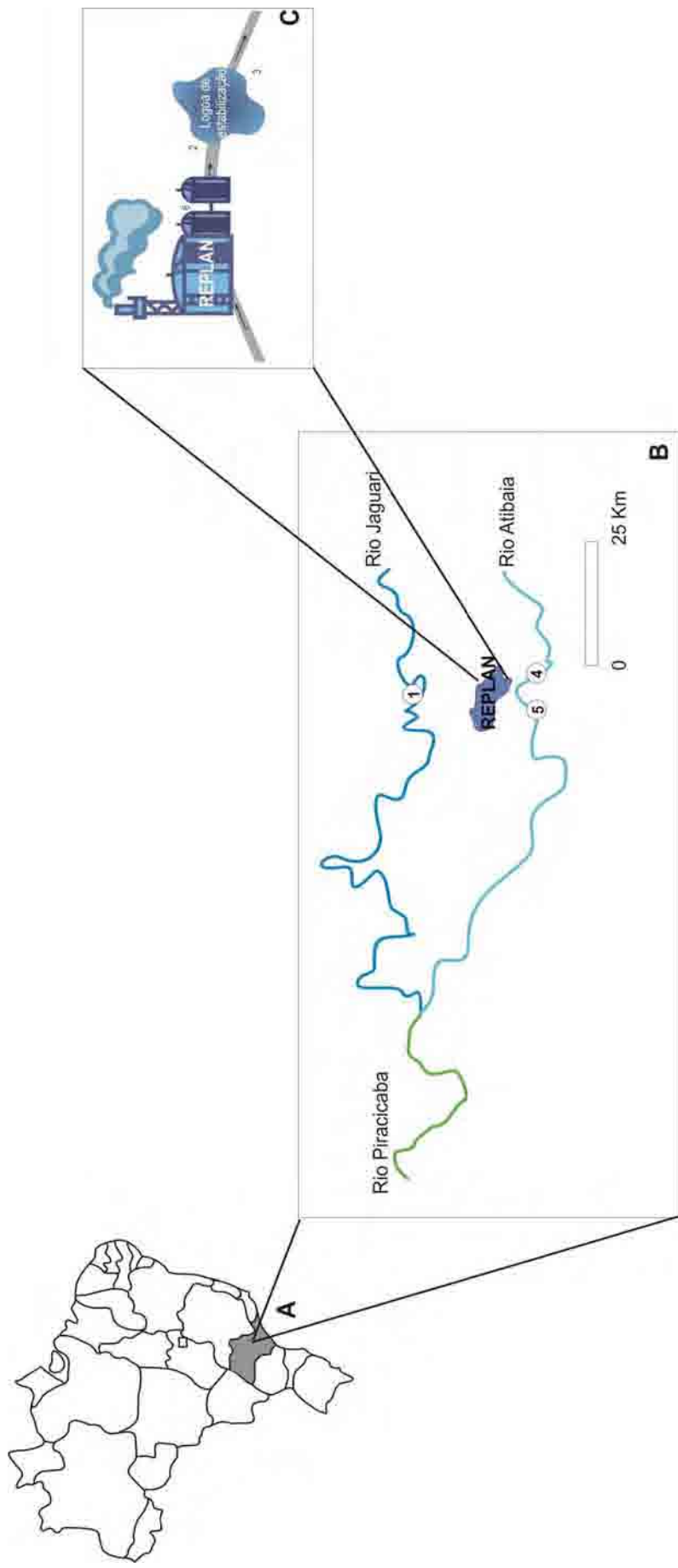
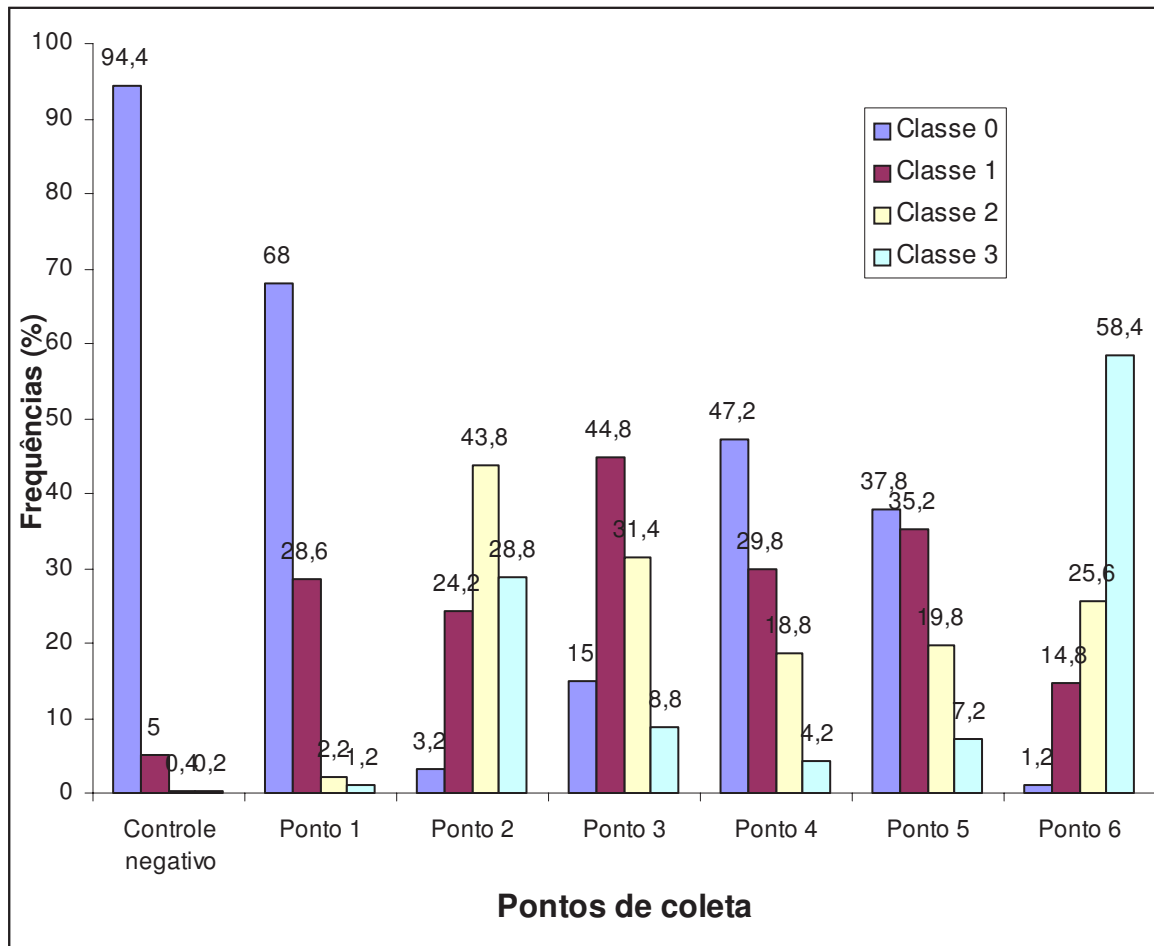
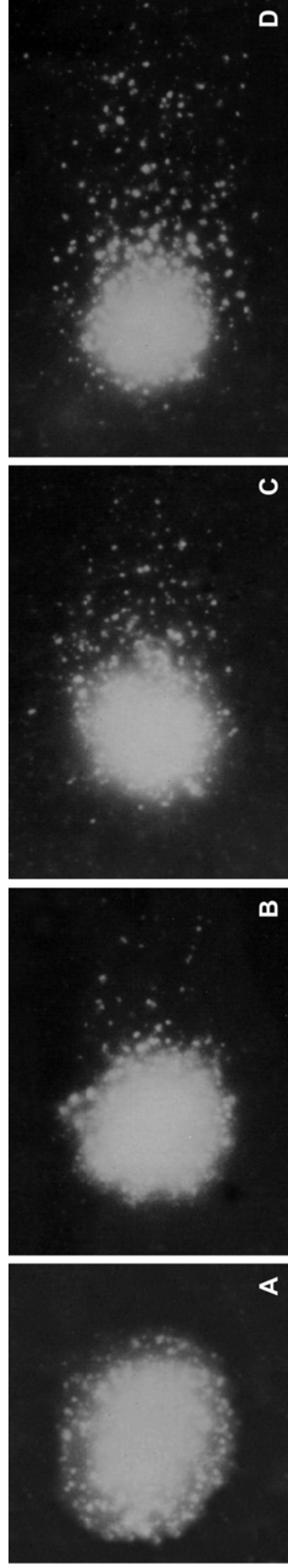


Figura 1: A. Localização da cidade de Paulínia (latitude 22°48'45"S, longitude 47°11'15"W); B. Curso do rio Jaguarí e do rio Atibaia e distribuição dos pontos de coleta nestes rios (1, 4 e 5); C. Distribuição dos pontos de coleta na refinaria REPLAN (2, 3 e 6).

Figura 2: Freqüências de nucleóides com e sem danos, para cada classe considerada, encontradas nos eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos por 72 h aos diferentes pontos de coleta e à água de poço artesiano (controle negativo).





**Figura 3:** Danos no DNA observados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição aos efluentes de refinaria. **A.** Classe 0; **B.** Classe 1; **C.** Classe 2; **D.** Classe 3.

## 6. BIBLIOGRAFIA

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

BELPAEME, K.; DELDERE, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, New York, v. 11, p. 485-492, 1996.

CLAXTON, L. D.; HOUK, V. S.; HUGHES, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 410, n. 3, p. 237-243, 1998.

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

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

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

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

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

LUBIANCA, J.M.; OLIVEIRA, N.C.D.; LEMOS, C.T. Análise de micronúcleos e ensaio cometa em peixes (*Loricariichthys anus*) provenientes de área com influência petroquímica. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 2004, Florianópolis. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, p. 146, 2004.

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

MATSUMOTO, S. T.; MALAGUTI, M.; MARIN-MORALES, M.A. Evaluation of the genotoxic potencial due to the action of na effluent contaminated with chromium, by the comet assay in CHO-K1 cultures. **Caryologia**, v. 58, n. 1, p. 40-46, 2005.

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

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

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

PEREIRA, A. A.B. Testes estatísticos para comparar proporções em problemas de citogenética. In: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-



NETO, R. (eds). **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e Critérios de Avaliação**. Brasil, 1991. pp. 113-121.

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

SASAKI, Y. F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S. MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 393, n. 1-2, p. 133-139, 1997.

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

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

VENTURA, B.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2004.

WHITE, P.A., RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 410, p. 223-236, 1998.

WIECZOREK, A. **Efeito do Efluente de Refinaria de Petróleo REPLAN/PETROBRÁS sobre a Dinâmica populacional de *Daphnia similis*.** Trabalho de Conclusão de Curso- Curso de Ecologia – Instituto de Biociências – IB – UNESP, 2003.

## **6. ARTIGO 4**

---

**O USO DA TÉCNICA DE CORANTEIS VITAIS, SOB SISTEMA  
TESTE DE *ALLIUM CEPA*, PARA IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL  
CITOTÓXICO DE XENOBIONTES**

Márcia M. Hoshina<sup>1</sup>, Thaís C. C. Fernandes<sup>1</sup>, \*Maria A. Marin-Morales<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista, IB-Campus de Rio Claro, Av. 24 A, 1515, CEP:  
13506-900, Rio Claro/SP-Brasil

\*Autor responsável pela correspondência: fone (19)3526-4143; Fax: (19) 3536-0009.

Agência de Fomento: ANP/PRH-05.

## RESUMO

Uma das principais preocupações do homem é a poluição dos recursos hídricos, uma vez que é um recurso mineral indispensável para a manutenção da vida de todos os seres vivos. Uma das principais fontes de degradação desse recurso é a poluição, sendo essa poluição causada por diversas fontes, como por exemplo o despejo de efluentes industriais nos corpos d'água e a contaminação por herbicidas, por percolação e lixiviamento. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito citotóxico de efluentes de refinaria de petróleo e do herbicida trifluralina, pela técnica de coloração com corantes vitais para evidenciar a indução de morte celular em sistemas testes de *Allium cepa*. Para a realização desse estudo, sementes de *Allium cepa* foram germinadas nos efluentes de refinaria e em soluções do herbicida trifluralina. Após a germinação, as raízes coletadas foram coradas com dois Corantes Vitais (iodeto de propídio e Hoescht). As células em processo de morte celular apresentaram uma coloração característica, conferida pelo iodeto de propídio (cor vermelha) e as células viáveis uma coloração azul devido a ação do corante Hoescht. Para o herbicida trifluralina verificou-se uma maior indução de morte celular nos meristemas expostos às maiores concentrações desse herbicida, o que justifica a própria indicação do produto. Para os efluentes de refinaria, o que se observou foi uma maior indução de morte celular quando o sistema teste foi exposto aos efluentes tratados apenas físico-quimicamente e antes do tratamento biológico. A indução diminuiu nos meristemas expostos às águas dos efluentes dos outros pontos, inclusive daquele que passou pelo tratamento biológico.

Palavras-chave: morte celular, citotoxicidade, efluentes de refinaria de petróleo, trifluralina, *Allium cepa*, Hoescht, iodeto de propídio.

## 1. INTRODUÇÃO

Muitos rios que atravessam grandes áreas metropolitanas recebem muitos resíduos derivados de atividades industriais, domésticos e agrícolas, o que acaba impactando a qualidade de suas águas (OHE et al., 2003).

O crescente comprometimento da qualidade de ecossistemas aquáticos tem ocorrido não só pelo excesso de emissão de esgotos domésticos, sem tratamentos, nos corpos hídricos, como também por uma variedade de resíduos químicos e orgânicos provenientes de descartes industriais e agrícolas, que perfazem uma extensa gama de substâncias, muitas delas potencialmente tóxicas (RAND & PETROCELLI, 1985).

Dentre as atividades industriais responsáveis pela emissão de substâncias potencialmente tóxicas em recursos hídricos, pode-se citar a indústria petrolífera. A atividade do refino de petróleo é uma atividade que requer grandes volumes de água para o seu funcionamento. Desse modo, a quantidade de efluentes produzidos e, conseqüentemente, despejados nos corpos d'água é também grande, o que agrava a possibilidade da presença, nesses efluentes, de substâncias tóxicas que possam comprometer os seres vivos presentes na biota associada.

Uma considerável contaminação por hidrocarbonetos derivados do petróleo é resultante da indústria petrolífera e desse modo é importante se realizar investigações que avaliam a toxicidade desses compostos (PACHECO & SANTOS, 2001). Uma classe importante de contaminantes derivados do petróleo são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (PÉREZ et al., 2001). Segundo o autor, um grande número de HPAs têm sido identificados como potentes carcinógenos e indutores de mutagenicidade. Vários autores tem destacado o potencial mutagênico dos HPAs (SILVA et al., 2003; SOUZA, 2005), potencial carcinogênico e potencial oxidante (PAGLIA & VALENTINE, 1967).

Atualmente, tem havido uma intensificação no uso de agrotóxicos pelos países agrícolas, na tentativa de aumentar, cada vez mais, a produtividade e a qualidade dos seus produtos. Dentre os pesticidas utilizados na agricultura, os herbicidas tem um destaque especial. No entanto, a maioria das ações tóxicas dos herbicidas sobre animais e plantas foi pouco investigada (KIM & FEAGLEY 1998, ABDEL-RAMHAM et al. 1999, VENTURA, 2004; FERNADES, 2005). Como conseqüência da falta de esclarecimento sobre o papel dos herbicidas no meio biológico, esses agentes químicos

também acabam representando danos aos ecossistemas e problemas à saúde humana (MUNGER et al. 1997, GORELL et al. 1998).

A preocupação com a proliferação de agentes químicos introduzidos no ambiente, que levam a possíveis alterações genéticas nos organismos, foi um dos principais motivos que levou ao desenvolvimento de diversas metodologias que avaliam a genotoxicidade de substâncias químicas (BRUSICK, 1987). Muitos trabalhos têm sido realizados por diversos pesquisadores preocupados com os efeitos nocivos dos herbicidas, na tentativa de verificar os seus possíveis efeitos fisiológicos (ALMEIDA, 1980), mutagênicos (SAKAMOTO & TAKAHASHI, 1979; VENTURA, 2004; FERNANDES, 2005) e carcinogênicos (TERRACINI, 1977).

A trifluralina é um herbicida pré-emergente, sendo considerado um pesticida da classe toxicológica III (medianamente tóxico). De acordo com vários órgãos internacionais, incluindo o Environmental Protection Agency (EPA), o Development for Environmental Assessment Center dos Estados Unidos e o IARC Monographs (International Agency for Research on Cancer), a trifluralina se caracteriza por ser um agente químico, possivelmente, carcinogênico para os seres humanos, embora o embasamento para essa conclusão seja apenas evidenciado em animais (WATERS et al. 1999).

De acordo com Mello et al. (2001), agentes indutores de estresse, tais como: radiação, drogas, choques térmicos, metais pesados, álcoois, hipóxia, jejum, inibidores metabólicos, agentes oxidantes e infecções virais, dentre outros, podem induzir a morte celular. Segundo Kaioumova et al. (2001), agentes químicos podem levar a um comprometimento da fisiologia celular, desencadeado por uma seqüência complexa de eventos que pode resultar em morte celular, tanto de maneira apoptótica como necrótica.

A necrose é um tipo de morte celular, considerada antigamente como descontrolada. Segundo Zakeri & Lockshin (2002), se uma célula encontra qualquer insulto ou injúria grave à sua existência, seus mecanismos de geração de ATP ou de integridade e permeabilidade de membrana são comprometidos. A necrose pode ser desencadeada pela presença de toxinas ou componentes químicos tóxicos, os quais promovem a lise celular, alterando as funções mitocondriais e canais iônicos do sistema de membranas, levando a um comprometimento da viabilidade da célula. A necrose não é determinada por fatores intrínsecos da própria célula, mas por perturbações do meio

ambiente, injúrias estas que causam uma agressão letal, por ser grave, intensa, contínua ou não, mas que ultrapassa o nível de habilidade homeostática da célula. Os agentes agressores podem ser agrupados em agentes físicos (ação mecânica, temperatura, radiação, efeitos magnéticos, eletricidade), químicos (compreendem substâncias tóxicas e não tóxicas), e biológicos (toxinas; infecções virais; bacterianas ou micóticas; parasitas, etc). Esses agentes provocam um comprometimento da integridade das membranas celulares e da manutenção da capacidade de multiplicação celular, por interferirem nas moléculas de RNA e DNA, o que levará a uma perda da homeostase e da morfostase celular, de tal forma que a célula perde também a sua viabilidade (KAIUOMOVA et al., 2001).

Diferentemente da apoptose, que é um fenômeno ocorrente em células únicas, a necrose tem sido, freqüentemente, descrita como um fenômeno multicelular. Estudos moleculares têm demonstrado que o primeiro evento observado na necrose é a alteração na bomba de sódio e de potássio, provocando edema intracelular. Quando as enzimas lisossomais digerem as organelas citoplasmáticas, o citoplasma adquire um aspecto vacuolizado, podendo ocorrer um processo associado de calcificação nas células mortas. As alterações nucleares ocorrem, reversivelmente, até a etapa de condensação da cromatina, formando blocos nucleares ligados à membrana nuclear e ao nucléolo (cariorexix). Entretanto, quando as alterações degenerativas progridem, pode aparecer retração do núcleo, que se transforma em uma massa densa e enrugada de cromatina (picnose). Esta cromatina sofre uma dissolução progressiva (cariólise), provavelmente decorrente da ação hidrolítica das DNAses de origem lisossomal. O citoplasma perde a sua basofilia e o limite celular se torna indistinto. Observa-se que a perda da homeostase envolve o sistema enzimático (comprometimento dos lisossomos) e o sistema de membranas, o qual parece ter um papel crucial para o estabelecimento de lesões irreversíveis na célula (ZAKERI & LOCKSHIN, 2002).

Dados recentes indicam que, em contraste com a necrose que é causada por condições muito extremas, a apoptose é um tipo de morte celular caracterizada por um evento fisiologicamente normal e regulado (programado). Atualmente, sabe-se que tanto a apoptose como a necrose possuem caminhos de sinalização, como receptores de morte celular, cascatas de quinases e eventos mitocondriais. Através da modulação desses caminhos de sinalização, em ambos os processos de morte celular, é possível identificar



e distinguir a apoptose da necrose (WOODLE & KULKARNI, 1998; HUPERTZ et al., 1999; STADELMAN & LASSMANN, 2000; PROSKURYAKOV et al., 2003).

Para Grant (1982) e Chauhan et al. (1999), o *Allium cepa* é um dos melhores sistemas - teste já estabelecidos, sendo rotineiramente utilizado para avaliar o potencial genotóxico de químicos no ambiente, devido a sua sensibilidade e boa correlação com sistemas-teste de mamíferos.

O objetivo desse estudo foi investigar, por meio de metodologia que utiliza dois corantes vitais (Hoechst e Iodeto de Propídio), os efeitos citotóxicos de efluentes de refinaria de petróleo e do herbicida trifluralina, sob o processo de indução de morte celular, utilizando para isso meristemas radiculares de *Allium cepa*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material**

O material biológico utilizado para o desenvolvimento do ensaio foram sementes de *Allium cepa* (2n=16 cromossomos) de um mesmo lote (variedade Baía periniforme), estocadas em local escuro e acondicionadas a temperatura de 6-10°C.

### **2.2. Métodos**

A metodologia empregada para a análise da possível indução de morte celular em sistema teste de *Allium cepa*, pelos efluentes de refinaria e pelo herbicida trifluralina, foi a técnica de coloração pelos corantes vitais (Hoescht 33342 e iodeto de propídio).

Cinquenta sementes de *Allium cepa* foram colocadas em placas de Petri, a temperatura ambiente, para germinar em efluentes de refinaria e em concentrações diferentes do herbicida trifluralina.

Para a análise realizada com os efluentes de refinaria, as sementes foram colocadas para germinar em águas de seis diferentes pontos de coleta (Fig 1):

- 1) Montante do Rio Jaguarí, (acima da captação da água utilizada pela refinaria);
- 2) Entrada da lagoa de estabilização da REPLAN;
- 3) Saída da lagoa de estabilização (água destinada aos despejos no Rio Atibaia);
- 4) 1Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia;
- 5) 1 Km a jusante do ponto 3;

#### 6) Após o tratamento físico-químico e antes do tratamento biológico

Para o herbicida trifluralina, as sementes foram colocadas para germinar em concentrações utilizadas nas culturas (concentração de campo – 3,34 ppm) e em três concentrações progressivamente menores (1,67 ppm; 0,84 ppm e 0,42 ppm, respectivamente). Todos os testes com o herbicida trifluralina foram realizados na ausência de luz, pois esse herbicida é considerado fotodegradável.

Para o ensaio realizado com os efluentes de refinaria, as raízes permaneceram nas placas de Petri até atingirem 2 cm de comprimento, sendo então coletadas para serem processadas a fresco.

Para o ensaio realizado com o herbicida, primeiramente, todas as sementes foram submetidas à germinação em água milli-Q, até que as raízes atingissem 2cm de comprimento. Posteriormente, as sementes germinadas foram transferidas para as placas contendo o herbicida trifluralina em suas diferentes concentrações, sendo sempre uma placa para cada concentração do herbicida. As sementes permaneceram nessas placas por 20 horas e, após esse período, as raízes foram coletadas para serem processadas a fresco.

O teste-controle negativo foi realizado submetendo-se as sementes apenas à germinação em água milli-Q. Algumas raízes foram fixadas em Carnoy (3 partes de etanol para uma parte de ácido acético) para servirem como controle positivo, uma vez que a fixação, obrigatoriamente, promove a morte celular. Foram realizados cortes longitudinais na região meristemática das raízes. A coloração foi feita, em lâmina, expondo o material a uma gota do corante vital Hoescht 33342 (10 ug/mL). Após dez minutos, o material foi transferido para outra lâmina e então submetido a uma gota de iodeto de propídio (30 ug/mL). Ambas as incubações foram feitas protegidas da luz. Na seqüência, o material foi analisado e fotografado em microscópio de fluorescência (Leica DMLB), sob os filtros de excitação de 365 nm e de barreira de 400 nm.

As células com núcleos fluorescentes azuis foram consideradas vivas e com integridade de membrana. As células com núcleos fluorescentes vermelhos foram consideradas em processo de morte celular e, portanto, sem integridade de membrana. Segundo Locke et al (1990), o Hoescht 33342 cora o DNA das células que tem suas membranas íntegras, enquanto que o iodeto de propídio cora apenas o DNA de células cuja integridade da membrana já está comprometida.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização combinada dos corantes Hoescht 33342 e do iodeto de propídio foi, inicialmente, utilizada para se testar a viabilidade de células animais, como por exemplo na viabilidade de células espermáticas de abelha. Os dois corantes associados (iodeto de propídio e Hoescht 33342) promovem uma coloração específica, claramente observada pelas cores vermelho (para células mortas) e verde/azul (para células vivas) (COLLINS & DONOGHUE, 1999).

Esta técnica foi adaptada neste trabalho, para análise de morte em células vegetais, pois ainda não havia descrição de utilização da mesma para a detecção da viabilidade nestes tipos celulares.

Foi feita, por meio da aplicação dos corante vitais, a avaliação do potencial citotóxico dos diferentes pontos de coleta dos efluentes de refinaria e de distintas concentrações do herbicida trifluralina, bem como para um teste-controle negativo (água milli-Q) e positivo (Carnoy 3:1).

De acordo com as observações realizadas para o herbicida trifluralina, pudemos observar que houve uma reação positiva das células com os corantes, onde foi possível verificar que a indução de morte celular no organismo-teste foi maior, a medida que se aumentava a concentração do herbicida trifluralina (Fig 2).

Para os pontos de coleta referentes aos efluentes de refinaria de petróleo, foi observado uma maior presença de células em processo de morte celular nos pontos com maior quantidade de substâncias potencialmente tóxicas. As maiores quantidades de células em processo de morte foram observadas para o ponto 6 (após o tratamento físico-químico e antes do tratamento biológico), seguido do ponto 2 (entrada da lagoa de estabilização da REPLAN), do ponto 3 (saída da lagoa de estabilização - água destinada aos despejos no Rio Atibaia), do ponto 5 (1 Km a jusante do ponto 3, no rio Atibaia), do ponto 4 (1 Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia) e do ponto 1 (montante do Rio Jaguarí, acima da captação da água utilizada pela refinaria) (Fig 3).

A indução de morte de células da região do pró-câmbio das raízes de *Allium cepa* foi observada para todas as concentrações do herbicida trifluralina. Foi observado também que a medida que a concentração do produto aumentava, havia a promoção de comprometimento de outros tecidos radiculares. Foram registradas células em morte na região meristemática fundamental e na protoderme. O mesmo sendo observado para os

pontos de coleta realizados nas imediações da refinaria de petróleo, que quanto menos tratado o efluente, maior a indução de morte nos diversos tecidos da raiz.

A partir dos resultados obtidos, podemos observar que houve a promoção da destruição de estruturas celulares que levaram as mesmas ao processo de morte celular. Pode-se inferir que o tipo de morte celular observado nas células de *Allium cepa* foi do tipo necrótico, pois a metodologia aplicada mostra-se mais eficiente para evidenciar esse tipo de morte. Como a necrose se baseia no comprometimento da integridade da membrana plasmática, a técnica é perfeitamente aplicável para a investigação, pois os corantes vitais possibilitam a visualização da perda de integridade da membrana nuclear. A perda da integridade celular pode estar relacionada com a perda da assimetria da membrana plasmática, devido a translocação de resíduos de fosfatidilserina do folheto interno da membrana para o folheto externo da membrana (VERMES et al, 1995). Em condições normais, aminofosfolipídios como fosfatidilserina residem, predominantemente, no folheto interno da membrana plasmática de seres eucarióticos.

Células apoptóticas, ao contrário das células necróticas, mantêm a integridade da membrana plasmática durante a maior parte deste processo de morte, ficando permeável a tais corantes vitais, somente durante a etapa de necrose secundária. (PADDENBERG et al., 1996)

O aumento da permeabilidade de membrana pode ser evidenciado pela incorporação do Hoescht 33342, que é um corante fluorescente intercalante de DNA (ORMEROD et al., 1993) ou pelo iodeto de propídio (ORMEROD et al., 1993; ZAMAI et al., 2001). A exclusão do corante fluorescente iodeto de propídio da célula tem se mostrado, particularmente, útil para estudos de morte celular. A natureza fortemente polar dessa molécula faz com que ela seja altamente impermeável para células íntegras, embora consiga penetrar, facilmente, na célula com membrana plasmática em início de perda de integridade. Uma vez dentro da célula, o iodeto de propídio se combina com o DNA, conferindo ao núcleo uma coloração vermelha fluorescente (BRANA et al., 2002).

Até hoje, os eventos que levam a ativação da morte celular permanecem pouco esclarecidos. É sabido que elementos estruturais do citoesqueleto (microtúbulos, microfilamentos de actina e filamentos intermediários de citoqueratina) desempenham um importante papel em uma grande variedade de processos celulares, como por

exemplo a determinação da forma da célula, organização citoplasmática, divisão celular, motilidade e diferenciação celular (POLLARD e COOPER, 1986; MACCIONI, 1986; AVILA, 1990; KLYMKOWSKY, 1995). Durante o processo de morte celular ocorrem muitas mudanças morfológicas que levam a acreditar que o citoesqueleto possa estar envolvido nessas mudanças. Diversos estudos tentaram demonstrar a relação de estruturas presentes no citoesqueleto com o processo de morte da célula, porém, um desses estudos evidenciou uma ação direta da actina no processo de morte celular (COTTER et al., 1992).

Outros autores, como Pittman et al. (1997), focaram seus estudos na tubulina e demonstraram que ela se reorganiza durante a morte celular de forma congruente com as mudanças características da célula em processo de morte. Esses autores demonstraram que a morte celular pode ser iniciada por drogas que despolimerizam ou estabilizam os microtúbulos. Estudos realizados por Juarranz et al. (1995), Stockert et al. (1996) e Cañete et al. (1997) demonstraram que microtúbulos e microfilamentos de actina foram danificados após fotossensibilização celular e desse modo, pode-se atribuir a presença de lesões no citoesqueleto, como fatores relevantes no desencadeamento do processo de morte da célula, causada por tratamentos fotodinâmicos.

De acordo com Anthony e Hussey (1999), os herbicidas dinitroanilinas, como a trifluralina, possuem um radical  $\text{NO}_2$  responsável pela sua ligação às moléculas de tubulina. O complexo formado, herbicida-tubulina, inviabiliza a formação dos microtúbulos e, conseqüentemente, dos fusos mitóticos, estruturas estas responsáveis pelo sucesso do processo de divisão celular. Já para Hertel et al. (1981), Sree et al. (1988), Hansen et al. (1998) e Vidakovik-Cifrek et al. (2002), o herbicida trifluralina, além de atuar junto às moléculas de tubulina, também pode alterar e desregular a concentração de cálcio na célula. Tanto a formação quanto à estrutura e a degradação dos microtúbulos são controladas pelo íon cálcio (Hepler, 1992) que, em alta concentração, acarreta em uma menor taxa de polimerização de microtúbulos (Hepler, 1992). Desse modo, pode-se sugerir que a indução da morte celular, observada nos ensaios realizados com o herbicida trifluralina, possa estar relacionada com uma ação direta do mesmo sobre os microtúbulos das células de *Allium cepa*, desencadeando uma desorganização estrutural da célula, o que levaria ao processo de morte destas células.

Os efluentes de petróleo, assim como todos os efluentes industriais, são considerados como uma mistura complexa de diferentes compostos e substâncias, sendo muito difícil estabelecer a correta composição dos mesmos. De acordo com os resultados observados para os testes realizados com os efluentes de petróleo, podemos concluir que houve uma resposta semelhante dos efluentes de refinaria com o observado para o herbicida trifluralina. Assim, pode-se sugerir que a citotoxicidade conferida pelos diferentes componentes do efluente de refinaria possa ser decorrente da presença de substâncias que atuam sobre a integridade da membrana, pela ação junto aos componentes celulares, como por exemplo os microtúbulos.

Nossos resultados mostram que a técnica de coloração pelos corantes vitais iodeto de propídio e Hoescht 33342 parece ser eficiente na detecção de citotoxicidade de xenobiontes sob sistema teste de *Allium cepa*, pois permite a observação da indução de morte celular, conferindo assim em mais uma ferramenta para estudos de análise de citotoxicidade de diferentes compostos.

#### **4. AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro, à Prof<sup>o</sup> Dejanira de Franceschi de Angelis do Laboratório de Toxicologia de Águas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biologia da UNESP-Rio Claro, ao programa PRH-05 (Programa de Recursos Humanos-05 da ANP) pelo apoio financeiro.

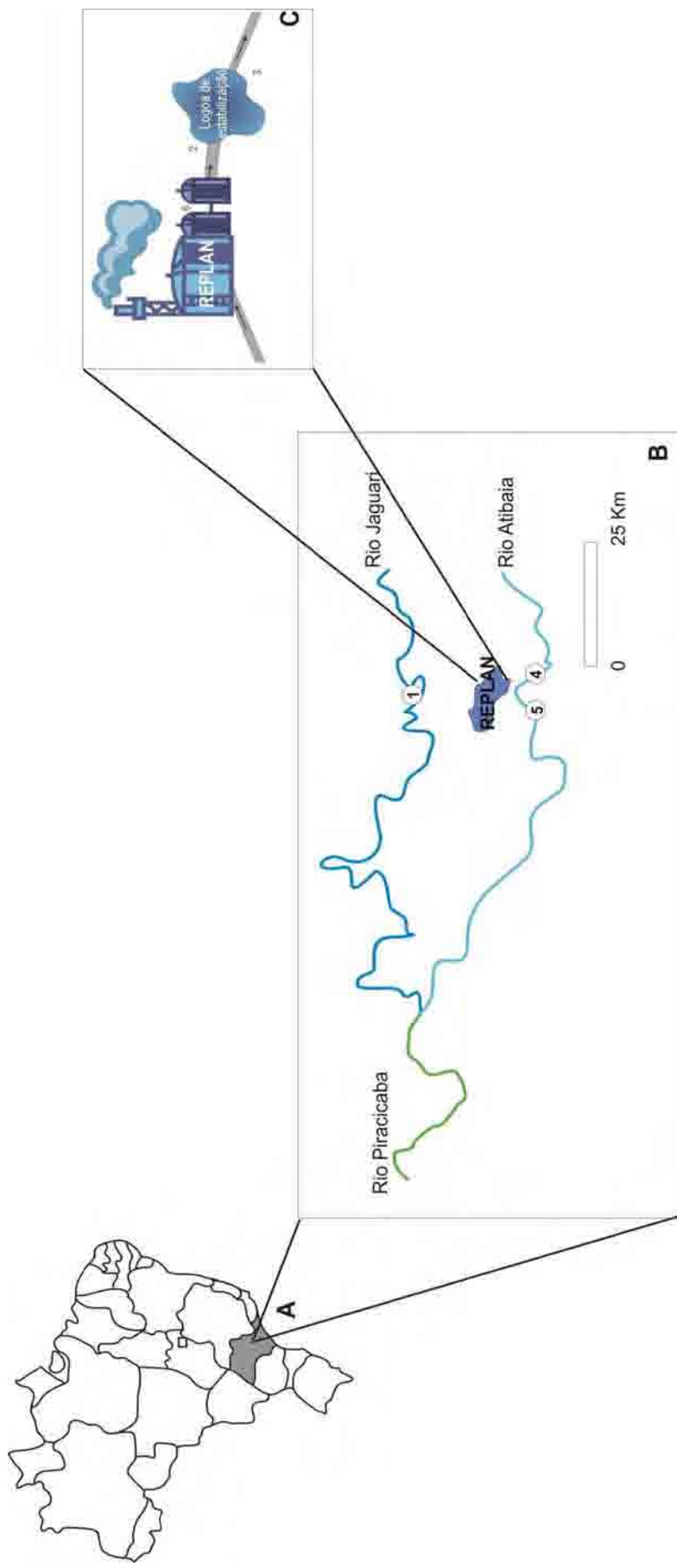
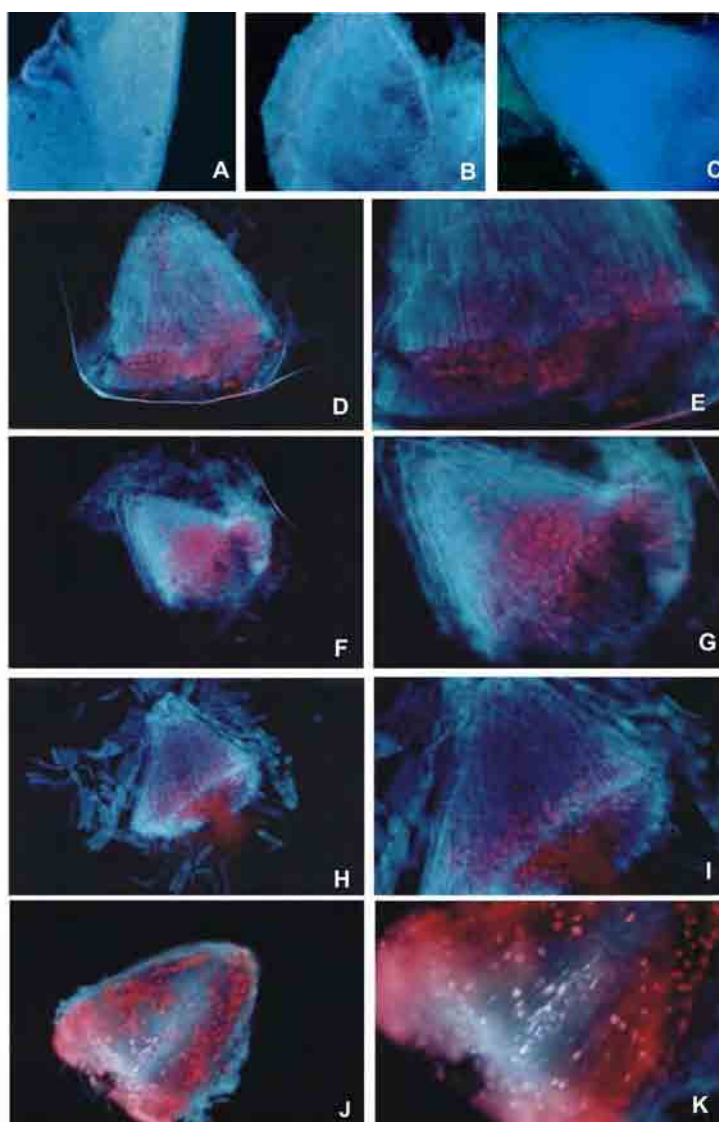
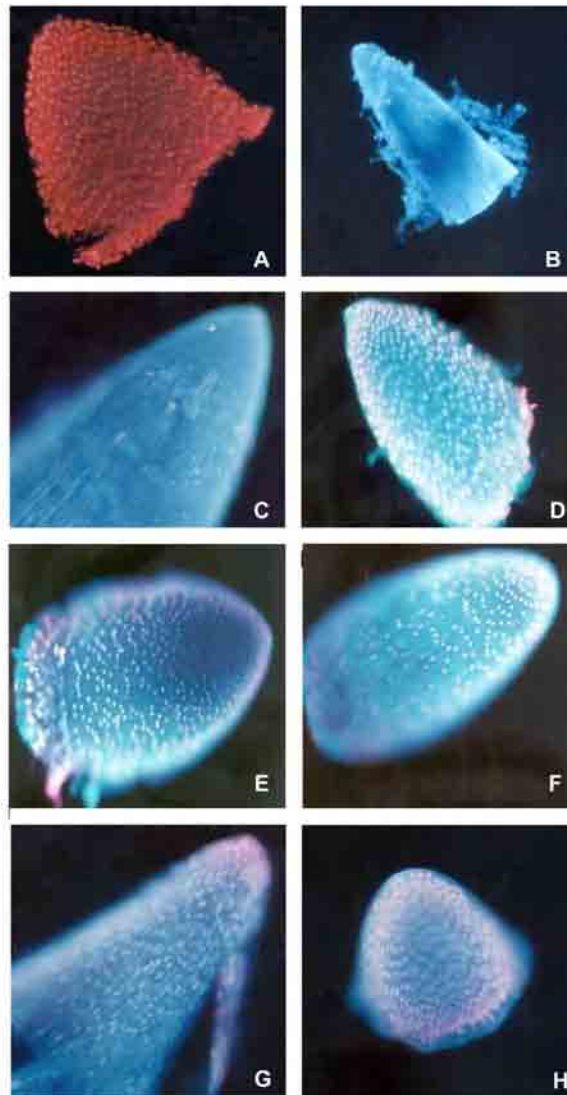


Figura 1 : A. Localização da cidade de Paulínia (latitude  $22^{\circ}48'45''S$ , longitude  $47^{\circ}11'15''W$ ); B. Curso do rio Jaguarí e do rio Atibaia e distribuição dos pontos de coleta nestes rios (1, 4 e 5); C. Distribuição dos pontos de coleta na refinaria REPLAN (2, 3 e 6).



**Figura 2:** Meristemas radiculares de *Allium cepa* tratados com diferentes concentrações do herbicida trifluralina, submetidos à metodologia de coloração pelos corantes vitais Hoescht e Iodeto de Propídio: **A, B e C.** Controle negativo; **D e E.** Concentração 0,42 ppm; **F e G.** Concentração 0,84 ppm; **H e I.** Concentração 1,68 ppm; **J e K.** Concentração 3,34 ppm.





**Figura 3:** Meristemas radiculares de *Allium cepa* tratados com efluentes de refinaria e rios relacionados, submetidos à metodologia de coloração pelos corantes vitais Hoescht e Iodeto de Propídio: **A.** Controle positivo; **B.** Controle negativo; **C.** Ponto 1; **D.** Ponto 2; **E.** Ponto 3; **F.** Ponto 4; **G.** Ponto 5; **H.** Ponto 6.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, A.R; WAUCHOPE, R.D.; TRUMAN, C.C.; DOWLER, C.C. Runoff and leaching of atrazine and alachor on a sandy soil as affected by application in sprinkler irrigation. **Journal of Environmental Science and Health-B: Pesticides and Food Contaminants**, New York, v. 34, p. 381-396, 1999.

ALMEIDA, W.F. Acúmulo de inseticidas no homem e sua significação epidemiológica. **O biológico**, São Paulo, v. 6, p. 77-93, 1980.

ANTHONY, R.G.; HUSSEY, P.J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 112-116, 1999.

AVILA, J. Microtubule dynamics. **FASEB J.**, v. 4, p. 3284-3290, 1990.

BRANA, C.; BENHAM, C.; SUNDSTROM, L. A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. **Brain Research Protocols**, v. 10, p. 109-114, 2002.

BRUSICK, D. General Toxicology, In: **Principles of Genetic Toxicology**, New York, Estados Unidos, 1987, pp. 421-432.

CAÑETE, M.; LAPEÑA, M.; JUARRANZ, A.; VENDRELL, V.; BORRELL, J.I.; TEIXIDÓ, J.; NONELL, S.; VILLANUEVA, A. Uptake of tetraphenylporphycene and its photoeffects on actin and cytokeratin elements ps HeLa cells. **Anti-Cancer Drug Des.**, v. 12, p. 543-554, 1997.

CHAUHAN, L. K. S.; SAVENA, P. M.; GUPTA, S. K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa* **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v.p 42, p. 181-189, 1999.

COLLINS, A.M.; DONOGHUE, A.M. Viability assessment of honey bee *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. **Theriogenology**, v. 51, p. 1513-1523, 1999.

COTTER, T.G.; LENNON, S.V.; GLYNN, J.M.; GREEN, D.R. Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. **Cancer Research**, Baltimore, v. 52, p. 997, 1992.

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

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, p. 273-291, 1982.

GORELL, J.M.; JHONSON, C.C.; RYBICKI, B.A.; PETERSON, E.L.; RICCHARDSON, R.J. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farmin, well water, and rural living. **Neurology**, Heidelberg, v. 50, p. 1346-1350, 1998.

HANSEN, A.L.; GERTZ, A.; JOERSBO, B.; ANDESREN, S.B. Antimicrotubule herbicide for in vitro chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. **Euphytica**, Wageningen, v. 101, p. 231-237, 1998.

HEPLER, P.K. Calcium and mitosis. **International Review of Cytology**, v. 2, p. 1273-1282, 1992.

HERTEL, C.; QUADER, H.; ROBINSON, D.G.; ROOS, I.; CARAFOLI, E.; MARME, D. Herbicides and fungicides stimulate Ca<sup>2+</sup> efflux from rat liver mitochondria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 37-39, 1981.

HUPERTZ, B.; FRANK, H-G.; HAUFMANN, P. Cell death. **Anatomy and Embriology**, Roma, v. 200, p.1, 1999.

JUARRANZ, A.; VILLANUEVA, A.; DÍAZ,V.; CAÑETE, M. Photodynamic effects of the cationic porphyrin, mesotetra (4N-methylpyridyl)-porphine, on microtubules of HeLa cells. **J. Photochem. Photobiol. [B]**, , v. 27, p. 47-53, 1995.

KAIUOMOVA, D.; SÜSAL, C.; OPELZ, G. Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Human Immunology**, Heidelberg, Germany, v. 62, p. 64-74, 2001.

KIM, J.H.; FEAGLEY, S.E. Adsorption and leaching of trifluralin, metachlor, and metribuzin in a commerce oil. **Journal of Environmental Science and Health-B: Pesticides and Food Contaminants**, New York, v. 33, p. 529-546, 1998.

KLYMKOWSKY, M.W. Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 7, p. 46-54, 1995.

LOCKE, S.J.; PENG, Y.S.; CROOS, N.L. A supravital staining technique for honeybee spermatozoa. **Physiological-Entomology**, v. 146, p. 187-192, 1990.

MACCIONI, R.B. Molecular cytology of microtubules. **Cell Biol. Rev.**, v. 8, p. 3-103, 1986.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; MARIA, S.S. **In: CARVALHO, F.H.; RECCO-PIMENTEL, S.M. (EDS.) A célula 2001**, Brasil: Manole, 2001, 275p.

MUNGER, R.; ISACSON, P.; HU, S.; BURRNS, T.; HANSON, J.; LYNCH, C.F.; CHERRYHOLMES, K.; VANDORPE, P.; HAUSLER, Jr. W.J. Intrauterine growth retardation in Iowa communities with herbicides-contaminated drinking water supplies. **Environmental Health Perspectives**, New York, v. 105, p. 308-314, 1997.

OHE, T.; WHITE, P. A.; DeMARINI, D. M. Mutagenic characteristics of river flowing through large metropolitan areas in North America. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 534, p. 101-112, 2003.

ORMEROD, M.G.; SUN, X.M.; SNOWDEN, R.T.; DAVIES, R.; FEARNHEAD, H.; COHEN, G.M. Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes: a flow cytometric study. **Cytometry**, v. 14, p. 595, 1993.

PACHECO, M. SANTOS, M. A. Biotransformation, Endocrine, and Genetic Responses of *Anguilla anguilla* L. to Petroleum Distillate Products and Environmentally Contaminated Waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, v. 64-75, 2001.

PADDENBERG, R.; WULF, S.; WEBER, A.; HEIMANN, P.; BECK, L.; MANNHERZ, H.G. Internucleosomal DNA fragmentation in cultured-cells under conditions reported to induce apoptosis may be caused by mycoplasma endonucleases. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 71, p. 105, 1996.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 70, p. 58-169, 1967.

PÉREZ, S.; FARRÉ, M.; GARCÍA, M.J.; BARCELÓ, D. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage and their contribution to its toxicity in the ToxAlert® 100 bioassay. **Chemosphere**, v. 45, p. 705-712, 2001.

PITTMAN, S. GEYP, M.; FRASER, M.; ELLEM, K.; PEASTON, A.; IRELAND, C. Multiple centrosomal microtubule organizing centers and increased microtubule stability are early features of VP-16 induced apoptosis in CCRF-CEM cells. **Leukemia Research**, v. 21, n. 6, p. 491-499, 1997.

POLLARD, T.D.; COPPER, J.A. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. **A. Rev. Biochem.**, n. 55, p. 987-1035, 1986.

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

RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R. Introduction. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**, New York: Hemisphere, 1985. p.1-28.

SAKAMOTO, E.T.; TAKAHASHI, C.S. Efeitos dos fungicidas Dithane M-45, Benlate e Vitavax 75 PM sobre os índices mitóticos dos meristemas radiculares de *Allium cepa*. In: **Anais da SPBC**, São Paulo, v. 31, p. 573, 1979.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. 1 ed. Brasil: Alcance, 2003. 422 p.

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

SREE, K.R.; VERHOEVEN, H.A.; DIJKHUIS, P. Mitotic dynamics of micronuclei induced by amiprofos-metyl and prospects for chromosome-mediated gene transfer in plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 75, p. 575-584, 1988.

STALDEMANN, C.; LASSMANN, H. Detection of apoptosis in tissue sections. **Cell Tissue Research**, Berlin, v. 301, p. 13-31, 2000.

STOCKERT, J.C.; JUARRANZ, A.; VILLANUEVA, A.; CAÑETE, M. Photodynamic damage to HeLa cell microtubules induced by thiazine dyes. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 39, p. 167-169, 1996.

TERRACINI, B. Valutazione della carcinogenecita degli idrocarburi clorati usati come pesticide. **Tumori**, Milano, v. 53, p. 601-618, 1977.

VENTURA, B.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2004.

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. **J. Immunol. Methods**, **184(1)**: 39. 1995.

VIDAKOVIC-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPES, D. Cytogenetic Damage in Shallot (*Allium cepa*) Root Meristems Induced by Oil Industry “High-Density Brines”. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 43, p. 284-291, 2002.

WATERS, M.D.; STACK, H.F.; JACKSON, M.A. Genetic toxicology data in the evaluation of potencial human environmental carcinogens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 437, p. 21-49, 1999.

WOODLE, E.S.; KULKARNI, S. Cell death. **Transplantation**, New York, v. 66, p. 681, 1998.

ZAMAI, L.; CANONICO, B.; LUCHETTI, F.; FERRI, P.; MELLONI, E.; GUIDOTI, L.; CAPPELLINI, A.; CUTRONEO, G.; VITALE, M; PAPA, S. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis in adherent cells. **Cytometry**, v. 44, p. 57, 2001.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R.A. Cell death during development. **Journal of Immunological Methods**, [S.1], v. 265, p. 3-20, 2002.



## 7. RESULTADOS GERAIS E DISCUSSÃO

---

### 7.1. Sistemas teste

Foram realizadas análises de citotoxicidade, genotoxicidade e de mutagenicidade utilizando-se como sistemas teste *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*, para testar amostras de água de efluentes de refinaria que são lançados no rio Atibaia, município de Paulínia/SP, bem como em amostras de água do rio Jaguarí.

Foram realizadas coletas durante os anos de 2003 e de 2004, nos meses de outubro de 2003, fevereiro de 2004, maio de 2004 e julho de 2004. Os pontos de coleta foram: 1) Montante do Rio Jaguarí, (acima da captação da água utilizada pela refinaria); 2) Entrada da lagoa de estabilização da REPLAN; 3) Saída da lagoa de estabilização (água destinada aos despejos no Rio Atibaia); 4) 1Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia; 5) 1 Km a jusante do ponto 3; 6) Após o tratamento físico-químico e antes do tratamento bacteriológico.

O sistema teste *Allium cepa* foi utilizado para avaliar os potenciais citotóxicos e mutagênicos (através dos ensaios de morte celular pela Técnica de Corantes Vitais e de aberrações cromossômicas) de efluentes de refinaria que são lançados no rio Atibaia, município de Paulínia/SP, bem como em amostras de água do rio Jaguarí. Para o ensaio de aberrações cromossômicas, foi realizado um controle positivo com MMS (metilmetano sulfonato) e um controle negativo com água milli-Q, para se comparar os resultados obtidos com as amostras de água coletadas nos diversos pontos relacionados com as atividades da refinaria. Para o ensaio de morte celular o controle negativo foi feito com água milli-Q e o controle positivo, fixando o material em Carnoy 3:1.

O sistema teste *Oreochromis niloticus* foi utilizado para se avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos (por meio dos ensaios de cometa, do micronúcleo e anormalidades nucleares) de efluentes de refinaria que são lançados no rio Atibaia, município de Paulínia/SP, bem como em amostras de água do rio Jagurari. Para comparação dos resultados, foi realizado um controle negativo utilizando água de poço artesiano.

A escolha dos sistemas testes *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* seguiu a indicação de outros estudos (FISKEJÖ, 1985; AL-SABTI, 1986; HOSE et al., 1987; GROVER et al., 1988; HARSHBARGER & CLARK, 1990; RANK & NIELSEN, 1993, 1997, 1998; FRANEKIC et al., 1994; AL-SABTI & METCALFE, 1995; KHORS et al., 1997; SMAKA-KINCL et al., 1997; KOVALCHUCK et al., 1998; CHAUHAN et al., 1999; COTELLE et al., 1999; ALVES-COSTA, 2001; BOMBAIL et al., 2001; GRISOLIA & STARLING, 2001), que descreveram a efetividade desses organismos para estudos de biomonitoramento ambiental.

## **7.2. Análises físicas e químicas das amostras coletadas nos rios e na refinaria**

Foram realizadas análises físicas e químicas de todas as amostras de água coletada. Nas análises físicas, foram quantificados os padrões de pH, condutividade, cor aparente, turbidez, temperatura, sólidos sedimentáveis, sólidos solúveis e em suspensão, material volátil e material em suspensão (Tabela 1). Para as análises químicas foram quantificados os seguintes itens: oxigênio dissolvido (OD), demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), cloretos, acidez em CaCO<sub>3</sub>, alcalinidade, amônia, nitrato, nitrito (Tabela 2), além dos íons presentes nas amostras (Tabela 3).

De acordo com os resultados expressos na Tabela 1, podemos observar que não houve grandes variações com relação ao pH entre todas as amostras analisadas.

Os valores de condutividade, medidas em µS/cm na água, trazem informações importantes quanto a presença de sais dissolvidos. Pode-se inferir que quanto maiores os valores de condutividade registrados, maiores são as quantidades de matéria iônica dissolvida. Sabe-se ainda que o uso da água em diversas atividades faz com que haja um aumento de íons na sua composição. Se compararmos os valores médios encontrados

nos pontos 1 e no ponto 4, podemos afirmar que o Rio Jaguari tem águas com menor índice de reutilização, pelos valores médios exibidos (110,68  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

A cor da água depende das substâncias nela solubilizadas. Águas naturais apresentam uma cor característica dada pelos diferentes sais nelas dissolvidos, especialmente sais de ferro, manganês e matéria orgânica, destacando-se clorofila oxidada ou não, ácidos húmicos, etc. Foi observada uma diferença entre águas do Rio Atibaia e Jaguari, sendo que para o ponto 1 (rio Jaguari) o valor observado foi de 313,56 em mg/PtCo e para o ponto 4 de 262,73.

A turbidez de um líquido envolve partículas em suspensão. Tais partículas podem ser decantáveis a curto, médio e longo prazo, dependendo do seu tamanho e de sua densidade. De uma maneira geral, os componentes que conferem turbidez à água enquadram-se em células microbianas, argila, matéria parcialmente unificada, matéria orgânica em decomposição e substâncias químicas formadoras de precipitados. Como pode ser observado na Tabela 1, foi observado um maior valor de turbidez para as águas do ponto 6.

Os sólidos sedimentáveis (SS) indicam quantidades mais grosseiras de resíduos. Este parâmetro prevê que o rio recebe muitos efluentes com cargas orgânicas e inorgânicas. Ao analisar os SS, deve-se considerar ainda que em águas com baixa velocidade de escoamento, os resíduos vão se decantando, ao longo do percurso, com maior facilidade que águas mais turbulentas (encachoeiradas). Desse modo, foi notório que as águas do rio Atibaia receberam uma maior quantidade de efluentes com cargas orgânicas e inorgânicas do que o rio Jaguari.

O parâmetro “material volátil” representa acréscimo de matéria orgânica na água. Segundo este parâmetro, podemos afirmar que houve um aumento de material volátil nos efluentes de refinaria e que esse valor diminuiu, após os tratamentos realizados pela refinaria.

A matéria residual fixa pode estar correlacionada com as elevadas cargas de esgotos domésticos brutos que ainda não foram mineralizados, quer por processos químicos, físico-químicos ou biológicos. Águas com elevados índices de matéria mineral fixa não são recomendados para agricultura ou dessedentação dos animais.

**Tabela 1. Análise do ensaio físicos realizados nas águas derivadas dos pontos de coleta**

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
PH	7,43±0,17	8,10±0,26	8,52±0,36	7,72±0,20	7,63±0,13	7,49±0,25
Condutividade(uS/cm)	110,68±26,60	2837,81±454,05	2746,88±595,87	314,98±131,52	346,27±220,60	2492,50±220,60
Cor aparente (PtCo)	313,56±533,25	154,06±57,11	139,63±38,04	262,73±327,53	222,47±164,62	1324,50±676,35
Turbidez (NTU)	58,05±75,35	23,92±13,50	16,09±8,93	44,99±35,04	46,14±33,97	257,33±334,45
Temperatura (°C)	25,50±2,31	29,44±1,75	26,56±1,50	25,50±2,31	25,50±2,31	32,44±1,03
Sólidos sedimentáveis (mL/L)	0,18±0,15	0,11±0,05	0,11±0,03	0,26±0,19	0,20±0,15	0,19±0,18
Sólidos solúveis em suspensão (g/L)	0,2014±0,2708	1,5450±0,3561	1,4094±0,1791	0,1860±0,0864	0,2219±0,0623	1,8064±0,2826
Material volátil (g/L)	0,0651±0,1225	0,1174±0,0297	0,1072±0,0294	0,0433±0,0197	0,0427±0,0138	0,2678±0,0736
Material residual (g/L)	0,0728±0,0734	1,3586±1,3243	1,3071±1,2773	0,1609±0,1535	0,1813±0,1708	1,5285±1,4989

A presença de um valor elevado de oxigênio dissolvido (OD) na água indica que a matéria orgânica, quando presente, não sofre rápida degradação, não induzindo a um decréscimo nos valores de oxigênio, mas permitindo a reoxigenação. Pela Tabela 1, podemos observar que no ponto 6 não há OD, sendo que esse valor aumenta após o efluente passar por tratamento biológico, o que mostra que o tratamento utilizado pela empresa parece ser eficiente, pelo menos para este parâmetro.

A acidez em carbonato é limitada e pequena na água dos rios analisados e do efluente tratado. Embora na entrada do tratamento biológico, que se processa com auxílio de uma biota mista, é detectada a média de 15,00 mg/CaCO<sub>3</sub>/L, durante o processo a alcalinidade deixa de existir, provavelmente, em função do metabolismo microbiano que necessita condições ácidas para algumas vias metabólicas.

A presença de baixa acidez traz preocupação pelas conseqüências que podem acarretar, pois a presença da amônia nas condições alcalinas a torna altamente tóxica. As águas dos rios e os efluentes investigados apresentam baixa reserva de alcalinidade.

O nitrogênio atmosférico representa a maior fração gasosa (78%) e, para que possa ser aproveitado, precisa ser transformado em outros compostos. Pela fixação biológica, o N<sub>2</sub> passa para a forma reduzida de NH<sub>4</sub>. Este, posteriormente, vai ser incorporado na matéria orgânica, como por exemplo no grupo amina das proteínas. Estas, ao serem degradadas, geram o NH<sub>3</sub>, que, mediante condições oxidativas, vai transformar-se em nitrito (NO<sub>2</sub>). A presença de nitrito em água indica deficiência de oxigênio e, portanto, condições de anaerobiose. Águas estagnadas, de fundo de lagos e rios, geralmente, são detentoras de elevadas quantidades de nitrito. O nitrito só é utilizado por grupos especiais de bactérias. Os teores de NO<sub>2</sub> do ponto 6, em relação a dos pontos 2 e 3 (após tratamento), mostram que ocorreu uma eficiente transformação para nitrato. De maneira geral, as águas do Rio Jaguari já apresentam uma menor quantidade de NO<sub>2</sub> do que as do Rio Atibaia.

**Tabela 2. Análise do ensaio químicos realizados nas águas derivadas dos pontos de coleta**

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,7±1,3	6,8±1	9,0±1,4	6,1±2,0	5,9±2,1	0,00±0,00
Demanda química de oxigênio (mg/L)	22,03±9,1	131,11±33,55	107,16±23,05	28,30±5,97	30,32±7,45	848,17±205,94
Demanda bioquímica de oxigênio (mg/O <sub>2</sub> /L)	2,32±0,75	2,38±1,25	3,85±1,66	5,93±0,95	6,15±1,86	252,42±107,33
Cloreto (mg/L)	5,86±3,01	620,02±155,36	614,06±123,45	13,01±6,06	19,90±10,86	660,63±197,29
Acidez de CaCO <sub>3</sub> (mg/L)	4,05±1,34	0,00±0,00	0,00±0,00	4,46±0,56	4,75±2,04	15±7,26
Alcalinidade – CO <sub>3</sub> (mg/L)	0,00±0,00	12,24±10,45	20,72±19,67	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Alcalinidade – HCO <sub>3</sub> (mg/L)	22,10±8,5	132,00±43,79	120,19±46,66	45,76±13,74	45,06±12,80	213,64±52,58
Amônia (mg NH <sub>3</sub> /L)	0,61±0,32	0,34±0,18	0,49±0,12	2,43±1,37	2,26±1,31	19,23±16,51
Nitrito (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L)	0,1246±0,0699	0,0153±0,0101	0,0514±0,0213	0,1925±0,0765	0,1874±0,0705	0,3268±0,6743
Nitrato (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	1,5678±0,7439	9,8909±2,6140	9,4663±2,7605	1,5456±0,4129	1,6552±0,4183	8,2878±4,2367

A presença de nitrato na água implica que, em algum ponto do processo, ocorreu oxidação da amônia e do nitrito, pela via oxidativa dos microrganismos, que transformaram estes sais em nitrato ( $\text{NO}_3$ ). O Rio Jaguari apresentou uma concentração média de nitrato ao redor de 1,5678 mg/L e o Rio Atibaia ao redor de 1,5456 mg/L. O nitrato é a forma de sal nitrogenado inorgânico assimilado pelas plantas, que o transformam em produtos orgânicos nitrogenados como proteínas, enzimas, nucleotídeos e outros. Águas que recebem esgotos das cidades podem apresentar elevados teores de nitratos.

Esgotos domésticos não tratados e o escoamento de solos agrícolas durante as chuvas que atingem os rios podem ser as causas da elevada presença de nitritos nas águas. Rios com margens altamente vegetadas podem sofrer a depuração dos sais. A purificação da água pode acontecer pela passagem entre as raízes das plantas, diminuindo os teores dos sais. Pela necessidade de fonte nitrogenada, as plantas promovem a remoção do nitrogênio, pelo processo de assimilação.

Na lagoa de estabilização da refinaria, há indícios de que o  $\text{NO}_3$  diminuiu pois, entre ponto 2 e 3, houve uma diferença de 0,4246 mg/L do sal removido.

Excesso de nitrato na água pode comprometer o sistema renal e hematopoiético dos animais expostos.

O petróleo, ao ser refinado, gera amônia que se transforma em nitrito, que por sua vez gera o nitrato, que acaba sendo descarregado no efluente industrial. Assim, dependendo do processo de tratamento do efluente, este se transforma em nitrato que é a forma de nitrogênio assimilado pelas plantas.

Pela Tabela 3, podemos observar que as águas do Rio Jaguari apresentaram as menores concentrações de quase todos os íons, com exceção do ferro e do alumínio. As águas dos pontos 2, 3 e 6 apresentaram grandes concentrações de íons dissolvidos, íons esses oriundos do processo de refino de petróleo, uma vez que várias substâncias químicas que contém esses íons são utilizadas no processo de refino. Pode-se notar também que esses valores decresceram após os efluentes passarem pelos tratamentos da refinaria, indicando que os tratamentos foram efetivos para o controle desses íons.

### 7.3. Análise dos efeitos citotóxicos

Foram realizadas análises, em sistema teste de *Allium cepa*, para avaliar a potencialidade de indução do efeito citotóxico de amostras de água de efluentes de refinaria, que são lançados no rio Atibaia, município de Paulínia/SP, bem como em amostras de água do rio Jaguari; por meio do ensaio de morte celular (Técnica de Corantes Vitais). Foram observadas, para todas as raízes de *Allium cepa* submetidas à germinação nas diferentes amostras de água coletadas, porções de tecidos vivos e porções de tecidos em processo de morte celular. Nenhuma região de morte celular foi encontrada em raízes de *Allium cepa* submetidas à germinação no controle negativo (água milli-Q).

Além disso, também foram observadas células em processo de morte celular em meristemas de *Allium cepa* submetidas ao ensaio de aberrações cromossômicas, sendo que essas células possuíam núcleos heteropicnóticos, células com fragmentação nuclear ou citoplasma vacuolizado. Para o ensaio realizado com o sistema teste *Oreochromis niloticus*, também foi observada a presença de células em processo de morte celular, sendo que elas apresentaram as seguintes características: núcleo heteropicnótico, núcleo periférico, células com citoplasma vacuolizado ou células com degeneração do material nuclear.

Houve maior indução de morte celular quando os organismos foram expostos às águas dos pontos 6 (após o tratamento físico-químico e antes do tratamento bacteriológico), seguidos do ponto 2 (entrada da lagoa de estabilização da REPLAN) e do ponto 3 (saída da lagoa de estabilização-água destinada aos despejos no Rio Atibaia). Esses resultados inferem que estes pontos apresentam um alto potencial de citotoxicidade.

Nossos dados revelam que o ensaio de morte celular em sistema teste de *Allium cepa* constitui um bom parâmetro de avaliação de citotoxicidade de poluentes ambientais.





Para o ensaio de morte celular pela técnica de corantes vitais, pode-se presumir que o tipo de morte celular observado nas células de *Allium cepa* foi do tipo necrótica, uma vez que métodos para se avaliar a necrose se baseiam no comprometimento da integridade da membrana plasmática, característica esta que pode ser observada quando se utilizou a metodologia de corantes vitais. Esta técnica é baseada na perda da integridade da membrana nuclear, que pode estar relacionada com a perda da assimetria da membrana plasmática e com a presença de resíduos de fosfatidilserina na camada interna da membrana, pela sua translocação para a camada externa (VERMES et al, 1995). Nos seres eucarióticos, os aminofosfolipídios como, fosfatidilserina, residem, predominantemente, na camada externa da membrana.

O aumento da permeabilidade de membrana pode ser evidenciado pela incorporação de um corante fluorescente, intercalante de DNA, como por exemplo o Hoescht 33342 (ORMEROD et al., 1993) e o iodeto de propídio (ORMEROD et al., 1993; ZAMAI et al., 2001). A natureza altamente polar do iodeto de propídio faz com que ele seja também altamente impermeável em células íntegras. No entanto, ele consegue penetrar na célula, quando a membrana plasmática está com a sua integridade comprometida. Uma vez dentro da célula, o iodeto de propídio se combina com o DNA, conferindo ao núcleo uma coloração vermelha, altamente fluorescente (BRANA et al., 2002), evidenciando assim as células em processo de morte celular. As células “vivas”, ou seja, com a sua membrana plasmática íntegra, apresentam núcleos com coloração azul fluorescente.

A morte celular observada neste estudo deve ter sido ocasionada por problemas nos microtúbulos das células meristemáticas de *Allium cepa*, visto que, para a técnica de corantes vitais foi realizado, conjuntamente, a avaliação da citotoxicidade do herbicida trifluralina. Segundo Anthony & Hussey (1999), os herbicidas dinitroanilinas, como a trifluralina, possuem um radical NO<sub>2</sub> responsável pela sua ligação às moléculas de tubulina. O complexo formado, herbicida-tubulina, inviabiliza a formação dos microtúbulos e, conseqüentemente, dos fusos mitóticos, estruturas estas responsáveis pelo sucesso do processo de divisão celular. Já para Hertel et al. (1981), Sree et al. (1988), Hansen et al. (1998) e Vidakovik-Cifrek et al. (2002), o herbicida trifluralina, além de atuar junto às moléculas de tubulina, também pode alterar e desregular a concentração de cálcio na célula. Tanto a formação quanto à estrutura e a degradação

dos microtúbulos são controladas pelos íons cálcio (HEPLER & WAYNE, 1985; HEPLER, 1992) que, quando em alta concentração acarretam em uma menor taxa de polimerização (HEPLER, 1992). Desse modo, pode-se sugerir que a indução da morte celular observada nos ensaios realizados com o herbicida trifluralina possa estar relacionada com uma ação direta do mesmo sobre os microtúbulos das células de *Allium cepa*, desencadeando uma desorganização estrutural da célula, o que levaria ao processo de morte das mesmas. Como o mesmo comportamento foi observado para os meristemas expostos aos efluentes de refinaria, pode-se inferir que a morte celular observada pode também ter sido desencadeada por problemas nos microtúbulos.

Através da análise dos nossos resultados pode-se inferir que a técnica de coloração pelos corantes vitais iodeto de propídio e Hoescht parece ser indicada para a avaliação de indução de morte celular em meristemas radiculares de sistema teste de *Allium cepa*, sendo que essa morte, provavelmente, seja do tipo necrótica, constituindo-se em mais uma eficiente ferramenta para a análise de citotoxicidade de poluentes ambientais.

### **7.3. Análise dos efeitos genotóxicos**

Para a análise dos efeitos genotóxicos de amostras de água de efluentes de refinaria que são lançados no rio Atibaia, município de Paulínia/SP, bem como em amostras de água do rio Jaguará, foi realizado o ensaio de cometa, utilizando eritrócitos de *Oreochromis niloticus*.

O ensaio do cometa tem sido proposto como uma eficiente ferramenta no campo da genética toxicológica (TICE et al., 1990; BETTI et al., 1993). Esse teste evidencia danos na molécula de DNA, pela migração diferencial do material nuclear, quando submetido à eletroforese (ANDERSON et al., 1998; MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998; NANTHAWAN et al., 2002; LEE & STEINERT, 2003).

As análises realizadas através do ensaio do cometa revelaram que os efeitos genotóxicos foram significativos para as amostras de água oriundas do ponto 6 (após o tratamento físico-químico e antes do tratamento bacteriológico), seguidos do ponto 2 (entrada da lagoa de estabilização da REPLAN) e do ponto 3 (saída da lagoa de estabilização-água destinada aos despejos no Rio Atibaia). Por estes resultados pode-se inferir que há um grande potencial de indução de genotoxicidade nos efluentes de

refinaria, sendo que esse potencial diminui a medida em que são realizados os processos de tratamento dos efluentes. No entanto, vale salientar que essa metodologia aqui empregada ainda necessita de adequações no seu protocolo, para que os resultados possam ser mais confiáveis.

#### **7.4. Análise dos efeitos mutagênicos**

Para a análise dos efeitos mutagênicos de águas de efluentes de refinaria que são lançados no rio Atibaia, município de Paulínia/SP, bem como em amostras de água do rio Jagurarí, foram realizados os testes de aberrações cromossômicas, utilizando o sistema teste de *Allium cepa* e o teste de micronúcleo e de anormalidades nucleares, utilizando *Oreochromis niloticus* como sistema teste.

O teste de aberrações cromossômicas com *Allium cepa* fornece um rápido exame dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de substâncias químicas dispostas no meio (GRANT, 1982; GRANT, 1994; FISKEJÖ, 1985; FISKEJÖ, 1988; FISKEJÖ, 1993a; FISKEJÖ, 1993b; NIELSEN & RANK, 1994). Este teste tem sido amplamente utilizado para se monitorar os efluentes de rios (FISKEJÖ, 1993b; RANK & NIELSEN, 1994; SMAKA-KINCL et al., 1997; HOSHINA, 2002; MATSUMOTO, 2004).

Para o teste de aberrações cromossômicas, foram analisadas células portadoras de alterações cromossômicas, sendo estas divididas em aberrações cromossômicas mutagênicas (micronúcleos e quebras cromossômicas) e potencialmente mutagênicas (C-metáfases, metáfases poliplóides, metáfases com aderências cromossômicas, anáfases multipolares, anáfases e telófases com atrasos e pontes cromossômicas, células polinucleadas, células poliplóides), de acordo com o comportamento dessas alterações cromossômicas, ou seja, em persistirem ou serem eliminadas pelas células, durante o progresso da divisão celular.

Foram observadas uma maior incidência de aberrações cromossômicas em meristemas de *Allium cepa* submetidas à germinação nas águas derivadas do ponto 6 (após o tratamento físico-químico e antes do tratamento bacteriológico), seguidos do ponto 2 (entrada da lagoa de estabilização da REPLAN) e do ponto 3 (saída da lagoa de estabilização-água destinada aos despejos no Rio Atibaia), mostrando que os efluentes da refinaria possuem potencial de mutagenicidade em sistema teste de *Allium cepa*, sendo que esse potencial diminuiu conforme esses efluentes passaram pelos processos

de tratamento da refinaria (tratamento biológico, tratamento físico-químico, lagoa de estabilização). As águas coletadas no rio Atibaia apresentaram um aumento no potencial mutagênico após receberem os efluentes da refinaria, que pode ter sido resultado do efeito sinérgico entre os efluentes da refinaria e compostos/substâncias químicas, previamente, existentes nas águas do Rio Atibaia.

A C-metáfase (figura mitótica com cromossomos condensados distribuídos aleatoriamente e com ausência de fuso) foi originalmente observada após tratamento de células com concentração suficientemente alta de colchicina. Esse tipo de anormalidade mitótica pode, as vezes, levar a formação de núcleos poliplóides, embora o resultado mais freqüente seja a formação de vários micronúcleos (KIRSCH-VOLDERS, 2002).

Nas C-metáfases ou C-mitoses, o fuso nuclear é completamente inativado, o que significa que nenhuma placa equatorial torna-se organizada e, conseqüentemente, a divisão do centrômero é atrasada. Desta forma, um tratamento C-metafásico contínuo conduziria a uma duplicação do número de cromossomos das células que passam por mitose. Como efeito da C-metáfase, temos também a produção de números cromossômicos variáveis, decorrendo na produção de células com números superiores e inferiores àquelas originadas em ciclo celular. Então, um desvio muito grande em relação ao número normal induzirá um desbalanço cromossômico, com perda da viabilidade, inativação parcial ou completa do fuso nuclear e um aumento da contração cromossômica. A C-metáfase deve ser referida como um mecanismo causador de sérios danos, podendo ser incluída entre os parâmetros utilizados para avaliação dos efeitos genotóxicos (FISKEJÖ, 1985; FISKEJÖ, 1993c).

C-metáfases, anáfases multipolares, cromossomos perdidos, atrasos cromossômicos e poliploidia são fenômenos que podem ser derivados de problemas com os microtúbulos (microtúbulos interrompidos ou desenvolvidos de forma incompleta), uma vez que essas estruturas são importantes componentes do fuso mitótico e os fusos são responsáveis pela segregação correta dos cromossomos para as células filhas (VIDAKOVIC-CIFREK et al., 2002).

Anáfases multipolares e com cromossomos perdidos são conseqüências de C-metáfases fracas e podem levar a aneuploidia (KOVALCHUCK et al., 1998).

De acordo com Fiskejö e Levan (1993), Marcano & Del Campo (1995) e por Marcano et al. (1998), aderência cromossômica é um sinal comum da influência tóxica

nos cromossomos e decorre, provavelmente, em um efeito irreversível para a célula. A aderência é um tipo de anormalidade que envolve a matriz protéica do material cromatínico e não, propriamente, a molécula de DNA. A aderência cromossômica, por ser um processo irreversível, geralmente promove a morte da célula (FISKEJÖ, 1988; FISKEJÖ, 1995; FISKEJÖ, 1997).

A formação de pontes anafásicas, rupturas nos cromossomos, cromossomos perdidos (não migração das cromátides) e cromossomos que não sofreram disjunção (cromátides que não se separaram) são fenômenos que podem ocorrer como conseqüência da aderência (MARCANO, 2004). Neste caso, os cromossomos permanecem unidos e, quando separados, podem levar a ruptura ou perda dos cromossomos (MARCANO et al., 1999), bem como a aneuploidia e a poliploidia (FISKEJÖ, 1985). Quando as pontes cromossômicas resultam de rearranjos estruturais, são acompanhadas de fragmentos cromossômicos (GIACOMELLI, 1999).

Segundo Rank e Nielsen (1997) e Fernandes (2005) a presença de anáfases multipolares ocorre devido ao mau funcionamento do fuso mitótico, que distribui os cromossomos irregularmente, encaminhando-os para mais de dois pólos das células, contrariamente ao que ocorre em células de divisão celular normal.

Segundo Fiskejö (1993a), os fragmentos cromossômicos podem ser derivados de quebras cromossômicas que aparecem em decorrência de pontes anafásicas. Essas pontes podem ser originadas de translocações cromossômicas coesivas.

Micronúcleos podem aparecer em células que passaram pelo processo de divisão, onde houve a ocorrência de fragmentos cromossômicos, derivados de quebras cromossômicas e/ou de cromossomos inteiros que não foram levados pelos fusos aos pólos celulares, durante a mitose. Na telófase, esses fragmentos ou cromossomos inteiros são encapsulados em um núcleo menor e separado do núcleo principal, razão pela qual recebe o nome de "micronúcleo" (KIRSCH-VOLDERS, 2002).

Como os micronúcleos podem se originar, segundo Sudhakar et al. (1998), de um atraso cromossômico na anáfase, caracterizado por um mau funcionamento do fuso ou por fragmentos acêntricos, derivados de uma resposta clastogênica, podemos inferir que os agentes químicos podem induzir micronúcleos, por meio de distúrbios provocados no fuso ou pela promoção de quebras cromossômicas.

A poliploidia, evento que origina células com várias cópias do conjunto cromossômico (exemplo 3N e 4N), pode ser induzida pela ausência de fuso mitótico funcional e uma conseqüente falha na migração das cromátides para os pólos. Esse processo, conhecido como retardo mitótico (ELHAJOUJI et al., 1998), produz células 4N e 4C (onde C corresponde ao conteúdo haplóide do DNA de uma espécie). Outros mecanismos de poliploidia são a falha da citocinese ou a fusão nuclear de células binucleadas (KIRSCH-VOLDERS, 1998).

Para o teste de micronúcleo e de anormalidades nucleares em sistema teste de *Oreochromis niloticus* foram observados os eritrócitos portadores destas alterações. As alterações nucleares, observadas nos eritrócitos dos peixes expostos as águas derivadas dos pontos de coleta, podem ser consideradas aberrações nucleares, as quais são bastante comuns, segundo Carrasco et al. (1990), em organismos submetidos à exposição de agentes químicos.

Nossos dados demonstraram que as amostras de água derivadas do ponto 6 (após o tratamento físico-químico e antes do tratamento bacteriológico), do ponto 2 (entrada da lagoa de estabilização da REPLAN) e do ponto 3 (saída da lagoa de estabilização-água destinada aos despejos no Rio Atibaia), possuem capacidade de interferir, ocasionalmente, no material genético dos organismos expostos, induzindo a formação de micronúcleos e de anomalias nucleares. O ponto 6 apresentou o maior potencial de mutagenicidade, seguido do ponto 2 e do ponto 3, respectivamente.

A indução de micronúcleos, segundo Schmid (1976) e Al-Sabti e Metacalfe (1995), pode estar relacionada com atrasos cromossômicos durante a anáfase, caracterizados por um mau funcionamento do fuso, ou devido à presença de fragmentos acêntricos.

Os mecanismos exatos da ação dos compostos químicos sobre os núcleos das células, na promoção de formação de alterações nucleares (células com núcleo “lobed”, células com núcleo “notched”, células com núcleo “broken-eggs” e células com núcleo “blebbed”) ainda não são bem conhecidos, sendo então necessária a intensificação desses estudos específicos, para que possa haver uma melhor compreensão da formação dessas alterações.

Segundo Ghadially (1982), a lesão do tipo “notched” deve estar, provavelmente, associada às aneuploidias. Segundo Canevari (1996), as células binucleadas podem

surgir pela dificuldade da formação de fuso mitótico, ocasionada pela ação aneugênica de compostos químicos.

Os dados referentes a todos os ensaios aqui apresentados demonstram um alto potencial de citotoxicidade, genotoxicidade e de mutagenicidade das águas do ponto 6 (após o tratamento físico-químico e antes do tratamento bacteriológico). As águas do ponto 2 (entrada da lagoa de estabilização da REPLAN) e do ponto 3 (saída da lagoa de estabilização-água destinada aos despejos no Rio Atibaia) apresentaram potencial alto de citotoxicidade, genotoxicidade e de mutagenicidade, porém menor que o do ponto 6. As águas derivadas do ponto 1 (montante do Rio Jaguarí - acima da captação da água utilizada pela refinaria) apresentaram os menores potenciais de indução de citotoxicidade, genotoxicidade e de mutagenicidade, comprovando que as águas deste rio, pelo menos no ponto onde se realizaram as coletas, possuem boa qualidade.

As águas derivadas do ponto de coleta número 4 (1 Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia) apresentaram potencial de indução de citotoxicidade, genotoxicidade e de mutagenicidade mais elevados que o observado para o ponto 1, o que demonstra que as águas derivadas desse ponto de coleta já possuem perturbação das suas características, o que leva a um comprometimento da sua qualidade. Após o despejo do efluente da refinaria (ponto 5 - 1 Km a jusante do ponto 3) observou-se um aumento no potencial de citotoxicidade, genotoxicidade e de mutagenicidade das águas do rio Atibaia, o que faz com que se infira que, apesar da eficiência dos processos de tratamento de efluentes realizados pela refinaria, deve haver um processo sinérgico entre os compostos existentes no efluente da refinaria e compostos químicos existentes nas águas do rio Atibaia, visto que esse rio recebe também despejo de outras atividades industriais, além da refinaria de petróleo, efeito este confirmado pelos outros testes aplicados neste estudo.



## 8. CONCLUSÃO

---

- as análises realizadas para os diferentes pontos de coleta relacionados com as atividades da refinaria de petróleo da cidade de Paulínia - SP, mostraram que houve uma maior indução dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos no ponto 6 (após o tratamento físico-químico e antes do tratamento bacteriológico), seguidos do ponto 2 (entrada da lagoa de estabilização da REPLAN), ponto 3 (saída da lagoa de estabilização-água destinada aos despejos no Rio Atibaia), ponto 5 (1 Km a jusante do ponto 3), ponto 4 (1 Km a montante do ponto 3, no Rio Atibaia) e ponto 1 (montante do Rio Jaguarí - acima da captação da água utilizada pela refinaria), pelos testes realizados com *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*;
- os tratamentos realizados pela refinaria, com a intenção de melhorar a qualidade dos seus efluentes, parecem ser eficientes, embora ainda deva haver a persistência de algumas substâncias que tenham algum efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico sobre os organismos expostos;
- as águas do rio Atibaia já apresentam qualidade comprometida antes mesmo do despejo do efluente da refinaria, o que indica que deve haver uma contaminação anterior neste rio, dada por efluentes domésticos ou de outras indústrias;
- o tratamento biológico realizado pela refinaria parece ser bastante efetivo, pois podemos observar uma significativa diminuição dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do efluente, após a passagem dos mesmos por esse tratamento;

- o efluente do ponto 6 foi o que apresentou uma característica extremamente tóxica, pois promoveu a morte de peixes quando estes foram submetidos aos ensaios com o efluente puro, ou seja, sem qualquer diluição;
- além da promoção da morte dos peixes, o efluente do ponto 6 promoveu altos índices de morte celular, tanto em células meristemáticas de *Allium cepa* (cebola) como em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (tilápia);
- os efluentes de refinaria possuem tanto substâncias aneugênicas (promoveu alteração do número cromossômico em células meristemáticas de *Allium cepa*) como clastogênicas (promoveu a quebra de cromossomos de células meristemáticas de *Allium cepa* e o surgimento de micronúcleos tanto em células de *Allium cepa* como de *Oreochromis niloticus*);
- não houveram diferenças significativas entre os resultados das diferentes coletas, para cada ponto, durante o período de estudo, mostrando que os efluentes de refinaria impactam o recurso hídrico onde faz seus despejos, independentemente da estação do ano;
- a técnica de morte celular, utilizando corante vitais, parece ser uma boa e eficiente ferramenta para estudos de citotoxicidade de poluentes ambientais.
- o efeito danoso do efluente da refinaria parece ser acentuado pelo sinergismo com outros efluentes lançados no rio Atibaia, o que acaba comprometendo a sua qualidade e aumentando, ainda mais, os seus potenciais efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos.

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ABDOU, R.F.; MEGALLA, A. M.; MOHARRAM, K.M.; ABDEL-GAWAD, T.H.I.; SHERIF, M. A. L.; EL-SYED; LOTTFY, A. E. Cytological effects of fungal metabolites produced by fungi isolated from Egyptian poultry feedstuffs. **J. Basic Microbiol.**, **29**: 131-139. 1989.

AL-SABTI, K. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. **Cytobios**, Cambridge, v. 47, p. 147-154. 1986.

AL-SABTI, K.; KURELEC, B. Chromosomal aberration in onion (*Allium cepa*) induced by water chlorination by-products. **Archives of Environmet Contamination and Toxicology**, New York, v.34, p. 80-88, 1985.

AL-SABTI, K. *Allium* test for air and water borne pollution control. **Cytobios**, Cambridge, v.59, p. 71-78, 1989.

AL-SABTI, K.; FRANKO, M.; ANDRIJANIC, B.; KNEZ, S.; STEGNAR, P. Chromium-induced micronuclei in fish. **Journal of applied toxicology**, Chichester, v. 13, n. 5, p. 333-336, 1994.

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

ALVES, M.N. **Aplicação de bioensaios bacterianos para determinação da toxicidade aguda de efluentes industriais e corpos de água receptores**. 1990. [s.n.]. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

ALVES-COSTA, J.R.M. **Biomarcadores de contaminação em peixes d água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus***. 2001. [s.n.]. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ANTHONY, R.G.; HUSSEY, P.J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 112-116, 1999.

ARRIGONI, O.; BITONTI, M.B.; COZZA, R.; INNOCENTI, A.M.; LISO, R.; VELTRI, R. Ascorbic acid effect on pericycle cell line in *Allium cepa* root. **Caryologia**, v. 42, p. 213-216, 1989.

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

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

ANDERSON, D.; YU, T-W; MCGREGOR, D.B. Comet assay responses as indicators of carcinogenic exposure. **Mutagenesis**, New York, v. 13, p. 539-555, 1998.

BERGGREN, D.; FISKEJÖ, G. Aluminum toxicity and speciation in soil liquids-experiments with *Allium cepa*. **Environmental and Toxicological Chemistry**, Pensacola, v. 6, p. 771-779, 1987.

BERTOLETTI, E. **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental: ensaios biológicos com organismos aquáticos e sua ação no controle da poluição de São Paulo**. 1 ed. Brasil: [s.n.], 1996. 29p.

BETTI, C.; BARALE, R.; POOL-ZOBEL, B.V.L. Comparative studies on cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats. **Environment and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 22, p. 173-180, 1993.

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

BORBOA, L.; DE LA TORRE, C. The genotoxicity of Zn(II) and Cd(II) in *Allium cepa* root meristematic cells. **New Phytology**, v. 134, p. 481-486, 1996.

BRANA, C.; BENHAM, C.; SUNDSTROM, L. A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. **Brain Research Protocols**, v. 10, p. 109-114, 2002.

BRANCOLINI, C.; LAZAVERIC, D.; RODRIGUEZ, J.; SCHNEIDER, C. Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to caspase-dependent proteolytic cleavage of beta-catenin. **Journal of Cell Biology**, v. 139, p. 759-771, 1997.

BRUNET, C.L.; GUNBY, R.H.; BENSON, R.S.; HICKMAN, J.A.; WATSON, A.J.; BRADY, G. Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers. **Cell Death and Differentiation**, v. 5, p. 107-115, 1998.

BROWN, S.B.; BAILEY, K.; SAVILL, J. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. **Biochemistry Journal**, v. 323, p. 233-237, 1997.

BURGEOT, T.; HIS, E.; GALGANI, F. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for detection of seawater genotoxicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 345, p. 1-16, 1995.

CANEVARI, R.A. Avaliação dos efeitos genotóxicos e diâmetro dos micronúcleos obtidos em *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) submetidos a tratamentos agudos com o inseticida azodrin e o herbicida trifluralina. 1996. [s.n.]. Monografia (Bacharelado em Biologia Geral) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CARDONE, M.H.; SALVESEN, G.S.; WIDMANN, C.; JOHNSON, G.; FRISCH, S.M. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. **Cell**, v. 90, p. 315-323, 1997.

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

CASIANO, C.A.; MARTIN, S.J.; GREEN, D.R.; TAN, E.M. Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1) – mediated T cell apoptosis. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 765-770, 1996.

CHANG, L.W.; MEIER, J.R.; SMITH, M.K. Application of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of a lead-contaminated soil. **Archives of Environment Contamination and Toxicology**, New York, v. 32, p. 166-171, 1997

CHAUHAN, J.K.S.; SUNDERARAMAN, V. Effect of substituted ureas on plant cells. I. Cytological effects of isoproturon on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Cytologia**, v.55, p. 91-98. 1990.

CHAUHAN, L.K.S, SAXENA, P.M., GUPTA, S.K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environment and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 42, p. 181-189, 1999.

CLAXTON, L. D.; HOUK, V. S.; HUGHES, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 410, n. 3, p. 237-243, 1998.

CONSTANTIN, M.J.; OWENS, E.T. Introduction and perspective of plant genetic and cytogenetic assays. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, p. 13-36, 1982.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J-F.; FÉRARD, J-F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*- micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, p. 161-171, 1999.

COTTER, T.G.; LENNON, S.V.; GLYNN, J.M.; GREEN, D.R. Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. **Cancer Research**, Baltimore, v. 52, p. 997, 1992.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G. GORCZYCA, W.; HOTZ, M.A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, p. 795, 1992.

DARZYNKIEWICZ, Z.; JUAN, G.; LI, X.; GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, F. Cytometry in cell necrobiology: análisis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). **Cytometry**, v. 27, p. 1, 1997.

DAS, R.K.; NANDA, N.K. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin-C and paper mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 175, p. 67-71, 1986.

DASGUPTA, A.; ZDUNEK, T. In vitro lipid peroxidation of human serum catalyzed by cupric ion: antioxidant rather than prooxidant role of ascorbate. **Life Sciences**, v. 50, p. 875-882, 1992.

DEGRASSI, F.; RIZZONI, M. Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 97, p. 19-33, 1982.

DE MARCO, A.; PALGIALUNGA, S.; RIZZONI, M.; TESTA, A.; TRINCA, S. Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated with heavy metals (cadmium and chromium) in the presence of NTA. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 206, p. 311-315, 1988.

DE-SERRES, F.J. Preface: Higher plants as effective monitors of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 270, n. 1, p. 1-3, 1992.

DEVAUX, P.F. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. **Biochemistry**, v. 30, p. 1163-1173, 1991.

DIXIT, G.B.; NERLE, S.K. Cytotoxic effects of industrial effluents on *Allium cepa* L. **Geobios**, v. 12, p. 237-240, 1985.

ELHAJOUJI, A.; CUNHA, M.; KIRSCH-VOLDERS, M. Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. **Mutagenesis**, v. 13, p. 193-198, 1998.

EL-KHODARY, S.; HABIB, A.; HALIEM, A. Effects of the herbicide tribunil on root mitosis of *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 55, p. 209-215, 1990.

EVSEEVA, T.I., KHRAMOVA, E.S. Action of low concentration of  $^{232}\text{Th}$  on *Tradescantia* (clone 02) and meristematic root tip cells of *Allium cepa*. In: **Proceedings of the Fifth International Conference on High Levels of Natural Radiation and Radon Areas**, Munich, pp. 489-491. 2002.



EVSEEVA, T.I.; GERAS'KIN, S.A. SHUKTOMOVA, I.I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 68, p. 235-248, 2003.

FADOK, V.A.; VOELKER, D.R.; CAMPBELL, P.A.; COHEN, J.J.; BRATTON, D.L.; HENSON, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 2207-2216, 1992.

FELLENBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental**. São Paulo, EDUSP, 1980, 196 p.

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

FERNANDES, T.C.C. **Uso do teste de *Allium cepa* na detecção da toxicidade e genotoxicidade do herbicida trifluralina**. 2002. [s.n.]. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

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

FISKEJÖ, G. Mercury and selenium in a modified *Allium* test. **Hereditas**, v. 64, p. 142-146, 1979.

FISKEJÖ, G.; LASSEN, C.; RENBERG, L. Chlorophenoxyacetic acids and chlorophenols in the modified *Allium* test. **Chemico-Biological Interactions**, v. 34, p. 333-344, 1981.

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

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

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

FISKEJÖ, G. The *Allium* test – a potential standard for the assessment of environmental toxicity, in : J.W. Gorsuch, (Ed.), ASTM (American Society of Testing Materials) Special Technical Publication 1216. **Environ. Toxicol. Risk Assessment**, pp. 331-345. 1993a.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test in wastewater monitoring. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v. 8, p. 291-298, 1993b.

FISKEJÖ, G. Technical Methods Section. *Allium* test I: A 2-3 Day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 8, p. 461-470, 1993 c.

FISKEJÖ, G. *Allium* test. **Meth. Mol. Biol.**, v. 43, p. 119-127, 1995.

FRANEKIC, J.; BRATULIC, N.; PAVLIKA, M.; PAPES, D. Genotoxicity of thiocarbamates and their metabolites. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 325, p. 65-74, 1994.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEM-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cell Biology**, v. 119, p. 493-501, 1992.

GHADIALLY, F.N. **Ultrastructural pathology of the cell and matrix**. 2nd. Ed. Butterworths, London, UK, 971p. 1982.

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

GRANT, W. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Genotox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 281, p. 89-92, 1982.

GRANT, W. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 310, p. 175-85, 1994.

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

GROVER, I.S.; DHINGRA, A.K.; ADHIKARI, N.; LADHAR, S. S. Genotoxicity of pesticides - a comparative study using a battery of assays. **Nucleus**, v.31, p. 69-77, 1988.

GROVER, I.S.; DHINGRA, A.K.; ADHIKARI, N.; LADHAR, S.S. Genotoxicity of pesticides, in : MENDELSON, R.J. Albertini (eds), **Mutation and the Environment: Part E**, Wiley Liss, Nova York, 1990, pp. 91-106.

GROVER, I.S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, p. 183-188, 1999.

GULATI, A.; PRAKASH, S.; GUPTA, S.P. Genotoxicity testing for relative efficiency of selected pesticides on *Allium cepa*. **Journal of Environment Biology**, v. 12, n.2, p. 89-95, 1994.

HANSEN, A.L.; GERTZ, A.; JOERSBO, B.; ANDESREN, S.B. Antimicrotubule herbicide for in vitro chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. **Euphytica**, Wageningen, v. 101, p. 231-237, 1998.

HARSHBARGER, J. C.; CLARK, J., B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of north-america. **Science of the total environment**, Amsterdam, v. 94, n. 1-2, p. 1-32, 1990.

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

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; IRKHART, B.; MACGREGOR, J. T. E.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity – a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.

HEPLER, P.K.; WAYNE, R.O. Calcium and plant development. **Ann. Rev. Plant.**, v. 36, p. 397-439, 1985.

HEPLER, P.K. Calcium and mitosis. **International Review of Cytology**, v. 2, p. 1273-1282, 1992.

HERTEL, C.; QUADER, H.; ROBINSON, D.G.; ROOS, I.; CARAFOLI, E.; MARME, D. Herbicides and fungicides stimulate Ca<sup>2+</sup> efflux from rat liver mitochondria. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 37-39, 1981.

HOOFTMAN, R. N.; DE RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 104, n. 1-3, p. 147-152, 1982.

HOSE, J.E.; HANNAH, J.B.; PUFFER, H.W.; LANDOLT, M.N. Histologic and skeletal abnormalities in benzo(a)pyrene-treated rainbow trout alevins. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 13, p. 675-684, 1984.

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

HOSHINA, M.M. **Avaliação 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***. 2002. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP.

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

HUGHES, J.B.; HEBERT, A.T. Erythrocyte micronuclei in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and in Long Island Sound. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 20, p. 474-479, 1991.

HUPERTZ, B.; FRANK, H-G.; HAUFMANN, P. Cell death. **Anatomy and Embriology**, Roma, v. 200, p. 1, 1999.

JUNGCLAUS, G.A.; LOPEZ-ÁVILA, V.; HITERS, R.A. Organic compounds in an industrial wastewater: a case study of their environmental impact. **Environ. Sci. Technol.**, **12**: 88-96. 1978.

KAYALAR, C.; ORD, T.; TESTA, M.P.; ZHONG, L.T.; BREDESEN, D.E. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse Dnase I inhibition. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **93**: 2234-2238. 1996.

KAIUOMOVA, D.; SÜSAL, C.; OPELZ, G. Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Human Immunology**, Heidelberg, Germany, v. 62, p. 64-74, 2001.

KAK, S.N.; KAUL, B.L. Interaction of hyperthermia with gamma rays in *Allium cepa* cells. **Indian J. Exp. Biol.**, **27**: 98-99. 1989.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. Journal Cancer**, [S.l.], v. 26, p. 239-257, 1972.

KERR, J.F.R.; WINTERFORD, C.M.; HARMON, B.V. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, p.2013-2026. 1994.

KHORS, S.S., PANDA, K.K., PANDA, B.B. Genotoxicity of tetrodotxin from buffer fish tested in root meristem cells of *Allium cepa* L. **Mutagenesis**, v. 12, p. 265-9, 1997.

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

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

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; KUJITEN, G.A.M.; KEEHNEN, R.M.J.; PALS, S.T.; VAN OERS, M.H.J Annexin V for flow cytometric detection of

phosphatidylserine expression on B cell undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, p.1415-1420. 1994.

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

KROEMER, G.; ZAMZAMI, N.; SANTOS, A.S. Mitochondrial control of apoptosis. **Immunol. Today**, v.18, p. 44. 1997.

KUMAR, D.; SINHA, S.P. Threshold dose of cytogenetic toxicity of Lindane, Malthion and Metacid in *Allium cepa* root-tip cells. **Cytologia**, v. 54, p. 547-552. 1989.

KUMAR, S.; DUTA, L.P; ZINYU, R. Toxic effects of soots on root meristems of *Allium cepa*. **J. Environ. Biol.**, v. 12, p. 31-35. 1991.

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

LAZEBNIK, Y.A.; COLE, S.; COOKE, C.A.; NELSON, W.G.; EARNSHAW, W.C. Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. **J. Cell Biol.**, **123**: 7-22. 1993.

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

LEIST, M.; SINGLE, B.; CASTOLDI, A.F.; KÜHNLE, S.; NICOTERA, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 1481. 1997.

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

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

LIU, D.; JIANG, W.; WANG, W.; ZHAI, L. Evaluation of metal ion toxicity on root tip cells by the *Allium* test. **Israel Journal of Plan Science**, v. 43, p.125-133. 1995.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Bulletin of Marine Pollutants**, v. 42, p. 656-666. 2001.

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

MAcCARTHY, N.J.; WHYTE, M.K.B.; GILBERT, C.S.; EVAN, G.I. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. **Journal of Cell Biology**, v. 136, p. 215-227, 1997.

MAENO, E.; ISHIZAKI, Y.; KANESIK,T.; HAZAMA, A.; OKADA, Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation in early prerequisite to apoptosis. **PNAS**, v. 97, n. 17, p. 9487, 2000.

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



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

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

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

MARTIN, S.J.; GREEN, D.R. Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts? **Cell**, v. 82, p. 349-352, 1995.

MARTIN, S.J.; FINUCANE, D.M.; AMARANTE-MENDES, G.P.; OBRIEN, G.A.; GREEN, D.R. Phosphatidylserine externalization during CD-95 induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 28753-28756, 1996.

MASHIMA, T.; NAITO, M.; NOGUCHI, K.; MILLER, D.K.; NICHOLSON, D.W.; TSURUO, T. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. **Oncogene**, v. 14, p. 1007-1012, 1997.

MATSUMOTO, S.T., HOSHINA, M.M., SPINOSA, W., MARIN-MORALES, M.A. Análise citogenética de populações de *Eichornia* sp (Pontederidaceae) em regiões de diferentes atividades antrópicas da bacia do Rio Tietê. IN: 46º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia/SP, 2000.

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

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

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; MARIA, S.S. in CARVALHO, F.H.; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A célula 2001**, 1. ed. Campinas/Brasil: Manole, 2001. 275p.

MESSAM, C.A.; PITTMAN, R.N. Asynchrony and commitment to die during apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 238, p. 389-398, 1998.

MILLS, J.C.; STONE, N.L.; ERHARDT, J.; PITTMAN, R.N. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. **Journal of Cell Biology**, v. 140, p. 627-636, 1998.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 367, n. 4, p. 245-251, 1996.

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

MONTEITH, D.K.; VANSTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of the DNA damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 345, n. 3-4, p. 97-103, 1995.

MORAES, D.S.L. **Avaliação dos potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de *Allium cepa*.** 158 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR. 2000.

MORRIS, R.G.; HARGREAVES, A.D.; DUVAL, E.; WYLLIE, A.H.; Hormone-induced cell death. II. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. **American Journal of Pathology**, v.115, p. 426-436, 1984.

NANTHAWAN, A.; RAINOWITS, C.; MOISEEVA, E.; RINKEVICH, B. Genotoxicity of Kishon River, Israel: the application of an *in vitro* cellular assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 518, p. 21-37, 2002.

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

NEHLS, S.; SEGNER, H. Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-W1, using the comet assay. **Environmental Toxicology**, v. 16, p. 321-329. 2001.

NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, p. 299-306, 1997.

NIELSEN, M.N.; RANK, J. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of *Allium* test. **Hereditas**, v. 121, p. 249-254, 1994.

ORMEROD, M.G.; SUN, X.M.; SNOWDEN, R.T.; DAVIES, R.; FEARNHEAD, H.; COHEN, G.M. Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes: a flow cytometric study. **Cytometry**, v. 14, p. 595, 1993.

ORTH, K.; CHINNAYN, A.M.; GARG, M.; FROELICH, C.J.; DIXIT, V.M. The CED-3/ICE like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 16443-16446, 1996.

OSHIMI, Y.; OSHIMI, K.; MIYAZAKI, S. Necrosis and apoptosis associated with distinct  $\text{Ca}^{2+}$  response patterns in target cell attacked by human natural killer cells. **Journal of Physiology**, v. 495, p. 319, 1996.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 70, p. 58-169, 1967.

PALOMBA, L.; SESTILI, P.; COLUMBARO, M.; FALCIERI, E.; CANTÓN, O. Apoptosis and necrosis following exposure of U937 cells to increasing concentrations of hydrogen peroxide: the effect of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor 3-aminobenzamide. **Biochem. Pharmacol.**, v. 58, p. 1743. 1999.

PANDA, K.K.; MAHESWAR, L.; PANDA, B.B. Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. **Sci. Total Environ.**, v. 96, p. 281-296, 1990.

PAVLICA, M.; PAPES, D.; NAGY, B. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 263, p. 77-81, 1991.

PETIT, P.X.; LECOEUR, H.; ZORN, E.; DAUGUET, C.; MIGNOTTE, B.; GOUGEON, M.L. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. **Journal of Cell Biology**, v. 130, p. 157, 1995.

PITTMAN, S. GEYP, M.; FRASER, M.; ELLEM, K.; PEASTON, A.; IRELAND, C. Multiple centrosomal microtubule organizing centers and increased microtubule stability are early features of VP-16 induced apoptosis in CCRF-CEM cells. **Leukemia Research**, v. 21, n. 6, p. 491-499, 1997.

PORTE, C.; ALBAIGÉS, J. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans, and fishes. **Archives of Environment Contamination and Toxicology**, v. 26, p. 273-281, 1993.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, Washington, v. 246, n. 4928, p.352-358, 1989.

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

QUINZANI - JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátidas hermanas.** 1987. 276 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade de Complutense, Madrid.

RAFF, M. Cell suicide: A beginner's guide to apoptosis. **Simpósio das Sociedades Brasileiras de Microscopia e Microanálise e de Biologia Celular: Envelhecimento e morte celular; quantificação em microscopia:** Resumos, [S.l.], p. 26-36, 1998.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Introduction. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**, New York: Hemisphere, 1985. p.1-28.

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

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

RANK, J., NIELSEN, M.H. *Allium cepa* anaphase- telophase root tip chromossome aberration assay on N-methyl-N-Nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfone. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 390, p. 121-7, 1997.

RANK, J., NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromossome aberration assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 418, p. 113-9, 1998.

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

RAO, B.V. Cytological effects of Pendimithalin in *Allium cepa* root meristems. **Cell Chromosome Research**, v. 12, p. 57-59, 1989.

RUDEL, T.; BOKOCH, G.M. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. **Science**, v. 276, p. 1571-1574, 1997.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLANDER, A. **Chemical Mutagens: Principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, 1976, p. 31-53.

SCHULL, W.J. **Mutation** (Second Conference on Genetics) The University of Michigan Press Ed. 248p. 1962.

SHROIT, A.J.; ZWAAL, R.F.A. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1071, p. 313-329, 1991.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. 1 ed. Brasil: Alcance, 2003. 422 p.

SINGH, R.M.; SHARMA, A.; SARBHOY, R.K. Cytogenetical effects of agricultural chemical in onion (*Allium cepa L.*). **International Journal of Tropical Plant Disease**, v. 8, p. 225-229, 1990.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 368, p. 171-179, 1997.

SOLARY, E.; BERTRAND, R.; KOHN, J.W.; POMMIER, Y. Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated IIL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. **Blood**, v. 81, p. 1359-1368, 1993.

SREE, K.R.; VERHOEVEN, H.A.; DIJKHUIS, P. Mitotic dynamics of micronuclei induced by amiprofos-metyl and prospects for chromosome-mediated gene transfer in plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 75, p. 575-584, 1988.

STALDEMANN, C.; LASSMANN, H. Detection of apoptosis in tissue sections. **Cell Tissue Research**, Berlin, v. 301, p. 13-31, 2000.

STAHL, R.G. The genotoxicity of organic compounds in natural waters and waste waters. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v. 22, p. 94-125, 1991.

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

SUDHAKAR, D.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Biomonitoring of low levels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 203, p. 11-21, 1998.

TAS, J.; WESTERNENG, G. Reagent for the fluorescent staining of nucleic acids. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Stanford, v. 29, p. 929, 1981.

TICE, R.R.; IVETT, J.L. Cytogenetic analysis of bone marrow damage. In: **Toxicology of the blood and bone marrow**, 1 ed. Estados Unidos: Raven Press of New York, 1985, 140p.

TICE, R.R.; ANDREWS, P.W.; SINGH, N.P. The single cell gel assay. A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: B.M. Suntherland and A.D. Wordhead (Eds) **DNA damage and repair in human tissues**. New York: Plenum, 1990.

TIMBRELL, J.A. **Introduction to Toxicology**. 2<sup>a</sup>. Ed. Taylor & Francis Ed. 167p. 1999.

UMEDA, M.; EMOTO, K. Membrane phospholipid dynamics during cytokinesis: regulation of actin filament assembly by redistribution of membrane surface phospholipid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 101, p. 81-91, 1999.

VANAGS, D.M.; PORN-ARES, M.I.; COPPOLA, S.; BURGESS, D.H.; ORRENIUS, S. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 31075-31085, 1996.

VEGA, M.M., FERNANDEZ, T.B., TARAZONA, J.V., CASTAÑO, A. Biological and Chemical Tools in the Toxicological Risk Assessment of Jarama River, Madrid, Spain. **Environmental Pollution**, v. 93, n. 2, p. 135-139, 1996.

VENTURA, B.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos da atrazina usando sistema-teste de *Allium cepa***. 2002. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP.

VENTURA, B.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2004.



VERHOVEN, B.; SCHLEGEL, R.A.; WILLIAMSON, P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 1597-1601, 1995.

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. **J. Immunol. Methods**, v. 184, n.1, p. 39, 1995.

VIDAKOVIC, Z.; PAPES, D.; TOMIC, M. Toxicity of waste drilling fluids in modified *Allium* test. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 69, p. 413-423, 1993.

VIDAKOVIC-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPES, D. Cytogenetic Damage in Shallot (*Allium cepa*) Root Meristems Induced by Oil Industry "High-Density Brines". **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 43, p. 284-291, 2002.

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

WALKER, P.R.; PANDEY, S.; SIKORSKA, M. Degradation of chromatin in apoptotic cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 2, p. 97, 1995.

WEN, L.P.; FAHRNI, J.A.; TROIE, S.; GUAN, J.L.; ORTH, K.; ROSEN, G.D. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 26056-26061, 1997.

WHITE, P.A., RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, Amsterdam, v.410, p.223-236, 1998.

WILLINGHAM, M.C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Stanford, v. 41, p. 7-19, 1999.

WOODLE, E.S.; KULKARNI, S. Cell death. **Transplantation**, New York, v. 66, p. 681, 1998.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, [S.1.], v. 68, p. 251-306, 1980.

WYLLIE, A.H. Cell death: A new classification separating apoptosis from necrosis. In: **Cell death in Biology and Pathology** (BOWDEN, I.D. & LOCKSHIN, R.A., Eds.). p.9. Chapman & Hall, Londres. 1980.

ZACHOWSKI, A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: Transverse asymmetry and movement. **Biochemistry Journal**, v. 294, p. 1-14, 1993.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R.A. Cell death during development. **Journal of Immunological Methods**, [S.1.], v. 265, p. 3-20, 2002.

ZAMAI, L.; CANONICO, B.; LUCHETTI, F.; FERRI, P.; MELLONI, E.; GUIDOTI, L.; CAPPELLINI, A.; CUTRONEO, G.; VITALE, M; PAPA, S. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis in adherent cells. **Cytometry**, v. 44, p. 57, 2001

ZHAO, J.; ZHOU, Q.; WIEDMER, T.; SIMS, P.J. Level of expression of phospholipid scramblase regulates induced movement of phosphatidylserine to the cell surface. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 6603-6606, 1998.

ZHENG, T.S.; FLAVELL, R. A.; Divinations and surprises: genetic analysis of caspase function in mice. **Experimental Cell Research**, v. 256, p. 67, 2000.

## **10. ANEXO**

---

## **ANEXO 1**

### **Padrões de qualidade de água para a saúde pública e classificação das águas.**

De acordo com a origem, características, componentes, destino e uso das águas de ambientes lóticos, foram estabelecidos padrões para a classificação das águas. A resolução CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) nº 20 de 18 de junho de 1986, estabeleceu, no estado de São Paulo, critérios de classificação das águas doces, salobras e salinas:

Classe Especial: destinadas ao abastecimento doméstico em estado natural, sem prévia ou simples desinfecção, preservando o equilíbrio nas comunidades aquáticas, com restrições a presença de coliformes e qualquer outro tipo de rejeitos.

Classe 1: destinadas ao abastecimento doméstico após tratamento simplificado de desinfecção, à proteção das comunidades aquáticas, à recreação de contato primário, à irrigação de hortaliças e de frutas cultivadas rente ao solo e consumidas cruas e a aquicultura de espécies destinadas à alimentação humana, com padrões de qualidade que restringem substâncias lipídicas, microorganismos patogênicos, como coliformes, substâncias orgânicas e inorgânicas, cancerígenas ou tóxicas como metais pesados, biocidas, organoclorados e fosforados, carbamatos, além de substâncias que eliminem odor, formem depósitos e flutuem. Sendo estes padrões estendidos às classes 2 e 3.

Classe 2: destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional, à proteção das comunidades aquáticas, à recreação de contato primário (natação, esqui-aquático e mergulho), à irrigação de hortaliças e plantas frutíferas e à aquicultura.

Classe 3: destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional, à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras, e à dessedentação de animais, usos esses menos exigentes em relação a sua potabilidade.

Classe 4: destinadas à navegação, à harmonia paisagística e aos usos menos exigentes, com padrão de qualidade que restringe apenas aos materiais sedimentáveis, flutuantes e algumas substâncias químicas.

Classe 5 e 6: Águas salinas (alto teor de cloreto de sódio – marinha).

Classe 7 e 8 : Águas salobras (acentuado teor de sais como bicarbonatos, cloretos, nitratos de cálcio e magnésio), sendo diferenciadas pelo tipo de uso à que se destinam.