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

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E
MUTAGÊNICOS DO BTEX, ANTES E APÓS O PROCESSO DE
BIORREMEDIAÇÃO POR MICRORGANISMOS, UTILIZANDO
OS SISTEMAS TESTE DE *Allium cepa* E CULTURA DE
CÉLULAS DE MAMÍFERO.**

DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO

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).

Abril - 2009

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS,
GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DO BTEX, ANTES E
APÓS O PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO POR
MICRORGANISMOS, UTILIZANDO OS SISTEMAS TESTE
DE *Allium cepa* E CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO.**

DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia 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).

Rio Claro

Abril/2009

620.1122 Mazzeo, Dânia Elisa Christofolletti
M477a Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero / Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo. – Rio Claro : [s.n.], 2009

143 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

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

1. Biodegradação. 2. Mutagênese ambiental. 3. Aberrações cromossômicas. 4. Micronúcleo. 5. Ensaio do Cometa. I. Título.

Dedico este trabalho aos
meus queridos pais, Vânia e
Junior e ao meu noivo Eduardo.

“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras.”
(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Expresso meus sinceros agradecimentos:

À minha mãe, por ser um exemplo a ser seguido como mulher, quanto à sua dupla jornada, persistência e dedicação em tudo o que faz e, ao meu pai, um homem íntegro e protetor. Obrigada por estarem sempre presentes, compartilhando, com muito amor, todas as etapas de minha vida.

À minha irmãzinha Bruna por sua companhia, amizade, espontaneidade e alegria.

À minha querida avó Cecília por todos os conselhos, lições de vida, mimos e pela grande torcida para a minha realização profissional e pessoal. Ao meu avô Nelson pela sua simplicidade e grande simpatia.

Ao meu noivo Eduardo, meu grande companheiro e amigo, uma pessoa divertida, paciente, compreensiva e que muito me ajudou na finalização deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales, uma pessoa carismática, de energia contagiante e brilhante pesquisadora, que mesmo sempre muito atarefada, consegue cumprir com perfeição todas as suas obrigações. Agradeço pela orientação neste trabalho, pelos valiosos conhecimentos repassados, pela confiança, apoio e incentivo.

Ao PRH-05, Programa de Formação de Recursos Humanos em Geologia do Petróleo e Ciências Ambientais Aplicadas ao Setor de Petróleo & Gás e de Biocombustíveis (UNESP/MCT/FINEP/ANP) pela bolsa de estudos concedida e pelo suporte financeiro ao projeto.

Ao Prof. Dr. Dimas Dia Brito, pela excelente coordenação frente ao PRH-05 e ao secretário José Maria Cazonatto pelo auxílio com toda a burocracia.

À Profa. Dra. Sílvia Tamie Matsumoto por sua imensa contribuição a este trabalho.

À Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, pelas sugestões e correções dos relatórios.

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho e pelo grande incentivo que tem dado as pesquisas na área de mutagênese ambiental.

Ao Prof. Dr. Carlos Emílio Levy pela grande colaboração prestada.

À Jaqueline Bianchi, por ser a grande responsável pela implementação da metodologia de cultura de células no laboratório de Mutagênese e que, com grande paciência e dedicação, nos ensinou toda a técnica para a realização dos experimentos.

À Thais, pela companhia durante as atividades do PRH-05 e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Márcia, Dani, Bárbara, Jaqueline e ao Matheus, pela ajuda com a cultura de células e com a “maratona do cometa”.

Ao Centro de Estudos Ambientais – CEA, pela disponibilização dos equipamentos necessários para a realização da biorremediação, em especial, à química Francisca de Assis Mattioli Gonçalves pelo acompanhamento do experimento.

Ao Davi Butturi pelo auxílio com as análises estatísticas deste trabalho.

A todos os meus companheiros do laboratório de Mutagênese: Livia, Cristiane, Nádia, Renata, Bárbara, Matheus, Jaque, Jana, Dani, Márcia, Thais, Bruna, Cintya e Tati, que apesar de apresentarem personalidades bem diferentes entre si, constituem um grupo bastante unido e estão sempre dispostos a ajudar.

À Sandra Veloso, técnica do laboratório de Mutagênese, pelo cuidado com o preparo das soluções, pela organização do laboratório, por sua simpatia e alegria.

Aos funcionários, professores e alunos do Departamento de Biologia, por proporcionarem um ambiente de trabalho alegre e prazeroso.

RESUMO

Derivados de petróleo como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) são hidrocarbonetos monoaromáticos muito utilizados como solventes e matéria-prima em diversos processos industriais, além de estarem presentes, em grandes quantidades, nos combustíveis fósseis. Pelo seu amplo uso e alta solubilidade em água, o BTEX vem caracterizando um poluente freqüente das águas, em especial, as subterrâneas. A aplicação do processo de biorremediação parece constituir uma metodologia promissora para o tratamento de águas contaminadas por essa mistura. Testes citogenéticos são adequados e eficientes para identificar e avaliar efeitos danosos de substâncias sobre os organismos, em suas diversas concentrações e tempos de exposição. Neste trabalho foi avaliado o efeito de cinco concentrações do BTEX, antes e após o processo de biodegradação por microrganismos selecionados de efluente bruto de refinaria de petróleo, sobre os sistemas testes de *Allium cepa* e cultura de células HTC. A comparação do total de aberrações cromossômicas e nucleares (alterações genotóxicas) realizada entre as concentrações de BTEX não biodegradadas e biodegradadas revelou uma diminuição significativa destas anormalidades para as concentrações BTEX 1, 2 e 4. As alterações mutagênicas, avaliadas pelo teste do micronúcleo (MN) em células meristemáticas, foram significativas para as concentrações BTEX 1, 2, 4 e 5 não biodegradadas. Ao se comparar as freqüências de MN entre a concentração preparada de BTEX com a sua respectiva concentração biodegradada, observou-se uma redução significativa para as biodegradadas 1 e 4. Não houve indução significativa de MN para as células F₁ para nenhuma das concentrações testadas. O BTEX não provocou nenhum efeito citotóxico significativo para este organismo. O teste do MN realizado com células HTC revelou que o BTEX foi mutagênico, apenas para a maior concentração, tanto antes como após a sua biodegradação. Os danos genotóxicos, avaliado pelo ensaio do cometa, mostrou que o BTEX foi genotóxico para todas as concentrações não biodegradadas, testadas nos ensaios com células HTC, tendo esse potencial reduzido após o processo de biodegradação. Pelos resultados obtidos, podemos afirmar que a mistura BTEX pode promover alterações danosas no material genético de *Allium cepa* e de células HTC. O processo de biodegradação por microrganismos, da mistura aquosa do BTEX, foi eficiente na diminuição dos efeitos genotóxico e mutagênico, indicando que os compostos da mistura foram degradados em metabólitos não tóxicos para as células. Além disso, concluímos que efluentes brutos de refinaria de petróleo podem conter microrganismos capazes de degradar compostos orgânicos, como o BTEX.

ABSTRACT

Oil products as benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) are monoaromatic hydrocarbons widely used as solvents and raw materials in several industrial processes, and are present in large quantities in fossil fuels. By its widespread use and high solubility in water, the BTEX is featuring a common pollutant of water, particularly groundwater. Implementation of the bioremediation seems to be a promising method for treatment of contaminated water with this mixture. Cytogenetic tests are appropriate and efficient to identify and assess the harmful effects of substances on the organisms in their several concentrations and time of exposure. This study evaluated the effect of five BTEX concentrations, before and after the biodegradation process by microorganisms selected from raw sewage from oil refinery using the test systems of *Allium cepa* and HTC cells. The comparison of total chromosomal and nuclear aberrations (genotoxic alterations) performed between BTEX concentrations bioremediated and not bioremediated showed a significant decrease of these abnormalities for BTEX concentrations 1, 2 and 4. Mutagenic alterations, evaluated by the micronucleus test (MN) in meristematic cells, were significant to the BTEX concentrations 1, 2, 4 and 5 not bioremediated. When comparing the frequencies of MN between the prepared concentration of BTEX with its concentration bioremediated, there was a significant reduction for the bioremediated 1 and 4. There was no significant induction of MN to cells F1 to any of the concentrations tested. The BTEX did not cause any significant cytotoxic effect to those organisms. The test performed with micronucleus of the HTC cells revealed that the BTEX was mutagenic, but only to the highest concentration, both before and after the biodegradation. Genotoxic damage as measured by the comet assay showed that BTEX was genotoxic for all concentrations not bioremediated, tested in experiments with HTC cells, and this potential was reduced after the biodegradation process. By the obtained results, we can suggest that the BTEX mixture can promote harmful effects in the genetic material of *Allium cepa* and HTC cells. The biodegradation process by microorganisms, of BTEX aqueous mixture, was efficient by reducing the genotoxic and mutagenic effects, showing that the compounds of the mixture were degraded into metabolites not toxic to cells. Furthermore, it was observed that raw sewage from oil refinery may contain microorganisms capable of degrading organic compounds such as BTEX.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. OBJETIVOS	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1. Caracterização físico-química do BTEX	15
3.2. Efeitos do BTEX sobre os organismos	19
3.2.1. Benzeno.....	20
3.2.2. Tolueno.....	22
3.2.3. Etilbenzeno.....	23
3.2.4. Xilenos.....	24
3.2.5. Estudos de misturas químicas.....	25
3.3. Biorremediação	26
3.3.1. Efetividade do processo de biorremediação.....	28
3.4. Mutagênese Ambiental	29
3.5. O uso da espécie <i>Allium cepa</i> como organismo teste	32
3.6. Cultura de células de mamíferos como sistema teste	34
3.7. Teste de Aberrações Cromossômicas	36
3.8. Teste do Micronúcleo	37
3.9. Ensaio do Cometa	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Hidrocarbonetos monoaromáticos testados	41
4.2. Obtenção das amostras biorremediadas	42
4.3. Sistemas testes e tratamentos	42
4.3.1. Sistema teste <i>Allium cepa</i>	42
4.3.2. Cultura de células HTC e o teste do micronúcleo.....	44
4.3.3. Cultura de células HTC e o ensaio do cometa.....	44
4.4. Forma de análise dos resultados	45
4.4.1. Ensaio com <i>Allium cepa</i>	45
4.4.2. Teste do micronúcleo com cultura de células HTC.....	46
4.4.3. Ensaio do cometa com cultura de células HTC.....	46
5. RESULTADOS	48

Artigo 1. Efetividade do tratamento de biorremediação de águas contaminadas com o BTEX, avaliada pelas metodologias de aberrações cromossômicas e do micronúcleo em sistema teste de <i>Allium cepa</i>	49
Artigo 2. Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos da mistura BTEX, antes e após biorremediação, por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo em cultura de células HTC.....	74
Artigo 3. Caracterização da eficiência da biodegradação bacteriana da mistura BTEX, por meio de análises químicas e biológicas.....	97
6. CONCLUSÕES GERAIS	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

1. INTRODUÇÃO GERAL

O petróleo, assim como os seus derivados, tem sido considerado um dos principais contaminantes do meio ambiente. Devido ao grande aumento na escala de produção, transporte e utilização mundial, tanto como fonte de energia como na fabricação de diversos produtos como plásticos, solventes, produtos farmacêuticos, cosméticos, combustíveis fósseis, borrachas sintéticas e muitos outros, muitos pesquisadores têm dedicado uma atenção especial na investigação dos possíveis impactos que estes produtos possam promover no meio ambiente.

Contaminações pelo petróleo e seus produtos são comumente observadas no ambiente como decorrentes de acidentes no processo de carga, descarga, transporte, produção de subprodutos e combustão (PEDROZO et al., 2002). Quando esses produtos atingem o solo, eles podem percorrer três caminhos distintos: ficar retido nos espaços porosos do solo; dissolver na água subterrânea ou evaporar e atingir a atmosférica (NADIM et al., 1999), apresentando, assim, uma potencialidade de contaminação dos diversos meios físicos.

Derivados do petróleo como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) são compostos que têm despertado um interesse especial nos pesquisadores, pelas suas características tóxicas; pela mobilidade no meio-ambiente, tanto na fase gasosa, líquida como sólida, e pela alta solubilidade da mistura em água. Tais características levam a uma preocupação específica, quanto à poluição das águas, principalmente, as subterrâneas (LOVLEY, 1997; ANNESER et al., 2008).

O BTEX é constituído por hidrocarbonetos monoaromáticos que são comumente encontrados no petróleo bruto e em alguns de seus derivados, como, por exemplo, a gasolina (CHEN et al., 2008). Eles também são produzidos na escala de megatoneladas por ano, como

produtos químicos a granel para uso industrial, sendo utilizados como solventes e matérias-primas na fabricação de pesticidas, plásticos e fibras sintéticas (HUTCHINS et al., 1991).

Uma alternativa para a degradação do BTEX em aquíferos contaminados é o processo de biorremediação que, segundo Barthe (1986) e Bouwer et al. (1994), é um processo atrativo, seguro e efetivo, frente às técnicas físicoquímicas convencionais que são empregadas no tratamento de solos e de águas contaminadas por derivados de petróleo.

A tecnologia de biorremediação por microrganismos é implementada em ambientes impactados pelo favorecimento do crescimento e da reprodução de microrganismos naturalmente presentes no local, por meio do fornecimento de um aceptor de elétrons (oxigênio ou nitrato), nutrientes (nitrogênio e fósforo) e de uma fonte de energia (carbono), que serve para acelerar o processo de biodegradação. Como o petróleo e seus derivados são constituídos basicamente de hidrocarbonetos, a biodegradação destes produtos se dá pela utilização destas moléculas orgânicas como fonte de energia (PEDROZO et al., 2002).

Para que uma biorremediação seja considerada eficiente, o produto resultante da decomposição deve ser constituído apenas por água e gás carbônico. Porém, muitos estudos relatam que atividades microbianas podem transformar compostos não tóxicos ou com baixa toxicidade em tóxicos potentes, sendo que, em muitos casos, produtos resultantes da biorremediação são, reconhecidamente, carcinogênicos (ALEXANDER, 1999). Desta forma, para se avaliar a efetividade do processo de biorremediação no tratamento de aquíferos contaminados com petróleo, torna-se necessário, além de uma avaliação química, o uso de bioensaios, por estes fornecerem dados mais consistentes e confiáveis na análise de riscos genotóxicos, permitindo um melhor reconhecimento da genotoxicidade de possíveis metabólitos formados durante o processo da biodegradação (REUSSER et al., 2002 e PLAZA et al., 2005).

Segundo Maila e Cloete (2005), o uso de atividades biológicas como bioindicadores da remoção de poluentes orgânicos pode ser um complemento às ferramentas tradicionais existentes por possibilitar, pelas respostas biológicas apresentadas pelos bioindicadores, uma melhor avaliação da eficiência dos processos tecnológicos aplicados na melhoria das condições ambientais.

A genética toxicológica tem por finalidade identificar e analisar a ação de agentes tóxicos que são capazes de interagir com o material genético dos seres vivos. O entendimento das propriedades físicas e químicas dos compostos químicos, bem como de seus efeitos sobre as células, constituem importantes informações para a avaliação da potencialidade do

composto comprometer o material genético dos organismos expostos ou mesmo da possibilidade de causar a sua morte. (ARNAIZ, 1995).

As plantas são consideradas excelentes organismos testes a serem usados no monitoramento ambiental. Esta característica se deve às respostas que estes organismos apresentam frente às alterações ambientais, uma vez que altas frequências de células aberrantes, frequentemente, estão associadas a instabilidades genéticas decorrentes da exposição dos organismos a condições ambientais desfavoráveis (BEZRUKOV; LAZARENKO, 2002).

Dentre os vegetais mais utilizados em estudos de biomonitoramento, destaca-se a espécie *A. cepa*. Muitos testes para identificação da presença de químicos potencialmente genotóxicos e mutagênicos vêm sendo realizados com este organismo, mostrando bons resultados para este tipo de análise. As células de meristemas radiculares de *A. cepa* apresentam características que as credenciam como um eficiente material para estudos citogenéticos, sendo indicadas para ensaio de aberrações cromossômicas com poluentes ambientais (ATEEQ et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008).

Culturas de células de mamíferos são utilizadas, com sucesso, nos estudos de avaliação da mutagenicidade dos agentes tóxicos. Estes testes apresentam vantagens pela facilidade de padronização das condições do ensaio, pela possibilidade de realizar tratamentos das células em várias fases do ciclo celular e pela organização do material genético assemelhar-se às células *in vivo* (RABELLO-GAY, 1991), além de serem reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis (ROGERO et al., 2003).

Dentre as linhagens celulares mais utilizadas para testes de genotoxicidade e mutagenicidade (CHO, V79, HepG2, HTC, etc.), as HTC (*Hepatoma Tissue Culture*) constituem sistemas simples e sensíveis para realização de ensaios *in vitro*. As células HTC apresentam alta atividade metabólica e, por isso, são largamente utilizadas em pesquisas para verificar, *in vitro*, a influência da toxicidade de substâncias quando metabolizadas pelo fígado (GAD, 2000).

2. OBJETIVOS

Frente ao exposto acima, este trabalho teve como objetivos:

- Investigar a potencialidade citotóxica (análise de morte celular e de índice mitótico), genotóxica (teste de aberrações cromossômicas) e mutagênica (teste de micronúcleo) de diferentes concentrações da mistura BTEX sobre células meristemáticas do sistema-teste de *Allium cepa*;
- Investigar o potencial mutagênico (teste do micronúcleo) de diferentes concentrações da mistura BTEX sobre células F₁ do sistema-teste de *A. cepa*;
- Investigar as potencialidades genotóxicas (ensaio do cometa) e mutagênicas (teste do micronúcleo), *in vitro*, de diferentes concentrações da mistura BTEX, sob células de hepatoma de rato (HTC);
- Conhecer e selecionar os microrganismos capazes de biodegradar a mistura BTEX, para possível utilização de tratamento de biorremediação de ambientes aquáticos contaminados com este composto;
- Comprovar a eficiência do processo de biodegradação, quanto à capacidade de promover redução dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, por meio de ensaios com células meristemáticas de *A. cepa*;
- Comprovar a eficiência do processo de biodegradação, quanto à capacidade de promover redução dos efeitos mutagênicos do BTEX, por meio de ensaios com células F₁ do sistema-teste de *A. cepa*;
- Comprovar a eficiência do processo de biodegradação, quanto à capacidade de promover redução dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do BTEX, por meio de ensaios com células HTC.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Caracterização físico-química do BTEX

A sigla BTEX é um acrônimo formado a partir dos nomes das substâncias químicas: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (o-xileno, m-xileno, p-xileno). Como essas substâncias são geralmente encontradas juntas no ambiente, utiliza-se a expressão BTEX como uma referência conjunta a elas.

O BTEX pertence a um grupo químico denominado de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs). Por apresentarem uma característica de alta volatilidade, contaminam a atmosfera, ao invés de persistirem nas superfícies de águas e solos. Esses compostos são poluentes que contribuem nos processos de degradação ambiental, interferindo, por exemplo, na redução do ozônio estratosférico e na formação do ozônio troposférico. A oxidação dos COVs, na presença de óxidos de nitrogênio, leva à formação do smog fotoquímico, prejudicial para os seres humanos, animais e vegetação (FALCÓ; MOYA, 2007). Em relação à água, os COVs estão entre os poluentes mais comumente encontrados em águas subterrâneas (SAFAROVA et al., 2004). Estes hidrocarbonetos possuem uma alta mobilidade em sistemas solo-água, devido ao seu menor coeficiente de partição entre octanol-água.

O coeficiente de partição octanol (2-Etil Hexanol - $C_4H_{10}O$)-água (K_{OW}) é uma medida da lipofilicidade de um composto e é definido como a razão da concentração do mesmo, no equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, água e octanol. Ele representa o balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do composto e influencia o transporte de um composto orgânico no ambiente (SILVA; FERREIRA, 2003). Um menor coeficiente de partição implica em uma lenta absorção no solo e, conseqüentemente, um transporte preferencial via água, favorecendo a

contaminação de reservatórios, por migrarem mais rapidamente pelas águas (NAKHLA, 2003). Estes compostos, freqüentemente, ocorrem em níveis traço em águas superficiais, como resultado da sua volatilidade, mas encontram-se em uma concentração bem mais elevada nas águas subterrâneas, sendo considerados como contaminantes prioritários a serem avaliados nas análises de água (FALCÓ; MOYA, 2007).

A mistura BTEX representa um grupo homogêneo de hidrocarbonetos orgânicos voláteis com propriedades físico-químicas semelhantes (Tabela 1). O benzeno, o tolueno, o etilbenzeno e os xilenos são hidrocarbonetos monoaromáticos, incolores e com odor característico, sendo solúveis em água, mas geralmente miscíveis com outros solventes orgânicos, como o éter etílico, acetona, etanol e clorofórmio (DEAN, 1978). Os meios contaminados com esses químicos incluem o ar, a água e o solo (ATSDR, 2004). São os principais componentes aromáticos encontrados em muitos produtos do petróleo, estando presente, com freqüência, em águas subterrâneas, como resultado de vazamentos de tanque de estocagem e de dutos subterrâneos (JOHNSON et al., 2003), além de atividades industriais.

Os limites para a concentração destes compostos em águas subterrâneas são bastante restritos e correspondem aos limites de potabilidade. A concentração máxima total permitida em águas subterrâneas para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos é 5µg/L, 170µg/L, 200µg/L e 300µg/L, respectivamente (CETESB, 2004).

Estes químicos têm sido utilizados na indústria química para preparar catalisadores sólidos, em reações de polimerização, para dissolver composições fotossensíveis e para sintetizar pesticidas e produtos farmacêuticos (BARRETO et al., 2007). Representam cerca de 35% da composição dos combustíveis fósseis, estando presentes, particularmente, na gasolina automotiva, combustíveis de avião e querosene, e em menor quantidade no óleo diesel. Além disso, são utilizados como solventes em inúmeros produtos, como tintas e revestimentos (ATSDR, 2004) e na fabricação de plásticos e fibras sintéticas (HUTCHINS et al., 1991).

Devido à elevada concentração da mistura BTEX no petróleo e à utilização maciça desta mistura como fonte de energia, como solventes e na produção de outros químicos orgânicos, aumenta a possibilidade de contaminação de recursos hídricos por este composto, o que pode acarretar em sérios problemas para o ambiente e para a saúde pública (WALDEN; SPENCE, 1997).

O benzeno tem sido amplamente utilizado como solvente em indústrias farmacêuticas, em tintas, colas e derivados, porém, recentemente, há uma forte pressão em se restringir esse amplo uso, pelas evidências comprovadas das suas características carcinogênicas (ROMA-TORRES et al., 2006). Dentre os hidrocarbonetos de petróleo, o benzeno é um dos compostos


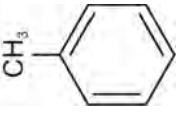
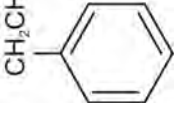
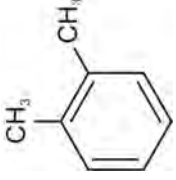
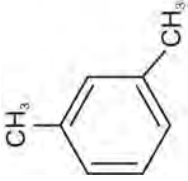
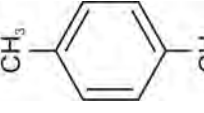
mais solúveis em água. No meio ambiente, ele é encontrado na atmosfera devido, principalmente, à sua presença em gases de exaustão de motores a gasolina, pelo próprio processo de sua produção, bem como pelo uso industrial como produto intermediário. Na água, ele aparece decorrente de descargas de efluentes industriais ou por vazamentos (IRWIN et al., 1997).

O tolueno é um composto orgânico volátil, da classe dos hidrocarbonetos monoaromáticos (MACKAY et al., 1992), considerado um poluente em potencial pela USEPA (1991; 1995 a; b). Como o etilbenzeno e os xilenos, o tolueno é um alquilbenzeno. Ele difere do benzeno por conter um grupo metil adicionado ao anel benzênico (IRWIN et al., 1997). O tolueno é amplamente utilizado como solvente de tintas, tiners, adesivos e em produtos farmacêuticos, sendo também misturado na gasolina, juntamente com o benzeno e os xilenos (ROMA-TORRES et al., 2006).

O etilbenzeno caracteriza-se por ser um hidrocarboneto aromático presente no petróleo e é um dos componentes de combustíveis líquidos. Ele é usado como solvente na produção de borracha sintética e estireno. Este composto é comumente encontrado no ar na forma de vapor, movendo-se facilmente do ar para a água e do ar para o solo. Uma vez na atmosfera, a molécula de etilbenzeno reage, por fotólise, com outros produtos químicos, formando as substâncias constituintes dos “smogs”. Na superfície da água, o etilbenzeno reage naturalmente com os outros compostos presentes na água, enquanto que, no solo, grande parte do etilbenzeno é degradada por bactérias. Como o etilbenzeno liga-se moderadamente ao solo, ele também pode se mover através do mesmo, contaminando as águas subterrâneas (ATSDR, 1999).

O xileno é um hidrocarboneto aromático, composto por dois grupos metil ligados ao anel benzênico, apresentando três diferentes formas isoméricas: ortho, meta e para, sendo que a mistura dessas formas é usada em uma variedade de solventes, principalmente nas indústrias de tintas (ROMA-TORRES et al., 2006). O xileno tende a evaporar rapidamente quando exposto à atmosfera, mas pode ser mais persistente em sedimentos, no solo ou em águas subterrâneas, onde não se encontra exposto diretamente ao ar. O xileno tende a migrar para as águas subterrâneas e persistir nelas por meses ou até mesmo anos (ATSDR, 1993).

TABELA 1. Estruturas químicas e propriedades físico-químicas do BTEX.

	BENZENO	TOLUENO	ETILBENZENO	ORTO-XILENO	META-XILENO	PARA-XILENO
SINÔNIMOS	Benzol Ciclohexatrieno	Metilbenzeno Toluol Fenilmetano	Etilbenzol Feniletano	o-Xilol 1,2-Dimetilbenzeno	m-Xilol 1,3-Dimetilbenzeno	p-Xilol 1,4-Dimetilbenzeno
CAS NUMBER	71-43-2	108-88-3	100-41-4	95-47-6	108-38-3	106-42-3
ABREVIACÃO	B	T	E	X	X	X
FÓRMULA MOLECULAR	C ₆ H ₆	C ₇ H ₈	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀
FÓRMULA ESTRUTURAL						
PESO MOLECULAR	78,11	92,13	106,17	106,17	106,17	106,17
DENSIDADE (g/L a 20°C)	0,8794	0,8660	0,8665	0,8800	0,8640	0,8611
SOLUBILIDADE EM ÁGUA (mg/L a 25°C)	1790	526	169	178	161	162
COEFICIENTE DE PARTIÇÃO OCTANOL-ÁGUA (log K_{ow})	2,13	2,73	3,15	3,12	3,20	3,15
PONTO DE FUSÃO (°C)	5,5	-95,0	-95,0	-25,0	-47,9	-14,0
PONTO DE EBULIÇÃO (°C)	80,1	110,4	136,25	144,4	139,0	138,3
PRESSÃO DE VAPOR (mmHg a 25°C)	94,8	28,4	9,6	6,61	8,29	8,84

3.2. Efeitos do BTEX sobre os organismos

O ser humano pode se expor ao BTEX por ingestão ou por inalação. A exposição aguda a essa classe de compostos é associada à irritação da pele, depressão do sistema nervoso central e efeitos sobre o sistema respiratório. A exposição prolongada ao BTEX também pode afetar órgãos, tais como rins e fígado, e o sistema circulatório (MAZZUCO, 2004), sendo também considerados perigosos pela sua potencialidade de causar leucemia (CORSEUIL; ALVAREZ, 1996). De acordo com Irwin et al. (1997), os efeitos crônicos do BTEX incluem, no homem, danos ao fígado, rins, coração, pulmões e sistema nervoso.

Estudos toxicocinéticos em humanos e animais indicam que esses químicos são bem absorvidos, extensivamente metabolizados e distribuídos para tecidos ricos em lipídeos e altamente vascularizados, como o cérebro, a medula óssea e o tecido adiposo, devido à alta lipofilicidade que apresentam. No entanto, não persistem no corpo por longos períodos, sendo facilmente eliminados (ATSDR, 2004). Estudos com animais e com o homem demonstram uma rápida absorção desses compostos pela via pulmonar, com índices de retenção para o homem entre 30 a 80%. Em relação à via oral, a absorção do BTEX é rápida e eficiente, entre 80 a 97% da dose ingerida. A absorção de vapores desses hidrocarbonetos pela pele é menos significativa do que por via pulmonar e oral, embora a absorção cutânea, em sua forma líquida, seja dependente da hidratação e espessura da camada córnea e da taxa de perfusão sanguínea da derme (PEDROZO et al., 2002).

Em relação ao processo de biotransformação, o BTEX é biotransformado pela via oxidase do citocromo P-450, sofrendo modificações tanto no carbono aromático como nos grupos alquilados da cadeia lateral. Estes intermediários oxidados são conjugados com substratos endógenos, como o ácido glicurônico, sulfatos, glutathione, cisteína ou glicina, tornando-se passíveis de serem excretados pelos rins ou, em alguns casos, pela bile. A biotransformação destes compostos pode resultar em produtos menos tóxicos do que o próprio químico (tolueno em ácido hipúrico) ou em produtos com um efeito tóxico ainda maior (benzeno em hidroquinona) (PEDROZO et al., 2002).

Trabalhadores expostos ocupacionalmente a derivados do petróleo com equivalente de carbono entre 5 e 9, nos quais incluem-se BTEX, podem apresentar alterações das enzimas hepáticas, expressas pelo aumento dos níveis séricos das transaminases, além de um aumento do fígado, infiltração gordurosa e insuficiência hepática, decorrentes da ação hepatotóxica crônica destas substâncias (ATSDR, 1995; GÓES, 1997).

De acordo com Chen et al (2008), o BTEX pode ser considerado genotóxico para linfócitos humanos mantidos em cultura, pois induziu uma variedade de danos no DNA, como

quebras de fita simples, quebras de fita dupla e modificação de base oxidativa, detectados pelo ensaio do cometa.

O conhecimento sobre o mecanismo de ação e o efeito tóxico da ação conjunta do benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, bem como o efeito aditivo, antagônico ou sinérgico dessas substâncias sobre os organismos alvos é bastante limitado, sendo que informações sobre a interação desses químicos ficam restritas, principalmente, a combinações binárias dos mesmos (ATSDR, 2004).

3.2.1. Benzeno

O benzeno é um poluente potencialmente carcinogênico (USEPA, 1986 ; 1991). A exposição crônica ao benzeno pode resultar em sérios efeitos hematológicos para o homem, nos quais todos os componentes do sangue podem ser afetados (WHO, 1993; 2000). Exposições a altas concentrações de benzeno levam à degradação progressiva da medula óssea, anemia aplástica, leucemia, além de alterações imunológicas (YARDLEY-JONES et al., 1990). Danos cromossômicos têm sido encontrados entre trabalhadores expostos a níveis muito baixos de benzeno (GREEN, 1988), sendo estes resultados confirmados em testes com outros animais (USEPA, 1985). A exposição ocupacional ao benzeno tem sido associada com uma elevada frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos (DABNEY, 1994). Alguns autores afirmam que o aumento do índice de aberrações cromossômicas é dose e tempo dependente da exposição ao benzeno (TOMPA et al., 1994; SMITH; ROTHMAN, 2000).

Inúmeros estudos de genotoxicidade *in vitro* têm indicado que o benzeno é fracamente mutagênico ou não mutagênico para ensaios de mutação em genes padronizados, mas é capaz de induzir quebras cromossômicas e pode interferir na segregação cromossômica (DEAN, 1985; WATERS et al., 1988; BIRD et al., 2005). De acordo com Dean (1985), o benzeno é capaz de induzir tanto aberrações cromossômicas estruturais como numéricas (aneuploidias) em células mantidas em cultura.

Estudos realizados por Whysner (2000) indicam que o benzeno induziu micronúcleos em células de medula óssea de camundongo, quando testados *in vivo*, não confirmado em testes *in vitro*. Estes dados, segundo o autor, mostram que para o benzeno agir é necessária uma ativação metabólica. Já quando testes *in vitro* foram realizados com metabólitos do benzeno, estes se mostraram positivos.

De acordo com Whysner et al. (2004), o benzeno induziu alterações cromossômicas significativas em cultura de linfócitos, mas não em células CHO, possivelmente pela ausência da capacidade de metabolização dessas últimas.

Estudos *in vivo* realizados sobre o mecanismo de ação do benzeno em células da medula óssea e do baço de camundongos indicaram que a formação de micronúcleo é resultado tanto de perda como de quebra cromossômica. Dessa forma, os autores concluíram que a exposição ao benzeno acarreta tanto efeitos clastogênicos como aneugênicos e que o tipo de ação pode variar dependendo do órgão-alvo ou do tipo celular (Chen et al., 1994). No entanto, diversos estudos demonstram a prevalência da capacidade clastogênica do benzeno, embora adutos de DNA instáveis, danos oxidativos e perturbações no fuso também sejam responsáveis pelo efeito tóxico deste químico (Whysner et al., 2004).

Segundo Bird et al. (2005), o benzeno produz efeitos citogenéticos em animais e humanos, incluindo danos aos cromossomos e/ou ao processo de divisão. Au et al. (1991) observaram um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos de camundongos CD-1 expostos a baixos níveis de benzeno (40 e 100 ppb).

Mullin et al. (1998) investigaram a frequência e o padrão de mutações no transgene *lacI* em tecidos de pulmões de camundongos Big Blue expostos ao benzeno. Esses autores concluíram que o benzeno é uma substância mutagênica para células de pulmões, pois, quando estas células foram expostas a vapores de benzeno, apresentaram um aumento da frequência de genes mutados e um aumento na extensão das deleções, em relação aos animais não expostos a esse químico.

O uso de marcadores citogenéticos, observados pela metodologia de hibridização *in situ* (FISH), mostrou que o benzeno induz aneuploidia em células metafásicas de humanos (BIRD et al., 2005). Os autores observaram que os cromossomos 5 e 7 do cariótipo humano parecem ser mais sensíveis a perdas decorrentes da ação deste produto do que os demais cromossomos, embora, segundo os autores, esse dado não tenha sido devidamente comprovado nestes ensaios.

Ensaio com células dos filamentos estaminais de *Tradescantia*, realizados por Van't Hof e Schairer (1982), mostraram que a concentração de 4.000 mg/L de benzeno, na sua forma gasosa, promoveu um aumento significativo da frequência de mutações nestas plantas, comprovando a sua potencialidade mutagênica para este organismo teste. O benzeno também induziu um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas de células de raízes de *Allium cepa*, submetidas à exposição na concentração de 100 μ M (RANK; NIELSEN, 1994).

Hoje em dia, o principal interesse dos estudos sobre o benzeno está na avaliação da exposição contínua e prolongada a baixos níveis de benzeno, tanto no meio ocupacional como no ambiente (DUARTE-DAVIDSON et al., 2001; SUL et al., 2002).

Os mecanismos de ação tóxica do benzeno ainda não estão totalmente esclarecidos, embora acredita-se que estejam relacionados com os processos de biotransformação, e a decorrente formação dos seus principais metabólitos: fenol, catecol, muconaldeído e hidroquinona (PEDROZO et al., 2002). Segundo a Organização Pan-americana da Saúde (OPS, 1996), a toxicidade do benzeno está relacionada com capacidade de ligação de seus metabólitos com o DNA ou o RNA, que interfere no processo de reparo e replicação celular, resultando em danos cromossômicos e carcinogênese.

3.2.2. Tolueno

O tolueno é um inibidor de atividades do sistema nervoso central (NLM, 1994) e promotor de outros efeitos a este sistema, tais como, perda de memória e danos progressivos do cérebro e dos nervos, tanto em exposições agudas como crônicas (DABNEY, 1994). A intoxicação aguda pelo tolueno pode se expressar pela síndrome da encefalopatia tóxica, cujas características são dadas por sintomas como euforia, instabilidade emocional e motora e alterações da linguagem em uma fase inicial, seguidas por sonolência e comprometimento das funções motoras e intelectuais (PEDROZO et al., 2002). Exposições a altas concentrações de tolueno (entre 5000 a 30000 ppm) podem levar, em poucos minutos, a um quadro neurológico de desorientação, alucinações, perda de coordenação motora, tremores, convulsões e inconsciência, podendo chegar até ao coma (OPS, 1996; AITIO; WADA, 1993).

O tolueno é ocasionalmente detectado em amostras de água potável em níveis geralmente abaixo de 3 µg/L (IRWIN et al., 1997). Estudos realizados pela Universidade de Washington (1990) descreveram uma mínima ou pequena teratogenicidade para o tolueno. Quanto à mutagenicidade do composto, EC (1993) cita que esta é inexistente para mamíferos e microorganismos, porém seus ensaios mostram-se inconclusivos. Também foram registrados resultados controversos para ensaios de aberrações cromossômicas realizados com o tolueno para esses mesmos organismos (DABNEY, 1994).

Estudos realizados por Hammer (2002) mostraram um aumento significativo de trocas entre cromátides irmãs em linfócitos do sangue de trabalhadores expostos ocupacionalmente a concentrações de 141 a 328 mg/m³ de tolueno, comprovando o efeito genotóxico dessa substância.

De acordo com Murata et al. (1999), os danos oxidativos no DNA, promovidos pelo tolueno e seus metabólitos, identificados pelo uso de sondas (^{32}P -5-end-labeled) de fragmentos de DNA de genes humanos, são fatores importantes nos processos de indução de carcinogenicidade e na toxicidade reprodutiva, embora o potencial carcinogênico do tolueno seja mais baixo do que o benzeno.

Como relatado pela USEPA (2005), em sua revisão toxicológica do tolueno, feita com inúmeros estudos realizados por diversos pesquisadores, o tolueno não apresentou efeito positivo para os testes de mutação reversa com *Salmonella typhimurium*, tanto com a adição da fração S9 como sem a presença desse sistema de metabolização, e para o teste de mutação reversa com *E. coli*. Nenhum aumento na troca de cromátides irmãs ou aberrações cromossômicas em células CHO e em linfócitos humanos expostos, *in vitro*, ao tolueno foi reportado, até mesmo em concentrações que inibiram o crescimento celular.

A inalação de 1500 mg/L de tolueno por ratos Wister machos induziu danos oxidativos no pulmão, rins e fígado, observados pela utilização do marcador imunoreativo 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (TOKUNAGA et al., 2003).

De acordo com McGregor (1994), testes *in vitro* indicam que o tolueno não é genotóxico e avaliações *in vivo*, realizadas com roedores e humanos, não são conclusivas quanto à genotoxicidade deste composto. Esse mesmo autor sugere que exposições ao tolueno não resultam em danos genéticos em células somáticas. De acordo com Hammer (2002), o efeito genotóxico do tolueno é ainda matéria para muita investigação.

3.2.3. Etilbenzeno

O etilbenzeno foi classificado pela International Agency for Research on Cancer (IARC, 2000), como uma substância possivelmente carcinogênica para humanos, devido aos resultados significativos de carcinogenicidade para animais.

Hidrocarbonetos aromáticos, como o etilbenzeno, se tornam metabolizáveis quando dissolvidos em uma solução aquosa (SIKKEMA et al., 1995). O etilbenzeno é biotransformado, preferencialmente, por hidroxilação catalisada por enzimas da fração microsomal hepática e posterior conjugação de seus metabólitos (PEDROSO, et al., 2002). No homem, os principais metabólitos formados são os ácidos mandélico e fenilglioxílico (ATSDR, 1999).

A entrada do etilbenzeno na célula se dá, passivamente, através da bicamada lipídica da membrana celular, podendo resultar em mudanças na sua estrutura e integridade, conferindo, assim, um mecanismo de toxicidade do composto. As mudanças na integridade da

membrana podem afetar, subseqüentemente, suas funções, particularmente as de barreira biológica, transdutoras de energia, além de alterar sua matriz protéica (SIKKEMA et al., 1995).

O potencial genotóxico do etilbenzeno foi investigado, primeiramente, utilizando ensaios *in vitro* com *Salmonella typhimurium* (FLORIN et al., 1980; DEAN, 1985; NTP 1986, 1996), *Escherichia coli* (DEAN, 1985) e *Saccharomyces cerevisiae* (NESTMANN; LEE, 1983; DEAN, 1985). Estes dados indicaram que o etilbenzeno não é mutagênico para bactérias ou leveduras, tanto na presença como na ausência de atividade metabólica.

O potencial do etilbenzeno induzir aberrações cromossômicas e trocas entre cromátides-irmãs foi estudado em células de CHO (NTP 1986, 1996). Nenhuma resposta mutagênica foi observada para os ensaios com doses de 75, 100, ou 125 mg/L. Entretanto, o etilbenzeno foi considerado mutagênico, na concentração de 80 mg/L, pelos ensaios realizados com linfoma de camundongo, sem atividade metabólica, e letal para as células de linfoma de camundongo, na concentração de 100 mg/L (MCGREGOR et al., 1988). Os resultados positivos sugerem que o etilbenzeno pode causar um aumento no potencial genotóxico em humanos (ATSDR, 1999).

Uma revisão realizada por Henderson et al. (2007) relata que o etilbenzeno não é mutagênico para bactérias, não induziu mutações em leveduras e nem trocas entre cromátides irmãs em células CHO. Este químico não foi considerado clastogênico para células CHO e para linhagens celulares de fígado de rato, mas ocasionou a formação de micronúcleos em células SHE, *in vitro*. Ainda segundo esses mesmos autores, nenhuma evidência de genotoxicidade foi observada em humanos expostos a altos níveis de etilbenzeno. Os estudos da genotoxicidade do etilbenzeno são controversos, necessitando mais investigações sobre este assunto.

3.2.4. Xileno

A inalação do xileno pode causar hemorragia, inflamação e edema pulmonar, dependendo do grau de exposição. No entanto, esses sintomas são dificilmente observados, pois os xilenos são irritantes e apresentam odor reconhecível em concentrações muito mais baixas do que aquelas necessárias para produzir o edema. A aspiração do líquido para o interior dos pulmões pode resultar em pneumonia química, que pode ser fatal (MEDITEXT, 2000). Intoxicações agudas por xileno podem acarretar em alterações renais transitórias com elevação da quantidade de uréia no sangue e diminuição da creatina urinária (OPS, 1996).

A ação neurotóxica do xileno manifesta-se por meio de uma disfunção cognitiva, aumento dos níveis das catecolaminas hipotalâmicas, até um quadro de hiperatividade motora e convulsões (ATSDR, 1995).

O xileno é biotransformado pela oxidação do seu grupamento metila, formando os compostos ácidos orto, meta ou para-toluico (referente a cada um de seus três isômeros: orto, meta e para xileno) e, após sua conjugação com a glicina, origina seu principal metabólito, o ácido metilipúrico (LEITE, 1996).

Foram observados resultados negativos em ensaios de mutagenicidade com *Salmonella*, com linfoma de camundongo L5179Y e em ensaios de danos cromossômicos com células da medula óssea expostas a dosagens de xileno (NLM, 1988). No entanto, o xileno freqüentemente ocorre associado a outros compostos aromáticos, sendo essa mistura, possivelmente, mais genotóxica do que quando ele aparece isolado (IRWIN et al., 1997). Em ratos, a exposição ao xileno resultou em efeitos embriotóxicos e teratogênicos, afetando o cérebro, o fígado, os pulmões e o coração dos organismos (NLM, 1988).

Segundo Dean (1985), o xileno pode ser considerado como não mutagênico, pois testes realizados com bactéria, cultura de células de mamíferos e com animais *in vivo*, apresentaram resultados negativos conclusivos para a mutagenicidade do xileno.

Estudos de toxicidade com *Daphnia magna* mostram que o etilbenzeno e o m-xileno são os mais tóxicos dentre os BTEX, quando se avalia suas concentrações em massa/volume, enquanto que o benzeno é potencialmente mais tóxico, por ter a mais baixa CL₅₀ dentre os compostos do BTEX (IRWIN et al., 1997).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1986 e 1997), tanto o tolueno como o xileno não apresentaram efeitos genotóxicos nem carcinogênicos para humanos e animais de laboratórios.

3.2.5. Estudos de misturas químicas

As substâncias químicas, quando liberadas no ambiente, constituem misturas complexas, tornando-se, geralmente, mais mutagênicas devido ao efeito sinérgico. Cardozo et al. (2006) observaram que amostras de águas coletadas em rios contaminados por compostos orgânicos apresentaram potencial mutagênico para ensaios com *Salmonella* e para testes de micronúcleos em células V79. Quando realizaram ensaios testando, isoladamente, cada um dos compostos químicos presentes nas águas, estes foram negativos. Os autores concluíram que a mutagenicidade da água era decorrente da ação conjunta dos compostos nela presentes.

Os produtos mutagênicos, segundo Claxton et al. (2004), podem ser produzidos a partir de hidrocarbonetos simples e não mutagênicos (como o tolueno) ou por combustão (como o diesel), sendo que estes componentes estão comumente presentes em atmosferas urbanas e após a sua exposição a gases reativos, como NO_x e O₃, sob condições fotoativas, transformam-se em compostos mutagênicos. Estes produtos derivados podem ser carregados para a água de dois modos: diretamente do ar para a água ou percolando através do solo (CARDOZO et al., 2006).

Biomarcadores constituem parâmetros adequados para estudos com misturas de contaminantes, pois é possível observar os efeitos sinérgicos das substâncias, a partir de uma rede complexa de processos bioquímicos (ROOS et al., 2004).

3.3. Biorremediação

Diversos estudos mostram várias alternativas para a degradação do BTEX em aquíferos contaminados (LOVLEY, 1997; REUSSER et al., 2002; SCOW; HICKS, 2005). Entre essas técnicas encontra-se o processo de biorremediação que, segundo Barthe (1986) e Bouwer et al., (1994), é uma alternativa atrativa, segura e efetiva frente às técnicas fisicoquímicas convencionais que são empregadas no tratamento de solos e de águas contaminadas por derivados de petróleo.

Os tratamentos físicos convencionais retiram os contaminantes do ambiente sem destruí-los ou transformá-los quimicamente, gerando o acúmulo de resíduos tóxicos. Além disso, possuem um custo bastante elevado. Já os processos biológicos de biorremediação são considerados uma tecnologia limpa e promissora, principalmente devido à sua simplicidade, baixo custo e alta eficiência, quando comparados a outras alternativas (ALEXANDER, 1994).

De acordo com Mariano (2006), a biorremediação pode ser considerada como uma nova tecnologia para tratar locais contaminados mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes alvos. O princípio desta técnica consiste na remoção de poluentes do ambiente natural e/ou a sua conversão em produtos menos prejudiciais, utilizando, para isso, comunidades de microrganismos endógenos do ambiente contaminado (BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Como resultado, há uma mineralização destes poluentes, de modo a transformá-los em compostos inorgânicos menores, como gás carbônico, água, formas inorgânicas de N, P e S e componentes celulares (ALEXANDER, 1994; EWEIS et al., 1998).

A biodegradação geralmente ocorre por um consórcio de diferentes espécies de microrganismos capazes de metabolizarem os produtos e subprodutos da biodegradação, em

diferentes etapas (RÉGIS, 2000). Os biodegradadores podem pertencer a diferentes grupos taxonômicos como, algas, bactérias, fungos e protozoários (GHIORSE; WILSON, 1988; MELO; AZEVEDO, 1997).

A comunidade microbiana envolvida na degradação de poluentes ambientais pode ser dividida em: microrganismos primários e secundários. Os microrganismos primários são aqueles capazes de metabolizar o substrato principal fornecido ao sistema, enquanto que os microrganismos secundários utilizam, como fonte de energia, os produtos liberados pelos microrganismos primários (BULL; SLATER, 1982 apud GRADY, 1985).

Em relação aos compostos orgânicos, a maioria destes pode ser metabolizada por microrganismos, desde que as condições físico-químicas do meio estejam adequadas às necessidades desses microrganismos. Além disso, a proximidade dos microrganismos ao composto alvo da biodegradação, a disponibilidade do composto no meio e a participação do composto em alguma via metabólica dos microrganismos devem também ser consideradas (RÉGIS, 2000; SILVA et al., 2002; INAZAKI, 2003).

Para a biodegradação dos hidrocarbonetos, é essencial que haja uma reação de oxidação-redução, em que o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétron) e um aceptor de elétron é reduzido. Existem diferentes compostos que podem agir como aceptores de elétrons, entre eles o oxigênio (O_2), o nitrato (NO_3^-), os óxidos de Fe (III) e o sulfato (SO_4^{2-}). Além dos aceptores de elétrons, outras variáveis podem estar relacionadas com os processos biológicos, como o pH e o potencial redox da substância (KAO e WANG, 2000; RÖLING; VERSEVEL, 2002; HUNKELER et al., 2002, CHEON et al., 2004).

Nos tratamentos de águas subterrâneas contaminadas com hidrocarbonetos, a biorremediação natural mostra-se interessante devido, principalmente, aos baixos custos e por ser uma técnica que requer uma intervenção mínima no ambiente impactado (BHUPATHIRAJU et al., 2002). Os principais mecanismos de biotransformação de contaminantes orgânicos em águas subterrâneas acontecem nos biofilmes. Os biofilmes são formados por bactérias e polímeros extracelulares que se aderem à subsuperfície (camada intermediária e interface água-sedimento), obtendo energia e nutrientes por meio do fluxo da água subterrânea (BITTON; GERBA, 1984). As estratégias de biorremediação implicam em fornecer as condições adequadas da água, do ar e a suplementação dos nutrientes para os microrganismos, a fim de promover a metabolização dos contaminantes (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

Entre as possíveis técnicas de biorremediação incluem: a utilização de microrganismos autóctones, ou seja, do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de

remediação (biorremediação intrínseca ou natural); a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação) e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) (BENTO et al., 2003).

A estrutura química dos poluentes orgânicos tem uma profunda influência na habilidade dos microrganismos metabolizarem estas moléculas, especialmente com respeito às taxas e extensão da biodegradação. Alguns compostos orgânicos são rapidamente biodegradados (como os hidrocarbonetos com baixo a médio peso molecular e alcoóis), enquanto outros são recalcitrantes (como compostos químicos mais complexos e, principalmente, os hidrocarbonetos halogenados) (MARIANO, 2006). Geralmente, compostos ramificados e polinucleados são mais difíceis de degradar que moléculas monoaromáticas ou com cadeias simples (ALEXANDER, 1965 apud ATLAS, 1997).

A habilidade de determinados microrganismos degradarem o BTEX é conhecida desde 1908, quando Stormer observou a capacidade da bactéria *Bacillus hexabovorum* em crescer aerobiamente em meio contendo tolueno e xileno. A capacidade de microrganismos naturais do solo degradarem BTEX foi primeiro demonstrada por Gray e Thornton em 1928. Estes pesquisadores encontraram, entre 245 espécies de bactérias presentes em amostras de solos não contaminados, 146 capazes de degradar hidrocarbonetos (GIBSON; SUBRAMANIAM, 1984 apud CORSEUIL; ALVAREZ, 1996).

Chiang et al. (1989), num estudo de biodegradação aeróbia de BTEX em aquífero arenoso raso, reforçaram a idéia de que a quantidade de BTEX na água subterrânea é inversamente proporcional à disponibilidade de oxigênio dissolvido. Os autores observaram que quando a concentração de oxigênio dissolvido era superior a 0,9 ppm, o BTEX não era mais detectado, devido a sua utilização no processo de biodegradação.

3.3.1. Efetividade do processo de biorremediação

A avaliação da efetividade do processo de biorremediação geralmente é feita apenas por análises químicas. Contudo, há uma necessidade eminente de se associar a estas avaliações químicas outras metodologias que auxiliem na detecção e quantificação das transformações moleculares, decorrentes dos processos de biorremediação. Dentre estas metodologias, são importantes as ferramentas capazes de reconhecer a genotoxicidade de possíveis metabólitos formados durante a biorremediação. No caso do BTEX, diferentes metodologias, incluindo testes biológicos, podem detectar e estimar os efeitos das transformações do benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) e, assim, avaliar a

viabilidade do processo de biorremediação no tratamento de aquíferos contaminados com essas substâncias (REUSSER et al., 2002).

Ao analisar solos contaminados por derivados de petróleo submetidos ao processo de biorremediação, Alexander et al. (2002) observaram um aumento significativo da genotoxicidade e sugeriram que os microorganismos responsáveis pela degradação dos compostos estavam transformando os químicos presentes em novas substâncias com evidentes potenciais genotóxicos.

Phillips et al. (2000) relataram, em seus estudos realizados com solo, que, embora os tratamentos de biorremediação reduzissem a quantidade dos hidrocarbonetos totais de petróleo, eles induziam um aumento na toxicidade, observado pelos testes de germinação de sementes e de toxicidade com minhoca, indicando que metabólitos tóxicos intermediários poderiam ter sido formados durante a biodegradação.

Atividades microbianas, nas quais compostos não tóxicos ou com baixa toxicidade são convertidos em tóxicos potentes, têm sido relatadas para muitos compostos, sendo que alguns produtos são, reconhecidamente, carcinogênicos (ALEXANDER, 1999).

Um aumento da genotoxicidade também foi observado por Randerath et al. (1999), quando analisaram solos contaminados com diesel submetidos à biorremediação em laboratório.

Segundo Maila e Cloete (2005), o uso de testes biológicos como bioindicadores da remoção de poluentes orgânicos deve ser utilizado como um complemento às ferramentas tradicionais existentes, sendo possível entender o efeito do tratamento tecnológico e das condições ambientais nas respostas apresentadas pelos bioindicadores. De acordo com Plaza et al. (2005), o uso de bioensaios combinados com análises químicas apresentam resultados mais confiáveis para análise de riscos genotóxicos. Esta combinação de ensaios, segundo os autores, é indicada para a avaliação da efetividade de processos de biorremediação.

3.4. Mutagênese Ambiental

A preservação do meio ambiente e a prevenção de possíveis efeitos danosos que este meio pode sofrer vêm sendo uma preocupação constante e crescente no mundo atual. A utilização acentuada de produtos como fármacos, agroquímicos, cosméticos, corantes e muitos outros vem causando um aumento nas taxas de mutagênese ambiental (RIBEIRO et al., 2003). Sabe-se que muitos destes compostos podem causar mudanças prejudiciais, herdáveis, no material genético, sem que se expressem de imediato (VOGEL, 1982) e, quando

lançados no ambiente, podem representar um risco para a saúde do homem, em virtude do seu potencial para induzir mutações (TAVARES, 1991).

A poluição, segundo Dixon & Wilson (2000), pode atuar sobre o material genético de duas formas: exercendo pressão seletiva sobre a estrutura genética das populações ou desencadeando mudanças amplas e não programadas no DNA (mutações).

A genética toxicológica tem por finalidade identificar e analisar a ação de agentes tóxicos que são capazes de interagir com o material genético dos seres vivos. O entendimento das propriedades físicas e químicas dos compostos químicos, bem como de seus efeitos sobre as células, constituem importantes informações para se avaliar o comprometimento hereditário, deletério ou mesmo a potencialidade de ação letal que um determinado produto exerce sobre os organismos (ARNAIZ, 1995).

O estudo de danos no DNA é parte essencial da genética toxicológica, assim como a avaliação da indução de mutação cromossômica constitui um evento importante para estudos de carcinogênese. Uma mutação é definida como uma mudança na seqüência do DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica (RIBEIRO et al., 2003).

O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Muitas das mutações não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Outras mutações podem determinar a morte celular e, por conseqüência, não são também detectáveis. Assim, apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos pode se caracterizar em vantagens ou determinar um crescimento desordenado das células. Os chamados agentes mutagênicos, que vão alterar a seqüência das bases no DNA, podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Após passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar a perda do controle de sua divisão, determinando, assim, o aparecimento do câncer (RIBEIRO et al., 2003).

Efeitos genotóxicos podem promover quebras no DNA, acarretando perda de material genético e mutações que inviabilizam a célula ou que decorram em processos carcinogênicos. Atualmente, a genotoxicidade vem sendo avaliada por meio de diversos testes, realizados com vários organismos, e que resultam em informações seguras e precisas, quanto à potencialidade em causar lesão no DNA (FERNANDES, 2005).

É importante conhecer os processos mutacionais e os fatores que os produzem, pois possibilita administrar e minorar os riscos (SILVA et al., 2003), além de servir na

identificação e análise das substâncias que são capazes de interagir com o material genético dos organismos.

Testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para se avaliar as reações dos organismos vivos expostos à poluição ambiental, como também para identificar os efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes (MORAES, 2000). Biomarcadores constituem parâmetros adequados para estudos com misturas de contaminantes, pois é possível observar os efeitos sinérgicos dessas substâncias a partir de uma rede complexa de processos bioquímicos (ROOS et al., 2004; FERETTI et al., 2008).

Os métodos utilizados para a detecção de danos ao DNA podem ser divididos em duas categorias: os capazes de identificar alterações visíveis nos cromossomos (macroescala) e aqueles capazes de detectar mudanças na estrutura gênica (escala molecular). Porém, esta distinção é artificial, pois os cromossomos são a manifestação física da replicação do DNA e as anormalidades estruturais cromossômicas são o resultado de danos no DNA (DIXON & WILSON, 2000).

Resultados provenientes de bioensaios genéticos podem, segundo HOUK (1992), constituir informações relevantes à saúde humana. Como o alvo dos estudos toxicológicos é o DNA, o qual existe em todas as formas celulares vivas, pode se inferir que compostos que se mostram reativos com o DNA de uma espécie têm o potencial para produzir efeitos semelhantes em outras espécies.

Segundo Thiriot-Quévieux (2002), a citogenética é uma área do conhecimento que possibilita a realização de inúmeros estudos. Os cromossomos podem ser estudados como uma manifestação morfológica do genoma, sendo possível a visualização microscópica de seus tamanhos, formas, número e comportamentos, durante a mitose e a meiose.

Testes citogenéticos são adequados para identificar os efeitos perigosos de substâncias em suas diversas concentrações e em diferentes tempos de exposição, além de serem eficientes na avaliação da influência destas substâncias sobre os organismos. Os estudos da potencialidade mutagênica de substâncias são realizados, geralmente, em organismos-teste e comumente aplicados em biomonitoramentos para a avaliação da extensão da poluição, bem como em estudos de avaliação de efeitos combinados de substâncias tóxicas e mutagênicas, sobre os organismos no ambiente natural (MORAES, 2000).

De acordo com Vanzella (2006), existem mais de 200 testes de curta duração, utilizando uma ampla variedade de organismos-teste (desde procariontes até mamíferos), com a finalidade de avaliar agentes potencialmente causadores de danos genéticos presentes no ambiente.

3.5. O uso da espécie *Allium cepa* como organismo teste

Vegetais superiores constituem um importante material para teste das alterações genéticas provocadas por poluentes ambientais e são, atualmente, reconhecidos como excelentes indicadores de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de ambientes com presença de substâncias químicas (GRANT, 1994; YI; MENG, 2003).

Sistemas testes de plantas podem detectar a genotoxicidade mais rápida e eficientemente do que ensaios animais, sendo mais simples e econômicos, podendo ser usado, com sucesso, em monitoramento ambiental (YI; MENG, 2003). É aceito que condições não favoráveis são menos adequadas para o desenvolvimento de plantas, levando as suas células, com maior frequência, a anormalidades decorrentes de instabilidades genômicas (BEZRUKOV e LAZARENKO, 2002). Segundo Grant (1994), os vegetais superiores, quando utilizados como organismos-teste, são excelentes indicadores de efeitos tóxicos, pois respondem com uma alta sensibilidade e produzem poucos resultados falsos positivos. De acordo com Guimarães et al. (2000), testes com plantas são, ainda, apropriados para realização de estudos de mutagênese em curto período, tanto em laboratórios como no biomonitoramento *in situ*.

Dentre os vegetais superiores, *Allium cepa* tem sido indicado como um eficiente organismo-teste para estudos dos mecanismos básicos de ação e de determinação dos efeitos de alguns químicos (FISKEJÖ, 1985; BUSHRA ATEEQ et al., 2002), 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, 1978; RANK e NIELSEN, 1998; PATRA e SHARMA, 2002; MATSUMOTO et al., 2006), além de serem facilmente corados e observados (KURÁS et al., 2006).

A espécie *A. cepa* tem sido considerada pela “Royal Swedish Academy of Science” (FISKEJÖ, 1985) e pelo “Gene-Tox Program” (GRANT, 1982) como um material-teste padrão para detecção de possíveis danos genéticos resultantes da poluição ou do uso de químicos ambientais. A utilização desta espécie como organismo-teste também foi validada em estudos de colaboração internacional realizados entre o “United Nations Environmental Program” (UNEP), “World Health Organization” (WHO) e “US Environmental Protection Agency” (USEPA), que provaram a eficiência deste organismo na detecção de danos genéticos ocasionados pela ação de poluentes ambientais (GRANT, 1999).

Segundo Ateeq et al. (2002), as células de meristemas radiculares de *A. cepa* apresentam características que as credenciam como um eficiente material para estudos citogenéticos, sendo indicadas para ensaio de aberrações cromossômicas com poluentes ambientais. Muitos *endpoints* podem ser monitorados por meio das análises destas células, tais como indução de aberrações cromossômicas e cromatídicas, troca entre cromátides irmãs, alterações no índice mitótico e formação de micronúcleos (MIGID et al., 2007).

Para Grant (1982) e Chauhan et al. (1999), o *A. cepa* é um eficiente sistema-teste, sendo rotineiramente utilizado para avaliar o potencial genotóxico de químicos no ambiente, devido a sua sensibilidade e boa correlação com sistemas-teste de mamíferos. De acordo com Rank e Nielsen (1993), a sensibilidade do teste de mutagenicidade com *Allium* foi calculada como sendo superior em 82% aos resultados obtidos com roedores. Estes mesmos autores mostraram ainda que o teste de *A. cepa* foi mais sensível que os testes de Ames e de Microscreen. Outros autores afirmam que a espécie *A. cepa* apresenta uma maior sensibilidade em relação a outras plantas superiores utilizadas como organismos-teste, como, por exemplo, a espécie *Vicia faba* (MA et al., 1995; MIGID et al., 2007) e a *Tradescantia* (COTELLE et al., 1999). Pelos estudos realizados por Grover et al. (1990), sobre os efeitos genotóxicos de pesticidas em sistemas-teste vegetal e de mamífero (aberrações cromossômicas/micronúcleo em medula óssea de células de rato), foi comprovada uma correlação significativa de 91,5% entre os dois sistemas. Da mesma forma, outros trabalhos afirmaram que sistemas-teste vegetais e de mamíferos apresentam uma correlação que varia entre 75% a 90% (GRANT, 1978; 1982).

A espécie *A. cepa* constitui um dos mais antigos sistemas para análise de aberrações cromossômicas (NILAN, 1978). Seu uso foi introduzido por Levan, em 1938, com a demonstração de que a colchicina poderia causar distúrbios no fuso mitótico, levado a uma poliploidização das células meristemáticas das raízes dessa espécie. Mais tarde, este mesmo autor mostrou que diferentes soluções de sais orgânicos induziam diversos tipos de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* (LEVAN, 1945). Desde então, inúmeros trabalhos têm sido realizados com esse organismo-teste a fim de se obter uma resposta confiável e rápida para a avaliação da contaminação ambiental (COTELLE et al., 1999; GROVER; KAUR, 1999; MATSUMOTO; MARIN-MORALES; 2004; GRISOLIA et al., 2005; EGITO et al., 2007; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

3.6. Cultura de células de mamíferos como sistema teste

Com o controle cada vez mais rigoroso do uso de animais de laboratório em experimentos biológicos, tornou-se necessário o desenvolvimento e a padronização de testes *in vitro* que pudessem detectar a toxicidade das substâncias (ROGERO et al., 2003). De acordo com Morales (2008), métodos alternativos que substituam a utilização de animais em experimentos devem ser utilizados, sempre que possível, e a busca dessas metodologias precisa ser um dos alvos da ciência moderna.

Como animais utilizados em pesquisa precisam ser acondicionados, alimentados e mantidos nas melhores condições possíveis de higiene e saúde, caso contrário não podem ser utilizados para propósitos científicos, os testes *in vitro* vêm sendo cada vez mais utilizados pela comunidade científica. A utilização de testes *in vitro*, além de não esbarrar em fatores éticos, leva a uma diminuição do número de animais experimentados, uma redução nos custos operacionais e de infra-estrutura (OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT - OTA, 1986).

Nos últimos 20 anos, o modelo *in vitro* ganhou uma ampla aceitação na investigação toxicológica por proporcionar ferramentas avançadas, protocolos confiáveis e possuir diferentes aplicações, desde estudos de morte celular até a toxigenômica, contribuindo na avaliação dos efeitos celulares causadas por poluentes ambientais (BERTHEUSSEN et al., 1997; EL-DEMERDASH et al., 2001; ZUCCO et al., 2004) e na obtenção de resultados mais rápidos (BARLIE, 1994).

Ensaio com cultura de células constitui uma importante ferramenta de investigação básica, na atualidade, servindo a diversas áreas de investigação, como a imunologia, a virologia, a genética e a toxicologia *in vitro* (LEWINSKA et al., 2007). Células mantidas em cultura são facilmente manipuladas e observadas do ponto de vista microscópico, bioquímico e molecular, possibilitando o seu uso em diversos ensaios de toxicidade (MORALES, 2008).

Uma das maiores aplicações da cultura celular é a investigação da ação de vários produtos como drogas, detergentes, cosméticos, agrotóxicos, dentre outros, sobre células individualizadas. Contudo, os resultados obtidos com cultura de células não podem ser extrapolados diretamente para os animais, mas servem de suporte para a avaliação dos efeitos ocasionados por essas substâncias em sistemas biológicos. É sabido que se um produto causa danos em células mantidas em culturas, ele também poderá apresentar um efeito similar sobre os organismos expostos (CARVALHO, 1996).

Métodos *in vitro* possibilitam uma melhor padronização das etapas experimentais, possibilitando manipular ou introduzir variáveis desejadas, como tempo de tratamento, tipos

de combinações das substâncias testadas, temperatura, pH, dentre outros (BRUSICK, 1987; CARVALHO, 1996), sendo adequados para a determinação de mecanismos de ação de agentes tóxicos (BRUSICK, 1987). De acordo com Rogero et al. (2003), a cultura de células apresenta vantagens sobre os métodos *in vivo* pela possibilidade de limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente e por ter períodos de experimentação mais curtos. Adicionalmente, resultados satisfatórios podem ser obtidos mesmo com pequenas amostras de células e sem a necessidade de sacrifício de grandes quantidades de animais (CARVALHO, 1996).

Testes *in vitro*, com células de mamíferos, podem ser utilizados nos estudos de avaliação da mutagenicidade e genotoxicidade dos químicos ambientais (CARDOZO et al., 2006). Estes testes apresentam além das vantagens da facilidade de padronização das condições do ensaio, a possibilidade de realizar tratamentos das células em várias fases do ciclo celular, pelas células apresentarem uma organização do material genético semelhante às células *in vivo* (RABELLO-GAY, 1991).

Entre os métodos *in vitro*, as células de mamíferos são as mais comumente utilizadas em ensaios de genotoxicidade, porque apresentam uma boa correlação entre o efeito observado e o efeito esperado no homem (BRUSICK, 1987).

Dentre as células de roedores comumente utilizadas para estes testes (CHO, V79, HTC, etc.), as HTC (Hepatoma Tissue Culture) constituem sistemas simples e sensíveis para realização de ensaios *in vitro*, com a vantagem de detectar danos cromossômicos causados por carcinógenos dependentes de ativação metabólica (BIANCHI, 2008). As células HTC são células metabolizadoras provenientes de fígado de ratos (*Rattus norvegicus*), que expressam as enzimas de fase I e de fase II do processo de metabolização de substâncias químicas (OLIVEIRA et al., 2006). Essas células apresentam alta atividade metabólica e, por isso, são largamente utilizadas em pesquisas para verificar, *in vitro*, a influência da metabolização pelo fígado na toxicidade de substâncias (GAD, 2000).

Os maiores índices de expressão e de atividade catalítica das enzimas envolvidas na metabolização de drogas são observados nos hepatócitos, o que justifica a utilização deste tipo celular em ensaios toxicológicos (ZUCCO et al., 2004), fato este considerado uma valiosa ferramenta para avaliação *in vitro* (GUILLOUZO, 1998; SINZ, 1999). A indução ou a inibição de componentes do sistema enzimático, que metabolizam químicos tóxicos, podem constituir uma ferramenta importante para a obtenção de informações sobre os mecanismos pelos quais os metabólitos destes produtos induzem efeitos tóxicos sobre as células (KNOWLES et al., 1980).

Em experimentos realizados por Dean et al. (1980), sobre a potencialidade da aflatoxina B1 induzir trocas entre cromátides irmãs, as células HTC, quando comparadas com as células V79, se mostraram cerca de 200 vezes mais sensíveis à ação desta droga. Ao testar o potencial mutagênico do extrato n-butanólico do cogumelo *Agaricus blazei*, em células HTC e CHO-K1, Bellini et al. (2006) verificaram uma maior frequência de micronúcleos nas células HTC do que nas CHO. Malatesta et al. (2008) utilizaram células HTC como um modelo para investigação de efeitos de baixas concentrações do herbicida Roundup e obtiveram importantes informações sobre a interferência deste químico em diversas vias metabólicas das células. Esses autores mostraram ainda que esta cultura detectou, mais eficientemente, a toxicidade de baixos níveis de pesticidas do que testes realizados com animais.

Bianchi (2008) afirmou que as células HTC constituem um sistema-teste bastante eficaz para ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade pela aplicação do ensaio do cometa e teste do micronúcleo.

3.7. Teste de Aberrações Cromossômicas

As aberrações cromossômicas (AC) têm sido reconhecidas como um importante marcador da exposição de organismos a agentes genotóxicos (NATARAJAN, 2002). As AC são decorrentes de alterações na estrutura normal dos cromossomos, sendo originadas a partir de quebras cromossômicas, trocas de material cromossômico, distúrbios na divisão celular (SWIERENGA et al., 1991; FERETTI et al., 2008), ou ainda de alterações no número total de cromossomos. Todas estas alterações podem ocorrer espontaneamente nos organismos ou como resultado da exposição à agentes químicos ou físicos (RUSSEL, 2002). A maioria das aberrações cromossômicas é letal para as células, mas existem muitas delas que, mesmo causando danos genéticos permanentes em células somáticas ou germinativas, mantém as células viáveis (SWIERENGA et al., 1991).

Agentes químicos e físicos podem induzir AC por meio de diferentes mecanismos, envolvendo tanto ações clastogênicas como aneugênicas. A ação clastogênica é caracterizada pela indução de quebras cromossômicas durante a divisão celular (FENECH, 2000), ocasionando alterações cromossômicas estruturais (ALBERTINI et al., 2000). A ação aneugênica é decorrente da inativação de estruturas citoplasmáticas da célula (como, por exemplo, o fuso mitótico) (FENECH, 2000), que leva a uma segregação anormal dos cromossomos, tendo como consequência desta anormalidade a formação de células aneuplóides e ou poliplóides (ALBERTINI et al., 2000).

As AC representam a parte visível de uma grande variedade de alterações do material genético, resultantes da atuação de diferentes mecanismos de reparo das quebras do DNA (OBE et al., 2002). As quebras nas cadeias duplas do DNA são as lesões primárias, fundamentais para a formação de AC. Apesar de vários mecanismos de reparo estar envolvidos com a manutenção da estabilidade celular, muitos deles podem não ocorrer de maneira eficiente, gerando alterações no DNA e, conseqüentemente, as AC (PFEIFFER et al., 2000).

O teste de AC é uma das metodologias mais antigas utilizadas no monitoramento ocupacional e ambiental como biomarcador de efeitos genotóxicos induzidos por químicos ambientais (HAGMAR et al., 2004). Esse teste, baseado na citogenética convencional, é um dos poucos métodos diretos para mensurar alterações em sistemas expostos a mutágenos ou carcinógenos potenciais (RANK et al., 2002).

Os testes de AC têm apresentado posição de destaque entre a bateria de testes recomendados por lei, para a avaliação de agentes genotóxicos. As vantagens destes testes incluem a possibilidade de identificação dos diferentes tipos de AC, de detecção de alterações no índice mitótico e de avaliação do modo de ação dos químicos testados (MATEUCA et al., 2006). Além disso, é considerado um teste simples, fácil, rápido, confiável e de baixo custo (GROVER; KAUR, 1999).

Um bom organismo teste para ensaios de AC é aquele que apresenta características cromossômicas especiais, como cromossomos grandes, baixo número cromossômico e morfologia cromossômica bem definida, características estas comuns à espécie *A. cepa* (MATSUMOTO et al., 2006). O teste de aberrações cromossômicas realizados com *A. cepa* é um método rápido e eficiente para se estudar os efeitos genotóxicos e mutagênicos de químicos ambientais (GRANT, 1982; 1994; FISKEJÖ, 1985; 1988; RANK; NIELSEN, 1994; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; LEME; MARIN-MORALES, 2008; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008).

3.8. Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo tem sido muito utilizado para a avaliação de efeitos mutagênicos, tanto em animais (CRISTALDI et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2006; HOSHINA et al., 2008; VENTURA et al., 2008; ROZGAJ et al., 2009) como em vegetais (WANG; WANG, 1999; BISCARDI et al., 2003; LEME; MARIN-MORALES, 2008; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008), por ser um teste altamente sensível e eficiente na detecção de poluentes ambientais.

Este teste é considerado uma técnica vantajosa pela simplicidade de análise de resultados e pela possibilidade de aplicação em qualquer população celular em proliferação, não sendo necessário o conhecimento cariotípico prévio do organismo-teste utilizado (HAYASHI et al., 1998). Além disso, o teste do micronúcleo possibilita uma rápida detecção de danos causados no material genético de organismos expostos a químicos ambientais, como quebras e perdas de cromossomos inteiros, que são facilmente visualizados nas células filhas como uma estrutura similar ao núcleo principal, porém, de tamanho reduzido (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

O teste do micronúcleo é comumente utilizado para avaliar a indução de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas por agentes clastogênicos e aneugênicos (HEDDLE et al., 1991).

Os micronúcleos são estruturas compostas de cromatina que possuem a aparência de um pequeno núcleo. Estas estruturas se formam a partir de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros perdidos na fase de anáfase, estando presentes nas células filhas, após a divisão celular (NATARAJAN, 2002; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). Fenech et al. (1999) afirmam que a presença de micronúcleo nas células é uma evidência da presença de aberrações cromossômicas estruturais e/ou numéricas ocorridas durante a mitose.

Para que uma estrutura composta de material genético seja considerada um micronúcleo, ela deve apresentar algumas características tais como, um diâmetro com cerca de 1/16 a 1/3 do diâmetro do núcleo principal da célula; não ser refringente; não estar conectado ao núcleo principal; apresentar envoltório visivelmente separado da membrana nuclear; possuir a mesma intensidade de coloração do núcleo principal ou, eventualmente, apresentar uma coloração mais intensa (FENECH, 2000).

O teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese é uma técnica citogenética amplamente utilizada para a avaliação de danos cromossomos, como quebra ou perda cromossômica, em ensaios *in vivo* ou *in vitro* (Fenech, 2006). No teste do MN *in vitro*, o uso da citocalasina B leva ao bloqueio da citocinese, mas não evita a divisão nuclear, resultando em um acúmulo de células binucleadas, formadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão, independentemente do grau de sincronia e da proporção de células em divisão, sendo possível distinguir entre as células que não se dividiram e aquelas que completaram a divisão celular na cultura (FENECH, 1997; FENECH, 2000; KIRSCH-VOLDERS et al., 2002). Nos últimos anos, o teste do MN *in vitro* tornou-se uma ferramenta atraente para testes de mutagenicidade, devido a sua simplicidade e a sua ampla aplicabilidade em diferentes tipos celulares (DECORDIER; KIRSCH-VOLDERS, 2006). A

reprodutibilidade do teste é alta e a contagem das lâminas é fácil, objetiva e rápida, resultando em uma maior eficiência do teste (CORVI et al., 2008).

Entre os diversos parâmetros citológicos observados em células meristemáticas de pontas de raízes de plantas, para detecção de danos ocasionados por poluentes ambientais, a formação de micronúcleo é considerada o *endpoint* mais efetivo e simples (MA et al.1995). Esses mesmos autores apontam também uma alta eficiência na utilização de células F₁ para contagem de micronúcleos, já que quando comparadas às células meristemáticas, essas células apresentam um índice mitótico muito mais baixo e um alto grau de sincronia em intérfase. Após o término da divisão mitótica das células meristemáticas, os possíveis danos no DNA dessas células seriam visualizados na forma de MN em suas células filhas, que nesse caso, correspondem às células F₁.

Mais recentemente, foi mostrado que o micronúcleo também pode ser usado como um parâmetro adicional no estabelecimento do risco de câncer (GUZMÁN et al, 2003; OLAHARSKI et al., 2006). Rajagopalan et al. (2004) demonstraram uma correlação positiva entre a presença de MN e o câncer, a partir de observações em câncer de colo-retal e adenoma humanos deficientes no controle do *checkpoint* em G1-S como resultado de mutações hCD4, mostrando um aumento da instabilidade genômica correspondente a uma alta frequência de MN.

Os protocolos do teste do MN vêm sofrendo contínuas inovações, o que tem ampliado a sua aplicabilidade, com a possibilidade de ser incluído na bateria de testes recomendados pelas agências governamentais, nos ensaios obrigatórios dos produtos que entram anualmente no mercado mundial (SALVADORI et al., 2003).

3.9. Ensaio do cometa

Testes que avaliam danos no material genético, por meio da detecção de quebras na fita do DNA, são considerados testes sensíveis para ensaios de genotoxicidade (GUSTAVINO, 2005). Alguns autores (DARROUD; NATARAJAN, 1993; MCNAMEE et al., 2000) apontam o teste do cometa como uma ferramenta eficaz para o biomonitoramento ambiental, onde podem ser detectadas alterações na molécula de DNA das células que são expostas aos agentes químicos e físicos, tanto em testes *in vitro* como *in vivo*.

O ensaio do cometa ou SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis Assay) é um método de estudo genotoxicológico sensível, que avalia danos no DNA de células individualizadas. Este ensaio combina a simplicidade de técnicas bioquímicas (detecção de quebras de fita simples de DNA e/ou sítios álcali-lábeis) com as abordagens típicas dos ensaios citogenéticos em

células individualizadas (HARTMANN; SPEIT, 1997), sendo capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (TICE et al., 2000).

Comparado com outros testes de genotoxicidade, o ensaio do cometa pode ser considerado como uma técnica sensível, rápida, de fácil aplicação e econômica, que permite a detecção de diferentes respostas celulares ao dano e reparo de DNA, em pequenas amostras celulares, de qualquer população de células eucarióticas que possa ser obtida por suspensão simples (KOSZ-VNENCHAK; ROKOSZ, 1997; SASAKI et al., 1997; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; BÜCKER et al., 2006). O ensaio do cometa tem sido indicado como um excelente método para se detectar mudanças muito pequenas na estrutura do DNA, célula a célula, tais como as atividades de reparo, o modo de empacotamento do material genético e a própria integridade do DNA (KOPPEN et al., 1999).

O desenvolvimento da técnica se deve, principalmente, aos trabalhos de Östling e Johanson (1984), que utilizaram metodologia de eletroforese do DNA em micro-gel, e aos trabalhos de Singh et al. (1988), que aperfeiçoaram esta técnica, atribuindo-lhe maior sensibilidade com o uso de solução alcalina. Atualmente, muitos grupos de pesquisadores internacionais têm publicado normas e critérios para a realização do ensaio, com o objetivo de estabelecer protocolos de alta qualidade, para obter dados válidos, reprodutíveis e fidedignos (KLAUDE et al., 1996; BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005; DI-PAOLO, 2006).

O ensaio do cometa tem se mostrado uma ferramenta bastante útil na avaliação da genotoxicidade de áreas impactadas por petróleo e seus derivados. Exemplo disso pode ser visto nos estudos de Hamoutene et al. (2002), pela aplicação da técnica em invertebrados expostos a águas contaminadas por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, que mesmo em baixas concentrações foram capazes de gerar lesões no DNA dos organismos expostos.

Esta técnica também tem sido realizada com sucesso em células de mamíferos mantidas em cultura. Estudos realizados por Boeira et al. (2001), utilizando células de mamíferos em teste *in vitro*, comprovaram a sensibilidade da técnica pela observação da indução de danos no DNA promovidos por exposições destas células aos alcalóides harman e harmina. Matsumoto et al. (2005) afirmaram que o ensaio do cometa, aplicado em cultura de células de mamífero, comprovou ser bastante eficiente no monitoramento de águas contaminadas por cromo, decorrentes de despejos de efluentes de curtume. Mais recentemente, em estudos realizados com cultura de células HTC, foi observado que o ensaio do cometa é mais sensível que o teste do MN, na avaliação de danos do DNA promovidos pelo inseticida Malation (BIANCHI, 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Hidrocarbonetos monoaromáticos testados

O composto BTEX compreende uma mistura dos hidrocarbonetos benzeno (grau de pureza 99% - CAS N° 71-43-2), tolueno (grau de pureza 99% - CAS N° 108-88-3), etilbenzeno (grau de pureza 99,80% - CAS N° 100-41-4) e xileno (grau de pureza 99%, mistura de isômeros - CAS 1330-20-7).

Foram preparadas cinco diferentes concentrações de BTEX. O preparo destas concentrações foi feito com base em dois parâmetros distintos: 1. Solubilidade em água: Três concentrações diferentes de BTEX foram preparadas a partir dos índices de solubilidade em água de cada um dos componentes da mistura BTEX (benzeno: 1780mg/L, tolueno: 535mg/L, etilbenzeno: 152mg/L e xilenos: 135mg/L – valor este que corresponde à solubilidade do isômero menos solúvel, *m*-xileno). A primeira concentração (mais alta) corresponde à própria mistura citada acima (BTEX 1). As outras concentrações foram obtidas pela diluição da solução BTEX 1 pelos fatores 10 (BTEX 2) e 100 (BTEX 3); 2. concentrações-limite em água potável: a concentração BTEX 4 foi preparada seguindo as concentrações-limite de cada componente do BTEX para água potável, estabelecido pelo órgão de fiscalização ambiental do Estado de São Paulo/Brasil - CETESB (benzeno: 5µg/L, tolueno: 170µg/L, etilbenzeno: 200µg/L e xilenos totais: 300µg/L). A quinta concentração (BTEX 5) foi elaborada simulando a presença da mistura, com valores abaixo das concentrações limite para água potável (benzeno: 1,25µg/L, tolueno: 42,5µg/L, etilbenzeno: 50µg/L e xilenos totais: 75µg/L). As cinco diluições citadas foram preparadas com água ultra pura aerada por 12 horas a 20° C, para serem utilizadas nos testes com culturas de células (mesma solução utilizada também nos processos de biodegradação) e sem aeração para os testes com *A. cepa*.

4.2. Obtenção do inóculo e biodegradação das amostras

As mesmas concentrações do BTEX, descritas acima, foram submetidas ao processo de biodegradação por microrganismos, sendo, que o produto biodegradado foi testado, quanto à sua citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

Para a obtenção das amostras biodegradadas das concentrações propostas do BTEX, um consórcio de bactérias foi selecionado, de acordo com o protocolo abaixo:

Em um recipiente de vidro com tampa furada, para possibilitar a entrada de ar, foi adicionado 250 mL de água do rio Atibaia (recurso hídrico considerado de classe II) e 250 mL de um efluente de refinaria de petróleo (rico em bactérias). Nesta solução, acrescentou-se 0,5 g de sacarose, 0,5 g de peptona caseína e 0,5 g de extrato de levedura, com a finalidade de fornecer fonte de energia, fósforo e nitrogênio, aos microorganismos presentes nesta mistura. Esse inóculo foi mantido a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em ambiente semi-escuro, por 24 horas. Após esse período, foi adicionado ao inóculo, como fonte de carbono, 50 μL de solução pura de cada um dos componentes da mistura BTEX, seguido por agitação em shaker por 5 minutos a 30 rpm. Decorrido mais 24 horas, acrescentou-se mais 25 μL de cada componente puro, agitando novamente em shaker por 5 minutos a 30 rpm. A partir daí, foi sendo adicionado à cultura, por um período de 75 dias, 25 μL de cada componente a cada 48 horas, seguido por agitação em shaker por 5 minutos a 50 rpm, a fim de selecionar apenas as bactérias que utilizassem o BTEX como fonte de carbono. Uma semana antes do início da biodegradação, passou-se a adicionar 37,5 μL de cada um dos componentes do BTEX, mantendo o mesmo padrão de agitação. Essa cultura foi filtrada em papel de filtro comum, diluída em água ultra pura, na proporção de 5 mL da cultura para 100 mL de água, e aerada por 2 horas.

Uma parte de cada concentração preparada (conforme descrito no item 4.1) foi separada para a realização da análise química. Ao restante das amostras foi adicionado 1 mL da cultura de microrganismos diluída e uma cápsula de nutriente da Hach para DBO. O monitoramento do processo de biodegradação foi realizado em BODTrak Apparatus (HACH), em garrafas de vidro âmbar com agitação constante a 20°C . Para uma maior confiabilidade dos dados, esse processo foi realizado em duplicata. Ao final do processo, uma parte das amostras biodegradadas foi separada para realização da análise química.

4.3. Sistemas testes e tratamentos

4.3.1. Sistema teste *Allium cepa*

O material biológico utilizado neste estudo, como sistema-teste vegetal para avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, para as cinco concentrações

determinadas, constituiu-se de sementes de *Allium cepa* ($2n = 16$ cromossomos) de um mesmo lote e mesma variedade (cebola baia periforme).

Os ensaios foram realizados em recipientes com tampa contendo membranas de teflon, por apresentar condições especiais e apropriadas para o desenvolvimento do teste (impedimento da volatilização do composto para a atmosfera), para garantir a constante concentração do BTEX, durante todo o ensaio. Por se tratar de uma mistura volátil, alguns cuidados foram tomados no desenvolvimento do trabalho, como por exemplo, a estabilização do potencial de volatilização da mistura no volume de ar presente no recipiente. Para a promoção da estabilização, foi necessário calcular a pressão de vapor de cada uma das substâncias presente na mistura (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), por meio da lei de Raoult. Estes cálculos mostram a necessidade de se acrescentar nas soluções preparadas, quantidades adicionais de cada um dos componentes da mistura (0,09 μL de benzeno, 0,007 μL de tolueno, 0,000715 μL de etilbenzeno e 0,005 μL de xileno), o que garantiu a constância das concentrações do BTEX na água.

Os ensaios foram realizados adicionando 60 mL de cada uma das cinco concentrações preparadas, das concentrações biodegradadas, do MMS (controle positivo), da água ultra pura (controle negativo) e do branco (controle da biodegradação) em frascos separados. As sementes foram colocadas para germinar sobre membranas de polipropileno umedecidas com cada uma das substâncias acima descritas. Após atingirem cerca de 2 cm de comprimento, as raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol : ácido acético, v/v) por 6-12h, sendo, após este período, transferidas para um novo Carnoy, onde foram conservadas, sob refrigeração, até sua utilização.

Duas repetições foram realizadas para os tratamentos com as cinco concentrações preparadas de BTEX e um único ensaio para as concentrações biodegradadas.

Esses ensaios foram realizados em duas repetições, com temperatura constante de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O horário de coleta dos meristemas foi realizado entre 12h e 13h, pois neste período a divisão mitótica, para essa espécie, apresenta os seus maiores índices.

Para a confecção das lâminas, as raízes previamente fixadas, passaram por três banhos em água destilada e foram, seqüencialmente, submetidas à reação de Feulgen, que consta de uma hidrólise ácida em HCl 1 N a 60°C por 11 minutos e coloração pelo reativo de Schiff por 2 horas. As células da região meristemática e da região F_1 das raízes foram espalhadas por esmagamento suave em uma gota de carmim acético 2%. As lâminas foram recobertas com lamínulas, que foram extraídas em nitrogênio líquido e, posteriormente, montadas em Entelan.

Para as amostras biodegradadas, somente foi realizado o tratamento contínuo, sem o período de recuperação.

4.3.2. Cultura de células HTC e o teste do micronúcleo

O material biológico utilizado como sistema-teste para avaliação dos efeitos mutagênicos do BTEX, nas cinco concentrações determinadas, por meio do teste do micronúcleo, foi constituído de células HTC (*Hepatoma tissue culture*), que são células metabolizadoras cancerosas obtidas de fígado de *Rattus norvegicus* adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil.

As células foram cultivadas em um meio contendo D-Mem + HAMF12 (1:1) suplementado com 10% de soro bovino fetal a 37°C, sendo mantidas em frascos descartáveis de 25 cm² em estufa BOD a 37°C.

Para a realização do teste do micronúcleo, as células foram cultivadas por um ciclo celular completo (24 horas), antes da adição dos tratamentos. Em seguida, foram realizados tratamentos simultâneos de 24 horas, com a adição de 50 µL das 5 concentrações do BTEX, das amostras biodegradadas, do MMS (4x10⁻²M) (controle positivo) e do PBS (controle negativo).

Após os tratamentos, as células foram lavadas por duas vezes com PBS e adicionados 5 mL de meio de cultura completo com 3 µg/mL de citocalasina B, onde permaneceram por 28 horas. Decorrido este tempo, as células foram colhidas e fixadas em Carnoy (metanol/ácido acético 3:1 – v:v). A seguir, foram depositadas algumas gotas da cultura de células sobre lâminas limpas, geladas e contendo um filme de água. Após secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 5 minutos.

4.3.3. Cultura de células HTC e o ensaio do cometa

Após serem cultivadas por 24 horas (um ciclo celular completo) em meio de cultura completo, as células das três repetições de todos os tratamentos foram tratadas, independentemente, por 24 horas, com cada uma das concentrações de BTEX (com e sem biodegradação) e com as substâncias controle, conforme já descrito para o teste de MN. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e tripsinizadas com 0,5 mL de tripsina-EDTA 0,025% por, no máximo, 2 minutos. Decorrido este tempo, o processo foi interrompido pela adição de 5 mL de meio de cultura completo. As células foram então transferidas para tubos Falcon e centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, reservando-se, apenas, 0,5 mL da solução, onde o *pellet* foi ressuspensionado.

Para o prosseguimento do ensaio do cometa, foram realizados testes de viabilidade celular para todos os tratamentos. Para isto, 20 μ L de suspensão celular de cada tratamento foram misturados com 20 μ L de Azul de Trypan 0,4% e transferidos para câmara de Neubauer. Foram contabilizadas as quantidades de células viáveis (brancas) e inviáveis (coradas em azul), presentes nos quatro quadrantes da câmara.

Após a verificação de que todos os tratamentos apresentassem, no mínimo, 80% de viabilidade celular, uma alíquota de 20 μ L de suspensão celular foi misturada com 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (37°C), em uma concentração de 0,5% e, rapidamente, gotejada sobre lâminas secas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (60°C), diluição 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínula e levadas à geladeira (temperatura de 4°C), por 20 minutos. Após a remoção cuidadosa das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada, recém preparada, contendo 89 mL de solução de lise estoque (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris com pH ajustado para 10 com auxílio de 8 g de NaOH, 890 mL de água destilada e 1% de lauril sarcosinato de sódio), mais 1 mL de triton X-100 e 10 mL de DMSO, onde permaneceram por 1 hora, em geladeira, a 4°C.

As lâminas foram posteriormente transferidas para uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (pH > 13) recém preparada (300 mM de NaOH, 1 mM de EDTA, preparado de uma solução estoque contendo NaOH 10N e 200 mM de EDTA, pH 10), onde permaneceram por 20 minutos antes da eletroforese, para desnaturação do DNA. A corrida de eletroforese foi realizada a 4°C, por 20 minutos, a uma corrente de 25V e 300 mA. Seguindo-se a corrida, as lâminas foram submersas em solução de neutralização (0,4 M de tris-HCl, pH 7,5) em três séries de 5 minutos cada, secas a temperatura ambiente e fixadas com etanol por 10 minutos. Após a fixação e secagem, as lâminas foram coradas com 30 μ L de solução de brometo de etídio 1x, preparada de uma solução estoque 10x (200 μ g/mL) e cobertas com lamínula.

4.4. Forma de análise dos resultados

4.4.1. Ensaio com *Allium cepa*

Para análise das irregularidades celulares, foram confeccionadas 10 lâminas para cada ensaio realizado. Em cada lâmina foram analisadas, aproximadamente, 500 células, totalizando 5000 para cada tratamento.

Para a análise dos efeitos citotóxicos, foram analisados os índices mitóticos, os índices de fase e os índices de morte celular de cada tratamento, utilizando-se as seguintes relações:

$$\text{I.M (Índice Mitótico)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em divisão}}{\text{n}^\circ \text{ total de células observadas}} \times 100$$

$$\text{I.F (Índice de Fases)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células da fase investigada}}{\text{n}^\circ \text{ de células mitóticas}} \times 100$$

$$\text{MC (Morte Celular)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em processo de morte celular}}{\text{n}^\circ \text{ total de células observadas}} \times 100$$

Para a avaliação do potencial de indução de aberrações cromossômicas, foram observados e quantificados todos os possíveis tipos de aberrações cromossômicas encontradas nas células de todas as lâminas de cada tratamento.

A análise dos efeitos mutagênicos foi feita por meio da observação e contagem de células micronucleadas, registradas para todas as lâminas de cada tratamento.

Todos os resultados obtidos foram comparados com o controle negativo, por meio do teste estatístico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

4.4.2. Teste do micronúcleo com cultura de células HTC

Foram analisadas, sob microscopia de luz (aumento de 1000 vezes), cerca de 1000 células binucleadas com membranas nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração por lâmina, sendo duas lâminas para cada repetição. Como todo experimento foi realizado em triplicata, obteve-se um total de cerca de 6000 células contabilizadas para cada concentração e controles avaliados. Para a avaliação do potencial mutagênico do BTEX, os resultados dos ensaios de MN foram comparados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Para verificar a efetividade do processo de biodegradação na redução da mutagenicidade do BTEX, foram comparadas as frequências de MN, entre a concentração preparada e a sua correspondente amostra biodegradada, pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

4.4.3. Ensaio do cometa com cultura de células HTC

A avaliação dos resultados do ensaio do cometa, realizado com o sistema teste de mamíferos (células HTC), foi feito pela análise de 100 nucleóides não sobrepostos e escolhidos aleatoriamente para cada tratamento, a fim de se verificar o potencial genotóxico da mistura BTEX, nas suas diversas concentrações. A análise foi feita em microscópio de fluorescência, filtro B – 3⁴ (excitação: $\lambda = 420 - 490\text{nm}$, barreira $\lambda = 520\text{ nm}$), em objetiva de 40x. Os nucleóides foram classificados, visualmente, de acordo com a migração dos

fragmentos, em classes 0, 1, 2 e 3 (KOBAYASHI et al., 1995), onde a classe 0 representa células sem dano, a classe 1 – células com pouco dano, a classe 2 – células com médio dano e a classe 3 – células com grande dano.

O escore para os 100 nucleóides analisados foi obtido pela multiplicação do número de células encontradas em cada classe, pelo número da classe correspondente, com valores variando de 0 (ausência total de danos) a 300 (dano máximo causado). Os resultados obtidos para todos os tratamentos foram analisados, estatisticamente, pelo teste paramétrico de ANOVA, com análise posteriori pelo método de Dunnet ($p < 0,05$). A efetividade do processo de biodegradação foi avaliada pela comparação dos dados obtidos com os tratamentos realizados com as concentrações não remediadas e remediadas pelo teste t Student. A fim de verificar um efeito dose resposta entre as concentrações, foi utilizada a correlação de Pearson.

5. RESULTADOS

ARTIGO 1 – Efetividade do tratamento de biodegradação de águas contaminadas com o BTEX, avaliada pelas metodologias de aberrações cromossômicas e do micronúcleo em sistema teste de *Allium cepa*.

Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo, Thais Cristina Casimiro Fernandes, Maria Aparecida Marin-Morales.

ARTIGO 2 – Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos da mistura BTEX, antes e após biodegradação, por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo em cultura de células HTC.

Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo, Sílvia Tamie Matsumoto, Maria Aparecida Marin-Morales.

ARTIGO 3 – Verificação da eficiência da biodegradação bacteriana da mistura BTEX, por cultura mista de bactérias, mediante análises químicas e biológicas.

Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo, Carlos Emílio Levy, Dejanira Francheschi de Angelis, Maria Aparecida Marin-Morales.

Efetividade do tratamento de biodegradação de águas contaminadas com o BTEX, avaliada pelas metodologias de aberrações cromossômicas e do micronúcleo em sistema teste de *Allium cepa*.

Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo¹, Thais Cristina Casimiro Fernandes¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹

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

RESUMO

O petróleo e seus derivados têm sido considerados uns dos principais contaminantes do meio ambiente. Dentre os derivados do petróleo, o BTEX (benzeno, tolueno, xileno e etilbenzeno) constitui uma preocupação particular pela sua toxicidade e por se acumular, principalmente, nas águas subterrâneas. A aplicação do processo de biorremediação parece constituir uma metodologia promissora para o tratamento de águas contaminadas por estes produtos. Neste trabalho foram avaliados os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico do BTEX, antes e após o processo de biodegradação, usando o sistema teste de *Allium cepa*, por meio do ensaio de aberrações cromossômicas e do MN, em células meristemáticas e de região F₁ de raízes. Sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em cinco concentrações da mistura BTEX, não biodegradadas e biodegradadas, em água mili-Q (controle negativo), em MMS 4x10⁻⁴M (controle positivo) e em meio de cultura usado na biodegradação (branco - controle da biodegradação). Pelos resultados encontrados, a mistura BTEX parece não causar efeitos citotóxicos em *A. cepa*, por não promover alterações no índice mitótico e na frequência de morte celular. O potencial genotóxico do BTEX foi confirmado pelas frequências significativas de aberrações cromossômicas e nucleares observadas. A frequência de MN, em células meristemáticas, foi significativa para a maioria das concentrações testadas, caracterizando um efeito mutagênico para a mistura. No entanto, o BTEX não foi mutagênico para as células F₁, mostrando que não houve a fixação dos danos após a divisão celular das células meristemáticas. Uma diminuição significativa desses efeitos foi observada para as concentrações biodegradadas, em relação às suas respectivas concentrações não biodegradadas. Assim, inferimos que a ação tóxica da mistura BTEX é decorrente do efeito sinérgico de seus constituintes e que o processo de biodegradação caracteriza-se em uma alternativa segura e efetiva no tratamento de águas contaminadas pelo BTEX.

Palavras-chave: BTEX, biodegradação, genotoxicidade, mutagenicidade, *Allium cepa*.

1. INTRODUÇÃO

O petróleo, assim como os seus derivados, tem sido considerado um dos principais contaminantes do meio ambiente. Devido ao grande aumento na escala de produção, transporte e utilização mundial, tanto como fonte de energia como na fabricação de diversos produtos como plásticos, solventes, produtos farmacêuticos, cosméticos, combustíveis fósseis, borrachas sintéticas e outros, muitos pesquisadores têm dedicado uma atenção especial na investigação dos possíveis impactos que estes produtos possam promover no meio ambiente.

Contaminações pelo petróleo e seus derivados são comumente observadas no ambiente como decorrentes de acidentes no processo de carga, descarga, transporte, produção de subprodutos e combustão (PEDROZO et al., 2002).

O benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, coletivamente conhecido como BTEX, são compostos que têm despertado um interesse especial nos pesquisadores, pelas suas características tóxicas, mobilidade no meio-ambiente e alta solubilidade em água. Tais características levam a uma preocupação específica, quanto à poluição das águas, principalmente, as subterrâneas (LOVLEY, 1997; ANNESER et al., 2008).

O benzeno é um químico reconhecidamente carcinogênico para humanos, por induzir leucemias e certos tipos de linfomas (BIRD et al., 2005). Estudos *in vitro*, contudo, apontam o benzeno como fracamente mutagênico ou não mutagênico, mas com capacidade de induzir quebras cromossômicas e interferir na segregação cromossômica (DEAN, 1985; WATERS et al., 1988; BIRD et al., 2005; CHEN et al., 2008). Na água, ele aparece decorrente de descargas de efluentes industriais ou por vazamentos (IRWIN et al., 1997).

O tolueno, segundo Hammer (2002), tem ação neurotóxica e teratogênica, mas com discussões ainda controvertidas sobre a sua potencialidade genotóxica e mutagênica.

Exposições crônicas ao etilbenzeno estão associadas com efeitos prejudiciais ao sistema respiratório e aos rins (NTP, 1999; ATSDR, 2004). Segundo Henderson et al. (2007), esse composto parece não induzir efeito genotóxico nos organismos, porém, muitos ensaios são também controversos a esse respeito.

Em relação ao xileno, exposições crônicas estão associadas com efeitos prejudiciais ao sistema nervoso, fígado e rins (ATSDR, 2004; USEPA, 2005). De acordo com WHO (1997), esta substância não é considerada genotóxica nem carcinogênica para humanos ou animais de laboratório.

O conhecimento sobre o mecanismo de ação e o efeito tóxico da mistura BTEX, bem como o efeito aditivo, antagônico ou sinérgico dessas substâncias sobre os organismos

alvos é bastante limitado, sendo que informações sobre a interação desses químicos são restritas, principalmente, a combinações binárias de seus componentes (ATSDR, 2004).

O processo de biorremediação tem sido utilizado como uma ferramenta muito útil na remoção de poluentes orgânicos ambientais. Este processo se utiliza da própria comunidade microbiológica endógena presente no ambiente contaminado, mantida sobre condições controladas de aeração e suplementação de nutrientes, para degradar o contaminante do ambiente natural e/ou convertê-lo em substâncias menos prejudiciais aos organismos expostos (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

Segundo Maila e Cloete (2005), o uso de atividades biológicas como bioindicadores da remoção de poluentes orgânicos pode ser um complemento às ferramentas tradicionais existentes, por possibilitar, pelas respostas biológicas apresentadas pelos bioindicadores, uma melhor avaliação da eficiência dos processos tecnológicos aplicados na melhoria das condições ambientais. Dentre as metodologias empregadas para avaliação da eficiência de processos de biodegradação, as mais indicadas são aquelas com capacidade de reconhecer a genotoxicidade e mutagenicidade de possíveis metabólitos formados durante a biodegradação (PLAZA et al., 2005).

Dentre os vegetais mais utilizados em estudos de biomonitoramento, destaca-se a espécie *Allium cepa*. Muitos testes para identificação da presença de químicos potencialmente genotóxicos e mutagênicos vêm sendo realizados com este organismo, mostrando bons resultados para este tipo de análise. As células de meristemas radiculares de *A. cepa* apresentam características que as credenciam como um eficiente material para estudos citogenéticos, sendo indicadas para ensaio de aberrações cromossômicas e de micronúcleos com poluentes ambientais (ATEEQ et al., 2002; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; FERNANDES et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008).

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos de diferentes concentrações da mistura BTEX e do produto biodegradado dessa mistura, por meio do teste de aberrações cromossômicas e do micronúcleo em células meristemáticas e F₁ de raiz de *Allium cepa*, além de avaliar a eficiência do processo de biodegradação na redução de efeitos danosos do BTEX.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Hidrocarbonetos testados

Para o desenvolvimento dos ensaios, foi testada a mistura BTEX que compreende o benzeno (grau de pureza 99% - CAS N° 71-43-2), tolueno (grau de pureza 99% - CAS N° 108-88-3), etilbenzeno (grau de pureza 99,80% - CAS N° 100-41-4) e xileno (grau de pureza 99%, mistura de isômeros - CAS 1330-20-7).

Foram preparadas cinco diferentes concentrações de BTEX. O preparo destas concentrações foi feito com base em dois parâmetros distintos: 1. Solubilidade em água: Três concentrações diferentes de BTEX foram preparadas a partir dos índices de solubilidade em água de cada um dos componentes da mistura BTEX (benzeno: 1780mg/L, tolueno: 535mg/L, etilbenzeno: 152mg/L e xilenos: 135mg/L – valor este que corresponde à solubilidade do isômero menos solúvel, *m*-xileno). A primeira concentração (mais alta) corresponde à própria mistura citada acima (BTEX 1). As outras concentrações foram obtidas pela diluição da solução BTEX 1 pelos fatores 10 (BTEX 2) e 100 (BTEX 3); 2. concentrações-limite em água potável: a concentração BTEX 4 foi preparada seguindo as concentrações-limite de cada componente do BTEX para água potável, estabelecido pelo órgão de fiscalização ambiental do Estado de São Paulo/Brasil – CETESB (2004) (benzeno: 5µg/L, tolueno: 170µg/L, etilbenzeno: 200µg/L e xilenos totais: 300µg/L). A quinta concentração (BTEX 5) foi elaborada simulando a presença da mistura, com valores abaixo das concentrações limite para água potável (benzeno: 1,25µg/L, tolueno: 42,5µg/L, etilbenzeno: 50µg/L e xilenos totais: 75µg/L).

O teste controle negativo foi feito com água ultra-pura e o controle positivo com Metil Metano Sulfonato- MMS (CAS N° 66-27-3), na concentração de 4×10^{-4} M.

2.2. Amostras biodegradadas

As concentrações do BTEX, submetidas à degradação bacteriana, foram preparadas com água aerada por 12 horas a 20 °C. As bactérias usadas no processo de biodegradação foram selecionadas de um pool de bactérias presentes em um efluente bruto de refinaria de petróleo. O monitoramento do processo de biodegradação foi realizado em HACH BOD Trak Apparatus, em garrafas de vidro âmbar completamente vedadas, com agitação constante a 20°C durante 20 dias. Cada garrafa continha uma das concentrações de BTEX testadas neste trabalho e uma quantidade fixa de nutrientes (HACH BOD solution) e bactérias. Todo o consumo do oxigênio disponível nos ensaios, contabilizado pelo aparelho, foi relacionado

com o processo de biodegradação do BTEX, por ser este a única fonte de carbono disponível no meio.

Um outro ensaio foi realizado com o meio de cultura e a bactéria, porém sem adição de BTEX, para servir como controle da biodegradação (branco). Este teste foi desenvolvido para uma certificação de que os possíveis efeitos genotóxico ou mutagênico observados nos ensaios fossem decorrentes das concentrações testadas e não da solução nutritiva utilizada.

2.3. Análise química

A análise de BTEX presente nas amostras, antes e após o processo de biodegradação, foi realizada pelo laboratório Analytical Technology Company (São Paulo – Brasil). O método utilizado foi por injeção por Headspace e cromatografia gasosa com detector de fotoionização (GC/PID), de acordo com a USEPA-SW846 método 8021B.

2.4. Organismo teste

O material biológico utilizado neste estudo, para avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, para as cinco concentrações determinadas, constituiu-se de sementes de *Allium cepa* ($2n = 16$ cromossomos) de um mesmo lote e mesma variedade (cebola baia periforme).

2.5. Metodologia

A germinação das sementes de *A. cepa* foi feita em frasco de vidro (volume de 500 mL) com tampa contendo membranas de teflon, por apresentar condições especiais e apropriadas para o desenvolvimento do teste (impedimento da volatilização do composto para a atmosfera), o que garantiu que a concentração do BTEX fosse constante durante todo o ensaio.

Os ensaios foram realizados adicionando 60 mL de cada uma das cinco concentrações preparadas, das cinco concentrações biodegradadas, do MMS (controle positivo), da água ultra pura (controle negativo) e do branco (controle da biodegradação) em frascos separados. As sementes foram colocadas para germinar sobre membranas de polipropileno umedecidas com cada uma das substâncias acima descritas. Após atingirem cerca de 2 cm de comprimento, as raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol : ácido acético, v/v) por 6-12h, sendo, após este período, transferidas para um novo Carnoy, onde foram conservadas, sob refrigeração, até a sua utilização.

Duas repetições foram realizadas para os tratamentos com as cinco concentrações preparadas de BTEX e um único ensaio para as concentrações biodegradadas.

2.6. Preparo das lâminas

Para a confecção das lâminas da região meristemática das raízes e da região F₁ foi seguida a metodologia descrita por Leme e Marin-Morales (2008).

2.7. Análise dos resultados

Para análise das irregularidades celulares, foram confeccionadas 10 lâminas para cada ensaio. Em cada lâmina foram analisadas, aproximadamente, 500 células, totalizando 5000 células por ensaio para cada tratamento.

A citotoxicidade foi avaliada por meio do índice mitótico, índice de fases e presença de morte celular, observados nas células meristemáticas. Para a avaliação do potencial genotóxico, foram observados e quantificados todos os possíveis tipos de aberrações cromossômicas e nucleares, encontradas nas células meristemáticas de todas as lâminas de todos os tratamentos. A análise dos efeitos mutagênicos foi feita por meio da observação e contagem de células micronucleadas, da região meristemática e da F₁, registradas para todas as lâminas de todos os tratamentos.

Todos os resultados obtidos foram comparados com o controle negativo, por meio do teste estatístico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Para avaliar a efetividade do processo de biodegradação na redução de danos genotóxicos e mutagênicos induzidos pelo BTEX, foram comparadas as frequências das alterações de cada concentração, antes e após o processo de biodegradação. Exclusivamente para esta comparação, como foram realizadas duas repetições para o ensaio com as concentrações não biodegradadas e uma com as biodegradadas, as comparações foram feitas entre a média obtida com as não biodegradadas e os valores obtidos nos ensaios biodegradados.

3. RESULTADOS

3.1. Análise química

O resultado das análises químicas, referente à quantificação do BTEX nas amostras testadas, está apresentado na Tabela 1.

Ao se comparar a concentração inicial de BTEX com sua concentração biodegradada correspondente, pode-se observar que houve uma redução da quantidade de BTEX para todas

as concentrações analisadas, o que comprova a eficiência das bactérias presentes no efluente bruto de refinaria de petróleo na remoção desses compostos da água. Como o sistema utilizado para a realização da biodegradação era de ambiente totalmente fechado, a diminuição nas concentrações testadas foi atribuída, exclusivamente, ao consumo do BTEX como fonte de carbono pelas bactérias ali presentes.

3.2. Indução de citotoxicidade

As tabelas 2 e 3 mostram, respectivamente, os resultados obtidos para os ensaios com as concentrações preparadas e para as concentrações biodegradadas do BTEX.

Nenhuma das concentrações testadas levou a indução significativa de morte celular.

Em relação ao índice mitótico, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos nos ensaios com as concentrações não biodegradadas de BTEX. Para os índices de fase, foi observado um aumento significativo de células em prófase e uma diminuição de células em telófase para a maior concentração testada, somente na primeira repetição dos ensaios.

Quanto às concentrações biodegradadas, o índice mitótico não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação ao branco. Foi observada uma diminuição significativa de células em telófase para a maior concentração (biodegradada 1) e um aumento significativo de células em anáfase para a concentração biodegradada 3, quando comparadas com o branco.

3.3. Indução de genotoxicidade

Os tipos de aberrações cromossômicas e nucleares observadas e suas freqüências estão apresentados na Tabela 4 e 5, Figura 1.

A análise dos efeitos genotóxicos, realizada pela quantificação de alterações cromossômicas e nucleares em células meristemáticas de *A. cepa*, apontou resultados significativos para aderência cromossômica e broto nuclear para todas as concentrações não biodegradadas testadas. A segunda maior concentração testada (BTEX 2) induziu um aumento significativo de quebras e pontes cromossômicas. Uma freqüência significativa de células polinucleadas foi observada para a maior concentração testada (BTEX 1). O total de aberrações foi significativo para todas as concentrações testadas, quando comparadas com o controle negativo.

Após o processo de biodegradação, foram observados resultados significativos, em relação ao controle da biodegradação (branco), apenas para a presença de broto nuclear

(concentrações BTEX 1, 2, 3) e perda cromossômica (concentração BTEX 1). O total de aberrações foi significativo para as três maiores concentrações biodegradadas testadas, em relação ao branco.

A comparação do total de aberrações cromossômicas e nucleares, observado para as concentrações de BTEX, antes e após a biodegradação, revelou uma diminuição significativa destas anormalidades para as concentrações BTEX 1, 2 e 4, indicando uma redução dos efeitos genotóxicos, após o processo de biodegradação (Figura 2).

3.4. Indução de mutagenicidade

Os efeitos mutagênicos, avaliados por meio do teste de MN, foram observados em ensaios utilizando células da região meristemática e da região F₁ de radículas de *A. cepa* (Tabela 6 e 7, Figura 3).

Nas células meristemáticas, as concentrações de BTEX 1, 2, 4 e 5 induziram um aumento na frequência de MN, quando os valores foram comparados com o controle negativo. Para as células da região F₁, nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao controle negativo, com exceção do controle positivo. As concentrações biodegradadas testadas não induziram alteração significativa na frequência de MN, tanto para as células meristemáticas como para as da região F₁ (Tabela 7).

Ao se comparar as frequências de MN entre a concentração preparada de BTEX com a sua respectiva concentração biodegradada, observou-se uma redução significativa para as biodegradadas 1 e 4 (Figura 4). Para as células da região F₁, não foram observadas alterações nas frequências de MN, entre as amostras das concentrações não biodegradadas e biodegradadas (Figura 3).

4. DISCUSSÃO

Devido ao intenso uso do BTEX em várias atividades humanas (HUTCHINS et al., 1991; BARRETO et al., 2007), este composto é comumente encontrado no meio ambiente, principalmente contaminando águas subterrâneas (LOVLEY, 1997).

Embora alguns trabalhos tenham sido realizados com os componentes da mistura BTEX, de forma isolada, avaliações conclusivas sobre os efeitos genotóxicos e mutagênicos da mistura BTEX são ainda bastante limitadas (ATSDR, 2004).

Segundo Leme e Marin-Morales (2008), o organismo *A. cepa* provou ser bastante sensível para a detecção dos efeitos tóxicos dos hidrocarbonetos do petróleo, fato este também confirmado em nossos estudos.

Diversos autores têm mostrado que alterações no índice mitótico da espécie *Allium cepa* (SMAKA-KINCL et al., 1997; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008), bem como a presença de morte celular (BIANCHI, 2008) pode constituir bons parâmetros para avaliação do potencial citotóxico de químicos ambientais. Em nossos estudos, a mistura BTEX não induziu morte celular e nem alterações significativas no índice mitótico. Contudo, foi observada uma sutil alteração nos índices de fase. Dessa forma, acreditamos que esse químico não apresenta efeitos citotóxicos considerável para as células meristemáticas de *A. cepa*.

Ensaio de genotoxicidade, realizados com as diferentes concentrações de BTEX, mostram que essa mistura foi capaz de induzir diversos tipos de aberrações cromossômicas e nucleares em células meristemáticas de *A. cepa*. A aberrações cromossômica mais freqüentemente observada, para todas as concentrações testadas, foi aderência cromossômica. Segundo Fiskesjö e Levan, 1993; Marcano e Del Campo, 1995; Marcano et al., 1999 e Türkoglu (2007), aderência cromossômica é uma alteração indicativa de efeitos tóxicos sobre o material genético, que pode causar efeitos irreversíveis para as células, inclusive o processo de morte celular. Essa alteração também está envolvida com a formação de pontes cromossômicas e, posteriormente quebras cromossômicas (MARCANO et al., 2004; LEME et al., 2008), justificando as freqüências significativas dessas últimas alterações, observadas para a segunda maior concentração aqui testada.

Em relação às aberrações nucleares, a alteração mais freqüentemente observada foi a presença de broto nuclear. De acordo com Serrano-García e Montero-Montoya, (2001), a formação de broto nuclear está relacionada com a formação do envoltório nuclear antes do cromossomo estar totalmente incorporado ao núcleo, fato este decorrente de atrasos na segregação de alguns cromossomos. No entanto, segundo Fernandes et al. (2009), tal alteração não deve ser considerada como genotóxica, pois não acarreta em danos ou perda de material genético das células. Os autores afirmam que esta alteração constitui, apenas, um evento morfológico transitório do núcleo.

Danos cromossômicos têm sido encontrados entre trabalhadores expostos a níveis muito baixos de benzeno (GREEN, 1988), sendo estes resultados confirmados em testes com outros animais (USEPA, 1985). Estudos realizados por Rank e Nielsen (1994), mostraram que o benzeno induziu um aumento significativo na freqüência de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*, submetidas à exposição na concentração de 100 µM. Os demais constituintes do BTEX não apresentam efeitos genotóxicos significativos, embora muitos experimentos apresentem resultados controversos e confusos, principalmente

em relação a seus efeitos em plantas (DEAN, 1985; WHO, 1986; 1997). Dessa forma, acreditamos que o efeito genotóxico observado para o BTEX, nas células meristemáticas de *A. cepa*, pode ser decorrente da ação genotóxica do benzeno, bem como de uma ação sinérgica entre os componentes da mistura.

A presença significativa de micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa* indica que a mistura BTEX é capaz de causar efeitos mutagênicos sobre esse organismo-teste. Os micronúcleos podem ser originados de fragmentos acêntricos (ação clastogênica), perda cromossômica ou má formação do fuso mitótico (ação aneugênica) (SUDHAKAR et al., 2001), ou ainda, pela eliminação do material excedente de células poliplóides com a formação e expulsão de brotos nucleares (FERNANDES et al., 2007). Em nosso estudo, acreditamos que os micronúcleos tenham sido formados, em sua maioria, pela indução de quebras cromossômicas durante o processo de divisão. Dessa forma, nossos resultados corroboram com os de Whysner et al. (2004), que apontam para uma prevalência da capacidade clastogênica do benzeno, embora, segundo esses mesmos autores, adutos instáveis de DNA, danos oxidativos e perturbações no fuso também sejam responsáveis pelo efeito genotóxico deste químico. Ensaio com células dos filamentos estaminais de *Tradescantia*, realizados por Van't Hof e Schairer (1982), mostraram que a concentração de 4.000 mg/L de benzeno, na sua forma gasosa, promoveu um aumento significativo da frequência de mutações nestas plantas, comprovando uma potencialidade mutagênica para este organismo teste. No entanto, resultados obtidos com ensaios de avaliação de mutação apontam que o benzeno é fracamente mutagênico ou não mutagênico (DEAN, 1985; WATERS et al., 1988; BIRD et al., 2005). Assim, o resultado aqui encontrado pode ser explicado pela ação sinérgica da mistura, cujo efeito potencializa a ação mutagênica dos componentes da mistura.

Nossos resultados, obtidos com a mistura BTEX, corroboram os de Roma-Torres et al. (2006), que, ao estudarem trabalhadores expostos ao BTX (benzeno, tolueno e xileno), mostraram que essa mistura foi capaz de induzir efeitos genotóxicos e mutagênicos, como aberrações cromossômicas, micronúcleos e danos no DNA em leucócitos de sangue periférico.

Como as células F_1 são derivadas de divisões mitóticas de células meristemáticas (MA; XU, 1986), a ausência de frequências significativas de MN em células da região F_1 de raízes de *A. cepa*, para todas as concentrações testadas, significa que os danos observados nas células meristemáticas não foram transferidos e fixados nas F_1 . A presença de alterações celulares em células meristemáticas e a não correspondência de MN em células F_1 podem

estar relacionadas com a inviabilidade celular, decorrente das alterações registradas em consequência da exposição ao BTEX, fator este envolvido com o processo de morte celular.

Pelas análises químicas realizadas, antes e após o processo de biodegradação, foi possível provar uma eficiência do processo de biodegradação na redução da quantidade de BTEX presente nas amostras, comprovado pela redução dos danos observados no material genético das células de *A. cepa*. As comparações entre os resultados obtidos com as concentrações de BTEX e as suas respectivas concentrações biodegradadas mostram uma diminuição significativa dos danos genotóxicos e mutagênicos. Porém, quando os tratamentos biodegradados foram comparados com o branco, a frequência do total de alterações cromossômicas e nucleares continuou com mesmos níveis de significância dos tratamentos sem biodegradação, para as três maiores concentrações. Isso provavelmente ocorreu porque o BTEX ainda estava presente nas amostras biodegradadas em concentração suficiente para continuar induzindo alterações genotóxicas nas células, indicando que o período utilizado para o processo de biodegradação (20 dias) deve ser aumentado, para que haja uma maior eficiência das bactérias na eliminação do BTEX. Assim, os resultados biológicos estão de acordo com os resultados das análises químicas realizadas, pois, de maneira geral, quanto maior a biodegradação do BTEX das amostras, menor foram os efeitos genotóxicos e mutagênicos registrados.

5. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos com o organismo teste *A. cepa*, o BTEX se mostrou potencialmente genotóxico e mutagênico para células meristemáticas, inclusive quando testado em baixas concentrações.

A espécie *A. cepa* caracteriza-se em um eficiente organismo-teste para detecção de efeitos tóxicos induzidos por hidrocarbonetos do petróleo, como o BTEX. Ensaios de aberrações cromossômicas e de MN com estes organismos constituíram ferramentas bastante sensíveis na detecção de danos ao DNA induzidos pela mistura BTEX.

Avaliações de genotoxicidade e mutagenicidade, realizadas com células meristemáticas e F₁ de *A. cepa*, indicaram que o processo de biodegradação por microrganismos foi eficiente na biodegradação da mistura aquosa do BTEX, por diminuir os efeitos genotóxico e mutagênico, indicando que os compostos da mistura foram degradados em metabólitos não tóxicos para as células.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Profa. Dra. Dejanira Francheschi de Angelis, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, por disponibilizar o efluente bruto de refinaria de petróleo, para a obtenção dos microrganismos biodegradadores do BTEX e pelas importantes informações sobre a metodologia de seleção dos microrganismos destes efluentes. Ao Prof. Dr. René Peter Schneider, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP - São Paulo, pelas importantes indicações e sugestões sobre o BTEX. Ao Programa de Recursos Humanos ANP/FINEP/MCTCTPETRO, PRH-05 da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brasil, pelo suporte financeiro.

7. REFERÊNCIAS

ANNESER, B.; EINSIEDL, F.; MECKENSTOCK, R.U.; RICHTERS, L.; WISOTZKY, F.; GRIEBLER, C. High-resolution monitoring of biogeochemical gradients in a tar oil-contaminated aquifer. **Applied Geochemistry**, v. 23, p. 1715-1730, 2008.

AATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, M.; AHMAD, A. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105-113, 2002.

(ATSDR) AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Interaction profile for: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX)**. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2004, 137p.

BAMFORTH, S.M; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p.723–736, 2005.

BARRETO, G.E.S.; OLIVEIRA, E.S.; VILLAR, F.A.G.A.; SANTOS, G.S.; LIMA, R.M.F.; COSTA, S.L.; COSTA, M.F.D.; EGITO, E.S.T.; EL-BACHÁ, R.S. Investigation of toxic factors affecting cells of rat brains exposed to 3-methylcatechol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n.5, p.839-849, 2007.

BIANCHI, J. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Malation, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e células de mamíferos**. 2008. 165f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

BIRD, M.G.; GREIM, H.; SNYDER, R.; RICE, J.M. International symposium: Recent advances in benzene toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v.153–154, p.1–5, 2005.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722-725, 2008.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas subterrâneas no Estado de São Paulo 2001 – 2003**, São Paulo: CETESB, 2004, 137 p.

CHEN, C.S.; HSEU, Y.C.; LIANG, S.H.; KUO, J.-Y.; CHEN, S.C. Assessment of genotoxicity of methyl-tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. **Journal of Hazardous Materials**, v.153, p. 351–356, 2008.

DEAN, B. J. Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. **Mutation Research**, v.154, p.153-181, 1985.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, doi:10.1016/j.ecoenv.2009.03.014.

FISKESJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium cepa*. **Atlas**, v.21, p.139-149, 1993.

GREEN, M. **Academic American Encyclopedia**, Danbury: Grolier Electronic Publishing, 1988.

HAMMER, K.D. Metabolite ratio of toluene-exposed rotogravure printing plant workers reflects individual mutagenic risk by sister chromatid exchanges. **Mutation Research**, v.519, p.171–177, 2002.

HENDERSON, L.; BRUSICK, D.; RATPAN, F.; VEENSTRA, G. A review of the genotoxicity of ethylbenzene. **Mutation Research**, v.635, p. 81–89, 2007.

HUTCHINS, S.R.; SEWELL, G.W.; KOVACS, D.A.; SMITH, G.A. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions, **Environmental Science and Technology**, v.25, p. 68-76, 1991.

IRWIN, R.J.; VANMOUWERIK, M.; STEVENS, L.; SEESE, M.D.; BASHAM, W. **Environmental Contaminants Encyclopedia**, Fort Collins: Water Resources Division, 1997.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells, **Aquatic Toxicology**, v.88, p.214-219, 2008.

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

LOVLEY, D. R. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 75-81, 1997.

MA, T.H.; XU, Z. Validation of a new protocol of the *Allium* micronucleus test for clastogens. **Environmental Mutagenesis**, v. 8, n. 6, p. 65-66, 1986.

MAILA, M. P.; CLOETE, T. E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants – perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, p. 1-8, 2005.

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.

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

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluents using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, v.69, n.4, p.399-408, 2004.

NTP. NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of ethylbenzene (Cas No. 100-41-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies), **NIH Publication No. 99-3956**. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC.NTP TR 466, 1999.

PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M.; CORSEUIL, H.X.; SCHNEIDER, M.R.; LINHARES, M.M. **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo**. Salvador: NEAMA, 2002, 246p.

PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R. L. Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 415-420, 2005.

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

ROMA-TORRES, J.; TEIXEIRA, J. P.; SILVA, S.; LAFFON, B., CUNHA, L. M.; MÉNDEZ, J.; MAYAN, O. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. **Mutation Research**, v. 604, p. 19-27, 2006.

SERRANO-GARCÍA, L., MONTEIRO-MONTOYA, R. Micronuclei and heterochromatid buds are the results of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.38, p.38-45, 2001.

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

SUDHAKAR, R.; NINGE-GOWDA, K.N.; VENU, G. Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*. **Cytologia**, v.66, p.235-239, 2001.

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

(USEPA) U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Oil and Hazardous Materials/Technical Assistance Data System (OHM/TADS)**. Denver: Micromedex Inc.: 1985.

(USEPA) U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Toxicological review of toluene (CAS No. 108-88-3)**. Washington: USEPA, EPA/635/R-05/004, 2005, 107p.

VAN'T HOF, J.; SCHAIRER, L.A. *Tradescantia* assay system for gaseous mutagens: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v.99, p.303-315, 1982.

WATERS, M. D.; STACK, H. F.; BRADY, A. L.; LOHMAN, P. H. M.; HAROUN, L.; VAINIO, H. Use of computerized data listings and activity profiles of genetic and related effects in the review of 195 compounds. **Mutation Research**, v.205, p.295-312, 1988.

(WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 190: Xylenes**, Geneva: World Health Organization, 1997.

(WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 190: Xylenes**, Geneva: World Health Organization, 1997.

(WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 52: Toluene**, Geneva: World Health Organization, 1986.

WHYSNER, J.; VIJAYARAJ REDDY, M.; ROSS, P.M.; MOHAN, M.; LAX, E. A. Genotoxicity of benzene and its metabolites. **Mutation Research**, v.566, p.99-130, 2004.

Tabela 1. Análise química quantitativa do BTEX detectado nas amostras, antes e após o processo de biodegradação.

Amostra	Composto	Amostras iniciais (µg/L)				Amostras biodegradadas (µg/L)			
		Concentração	LD(µg/L)	FD	VI(mL)	Concentração	LD(µg/L)	FD	VI(mL)
Água de diluição	B	ND							
	T	ND							
	E	ND	0,30	1	10,00	-	-	-	-
	X (m,p)	ND							
	X (o)	ND							
	Total	ND							
BTEX 1	B	902344,00				322254,00			
	T	168698,00				63700,00			
	E	40404,00	600,00	2000	10,00	14809,00	300,00	1000	0,01
	X (m,p)	9222,00				3114,00			
	X (o)	2520,00				930,00			
	Total	1123188,00				404807,00			
BTEX 2	B	41862,90				20701,15			
	T	11137,90				2540,50			
	E	4206,60	30,00	100	0,10	306,65	15,00	50	0,20
	X (m,p)	999,20				104,30			
	X (o)	328,80				41,85			
	Total	58535,40				23694,45			
BTEX 3	B	8922,95				8,03			
	T	2602,45				2,95			
	E	1039,85	15,00	50	0,20	1,13	0,30	1	10,00
	X (m,p)	236,35				ND			
	X (o)	70,65				ND			
	Total	12872,25				12,10			
BTEX 4	B	4,36				3,47			
	T	22,29				1,62			
	E	45,62	0,30	1	10,00	ND	0,30	1	10,00
	X (m,p)	9,82				ND			
	X (o)	3,41				ND			
	Total	85,51				5,09			
BTEX 5	B	1,65				ND			
	T	3,03				ND			
	E	4,89	0,30	1	10,00	ND	0,30	1	10,00
	X (m,p)	ND				ND			
	X (o)	ND				ND			
	Total	9,57				ND			

ND: Não detectável; LD: Limite de detecção; FD: Fator de diluição; VI: Volume inicial da amostra. USEPA-SW 846 método 8021B.

Tabela 2. Índice mitótico, índices de fases e frequência de morte celular observados em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações da mistura BTEX.

ENSAIOS	REPETIÇÕES	IM	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE	MC
CN	1	44.26 ± 15.87	85.11 ± 4.79	4.71 ± 2.46	2.54 ± 1.39	7.64 ± 2.51	0.01 ± 0.05
	2	53.30 ± 6.80	87.46 ± 3.16	2.78 ± 1.20	1.55 ± 0.65	8.22 ± 2.29	0.16 ± 0.29
CP	1	35.32 ± 9.92	82.55 ± 5.30	5.77 ± 1.69	3.51 ± 1.97	8.17 ± 3.25	0.00 ± 0.00
	2	54.34 ± 6.51	88.84 ± 2.41	3.25 ± 0.95	1.54 ± 0.36	6.36 ± 2.17	0.17 ± 0.37
BTEX 1	1	39.36 ± 8.23	90.25 ± 2.84 *	3.72 ± 1.335	1.38 ± 0.79	4.65 ± 1.70 *	0.19 ± 0.38
	2	52.54 ± 5.89	88.64 ± 4.25	2.93 ± 1.07	1.60 ± 0.92	6.83 ± 4.03	0.21 ± 0.31
BTEX 2	1	33.37 ± 4.56	83.56 ± 3.83	5.63 ± 1.56	3.84 ± 1.78	6.97 ± 1.91	0.03 ± 0.09
	2	52.65 ± 3.00	87.70 ± 2.59	3.50 ± 1.37	2.13 ± 0.80	6.66 ± 1.88	0.04 ± 0.12
BTEX 3	1	35.08 ± 2.53	84.65 ± 2.83	5.12 ± 1.58	2.51 ± 0.68	7.72 ± 1.47	0.07 ± 0.22
	2	52.49 ± 3.73	86.26 ± 1.35	3.26 ± 0.77	2.03 ± 0.51	8.45 ± 1.02	0.00 ± 0.00
BTEX 4	1	53.59 ± 3.46	86.10 ± 4.06	3.08 ± 1.27	2.27 ± 0.58	8.55 ± 3.80	0.08 ± 0.24
	2	52.85 ± 4.67	85.61 ± 2.41	3.76 ± 0.99	2.06 ± 0.75	8.56 ± 2.37	0.08 ± 0.25
BTEX 5	1	33.68 ± 4.72	82.84 ± 4.70	5.06 ± 1.86	3.17 ± 0.93	8.94 ± 2.92	0.00 ± 0.00
	2	53.33 ± 5.20	86.40 ± 3.53	3.63 ± 1.08	2.09 ± 0.91	7.89 ± 2.30	0.02 ± 0.06

CN: controle negativo; CP: controle positivo; IM: índice mitótico; MC: morte celular.

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$), pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

Tabela 3. Índice mitótico, índices de fases e frequência de morte celular observados em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações da mistura BTEX submetidas ao processo de biodegradação.

ENSAIOS	IM	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE	MC
Branco	59.98 ± 7.19	83.02 ± 2.62	2.29 ± 1.07	0.78 ± 0.48	13.91 ± 2.64	0.05 ± 0.16
Biodegradado 1	61.45 ± 8.69	85.39 ± 2.37	2.64 ± 0.49	1.50 ± 0.91	10.46 ± 1.86*	0.00 ± 0.00
Biodegradado 2	55.04 ± 5.24	84.02 ± 4.32	2.35 ± 1.06	1.32 ± 0.73	12.31 ± 3.65	0.15 ± 0.34
Biodegradado 3	55.76 ± 8.31	84.36 ± 5.11	2.24 ± 1.02	2.01 ± 1.21*	11.40 ± 3.78	0.00 ± 0.00
Biodegradado 4	55.56 ± 5.08	81.24 ± 2.86	2.79 ± 0.83	1.23 ± 0.82	14.75 ± 3.03	0.00 ± 0.00
Biodegradado 5	59.44 ± 7.63	81.77 ± 3.64	2.45 ± 0.71	1.50 ± 0.78	14.28 ± 2.90	0.00 ± 0.00

* Estatisticamente diferente do branco ($p < 0,05$), pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

Tabela 4. Frequências de aberrações cromossômicas e nucleares observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações não biodegradadas da mistura BTEX.

ENSAIOS	REPETIÇÕES	CN	CP	BTEX 1	BTEX 2	BTEX 3	BTEX 4	BTEX 5
Aberrações cromossômicas								
Aderência	1	0,06 ± 0,08	0,21 ± 0,32	0,39 ± 0,33*	0,55 ± 0,28*	0,34 ± 0,22*	0,56 ± 0,38*	0,21 ± 0,12*
	2	0,10 ± 0,10	0,33 ± 0,26	0,31 ± 0,21*	0,60 ± 0,32*	0,56 ± 0,27*	0,69 ± 0,40*	0,60 ± 0,21*
Atraso	1	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,06	0,19 ± 0,38	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,12	0,04 ± 0,12	0,08 ± 0,08
	2	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,06	0,00 ± 0,00
C-metáfase	1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,04	0,01 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,06
Perda cromossômica	1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,06	0,03 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,24	0,00 ± 0,00
	2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,12 ± 0,14	0,02 ± 0,06	0,04 ± 0,08	0,22 ± 0,29	0,02 ± 0,07
Ponte cromossômica	1	0,09 ± 0,12	0,28 ± 0,26*	0,15 ± 0,20	0,52 ± 0,35*	0,25 ± 0,19	0,10 ± 0,14	0,24 ± 0,18
	2	0,04 ± 0,07	0,19 ± 0,13*	0,08 ± 0,10	0,29 ± 0,25*	0,12 ± 0,10	0,08 ± 0,14	0,08 ± 0,14
Quebra cromossômica	1	0,02 ± 0,05	0,40 ± 0,34*	0,04 ± 0,07	0,13 ± 0,13*	0,04 ± 0,06	0,11 ± 0,24	0,14 ± 0,19
	2	0,02 ± 0,06	0,23 ± 0,18*	0,18 ± 0,19	0,25 ± 0,19*	0,02 ± 0,06	0,14 ± 0,19	0,04 ± 0,08
Multipolaridade	1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,13	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,06	0,00 ± 0,00
	2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,13	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,06	0,02 ± 0,06
Anormalidades nucleares								
Broto nuclear	1	0,01 ± 0,05	0,14 ± 0,14*	0,80 ± 0,45*	0,23 ± 0,22*	0,51 ± 0,64*	2,90 ± 0,80*	0,42 ± 0,34*
	2	0,29 ± 0,30	1,25 ± 0,48*	3,55 ± 1,07*	2,62 ± 0,72*	1,48 ± 0,58*	3,04 ± 1,14*	1,22 ± 0,42*
Célula polinucleada	1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,18*	0,17 ± 0,27	0,01 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,13*	0,06 ± 0,13	0,10 ± 0,25	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,19
Célula poliplóide	1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,09
	2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,08	0,02 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Microcito	1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	2	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Núcleo lobulado	1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,16	0,00 ± 0,00
	2	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,13	0,14 ± 0,24	0,09 ± 0,16	0,10 ± 0,14	0,02 ± 0,06	0,04 ± 0,08
Total de Aberrações	1	0,17 ± 0,13	1,06 ± 0,74*	1,88 ± 0,71*	1,72 ± 0,65*	1,25 ± 0,75*	3,99 ± 1,23*	1,12 ± 0,58*
	2	0,44 ± 0,30	2,12 ± 0,55*	4,55 ± 1,34*	4,03 ± 0,75*	2,40 ± 0,69*	4,23 ± 1,21*	2,10 ± 0,74*

CN: controle negativo; CP: controle positivo

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$), pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

Tabela 5. Frequências de aberrações cromossômicas e nucleares observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações da mistura BTEX, submetidas ao processo de biodegradação.

	ENSAIOS	CN	CP	BRANCO	BTEX 1	BTEX 2	BTEX 3	BTEX 4	BTEX 5
Aberrações cromossômicas									
Aderência		0.15 ± 0.15	0.39 ± 0.19	0.23 ± 0.17	0.29 ± 0.18	0.33 ± 0.26	0.35 ± 0.31	0.29 ± 0.22	0.14 ± 0.16
Atraso		0.02 ± 0.06	0.08 ± 0.14	0.12 ± 0.14	0.02 ± 0.06	0.12 ± 0.16	0.08 ± 0.14	0.08 ± 0.13	0.10 ± 0.10
C-metáfase		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.06	0.00 ± 0.00
Perda cromossômica		0.02 ± 0.06	0.06 ± 0.10	0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.10*	0.08 ± 0.10	0.08 ± 0.10	0.14 ± 0.16	0.06 ± 0.09
Ponte cromossômica		0.00 ± 0.00	0.17 ± 0.17	0.06 ± 0.13	0.08 ± 0.13	0.06 ± 0.09	0.19 ± 0.18	0.06 ± 0.09	0.09 ± 0.13
Quebra cromossômica		0.00 ± 0.00	0.27 ± 0.28*	0.02 ± 0.06	0.06 ± 0.09	0.06 ± 0.09	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.06
Multipolaridade		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.06	0.02 ± 0.06	0.02 ± 0.06	0.03 ± 0.07	0.02 ± 0.06	0.00 ± 0.00
Anormalidades nucleares									
Broto nuclear		0.52 ± 0.33	1.34 ± 1.02	0.65 ± 0.37	1.42 ± 0.78*	0.94 ± 0.39*	1.13 ± 0.70*	0.97 ± 0.75	0.91 ± 0.41
Célula polinucleada		0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.06	0.08 ± 0.10	0.10 ± 0.14	0.14 ± 0.16	0.08 ± 0.10	0.06 ± 0.09	0.02 ± 0.06
Célula poliplóide		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Microcito		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Núcleo lobulado		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Total de Aberrações		0.71 ± 0.39*	2.33 ± 1.09*	1.17 ± 0.48	2.15 ± 0.81*	1.74 ± 0.55*	1.94 ± 0.78*	1.62 ± 0.61	1.33 ± 0.42

CN: controle negativo; CP: controle positivo

* Estatisticamente diferente do branco ($p < 0,05$), pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

Tabela 6. Frequências de micronúcleo (MN) observadas em células meristemáticas e da região F₁ de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações não biodegradadas da mistura BTEX.

ENSAIOS	REPETIÇÕES	MN	MN F ₁
CN	1	0.03 ± 0.06	0.84 ± 0.69
	2	0.04 ± 0.08	0.79 ± 0.65
CP	1	2.52 ± 0.53*	5.55 ± 3.00*
	2	3.47 ± 1.48*	5.30 ± 2.89*
BTEX 1	1	0.33 ± 0.34*	1.05 ± 0.95
	2	0.30 ± 0.27*	1.00 ± 0.92
BTEX 2	1	0.39 ± 0.36*	0.68 ± 0.67
	2	0.27 ± 0.23*	1.23 ± 1.24
BTEX 3	1	0.07 ± 0.12	1.78 ± 1.34
	2	0.10 ± 0.14	1.68 ± 1.26
BTEX 4	1	0.44 ± 0.74*	1.05 ± 0.72
	2	0.28 ± 0.25*	1.01 ± 0.70
BTEX 5	1	0.13 ± 0.09*	0.47 ± 0.49
	2	0.28 ± 0.26*	0.44 ± 0.46

CN: controle negativo; CP: controle positivo

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$), pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

Tabela 7. Frequências de micronúcleo (MN) observadas em células meristemáticas e da região F₁ de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações da mistura BTEX, submetidas ao processo de biodegradação.

ENSAIOS	MN	MN F ₁
CN	0.11 ± 0.13	0.77 ± 0.43
CP	1.94 ± 0.62*	5.29 ± 1.91*
Branco	0.18 ± 0.21	0.39 ± 0.50
Biodegradado 1	0.12 ± 0.14	0.56 ± 0.63
Biodegradado 2	0.16 ± 0.16	0.96 ± 0.83
Biodegradado 3	0.25 ± 0.21	0.69 ± 0.48
Biodegradado 4	0.10 ± 0.14	0.46 ± 0.49
Biodegradado 5	0.14 ± 0.13	0.55 ± 0.79

CN: controle negativo; CP: controle positivo

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$), pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

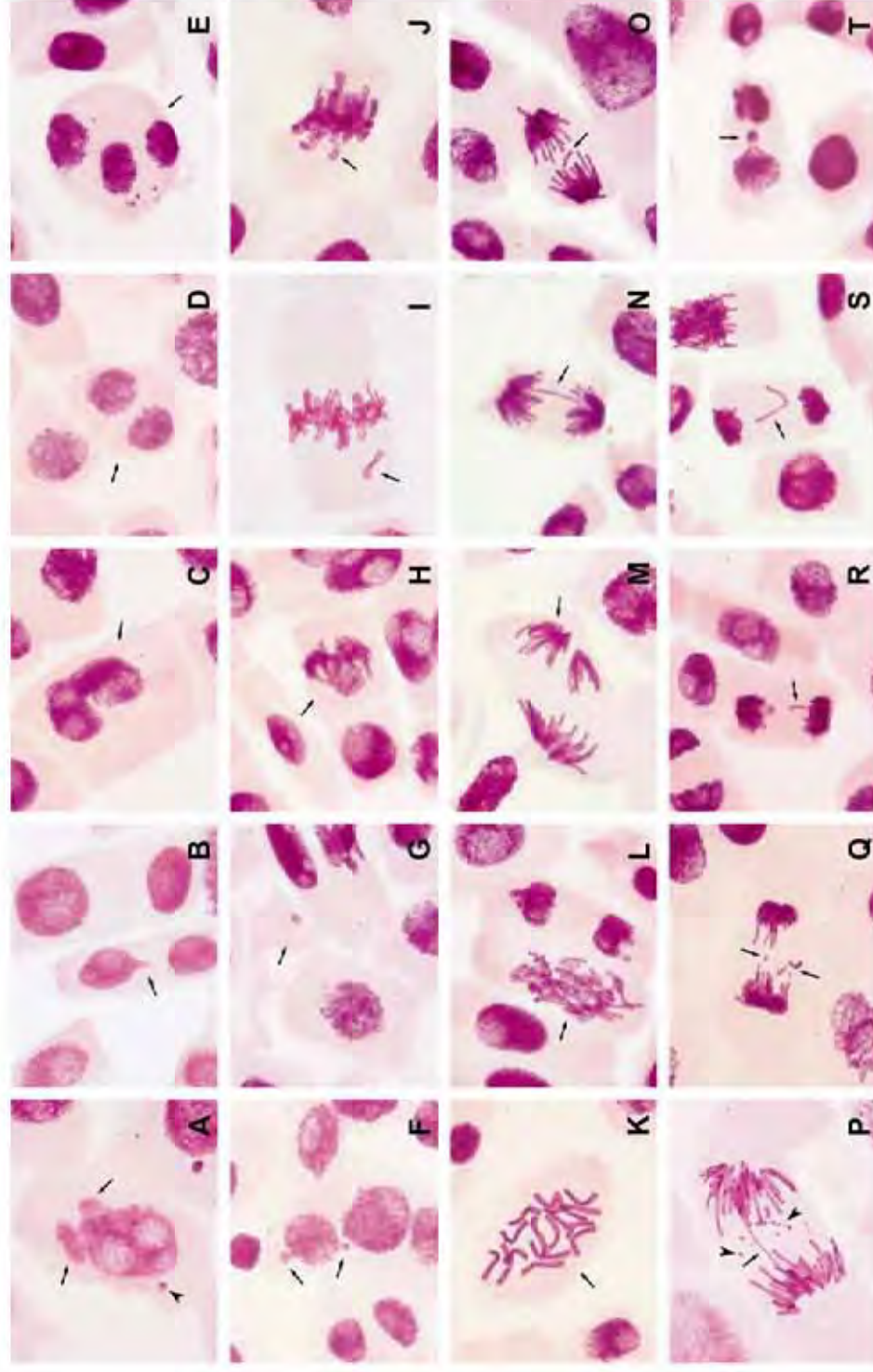


Figura 1. Alterações cromossômicas e nucleares observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações do BTEX. **A.** Célula poliploide com brotos (setas) e micronúcleo (cabeça de seta); **B.** Broto nuclear (seta); **C.** Núcleo bilobulado (seta); **D.** Célula binucleada (seta); **E.** Célula trinucleada; **F.** Célula com dois brotos nucleares (setas); **G.** Microcito (seta); **H.** Metafase com aderência (seta); **I.** Metafase com perda cromossômica (seta); **J.** Metafase com quebra cromossômica (seta); **K.** C-metáfase; **L.** Metafase poliploide com aderência (seta); **M.** Anáfase multipolar; **N.** Anáfase com ponte cromossômica (seta); **O.** Anáfase com quebra cromossômica (seta) e quebras cromossômicas (cabeça de seta); **Q.** Telófase inicial com quebras cromossômicas (setas); **R.** Telófase com atraso cromossômico (seta); **S.** Telófase com perda cromossômica (seta); **T.** Telófase com possível incorporação de cromossomo perdido (seta).

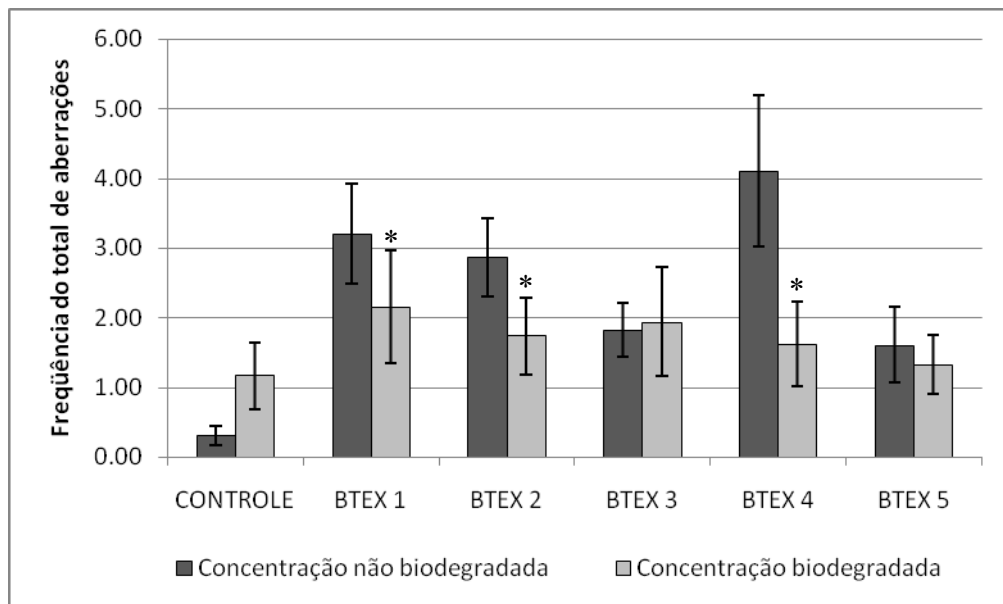


Figura 2. Comparação entre a frequência de danos genotóxicos (aberrações cromossômicas e nucleares) ocasionados ao material genético de células meristemáticas de *Allium cepa*, pela exposição às concentrações de BTEX não biodegradadas e as suas respectivas amostras biodegradadas. *Diferença significativa entre a concentração não biodegradada e sua respectiva concentração biodegradada, de acordo com o teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

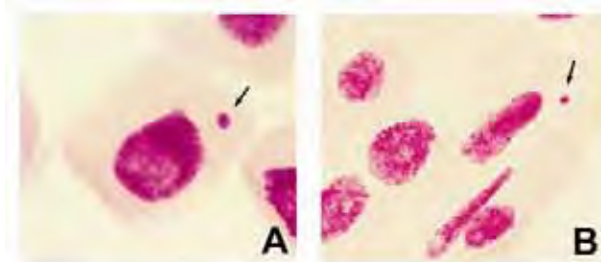


Figura 3. Alterações mutagênicas observadas em células de raízes de *Allium cepa* expostas ao BTEX. **A.** Célula meristemática micronucleada; **B.** Célula de região F₁ micronucleada.

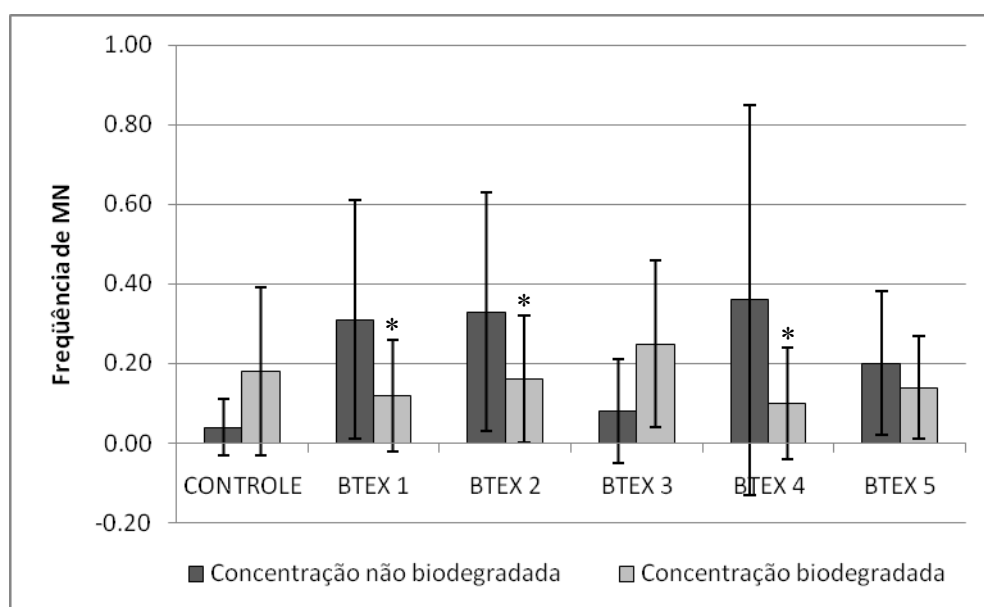


Figura 4. Comparação entre a frequência de danos mutagênicos (micronúcleos - MN) ocasionados ao material genético de células meristemáticas de *Allium cepa*, pela exposição às concentrações de BTEX não biodegradadas e as suas respectivas amostras biodegradadas. *Diferença significativa entre a concentração não biodegradada e sua respectiva concentração biodegradada, de acordo com o teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos da mistura BTEX, antes e após biodegradação, por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo em cultura de células HTC.

Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo¹, Sílvia Tamie Matsumoto², Maria Aparecida Marin-Morales¹

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

²Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Av. Marechal Campos, 1648, Maruípe, 29055-070 - Vitória, ES - Brasil

Resumo

Devido ao seu amplo uso, o BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) é um poluente constante do ambiente, com alta potencialidade de contaminar recursos hídricos, em especial, os subterrâneos. O processo de biorremediação por microrganismos tem sido freqüentemente utilizado como uma ferramenta para a remoção do BTEX de locais contaminados. A aplicação de ensaios biológicos tem se mostrado útil na avaliação da eficiência dos processos de biorremediação, por estes, além de identificar a toxicidade dos contaminantes originais, permitirem também uma melhor identificação dos efeitos de possíveis metabólitos formados durante o processo de biodegradação sobre os organismos-teste, promovendo informações que podem oferecer uma maior confiabilidade ao processo. Este trabalho teve como objetivo avaliar a potencialidade genotóxica e mutagênicas de cinco diferentes concentrações do BTEX, antes e após a biodegradação, sobre células HTC mantidas em cultura. Foi observado um efeito mutagênico, avaliado pelo teste do micronúcleo, para a maior concentração testada e para a sua respectiva concentração não biodegradada. A genotoxicidade, avaliada por meio do ensaio do cometa, foi significativa para todas as concentrações não biodegradadas testadas e não significativa para as biodegradadas. Pelos resultados obtidos, podemos afirmar que o BTEX é mutagênico em concentrações próximas à sua solubilidade em água e genotóxico até mesmo em concentrações mais baixas, contrariando alguns resultados descritos para os componentes da mistura testados individualmente, sugerindo assim um efeito sinérgico da mistura. O processo de biodegradação constitui uma metodologia segura e eficiente para ser aplicada em locais contaminados com BTEX.

Palavras-chave: BTEX, Ensaio do cometa, micronúcleo, cultura de células de mamíferos, Células HTC, biodegradação.

1. Introdução

Derivados do petróleo como benzeno, o tolueno, o etilbenzeno e o xileno (BTEX) são hidrocarbonetos monoaromáticos com características tóxicas; alta mobilidade no meio-ambiente, tanto na fase gasosa, líquida como sólida; e alta solubilidade em água. A presença do BTEX no ambiente é preocupante, principalmente pela sua potencialidade em contaminar recursos hídricos, em especial, os subterrâneos (LOVLEY, 1997; ANNESER et al., 2008).

Desde 1982, o benzeno tem sido considerado uma substância carcinogênica para humanos, devido ao seu potencial em induzir vários tipos de leucemias (IARC, 1987). Testes *in vitro* têm demonstrado que o benzeno apresenta uma fraca ou ausente ação mutagênica, mas é capaz de induzir quebras ou interferir na segregação cromossômica (DEAN, 1985; WATERS et al., 1988; BIRD et al., 2005).

O tolueno é um inibidor de atividades do sistema nervoso central (NLM, 1994), que promove perda de memória e danos progressivos do cérebro e dos nervos, tanto em exposições agudas como crônicas (DABNEY, 1994). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1986), o tolueno não é genotóxico nem carcinogênico para animais e humanos.

O etilbenzeno foi classificado como uma substância possivelmente carcinogênica para humanos, devido a resultados significativos de carcinogenicidade obtidos em animais (IARC, 2000). Segundo Henderson et al. (2007), esse composto parece não induzir efeito genotóxico nos organismos, porém, muitos ensaios são controversos a esse respeito.

O xileno possui uma ação neurotóxica que se manifesta por meio de uma disfunção cognitiva, aumento dos níveis das catecolaminas hipotalâmicas, até um quadro de hiperatividade motora e convulsões (ATSDR, 1995). Entretanto, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1997), o xileno não apresenta efeitos genotóxicos nem carcinogênicos para humanos e animais de laboratório.

O conhecimento sobre o mecanismo de ação e o efeito tóxico da ação conjunta do benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, bem como o efeito aditivo, antagônico ou sinérgico dessas substâncias sobre os organismos alvos, é bastante limitado, sendo que informações sobre a interação desses químicos são restritas, principalmente, a combinações binárias destes compostos (ATSDR, 2004).

Devido à elevada utilização do BTEX como solventes e matérias-primas na fabricação de pesticidas, plásticos, fibras sintéticas, tintas e produtos farmacêuticos (HUTCHINS et al., 1991; BARRETO et al., 2007) e à sua alta concentração em combustíveis fósseis, o BTEX é um poluente constante do meio ambiente, o que tem estimulado o desenvolvimento de diversas metodologias que possibilitam a sua remoção de locais contaminados. Uma

alternativa para a degradação do BTEX em aquíferos contaminados é o processo de biorremediação que, segundo Barthe (1986) e Bouwer (1994), é uma metodologia atrativa, segura e efetiva, frente às técnicas físicoquímicas convencionais que são empregadas no tratamento de águas contaminadas por derivados de petróleo.

Para avaliar a viabilidade do processo de biorremediação no tratamento de aquíferos contaminados com essas substâncias, o uso de bioensaios, combinados com avaliações químicas, apresentam resultados mais confiáveis para análise de riscos genotóxicos, permitindo reconhecer a genotoxicidade de possíveis metabólitos formados durante o processo de biodegradação (REUSSER et al., 2002; PLAZA et al., 2005).

A cultura de células de mamíferos tem sido amplamente utilizada como sistemas-teste em estudos de investigação do potencial genotóxico e mutagênico de poluentes ambientais (MATSUMOTO et al., 2003; 2005; CHENG et al., 2005; CARDOZO et al., 2006; BAO et al., 2007; BIANCHI et al., 2008; SPEIT et al., 2008). Entre essas culturas, a de HTC (*Hepatoma Tissue Culture*) tem sido considerada como uma linhagem propícia para esse fim, principalmente, por ser capaz de metabolizar substâncias químicas (GAD, 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar, por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo em linhagem de células de hepatoma de rato (HTC), a potencialidade genotóxica e mutagênica de diferentes concentrações da mistura BTEX, antes e após processo de biodegradação, e avaliar a eficiência deste processo na redução dos efeitos tóxicos da mistura BTEX.

2. Material e métodos

2.1. Químico testado

O composto BTEX, avaliado neste trabalho, compreende uma mistura de benzeno (grau de pureza 99% - CAS N° 71-43-2), tolueno (grau de pureza 99% - CAS N° 108-88-3), etilbenzeno (grau de pureza 99,80% - CAS N° 100-41-4) e xileno (grau de pureza 99%, mistura de isômeros - CAS 1330-20-7).

Foram preparadas cinco concentrações diferentes da mistura BTEX. O preparo destas concentrações foi feito com base em dois parâmetros distintos: 1. Solubilidade em água: Três concentrações diferentes de BTEX foram preparadas a partir dos índices de solubilidade em água de cada um dos componentes da mistura BTEX (benzeno: 1780mg/L, tolueno: 535mg/L, etilbenzeno: 152mg/L e xilenos: 135mg/L – valor este que corresponde à solubilidade do isômero menos solúvel, *m*-xileno). A primeira concentração (mais alta) corresponde à própria

mistura citada acima (BTEX 1). As outras concentrações foram obtidas pela diluição da solução BTEX 1 pelos fatores 10 (BTEX 2) e 100 (BTEX 3); 2. Concentrações-limite em água potável: a concentração BTEX 4 foi preparada seguindo as concentrações-limite de cada componente do BTEX para água potável, estabelecido pelo órgão de fiscalização ambiental do Estado de São Paulo/Brasil – CETESB (2004) (benzeno: 5µg/L, tolueno: 170µg/L, etilbenzeno: 200µg/L e xilenos totais: 300µg/L). A quinta concentração (BTEX 5) foi elaborada simulando a presença da mistura, com valores abaixo das concentrações limite para água potável (benzeno: 1,25µg/L, tolueno: 42,5µg/L, etilbenzeno: 50µg/L e xilenos totais: 75µg/L). As diluições foram preparadas com água ultra pura, aerada por 12 horas a 20° C.

O teste de controle negativo foi feito com meio de cultura mais PBS e o de controle positivo com metil metano sulfonato- MMS (CAS N° 66-27-3), na concentração de 4×10^{-2} M.

2.2. Amostras biodegradadas

As amostras biodegradadas foram obtidas pela degradação bacteriana das concentrações de BTEX, descritas anteriormente. As bactérias usadas no processo de biodegradação foram selecionadas de um pool de bactérias presentes em um efluente bruto de refinaria de petróleo. O monitoramento do processo de biodegradação foi realizado em HACH BOD Trak Apparatus, em garrafas de vidro âmbar completamente vedadas, com agitação constante a 20 °C durante 20 dias. Cada garrafa continha uma das concentrações de BTEX testadas neste trabalho e uma quantidade fixa de nutrientes (HACH BOD solution) e bactérias. Todo o consumo do oxigênio disponível nos ensaios, contabilizado pelo aparelho, foi relacionado com o processo de biodegradação do BTEX, por ser este a única fonte de carbono disponível no meio.

Um outro ensaio foi realizado com o meio de cultura e a bactéria, porém sem adição de BTEX, para servir como controle da biodegradação (branco). Este teste foi desenvolvido para uma certificação de que os possíveis efeitos genotóxico ou mutagênico observados nos ensaios fossem decorrentes das concentrações testadas e não da solução nutritiva utilizada.

2.3. Análise química

A análise de BTEX presente nas amostras, antes e após o processo de biodegradação, foi realizada pelo laboratório Analytical Technology Company (São Paulo – Brasil). O método utilizado foi por injeção por Headspace e cromatografia gasosa com detector de fotoionização (GC/PID), de acordo com a USEPA-SW846 método 8021B.

2.4. Linhagem celular

O material biológico utilizado como sistema-teste para realização do ensaio consistiu de células HTC (*Hepatoma tissue culture*), obtidas da espécie *Rattus norvegicus*, adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil. As células foram cultivadas em um meio contendo D-Mem + HAMF12 (1:1) suplementado com 10% de soro bovino fetal a 37 °C, sendo mantidas em frascos descartáveis de 25 cm² em estufa BOD a 37 °C.

2.5. Teste do Micronúcleo

Para a realização do teste do micronúcleo, as células foram cultivadas, por um ciclo celular completo (24 horas), antes da adição dos tratamentos. Em seguida, foram realizados tratamentos simultâneos de 24 horas, em triplicata, com a adição de 50 µL de cada uma das 5 concentrações do BTEX, das amostras biodegradadas, além dos ensaios com MMS (4x10⁻²M) (controle positivo), com PBS (controle negativo) e com o branco (controle da biodegradação). Cada uma das concentrações foi testada individualmente. Após os tratamentos, as células foram lavadas por duas vezes com PBS e adicionados 5 mL de meio de cultura completo com 3 µg/mL de citocalasina B, onde permaneceram por 28 horas. Decorrido este tempo, as células foram colhidas e fixadas em Carnoy (metanol/ácido acético 3:1 – v:v). A seguir, foram depositadas algumas gotas da cultura de células sobre lâminas limpas, geladas e contendo um filme de água. Após secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 5 minutos.

Foram analisadas, sob microscopia de luz (aumento de 1000 vezes), cerca de 1000 células binucleadas com membranas nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração por lâmina, sendo duas lâminas para cada repetição. Como todo experimento foi realizado em triplicata, obteve-se um total de cerca de 6000 células contabilizadas para cada concentração e controles avaliados. Para a avaliação do potencial mutagênico do BTEX, os resultados dos ensaios de MN foram comparados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (p<0,05). Para verificar a efetividade do processo de biodegradação na redução da mutagenicidade do BTEX, foram comparadas as frequências de MN, entre a concentração preparada e a sua correspondente amostra biodegradada, pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05).

2.6. Ensaio do cometa

Após serem cultivadas por 24 horas (um ciclo celular completo) em meio de cultura completo, as células das três repetições de todos os tratamentos foram tratadas, independentemente, por 24 horas, com cada uma das concentrações de BTEX (com e sem biodegradação) e com as substâncias controle, conforme já descrito para o teste de MN. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e tripsinizadas com 0,5 mL de tripsina-EDTA 0,025% por, no máximo, 2 minutos. Decorrido este tempo, o processo foi interrompido pela adição de 5 mL de meio de cultura completo. As células foram então transferidas para tubos Falcon e centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, reservando-se, apenas, 0,5 mL da solução, onde o *pellet* foi ressuscitado.

Para o prosseguimento do ensaio do cometa, foram realizados testes de viabilidade celular para todos os tratamentos. Para isto, 20 µL de suspensão celular de cada tratamento foram misturados com 20 µL de Azul de Trypan 0,4% e transferidos para câmara de Neubauer. Foram contabilizadas as quantidades de células viáveis (sem coloração) e inviáveis (coradas em azul), presentes nos quatro quadrantes da câmara.

Após a verificação de que todos os tratamentos apresentaram, no mínimo, 80% de viabilidade celular, uma alíquota de 20 µL de suspensão celular foi misturada com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (37 °C), em uma concentração de 0,5% e, rapidamente, gotejada sobre lâminas secas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (60 °C), diluição 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínula e levadas à geladeira (temperatura de 4 °C), por 20 minutos. Após a remoção cuidadosa das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada, recém preparada, contendo 89 mL de solução de lise estoque (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris com pH ajustado para 10 com auxílio de 8 g de NaOH, 890 mL de água destilada e 1% de lauril sarcosinato de sódio), mais 1 mL de triton X-100 e 10 mL de DMSO, onde permaneceram por 1 hora, em geladeira, a 4 °C.

As lâminas foram posteriormente transferidas para uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (pH > 13) recém preparada (300 mM de NaOH, 1 mM de EDTA, preparado de uma solução estoque contendo NaOH 10N e 200 mM de EDTA, pH 10), onde permaneceram por 20 minutos antes da eletroforese, para desnaturação do DNA. A corrida de eletroforese foi realizada a 4 °C, por 20 minutos, a uma corrente de 25V e 300 mA. Seguindo-se a corrida, as lâminas foram submersas em solução de neutralização (0,4 M de tris-HCl, pH 7,5) em três séries de 5 minutos cada, secas a temperatura ambiente e fixadas com etanol por 10 minutos. Após a fixação e secagem, as lâminas foram coradas com 50 µL de solução de

brometo de etídio 1x, preparada de uma solução estoque 10x (200 µg/mL) e cobertas com lamínula.

Para cada tratamento foram analisados 100 nucleóides não sobrepostos e escolhidos aleatoriamente, a fim de se verificar o potencial genotóxico do composto nas suas diversas concentrações, para este sistema teste de mamíferos. A análise foi feita em microscópio de fluorescência, filtro B – 3⁴ (excitação: $\lambda = 420 - 490\text{nM}$, barreira $\lambda = 520\text{ nM}$), em objetiva de 40x. Os nucleóides foram classificados, visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos, em classes 0, 1, 2 e 3 (KOBAYASHI et al., 1995), onde a classe 0 representa células sem dano, a classe 1 – células com pouco dano, a classe 2 – células com médio dano e a classe 3 – células com grande dano.

O escore para os 100 nucleóides analisados foi obtido pela multiplicação do número de células encontradas em cada classe, pelo número da classe correspondente, com valores variando de 0 (ausência total de danos) a 300 (dano máximo causado). Para a comparação entre os escores obtidos dos tratamentos realizados com as concentrações de BTEX com o controle negativo e das concentrações biodegradadas com o branco (controle biodegradado), utilizou-se o teste estatístico ANOVA, com análise posteriori pelo método de Dunnet ($p < 0,05$). Para estimar uma possível redução ou aumento dos danos ocasionados pela biodegradação, em relação à concentração original, os dados foram comparados entre si (concentração não biodegradada e biodegradada) pelo teste de t Student. Para a verificação da existência de um efeito dose resposta entre as concentrações, foi utilizada a correlação de Pearson.

3. Resultados

3.1. Análise química

O resultado das análises químicas referente à quantificação do BTEX nas amostras testadas está apresentado na Tabela 1. As 5 concentrações de BTEX quantificadas quimicamente diferiram das inicialmente preparadas para a realização dos ensaios biológicos. Dessa forma, o valor quantificado nas análises químicas corresponde a real concentração de cada amostra testada (tabela 1), devendo ser este o valor a ser considerado para os testes aqui apresentados.

Pelos resultados das análises químicas feitas após a biodegradação, pode-se observar que houve uma redução da quantidade de BTEX, para todas as concentrações analisadas, o que comprova a eficiência das bactérias presentes no efluente bruto de refinaria de petróleo na

remoção desses compostos da água. Como o sistema utilizado para a realização da biodegradação era de ambiente totalmente fechado, a diminuição nas concentrações testadas foi atribuída, exclusivamente, ao consumo do BTEX como fonte de carbono pelas bactérias ali presentes.

3.2. Teste do Micronúcleo com bloqueio de citocinese

A avaliação do potencial mutagênico do BTEX, por meio do teste do micronúcleo, revelou que apenas a maior concentração testada (BTEX 1) e o controle positivo diferiram estatisticamente do controle negativo, pela presença de um maior número de células portadoras de micronúcleos (Figura 1). Quanto às amostras biodegradadas, somente a maior concentração testada (Biodegradado 1) apresentou resultados significativos de mutagenicidade, em relação ao branco (controle biodegradado) (Tabela 2).

Ao se comparar as freqüências de MN presentes nas células HTC expostas às 5 concentrações preparadas do BTEX e as suas respectivas concentrações biodegradadas, não foram observadas diferenças significativas entre elas para este quesito. Foi observado um aumento estatisticamente significativo da freqüência de MN entre o teste branco e o controle negativo, no entanto, tal diferença não induziu a um aumento significativo de micronúcleo nas amostras biodegradadas, quando comparadas com as amostras correspondentes não biodegradadas (Figura 2).

3.3. Ensaio do cometa

Os resultados obtidos para a viabilidade celular, avaliada pelo método da coloração exclusiva com Azul de Trypan, estão apresentados na Tabela 3. A porcentagem de células vivas presentes em todas as repetições de todos os tratamentos realizados esteve sempre acima dos 94%, indicando que as concentrações testadas do BTEX não foram citotóxicas para as células HTC.

A genotoxicidade do BTEX, avaliada por meio do ensaio do cometa, mostrou resultados significativos para o controle positivo e para todas as concentrações testadas (BTEX 1, 2, 3, 4 e 5), quando comparados ao resultado apresentado pelo controle negativo (Tabela 3). Enquanto o controle positivo apresentou uma maior freqüência de danos de classe 3 (grande dano), as amostras de BTEX induziram médios danos (classe 2) e, principalmente, pequenos danos (classe 1) (Figura 3). Em relação às amostras biodegradadas, nenhum resultado obtido foi significativo quando comparado com o branco.

A efetividade do processo de biodegradação foi comprovada pela redução de danos genotóxicos nas células HTC, observada para todas as concentrações biodegradadas, em relação às concentrações correspondentes não biodegradadas do BTEX (figura 4), independentemente de o teste branco ter apresentado um resultado superior de genotoxicidade, em relação ao controle negativo.

Pelo teste de correlação de Pearson podemos afirmar que houve um efeito dose-resposta dependente para as concentrações do BTEX, indicando que um aumento da concentração da mistura leva a um aumento do dano genotóxico nas células HTC. Esse mesmo padrão foi observado também para as amostras biodegradadas.

4. Discussão

O benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno são geralmente encontrados juntos, como resíduos químicos em ambientes contaminados, estando presentes na água, no solo e na atmosfera. Devido a sua reconhecida ação tóxica sobre os organismos e as suas características químicas, tais como solubilidade e baixo coeficiente octanol-água (K_{ow}), essas substâncias são consideradas poluentes em potencial de águas subterrâneas (CHEN et al., 2008; ANNESER et al., 2008). No entanto, apesar da grande preocupação existente em relação ao BTEX, informações que caracterizam o risco à saúde e a relação dose-resposta à exposição a misturas contendo exclusivamente benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) são bastante limitadas (ATSDR, 2004).

Segundo Whysner et al. (2004), estudos realizados com cultura de células geralmente exibem a mesma resposta genotóxica que estudos com animais *in vivo*. Esses mesmos autores afirmam que, como os produtos de biotransformação do benzeno são similares entre as espécies, estudos utilizando cultura de células animais apresentam resultados bastante satisfatórios para explicar um possível efeito genotóxico em humanos.

Nossos resultados mostraram uma frequência significativa de micronúcleos no ensaio realizado com a maior concentração testada (BTEX 1). Esse resultado sugere que o BTEX, em concentrações próximas as da solubilidade de seus constituintes em água, é potencialmente mutagênico para as células de hepatoma de ratos mantidas em cultura.

Alguns autores têm reconhecido, por meio de ensaios com diversos organismos teste, desde bactérias até mamíferos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que o benzeno é fracamente mutagênico ou não mutagênico (DEAN, 1985; WATERS et al., 1988; BIRD et al., 2005). No entanto, Mullin et al. (1998) concluíram que o benzeno é uma substância mutagênica para

células de pulmões de camundongos Big Blue (transgene *lacI*), pois, quando animais foram expostos a vapores deste químico apresentaram um aumento na frequência de mutações na extensão das deleções no transgene *lacI*, em relação aos animais não expostos. A ausência de um efeito mutagênico também foi relatada para o tolueno (USEPA, 2005), para o etilbenzeno (HENDERSON et al., 2007) e para o xileno (DEAN, 1985).

Dessa forma, o resultado aqui encontrado pode ser explicado pela ação sinérgica da mistura, de modo que, quando essas substâncias encontram-se misturadas, tem sua ação mutagênica potencializada. Nossos resultados corroboram com o obtido por Roma-Torres et al. (2006), onde trabalhadores expostos ao BTX (benzeno, tolueno e xileno) apresentaram um aumento significativo dos índices de micronúcleos em leucócitos de sangue periférico.

O processo de biodegradação, embora tenha reduzido a quantidade de BTEX presente nas amostras analisadas, mostrou não ser totalmente eficiente na redução dos danos mutagênicos para as células HTC expostas à maior concentração da mistura (BTEX 1). Isso provavelmente ocorreu porque a quantidade de BTEX presente na amostra biodegradada ainda era alta, superior àquela apresentada na segunda maior concentração (BTEX 2), considerada como não mutagênica. Esse fato pode ser explicado pela necessidade de um maior tempo de biodegradação para águas contaminadas com altas concentrações de BTEX, que deve exceder ao tempo simulado na concentração BTEX 1. Estes dados comprovam a necessidade da combinação de ensaios químicos e biológicos para uma melhor avaliação da eficiência de processos de remoção de poluentes do ambiente, como afirmam Reusser et al. (2002); Plaza et al. (2005) e Maila e Cloete (2005).

Pelos resultados do ensaio do cometa, é possível sugerir que o BTEX é uma mistura potencialmente genotóxica para células HTC. Chen et al. (2008) também concluíram que o BTEX é genotóxico para linfócitos humanos, por meio de seus experimentos realizados individualmente com diversas concentrações para cada um dos componentes da mistura (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno). Esses autores observaram, pelo ensaio do cometa em pH alcalino, um aumento no escore de danos ao DNA para todos os químicos testados e em pH neutro, que o benzeno e o xileno induziram quebras de fita dupla, na concentração de 200 μ M. Segundo estes autores o BTEX também produziu danos oxidativos em linfócitos humanos. Outros autores afirmam que o benzeno é uma substância promotora de aberrações cromossômicas, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo* (DEAN, 1985; WATERS et al., 1988; AU et al., 1991; DABNEY, 1994; TOMPA et al., 1994; SMITH; ROTHMAN, 2000; BIRD et al., 2005), no entanto, acredita-se que para o benzeno agir seja necessária uma ativação metabólica (WHYSNER, 2000). Os demais constituintes do BTEX não apresentam efeitos

genotóxicos significativos, embora muitos experimentos apresentem resultados controversos e confusos (DEAN, 1985; WHO, 1986; 1997). Assim, acreditamos que o efeito genotóxico observado para o BTEX nas células HTC pode ser decorrente da ação genotóxica do benzeno, após ser metabolizado por estas células, bem como de uma ação sinérgica entre os componentes da mistura.

Os danos genotóxicos observados no ensaio do cometa com as células HTC, expostas às concentrações mais baixas do BTEX, não corresponderam aos danos mutagênicos observados no teste do MN. Isto pode ser explicado, nestes casos, pela possibilidade dos danos genotóxicos serem eventos transitórios, portanto, passíveis de reparo, o que, segundo Dearfield et al. (2002), não caracterizam eventos mutagênicos, por não promover alterações permanentes no conteúdo ou na estrutura do material genético dos organismos.

Devido às altas taxas de danos observados no ensaio do cometa, acreditamos que os micronúcleos formados nas células expostas ao BTEX sejam decorrentes, principalmente, de quebras cromossômicas, já que, segundo Whysner et al. (2004), diversos estudos apontam para uma prevalência da capacidade clastogênica do benzeno, embora adutos instáveis de DNA, danos oxidativos e perturbações no fuso também sejam responsáveis pelo efeito genotóxico deste químico.

Em relação ao processo de biodegradação, este parece não ter formado nenhum metabólito tóxico para as células HTC, após a degradação do BTEX pelas bactérias. No entanto, esse processo foi mais eficiente na redução de danos genotóxicos do que mutagênicos, como observado para os ensaios realizados com a concentração mais alta do BTEX (BTEX 1). Porém, esta mutagenicidade pode ser explicada pela necessidade de um tempo maior de biodegradação, para que haja um maior consumo do BTEX pelas bactérias e assim, diminuir os seus efeitos tóxicos. Pelos nossos resultados, observamos que o processo de biodegradação constitui uma ferramenta eficaz e segura a ser utilizada em tratamentos de águas contaminadas com BTEX. A diminuição da genotoxicidade e a manutenção dos efeitos não mutagênicos observados, pós biodegradação, indicam que não houve formação de metabólitos tóxicos durante o processo.

5. Conclusão

Assim, inferimos que o BTEX é uma substância potencialmente genotóxica para células HTC, inclusive em baixas concentrações e mutagênica para concentrações próximas a da solubilidade dos seus constituintes em água.

O ensaio do cometa foi uma ferramenta bastante sensível na detecção de danos genotóxicos da mistura BTEX. O teste do MN constituiu uma metodologia bastante eficiente na avaliação de danos mutagênicos de células HTC expostas ao BTEX.

Ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade, realizados com células HTC, indicaram que o processo de biodegradação por microrganismos foi eficiente na biodegradação da mistura aquosa do BTEX, por diminuir os efeitos genotóxicos e manter os resultados não mutagênicos da mistura, indicando que o BTEX foi degradado em metabólitos não tóxicos para as células.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem à Profa. Dra. Dejanira Francheschi de Angelis, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, por disponibilizar o efluente bruto de refinaria de petróleo, para a obtenção dos microrganismos biodegradadores do BTEX e pelas importantes informações sobre a metodologia de seleção dos microrganismos destes efluentes. Ao Prof. Dr. René Peter Schineider, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP - São Paulo, pelas importantes indicações e sugestões sobre o BTEX. Ao Programa de Recursos Humanos ANP/FINEP/MCTCTPETRO, PRH-05 da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brasil, pelo suporte financeiro.

7. Referências Bibliográficas

ANNESER, B.; EINSIEDL, F.; MECKENSTOCK, R.U.; RICHTERS, L.; WISOTZKY, F.; GRIEBLER, C. High-resolution monitoring of biogeochemical gradients in a tar oil-contaminated aquifer. **Applied Geochemistry**, v. 23, p. 1715-1730, 2008.

(ATSDR) AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for xylenes**, 1995.

(ATSDR) AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Interaction profile for: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX). Atlanta: ATSDR, 2004, 137p.

AU, W.W.; RAMANUJAM, V.M.S.; WARD JR., J.B.; LEGATOR, M.S. Chromosome aberrations in lymphocytes of mice after sub-acute low-level inhalation exposure to benzene, **Mutation Research**, v.260, p. 219–224, 1991.

BAO, L.; CHEN, S.; WU, L.; HEI, T.K.; WU, Y.; YU, Z.; XU, A. Mutagenicity of diesel exhaust particles mediated by cell–particle interaction in mammalian cells. **Toxicology**, v. 229, p. 91-100, 2007.

BARRETO, G.E.S.; OLIVEIRA, E.S.; VILLAR, F.A.G.A.; SANTOS, G.S.; LIMA, R.M.F.; COSTA, S.L.; COSTA, M.F.D.; EGITO, E.S.T.; EL-BACHÁ, R.S. Investigation of toxic factors affecting cells of rat brains exposed to 3-methylcatechol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n.5, p.839-849, 2007.

BARTHE, R. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. **Fems Microbiology Ecology**, v. 12, p. 155-172, 1986.

BIANCHI, J. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Malation, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e células de mamíferos.** 2008. 165f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

BIRD, M.G.; GREIM, H.; SNYDER, R.; RICE, J.M. International symposium: Recent advances in benzene toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v.153–154, p.1–5, 2005.

BOUWER, E.; DURANT, N.; WILSON, L.; ZHANG, W.; CUNNINGHAM, A. Degradation of xenobiotic compounds in situ: capabilities and limits. **Fems Microbiol. Ecol.**, v. 15, p. 307-317, 1994.

CARDOZO, T. R.; ROSA D. P.; FEIDEN, I. R.; ROCHA, J. A. V.; OLIVEIRA, N. C. D.; PEREIRA, T. S.; PASTORIZA, T. F.; MARQUES, D. M.; LEMOS, C. T.; TERRA, N. R.; VARGAS, V. M. F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research**, v.603, p. 83–96, 2006.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas subterrâneas no Estado de São Paulo 2001 – 2003**, São Paulo: CETESB, 2004, 137 p.

CHEN, C.S.; HSEU, Y.C.; LIANG, S.H.; KUO, J.-Y.; CHEN, S.C. Assessment of genotoxicity of methyl-tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. **Journal of Hazardous Materials**, v.153, p. 351–356, 2008.

CHENG, Y.W.; KANG, J.J.; SHIH, Y.L.; LO, Y.L.; WANG, C.F. Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p. 617–622, 2005.

DABNEY, B. **REPROTEXT data base**, Vol.22, Denver: Micromedex Inc., 1994.

DEAN, B. J. Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. **Mutation Research**, v.154, p.153-181, 1985.

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

GAD, S. C. Primary hepatocyte culture as an *in vitro* toxicologic system for the liver. In: GAD, S. C. **In Vitro Toxicology**. 2 ed., New York: Taylor & Francis, 2000. 410 p.

HENDERSON, L.; BRUSICK, D.; RATPAN, F.; VEENSTRA, G. A review of the genotoxicity of ethylbenzene. **Mutation Research**, v.635, p. 81–89, 2007.

HUTCHINS, S.R.; SEWELL, G.W.; KOVACS, D.A.; SMITH, G.A. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions, **Environ. Sci. Technol.**, v.25, p. 68-76, 1991.

(IARC) INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Benzene, In. IARC, **Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**, Suppl. 7, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, pp. 120–122, 1987.

(IARC) INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, IARC **Monograph, Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Industrial Chemicals**, vol. 77, 2000, pp. 227–266.

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

LOVLEY, D. R. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 75-81, 1997.

MAILA, M. P.; CLOETE, T. E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants – perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, p. 1-8, 2005.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALLAGUTTI, M.; MARIN-MORALES, M.A. Investigation of the genotoxic potential of the waters of a river receiving tannery effluents by means of the *in vitro* comet assay. **Cytologia**, v.68, p.395-401, 2003.

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

MULLIN, A.H.; NATARAJ, D.; REN, J.-J.; MULLIN, D.A. Inhaled benzene increases the frequency and length of *lacI* deletion mutations in lung tissues of mice. **Carcinogenesis**, v.19, n.10, p.1723-1733, 1998.

(NLM) NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Hazardous Substances Data Bank**, Denver: Micromedex Inc., 1994.

PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R. L. Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 415-420, 2005.

REUSSER, D. E.; ISTOK, J. D.; BELLER, H. R.; FIELD, J. A. In situ transformation of deuterated toluene and xylene to benzylsuccinic acid analogues in BTEX-contaminated aquifers. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 4127-4134, 2002.

ROMA-TORRES, J.; TEIXEIRA, J. P.; SILVA, S.; LAFFON, B., CUNHA, L. M.; MÉNDEZ, J.; MAYAN, O. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. **Mutation Research**, v. 604, p. 19-27, 2006.

SMITH, M.T.; ROTHMAN, N. Biomarkers in the molecular epidemiology of benzene-exposed workers, **Journal of Toxicology And Environmental Health**, Washington, v.61, p. 439–445, 2000.

SPEIT, G.; NEUSS, S.; SCHÜTZ, P.; FRÖHLER-KELLER, M.; SCHMID, O. The genotoxic potential of glutaraldehyde in mammalian cells *in vitro* in comparison with formaldehyde. **Mutation Research**, v.649, p.146–154, 2008.

TOMPA, A.; MAJOR, J.; JAKAB, M.G. Monitoring of benzene exposed workers for genotoxic effects of benzene: improved working-condition-related decrease in the frequencies of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes. **Mutation Research**, v.304, p. 159–165, 1994.

(USEPA) U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Toxicological review of toluene**. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), Washington D.C.: USEPA, 2005.

WATERS, M. D.; STACK, H. F.; BRADY, A. L; LOHMAN, P. H. M.; HAROUN, L.; VAINIO, H. Use of computerized data listings and activity profiles of genetic and related effects in the review of 195 compounds. **Mutation Research**, v.205, p.295-312, 1988.

(WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 190: Xylenes**, Geneva: World Health Organization, 1997.

(WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 52: Toluene**, Geneva: World Health Organization, 1986.

WHYSNER, J. Benzene-induced genotoxicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.61, p. 347–351, 2000.

WHYSNER, J.; VIJAYARAJ REDDY, M.; ROSS, P. M.; MOHAN, M.; LAX, E. A. Genotoxicity of benzene and its metabolites. **Mutation Research**, v.566, p.99–130, 2004.

Tabela 1. Quantidade de BTEX detectada nas amostras, por meio de análise química quantitativa, antes e após o processo de biodegradação.

Amostra	Composto	Amostras iniciais (µg/L)				Amostras biodegradadas (µg/L)			
		Concentração	LD (µg/L)	FD	VI(mL)	Concentração	LD (µg/L)	FD	VI(mL)
Branco	B	ND							
	T	ND							
	E	ND	0,30	1	10,00	–	–	–	–
	X (m, p)	ND							
	X (o)	ND							
	Total	ND							
BTEX 1	B	902344,00				322254,00			
	T	168698,00				63700,00			
	E	40404,00	600,00	2000	10,00	14809,00	300,00	1000	0,01
	X (m, p)	9222,00				3114,00			
	X (o)	2520,00				930,00			
	Total	1123188,00				404807,00			
BTEX 2	B	41862,90				20701,15			
	T	11137,90				2540,50			
	E	4206,60	30,00	100	0,10	306,65	15,00	50	0,20
	X (m, p)	999,20				104,30			
	X (o)	328,80				41,85			
	Total	58535,40				23694,45			
BTEX 3	B	8922,95				8,03			
	T	2602,45				2,95			
	E	1039,85	15,00	50	0,20	1,13	0,30	1	10,00
	X (m, p)	236,35				ND			
	X (o)	70,65				ND			
	Total	12872,25				12,10			
BTEX 4	B	4,36				3,47			
	T	22,29				1,62			
	E	45,62	0,30	1	10,00	ND	0,30	1	10,00
	X (m, p)	9,82				ND			
	X (o)	3,41				ND			
	Total	85,51				5,09			
BTEX 5	B	1,65				ND			
	T	3,03				ND			
	E	4,89	0,30	1	10,00	ND	0,30	1	10,00
	X (m, p)	ND				ND			
	X (o)	ND				ND			
	Total	9,57				ND			

ND: Não detectável; LD: Limite de detecção; FD: Fator de diluição; VI: Volume inicial da amostra. USEPA-SW 846 método 8021B.

Tabela 2. Valores médios e desvios-padrão da presença de micronúcleo (MN) em células HTC, expostas ao BTEX, antes e após a biodegradação.

Ensaio	MN
CN	6,67 ± 1,63
CP	113,50 ± 16,79 ^a
Branco	16,33 ± 2,34
BTEX 1	26,83 ± 1,72 ^a
BTEX 2	20,00 ± 2,53
BTEX 3	17,17 ± 2,48
BTEX 4	17,50 ± 2,35
BTEX 5	18,67 ± 1,97
Biodegradado 1	27,17 ± 4,12 ^b
Biodegradado 2	18,33 ± 3,33
Biodegradado 3	17,83 ± 2,93
Biodegradado 4	18,00 ± 0,89
Biodegradado 5	20,33 ± 3,01

6000 células analisadas por ensaio. Média ± Desvio padrão.

^a Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$) pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis.

^b Estatisticamente diferente do branco ($p < 0,05$) pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Tabela 3. Danos genotóxicos avaliados pelo ensaio do cometa em células HTC, após exposição à mistura BTEX e às amostras biodegradadas.

Ensaio	Classes				Escores	Viabilidade celular
	0	1	2	3		
Controle negativo	94	5	1	0	7	98.11
	92	5	3	0	11	97.85
	91	6	3	0	12	97.62
Média ± SD	92,33 ± 1,53	5,33 ± 0,58	2,33 ± 1,15	0,00 ± 0,00	10,00 ± 2,65	97,86 ± 0,25
Controle positivo	0	2	32	66	264	96.05
	0	11	58	31	220	98.00
	0	6	39	55	249	97.61
Média ± SD	0,00 ± 0,00	6,33 ± 4,51	43,00 ± 13,45	50,67 ± 17,90	244,33 ± 22,37**	97,22 ± 1,03
Branco	66	27	7	0	41	99.48
	73	14	10	3	43	99.90
	72	20	7	1	37	99.07
Média ± SD	70,33 ± 3,79	20,33 ± 6,51	8,00 ± 1,73	1,33 ± 1,53	40,33 ± 3,06	99,48 ± 0,41
BTEX 1	45	20	28	7	97	98.55
	46	29	22	3	82	98.08
	47	19	25	9	96	99.22
Média ± SD	46,00 ± 1,00	22,67 ± 5,51	25,00 ± 3,00	6,33 ± 3,06	91,67 ± 8,39**	98,62 ± 0,57
BTEX 2	51	28	19	2	72	98.85
	60	30	9	1	51	99.32
	45	33	17	5	82	99.14
Média ± SD	52,00 ± 7,55	30,33 ± 2,52	15,00 ± 5,29	2,67 ± 2,08	68,33 ± 15,82**	99,11 ± 0,24
BTEX 3	66	25	7	2	45	99.26
	58	34	8	0	50	98.97
	66	30	3	1	39	99.52
Média ± SD	63,33 ± 4,62	29,67 ± 4,51	6,00 ± 2,65	1,00 ± 1,00	44,67 ± 5,51*	99,25 ± 0,27
BTEX 4	58	35	7	0	49	99.12
	54	36	10	0	56	99.14
	52	38	10	0	58	98.95
Média ± SD	54,67 ± 3,06	36,33 ± 1,53	9,00 ± 1,73	0,00 ± 0,00	54,33 ± 4,73**	99,07 ± 0,11
BTEX 5	64	32	4	0	40	99.15
	56	32	11	1	57	98.51
	63	33	2	2	43	97.96
Média ± SD	61,00 ± 4,36	32,33 ± 0,58	5,67 ± 4,73	1,00 ± 1,00	46,67 ± 9,07**	98,54 ± 0,60
Biodegradado 1	57	24	18	1	63	99.18
	72	17	9	2	41	94.21
	63	29	7	1	46	98.11
Média ± SD	64,00 ± 7,55	23,33 ± 6,03	11,33 ± 5,86	1,33 ± 0,58	50,00 ± 11,53	97,17 ± 2,61
Biodegradado 2	64	25	10	1	48	99.75
	77	16	4	3	33	99.47
	68	26	4	2	40	97.07
Média ± SD	69,67 ± 6,66	22,33 ± 5,51	6,00 ± 3,46	2,00 ± 1,00	40,33 ± 7,51	98,76 ± 1,47
Biodegradado 3	82	16	2	0	20	94.71
	81	15	4	0	23	97.84
	76	19	5	0	29	99.32
Média ± SD	79,67 ± 3,21	16,67 ± 2,08	3,67 ± 1,53	0,00 ± 0,00	24,00 ± 4,58	97,29 ± 2,35
Biodegradado 4	79	16	5	0	26	97.56
	82	13	5	0	23	99.79
	69	20	11	0	42	97.99
Média ± SD	76,67 ± 6,81	16,33 ± 3,51	7 ± 3,46	0,00 ± 0,00	30,33 ± 10,21	98,45 ± 1,18
Biodegradado 5	83	14	3	0	20	99.28
	78	18	4	0	26	96.78
	80	13	7	0	27	99.48
Média ± SD	80,33 ± 2,52	15 ± 2,65	4,67 ± 2,08	0,00 ± 0,00	24,33 ± 3,79	98,51 ± 1,51

300 nucleóides analisados por ensaio.

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$), pelo teste de ANOVA.

** Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,01$), pelo teste de ANOVA.

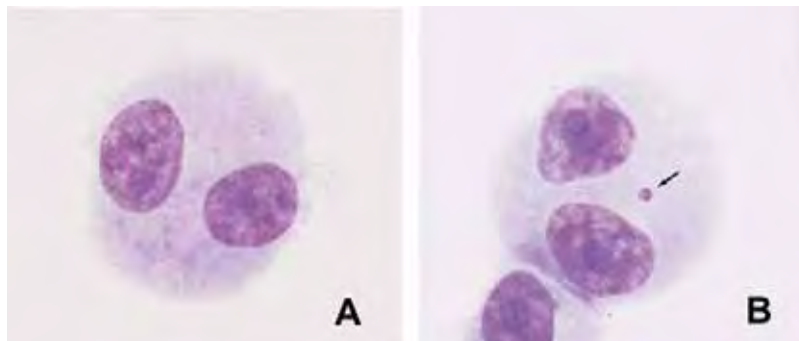


Figura 1. Células HTC expostas a diferentes concentrações de BTEX. **A.** Célula binucleada (sem alteração); **B.** Célula binucleada com micronúcleo (efeito mutagênico).

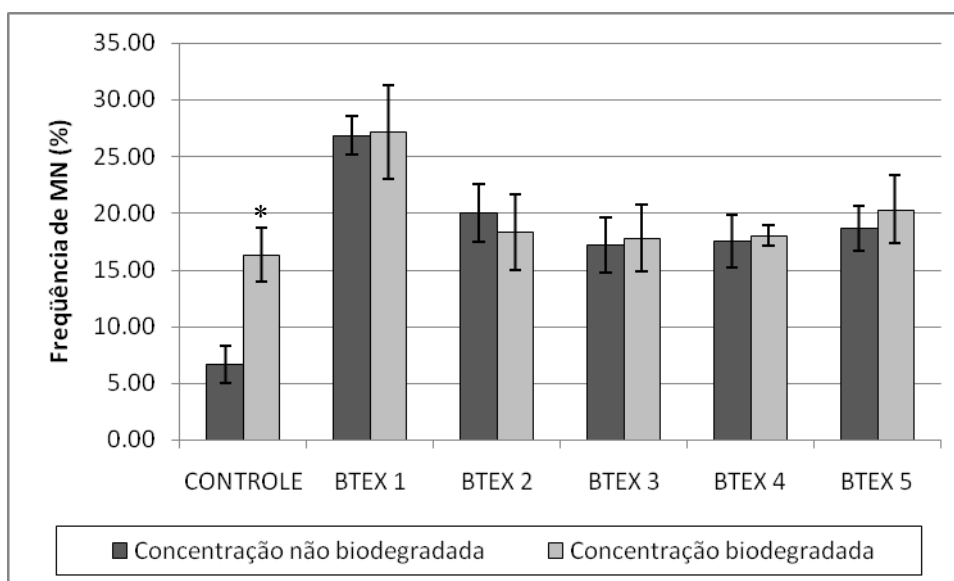


Figura 2. Comparação entre o valor médio de micronúcleos (MN) presentes em células HTC, expostas à mistura BTEX, antes e após o processo de biodegradação. *Diferença significativa entre a concentração não biodegradada e sua respectiva concentração biodegradada de acordo com o teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

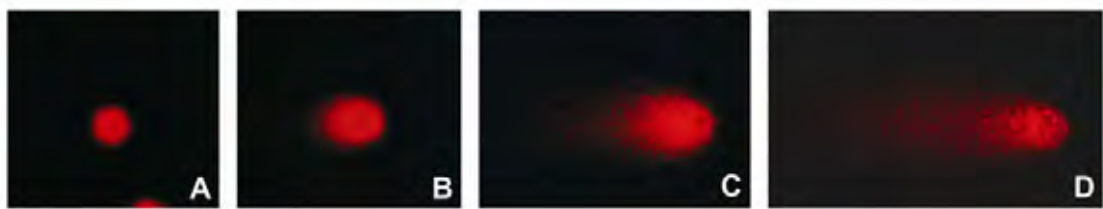


Figura 3. Classes de danos observadas no ensaio do cometa com células HTC expostas a diferentes concentrações de BTEX. **A.** Classe 0: célula sem dano; **B.** Classe 1: célula com pouco dano; **C.** Classe 2: célula com médio dano; **D.** Classe 3: célula com grande dano.

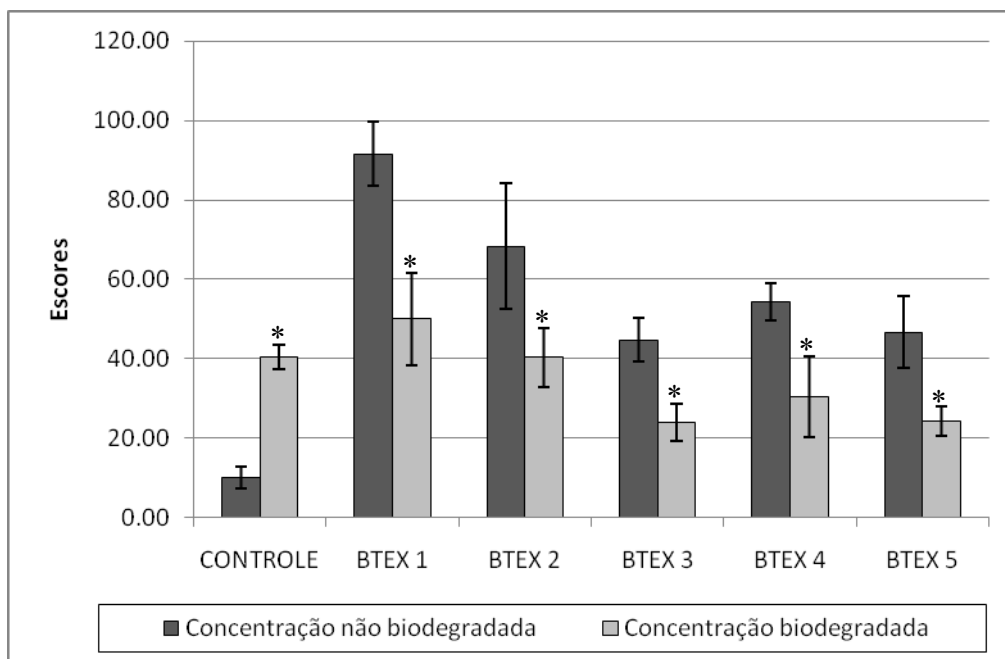


Figura 4. Comparação entre a média de danos genotóxicos ocasionados ao material genético de células HTC, pela exposição às concentrações de BTEX não biodegradada e as suas respectivas amostras biodegradadas. *Diferença significativa entre a concentração não biodegradada e sua respectiva concentração biodegradada, de acordo com o teste de t Student ($p < 0,05$).

Verificação da eficiência da biodegradação da mistura BTEX, por cultura mista de bactérias, mediante análises químicas e biológicas.

Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo¹, Carlos Emílio Levy², Dejanira Francheschi de Angelis³,
Maria Aparecida Marin-Morales¹.

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

²Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Alexander Fleming, 105, 13081-970, Campinas, SP, Brasil.

³Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

A contaminação de águas subterrânea por benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) tem sido cada vez mais freqüente, o que remete a uma eminente necessidade de desenvolvimento de metodologias que sejam mais eficientes na remoção ou na minimização dos impactos que estes componentes possam promover no ambiente. O processo de biorremediação por microrganismos tem sido considerado uma tecnologia eficiente no tratamento de locais contaminados por hidrocarbonetos, por ser capaz de transformar e/ou degradar os poluentes alvos. Neste trabalho, estudou-se a eficiência do processo de biodegradação do BTEX por bactérias; a diminuição dos danos genotóxicos e mutagênicos induzidos por estes compostos, por meio de dois sistemas-teste: *Allium cepa* (ensaio de aberrações cromossômicas e do micronúcleo) e células HTC (ensaio do cometa e do micronúcleo); e a avaliação dos microrganismos envolvidos nesta biodegradação. O processo de biodegradação foi realizado em BOD Trak Apparatus (HACH) por um período de 20 dias, utilizando microrganismos selecionados de efluente bruto de refinaria de petróleo. Os sistemas testes foram utilizados para comparar os danos induzidos por cinco diferentes concentrações não biodegradadas de BTEX em relação às concentrações biodegradadas. Foram isoladas do consórcio cinco espécies de bactérias. A *Pseudomonas putida* foi considerada, dentre as cepas isoladas, a bactéria degradadora de BTEX. As análises químicas realizadas mostraram que houve diminuição da presença de BTEX nas concentrações biodegradadas. Os resultados obtidos com os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade mostraram que o processo de biodegradação foi capaz de diminuir os danos genotóxicos do BTEX, para as células de *A. cepa* e HTC, e mutagênicos, para as células de *A. cepa*. A aplicação de bactérias isoladas em processos de biodegradação pode se caracterizar em uma ferramenta segura e efetiva em tratamentos de águas contaminadas pela mistura BTEX. Infere-se, portanto, que efluente bruto de refinaria de petróleo pode ser uma fonte de obtenção de microrganismos biodegradadores de hidrocarbonetos.

Palavras chave: Biodegradação, BTEX, genotoxicidade, mutagenicidade, *Allium cepa*, células HTC, *Pseudomonas putida*.

1. INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos monoaromáticos, como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), pela reconhecida toxicidade aos organismos, representam uma importante classe de contaminantes ambientais (ANNESER et al., 2008). São substâncias químicas amplamente utilizadas em diversos processos industriais (HUTCHINS et al., 1991), além de estarem presentes em grande quantidade nos combustíveis fósseis (ASTDR, 2004), o que promove contaminações atmosféricas, do solo e da água. Segundo Anneser et al. (2008), a alta solubilidade do BTEX em água constitui um sério problema de contaminação de águas subterrâneas.

A alta mobilidade destes hidrocarbonetos em sistemas solo-água está relacionada com o seu menor coeficiente de partição entre octanol-água, o que implica em uma lenta absorção no solo e, conseqüentemente, um transporte aquoso preferencial, favorecendo a contaminação de reservatórios de água, por migrarem mais rapidamente neste meio (NAKHLA, 2003).

Estes compostos ocorrem freqüentemente em níveis traço em águas superficiais, como resultado da sua volatilidade, no entanto, encontram-se em uma concentração bem mais elevada nas águas subterrâneas, sendo considerados contaminantes prioritários destes recursos, e, por isso, incluídos como compostos a serem avaliados nas análises de água (FALCÓ; MOYA, 2007).

A contaminação da água subterrânea pelos hidrocarbonetos, incluindo BTEX, é cada vez mais freqüente (REUSSER et al., 2002), o que tem levado à busca de metodologias mais eficientes na remoção ou na minimização de impactos destes componentes.

Os tratamentos físicos convencionais, além de terem custos operacionais elevados, retiram os contaminantes do ambiente sem destruí-los ou transformá-los quimicamente, gerando um acúmulo de resíduos tóxicos. Os processos biológicos de biorremediação são considerados uma tecnologia limpa e promissora, devido, principalmente à sua simplicidade, baixo custo e alta eficiência, quando comparados às outras alternativas (ALEXANDER, 1994).

De acordo com Mariano (2006), a biorremediação é considerada uma nova tecnologia para tratamento de locais contaminados, que tem como base o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes alvos.

A habilidade de determinados microrganismos degradarem o BTEX é conhecida, desde 1908, quando Stormer observou a capacidade da bactéria *Bacillus hexabovorum* crescer, aerobiamente, em meio contendo tolueno e xileno. A capacidade de microrganismos naturais do solo degradarem o BTEX foi primeiro demonstrada por Gray e Thornton em 1928.

Estes pesquisadores, segundo Gibson e Subramaniam (1984, apud CORSEUIL; ALVAREZ, 1996), encontraram, entre 245 espécies de bactérias presentes em amostras de solos não contaminados, 146 capazes de degradar hidrocarbonetos.

Para que uma biorremediação seja considerada eficiente, o produto resultante da decomposição deve ser constituído apenas por água e gás carbônico. Porém, muitos estudos relatam que atividades microbianas podem transformar compostos não tóxicos ou com baixa toxicidade em tóxicos potentes, sendo que, em muitos casos, produtos resultantes da biorremediação são, reconhecidamente, carcinogênicos (ALEXANDER, 1999). Desta forma, para se avaliar a eficiência do processo de biorremediação nos tratamentos de aquíferos contaminados com petróleo, é indicada, além de uma avaliação química, uma avaliação biológica, pelo uso de bioensaios, por estes fornecerem dados mais consistentes e confiáveis sobre os reais riscos dos organismos, decorrentes da ação de possíveis metabólitos formados durante o processo da biodegradação (REUSSER et al., 2002 e PLAZA et al., 2005).

Este trabalho teve como objetivo o estudo da biodegradação em meio aquoso de diferentes concentrações de BTEX, por microrganismos obtidos em efluente bruto de uma refinaria de petróleo, bem como avaliar o efeito genotóxico e mutagênico de amostras biodegradadas do BTEX, para a certificação da eficiência do processo de biodegradação, quanto a não formação de possíveis metabólitos tóxicos, e a identificação dos microrganismos degradadores, para a sua possível utilização em processos de descontaminação ambiental pelo BTEX.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção dos microrganismos via enriquecimento

Para estudar a biodegradação do BTEX em diferentes concentrações, selecionou-se um consórcio bacteriano, a partir de microrganismos presentes em uma amostra de efluente bruto de refinaria de petróleo.

Em um frasco de vidro com vedação parcial, para permitir a troca de gases, adicionou-se 250 mL de água do rio Atibaia (classe II) e 250 mL de efluente bruto de refinaria de petróleo contendo $9,6 \times 10^6$ UFC/mL de bactérias. Nesta suspensão, acrescentou-se 0,5 g de sacarose, 0,5 g de peptona de caseína e 0,5 g de extrato de levedura, com a finalidade de fornecer, minimamente, fonte de energia, fósforo e nitrogênio aos microrganismos presentes. Esse inóculo foi mantido a $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, em ambiente com pouca luminosidade, por 24 horas. Após esse período, adicionou-se ao inóculo, como única fonte de carbono, 200 μL de BTEX. A amostra foi agitada em shaker por 5 minutos a 30 rpm. Decorrido 24 horas, acrescentou-se

mais 100 μL de BTEX puro, seguindo-se o mesmo procedimento de agitação. Da mesma forma, por um período de 75 dias, 25 μL de cada componente puro foi acrescentado a cada 48 horas, seguido sempre de agitação em shaker por 5 minutos a 50 rpm. Deste modo, procedeu-se um enriquecimento seletivo das bactérias biodegradadoras dos hidrocarbonetos, além da manutenção da cultura até a sua utilização. Uma semana antes do início do procedimento para a biodegradação, adicionou-se 150 μL de BTEX puro a cada 48 horas, mantendo o mesmo padrão de agitação (repetiu-se esse procedimento 4 vezes). No final, a cultura foi filtrada em papel de filtro comum, diluída em água ultra pura, na proporção de 5 mL da cultura para 100 mL de água, e aerada por 2 horas. Este material constituiu o inóculo dos experimentos de biodegradação.

2.2. Preparo das concentrações

Para o desenvolvimento dos ensaios, foram preparadas cinco concentrações da mistura BTEX que compreende o benzeno (grau de pureza 99% - CAS N° 71-43-2), tolueno (grau de pureza 99% - CAS N° 108-88-3), etilbenzeno (grau de pureza 99,80% - CAS N° 100-41-4) e xileno (grau de pureza 99%, mistura de isômeros - CAS 1330-20-7).

As concentrações foram elaboradas com base em dois parâmetros distintos: 1. Solubilidade em água: Três concentrações diferentes de BTEX foram preparadas a partir dos índices de solubilidade em água de cada um dos componentes da mistura BTEX (benzeno: 1780mg/L, tolueno: 535mg/L, etilbenzeno: 152mg/L e xilenos: 135mg/L – valor este que corresponde à solubilidade do isômero menos solúvel, *m*-xileno). A primeira concentração (mais alta) corresponde à própria mistura citada acima (BTEX 1). As demais concentrações foram obtidas pela diluição da solução BTEX 1 pelos fatores 10 (BTEX 2) e 100 (BTEX 3); 2. Concentrações-limite em água potável: a concentração BTEX 4 foi preparada seguindo as concentrações-limite de cada componente do BTEX para água potável, estabelecido pelo órgão de fiscalização ambiental do Estado de São Paulo/Brasil - CETESB (benzeno: 5 $\mu\text{g/L}$, tolueno: 170 $\mu\text{g/L}$, etilbenzeno: 200 $\mu\text{g/L}$ e xilenos totais: 300 $\mu\text{g/L}$). A quinta concentração (BTEX 5) foi elaborada simulando a presença da mistura, com valores abaixo das concentrações limite para água potável (benzeno: 1,25 $\mu\text{g/L}$, tolueno: 42,5 $\mu\text{g/L}$, etilbenzeno: 50 $\mu\text{g/L}$ e xilenos totais: 75 $\mu\text{g/L}$). As diluições foram preparadas com água ultra pura, aerada por 12 horas a 20° C. Uma parte de cada concentração foi separada para análise química quantitativa das concentrações propostas.

2.3. Ensaio da biodegradação

Em frascos de vidro âmbar próprios para ensaio de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) adicionou-se 420 mL de cada concentração, 1 mL da cultura da suspensão de microrganismos diluída e uma cápsula de solução nutritiva (BOD *nutrient buffer* – Hach). Adaptou-se as garrafas ao aparelho BOD Trak Apparatus (HACH) e conectadas a um tubo único ligado aos sensores de pressão do instrumento, de forma que se formasse um sistema completamente fechado, para evitar que mudanças na pressão atmosférica externa interferissem nos dados do experimento. O líquido permaneceu em agitação constante a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 20 dias.

Este aparelho determina a DBO pela quantificação da queda da pressão no interior das garrafas vedadas. Essa diminuição na pressão acontece devido ao consumo do oxigênio disponível para os microrganismos, sendo expresso em mg/L. O CO_2 produzido pelos microrganismos, por meio da oxidação da matéria orgânica, não interfere na mensuração da pressão, pois é removido por cristais de hidróxido de lítio presentes nas tampas das garrafas, mas que não entram em contato com as amostras.

Uma garrafa contendo apenas a cultura de microrganismos e a solução nutritiva também foi preparada para servir como um controle da biodegradação. Para maior confiabilidade dos dados, esse processo foi realizado em duplicata. Ao final do processo, parte das amostras foi separada para realização da análise química quantitativa do BTEX.

2.4. Análise química

A análise de BTEX presente nas amostras, antes e após o processo de biodegradação, foi realizada pelo laboratório Analytical Technology Company (São Paulo – Brasil). O método utilizado foi a análise de BTEX por injeção por Headspace e cromatografia gasosa com detector de fotoionização (GC/PID) de acordo com a USEPA-SW846 método 8021B.

2.5. Isolamento e identificação dos microrganismos do inóculo.

O inóculo preparado a partir do efluente bruto da refinaria de petróleo foi homogeneizado, diluído em solução salina 0,85M e plaqueado em meio Agar sangue, Agar chocolate, Agar Sabouraud, Agar CLED e Agar MacConkey. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 7 dias. Das placas contendo as colônias foram isolados cinco biotipos, os quais foram identificados pelo procedimento de automação em Microbiologia para identificação Vitek II® BioMerieux.

2.6. Identificação dos microrganismos degradadores de BTEX

Para verificar quais os microrganismos encontrados no inóculo eram degradadores de BTEX utilizou-se o meio de Bushnell-Haas modificado (substituição do nitrato de amônia por peptona bacteriológica OXOID LP037), o qual contém todos os nutrientes necessários para o crescimento de bactérias, com exceção de fontes de carbono. O meio de cultura modificado foi separado em tubos de ensaios. Em cada tubo adicionou-se uma quantidade específica de BTEX (5µl, 10µl, 15µl ou 20µl) e 100µl da turvação de uma das bactérias isolada em salina na escala a 0,5 de Mac Farland. Este protocolo foi repetido para cada uma das bactérias identificadas. Outro teste foi desenvolvido adicionando ao meio Bushnell-Haas com as diferentes quantidades de BTEX acima descritas, o conjunto das bactérias identificadas no consórcio bacteriano inicial. Um tubo contendo glicose 0,1%, sem BTEX, foi usado como controle positivo de crescimento bacteriano. A *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle de crescimento positivo em meio contendo BTEX. Todos os ensaios foram desenvolvidos em duplicata.

Os tubos foram incubados em estufa a 35 °C por 10 dias, realizando leitura diária. A análise qualitativa de crescimento bacteriano foi feita segundo os seguintes critérios de inspeção visual dos tubos:

- (+): turvação positiva, crescimento pobre.
- (++): turvação positiva, crescimento moderado.
- (+++): turvação positiva, crescimento intenso.
- (-): turvação negativa, ausência de crescimento.

As amostras positivas foram repicadas, reisoladas e, para confirmação dos resultados, reidentificadas, para a certificação da não contaminação do meio.

2.7. Testes de genotoxicidade e mutagenicidade

- Teste *in vivo*

O material biológico utilizado neste estudo, como sistema-teste vegetal para avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das concentrações do BTEX e das amostras biodegradadas dessa mistura, constituiu-se de sementes de *Allium cepa* (2n = 16 cromossomos) de um mesmo lote e mesma variedade (cebola baia periforme).

O ensaio foi realizado em recipientes com tampa contendo membranas de teflon, a fim de impedir a volatilização de substâncias presentes nas amostras biodegradadas.

As sementes foram continuamente expostas às diferentes concentrações de BTEX biodegradadas, sendo um recipiente para cada concentração. Quando as raízes atingiram cerca

de 2 cm de comprimento foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol : ácido acético, v/v). Os testes controles foram realizados com água ultra pura (controle negativo) e com Metil Metano Sulfonato (MMS) na concentração de 4×10^{-4} (controle positivo).

Para a confecção das lâminas, foi seguida a metodologia descrita por Fernandes et al. (2007). Foram analisadas 10 lâminas para cada tratamento, 500 células por lâmina, totalizando 5000 células para cada concentração estudada de BTEX, tanto as biodegradadas como as não biodegradadas.

Para a avaliação do potencial de indução de aberrações cromossômicas, foram observados e quantificados todos os possíveis tipos de aberrações cromossômicas encontradas nas células de todas as lâminas para cada tratamento. Os efeitos mutagênicos foram verificados mediante observação e contagem de células micronucleadas, registradas para todas as lâminas de cada tratamento.

A comparação entre os resultados obtidos para as concentrações de BTEX não biodegradadas e sua respectiva concentração biodegradada foi feita por meio do teste estatístico de Mann Whitney, com nível de significância de 0,05.

- **Teste *in vitro***

Foram realizados testes *in vitro* com células HTC (*Hepatoma tissue culture*), obtidas da espécie *Rattus norvegicus*, para avaliação de genotoxicidade (ensaio do cometa) e de mutagenicidade (teste do MN) da mistura BTEX, antes e após processo de biodegradação.

Para a realização do teste do micronúcleo, as células foram cultivadas, previamente, por um ciclo celular completo (24 horas). Em seguida, foram realizados tratamentos simultâneos de 24 horas, para cada uma das concentrações do BTEX, adicionando, em cada frasco, 50 μ L da mistura específica (tratamentos não remediados e remediados), do Metil Metanosulfonato - MMS (4×10^{-2} M) (controle positivo), do tampão fosfato salino - PBS (controle negativo) e do branco (controle da biodegradação).

Após os tratamentos, as células foram lavadas por duas vezes com PBS e adicionados 5 mL de meio de cultura completo com 3 μ g/mL de citocalasina B, onde permaneceram por 28 horas. Decorrido este tempo, as células foram colhidas e fixadas em Carnoy (metanol/ácido acético 3:1 – v:v). Sobre lâminas geladas e contendo um filme de água, foram depositadas algumas gotas da cultura de células. Após secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 5 minutos. Foram analisadas cerca de 1000 células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração para cada repetição, sendo duas lâminas para

cada repetição, num total de 6000 células por tratamento. A análise estatística da comparação do número de células portadoras de micronúcleo, de cada concentração testada e de sua respectiva amostra biodegradada, foi realizada pela aplicação do teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

No ensaio do cometa, após serem cultivadas por 24 horas (um ciclo celular completo) em meio de cultura completo, as células das três repetições de todos os tratamentos foram tratadas, independentemente, por 24 horas, com cada uma das concentrações de BTEX (com e sem biodegradação) e com as substâncias controle, conforme já descrito para o teste de MN. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e tripsinizadas com 0,5 mL de tripsina-EDTA 0,025% por, no máximo, 2 minutos. Decorrido este tempo, o processo foi interrompido pela adição de 5 mL de meio de cultura completo. As células foram então transferidas para tubos Falcon e centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, reservando-se, apenas, 0,5 mL da solução, para a ressuspensão do *pellet*.

Para o prosseguimento do ensaio do cometa, foram realizados testes de viabilidade celular para todos os tratamentos, misturando 20 μ L de suspensão celular com 20 μ L de Azul de Trypan 0,4%. A contagem das células viáveis foi feita em câmara de Neubauer, considerando as células sem coloração como viáveis e as coradas em azul como inviáveis. Após a verificação de uma viabilidade celular superior a 80%, uma alíquota de 20 μ L de suspensão celular foi misturada com 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (37 °C), em uma concentração de 0,5% e, rapidamente, gotejada sobre lâminas secas, previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal a 60 °C, diluição 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínula e levadas à geladeira (temperatura de 4 °C), por 20 minutos. Após a remoção cuidadosa das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada, recém preparada, onde permaneceram por 1 hora, em geladeira, a 4°C.

As lâminas foram posteriormente transferidas para uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão ($\text{pH} > 13$) recém preparada, onde permaneceram por 20 minutos antes da eletroforese, para desnaturação do DNA. A corrida de eletroforese foi realizada a 4 °C, por 20 minutos, a uma corrente de 25V e 300 mA. Seguindo-se a corrida, as lâminas foram neutralizadas em Tris 0,4M, em três séries de 5 minutos cada, secas a temperatura ambiente e fixadas com etanol por 10 minutos. As lâminas foram coradas com 30 μ L de solução de brometo de etídio 1x, preparada de uma solução estoque 10x (200 $\mu\text{g/mL}$) e cobertas com lamínula.

A análise das lâminas foi feita em microscópio de fluorescência, filtro B – 3⁴ (excitação: $\lambda = 420 - 490\text{nM}$, barreira $\lambda = 520 \text{ nM}$), em objetiva de 40x. Cerca de 100 nucleóides, para cada tratamento, foram classificados, visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos, em classes 0 (sem dano), 1 (pouco dano), 2 (médio dano) e 3 (grande dano), de acordo com KOBAYASHI et al. (1995). O escore de dano foi obtido pela multiplicação do número de nucleóides pelo número da classe correspondente (0, 1, 2 e 3). Para estimar uma possível redução ou aumento dos danos ocasionados pela biodegradação, em relação à concentração original, os dados foram comparados entre si (concentração não biodegradada e biodegradada) pelo teste de t Student.

3. RESULTADOS

3.1. Análise química

Os resultados das análises químicas referente à quantificação do BTEX nas amostras testadas estão apresentados na Tabela 1. A análise química feita após a biodegradação, mostrou uma diminuição da quantidade de BTEX para todas as concentrações analisadas. O BOD Trak Apparatus (HACH), onde foi realizado a biodegradação, é um sistema totalmente fechado, o que garantiu que as diminuições das concentrações testadas do BTEX foram, exclusivamente, decorrentes do consumo da mistura, como única fonte de carbono, pelas bactérias ali presentes.

3.2. Biodegradação

Para a avaliação da biodegradação, foram feitas leituras contínuas do consumo de O₂, durante todo o processo. Este processo, realizado no aparelho BOD Trak Apparatus (HACH), transcorreu 20 dias consecutivos até a finalização dos experimentos. Como o tempo máximo de registro do aparelho utilizado é de 10 dias, houve a necessidade de submeter as amostras a 2 tratamentos consecutivos. Os valores de consumo de oxigênio, obtidos nos 10 primeiros dias, foram anotados e o aparelho religado por mais 10 dias. A comprovação da biodegradação do BTEX pode ser vista nas figuras 1 e 2.

Pelo consumo do oxigênio registrado, pode-se inferir que os microrganismos consumiram a matéria orgânica presente (BTEX). Por esta análise, é possível estimar o tempo onde o consumo de O₂ começa a entrar em declínio, sinalizando o momento de interrupção do experimento. Neste caso, o período citado foi de 20 dias. Os maiores índices de consumo de O₂ foram observados para as concentrações BTEX 2 e BTEX 3. Apesar da concentração BTEX 1 (maior concentração testada) apresentar a maior quantidade de fonte de carbono

disponível, o consumo de O₂ não foi tão alto, o que indica que, provavelmente, essa concentração tenha sido mais tóxica que as demais para as bactérias. As taxas de consumo de O₂ das duas menores concentrações (BTEX 4 e BTEX 5) foram as mais baixas obtidas, próximas daquela apresentada para o branco.

3.3. Identificação dos microrganismos degradadores de BTEX.

Diferentes microrganismos foram encontrados no consórcio microbiano, obtido a partir do efluente bruto de uma refinaria de petróleo. No meio MacConkey e Agar CLED, foram identificadas três espécies diferentes de bactérias (*Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas putida* e um Bacilo Gram negativo não-fermentador não identificado - BGNF). No meio Agar Sangue e Agar chocolate, foram identificadas outras duas espécies de bactérias (*Moraxella* sp e *Brevundimonas diminuta*) (TABELA 2). Não houve crescimento de fungos leveduriformes ou filamentosos no Agar Sabouraud.

Todos os microrganismos encontrados foram avaliados para a certificação da sua capacidade de degradação do BTEX ou se apenas sobreviviam no meio com a presença dessa mistura.

Os resultados obtidos em relação à identificação dos microrganismos degradadores de BTEX estão apresentados na Tabela 2. A bactéria *P. putida* turvou em meio contendo glicose e em todos os meios com BTEX. As bactérias *A. lwoffii*, *Moraxella* sp, *B. diminuta* e BGNF turvaram em meio contendo apenas glicose, porém não cresceram na presença de BTEX, para nenhuma das concentrações testadas. A *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, utilizada como controle, apresentou turvação em todos os tubos, tanto na ausência como na presença de BTEX. Os tubos que continham as cinco linhagens de bactérias obtidas do efluente de refinaria também turvaram.

O plaqueamento realizado com os tubos que apresentaram turvação positiva (*P. putida*, consórcio das cinco bactérias e *P. aeruginosa* - controle) mostrou a presença de *P. putida* para o plaqueamento do tubo com *P. putida* e com o consórcio de bactérias e de *P. aeruginosa* para o ensaio com *P. aeruginosa*.

Dessa forma, a *P. putida* foi a única bactéria isolada do efluente bruto de refinaria que apresentou crescimento na presença de BTEX. A cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 mostrou-se eficiente como controle positivo neste teste.

3.4. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico

-Teste *in vitro*

Os resultados referentes às freqüências de aberrações cromossômicas e de micronúcleo dos testes realizados com o organismo teste *A. cepa* estão apresentados na tabela 3. A comparação entre o total de aberrações cromossômicas observadas para a concentração de BTEX e sua respectiva concentração biodegradada, revelou uma diminuição significativa para as concentrações BTEX 1, 2 e 4, indicando uma redução dos efeitos genotóxicos induzidos pelo BTEX, após o processo de biodegradação.

As comparações entre as freqüências de MN das concentrações de BTEX e sua respectiva concentração biodegradada revelaram uma diminuição significativa para a concentração BTEX 1 e BTEX 4, evidenciando uma diminuição dos efeitos mutagênicos ocasionados pelo BTEX, após o processo de biodegradação.

-Teste *in vitro*

Comparando-se as freqüências de MN presentes nas células HTC expostas às 5 concentrações do BTEX com as suas respectivas concentrações biodegradadas, não foram observadas diferenças significativas entre elas. Observou-se um aumento estatisticamente significativo da freqüência de MN entre o teste branco e o controle negativo, no entanto, tal diferença não induziu a um aumento significativo de micronúcleo nas amostras biodegradadas, quando comparadas com as amostras correspondentes não biodegradadas (Tabela 4).

Pelos testes realizados com células HTC, observou-se, para todas as concentrações biodegradadas, uma diminuição significativa de danos genotóxicos, independentemente do teste branco ter apresentado um resultado superior de genotoxicidade, em relação ao controle negativo (Tabela 4).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Microrganismos encontrados no solo, águas superficiais e subterrâneas são capazes de degradar compostos orgânicos, utilizando-os como fonte de energia, e promover a sua eliminação do ambiente contaminado (PEDROZO et al., 2002). De acordo com Kataoka (2001), a biodegradação de compostos orgânicos ocorre de forma mais eficaz quando os microrganismos inoculados são pré-selecionados, portanto mais adaptados aos poluentes alvos.

Embora diversos autores afirmem que a biodegradação geralmente ocorre por um consórcio de diferentes espécies de microrganismos, incluindo as algas, as bactérias, os fungos e os protozoários (GHIORSE; WILSON, 1988; MELO; AZEVEDO, 1997; RÉGIS,

2000), pode-se afirmar, pelos estudos realizados, que o consórcio microbiano utilizado era constituído exclusivamente de bactérias.

Dentre as bactérias identificadas no inóculo, a *P. putida* foi a única capaz de degradar o BTEX. O papel das demais bactérias presentes no inóculo não foi identificado, sugerindo a necessidade de mais testes para se conhecer um provável envolvimento na degradação de metabólitos intermediários.

Assim como obtido em nossos resultados, diversos trabalhos citam a *P. putida* como degradadora de BTEX. Lee et al. (1994) observaram que a bactéria *P. putida* TB105, modificada em laboratório, foi capaz de metabolizar mistura de benzeno, tolueno e p-xileno sem a formação de nenhum metabólito intermediário. Shim et al. (2005) concluíram que culturas mistas de *P. putida* e *P. fluorescens* são capazes de degradar todos os componentes do BTEX, tanto em condições aeróbias como anaeróbias, resultando em completa mineralização dos compostos, sem a formação de metabólitos intermediários. Otenio et al. (2005) testaram a ação da bactéria *P. putida* CCM1 852, isolada de uma estação de tratamento de efluentes, sobre a biodegradação dos compostos benzeno, tolueno e xileno, individualmente e em misturas. Os resultados obtidos nos testes isolados com cada um dos componentes da mistura mostraram que essa bactéria foi capaz de metabolizar o tolueno e o xileno, mas não o benzeno. Segundo os autores, a análise de degradação da mistura BTX revelou que além do benzeno não ser metabolizado, houve também um decréscimo de 50% na taxa de metabolização do tolueno e do xileno.

Pelo resultado das análises químicas, foi possível comprovar que a *P. putida*, presente no efluente bruto de refinaria de petróleo e utilizada nesse ensaio, foi capaz de degradar todos os constituintes do BTEX, portanto pode ser considerada uma eficiente bactéria degradadora desta mistura.

O efluente bruto de refinaria de petróleo usado neste trabalho, para obtenção de degradadores de BTEX, mostrou que efluentes podem conter microrganismos capazes de degradar compostos orgânicos, como o BTEX, caracterizando-se como um importante material a ser utilizado em programas de descontaminação ambiental por derivados de petróleo.

Além da diminuição da quantidade de BTEX das amostras, o processo de biodegradação mostrou-se eficiente também na diminuição dos danos provocados ao material genético das células de *A. cepa* e de células HTC. A comparação entre os resultados obtidos para as concentrações de BTEX e suas respectivas concentrações biodegradadas mostraram uma diminuição significativa dos danos genotóxicos e mutagênicos, para as células

meristemáticas de *A. cepa*. Para as células HTC, o processo de biodegradação foi bastante eficiente na diminuição dos danos genotóxicos, e na manutenção da não mutagenicidade de amostras não biodegradadas, após biodegradação, com exceção da maior concentração testada, onde não se observou diminuição na frequência de MN entre as concentrações não biodegradada e biodegradada.

Os resultados apresentados indicam que, provavelmente, as concentrações mais elevadas de BTEX não foram suficientemente degradadas pela bactéria, apresentando, por isso, uma ação indutora de alterações mutagênicas nas células expostas. Assim, parece ser necessário um maior tempo de biodegradação, superior ao período de vinte dias utilizado neste trabalho, para a total degradação do BTEX presente nas concentrações mais altas testadas.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. René Peter Schneider, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP - São Paulo, pelas importantes indicações e sugestões sobre o BTEX. Ao Programa de Recursos Humanos ANP/FINEP/MCTCTPETRO, PRH-05 da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brasil, pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. Michigan: Academic Press, 1994. 302 p.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. San Diego: Academic Press, 1999, 453p.

ANNESER, B.; EINSIEDL, F.; MECKENSTOCK, R.U.; RICHTERS, L.; WISOTZKY, F.; GRIEBLER, C. High-resolution monitoring of biogeochemical gradients in a tar oil-contaminated aquifer. **Applied Geochemistry**, Oxford, v. 23, p. 1715-1730, 2008.

(ATSDR) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **INTERACTION PROFILE FOR: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX)**. 2004, 137p.

CORSEUIL, H.X.; ALVAREZ, P.J.J. Natural bioremediation perspective for BTX contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Water Science & Technology**, Oxford, v. 34, p.311-318, 1996.

FALCÓ, I.P.; MOYA, M.N. **Analysis of volatile organic compounds in water. In: NOLLET, L.M.L. (Ed.). Handbook of water analysis.** New York: CRC Press, 2007, p.599-666.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.88, n.3, p. 252-259, 2007.

GHIORSE, W. C.; WILSON, J. L. Microbial ecology of the terrestrial subsurface. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 33, p. 107-172, 1988.

HUTCHINS, S.R.; SEWELL, G.W.; KOVACS, D.A.; SMITH, G.A. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions, **Environmental Science and Technology**, Easton, v.25, p. 68-76, 1991.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2001.

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

LEE, J. Y.; ROH, J. R.; KIM, H. S. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the simultaneous biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene mixture. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 43, p.1146-1152, 1994.

MARIANO, A.P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e águas subterrâneas contaminados com óleo diesel.** 147f. Tese de Doutorado em Geociências e Meio Ambiente. Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2006.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental.** Embrapa-CNPMA, 1997, 246p.

NAKHLA, G. Biokinetic modeling of in situ bioremediation of BTX compounds – impact of process variable and scaleup implications. **Water Research**, New York, v.37, p.1296 - 1307, 2003.

OTENIO, M.H.; SILVA, M.T.L.; MARQUES, M.L.O.; ROSEIRO, J.C.; BIDOIA, E.D. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, p.258-261, 2005.

PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M.; CORSEUIL, H.X.; SCHNEIDER, M.R.; LINHARES, M.M. **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo**. Salvador: NEAMA, 2002, 246p.

PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R. L. Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 62, p. 415-420, 2005.

RÉGIS, G. **Tratamento eletrolítico das águas residuárias de uma indústria produtora de antioxidante de borracha visando sua biodegradação**. 117f. Tese de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, 2000.

REUSSER, D.E.; ISTOK, J.D.; BELLER, H.R.; FIELD, J.A. *In situ* transformation of deuterated toluene and xylene to benzylsuccinic acid analogues in BTEX-contaminated aquifers. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 36, p. 4127-4134, 2002.

SHIM, H.; HWANG, B.; LEE, S.S.; KONG, S.H. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. **Biodegradation**, Dordrecht, v.16, p.319-327, 2005.

Tabela 1. Análise química quantitativa do BTEX detectado nas amostras, antes e após o processo de biodegradação.

Amostra	Composto	Amostras iniciais (µg/L)				Amostras biodegradadas (µg/L)				PD (%)
		Concentração	LD(µg/L)	FD	VI(mL)	Concentração	LD(µg/L)	FD	VI(mL)	
Água de Diluição	B	ND								
	T	ND								
	E	ND	0,3	1	10	-	-	-	-	-
	X (m,p)	ND								
	X (o)	ND								
	Total	ND								
BTEX 1	B	902344				322254				64,3
	T	168698				63700				62,2
	E	40404	600	2000	10	14809	300	1000	0,01	63,3
	X (m,p)	9222				3114				66,2
	X (o)	2520				930				63,1
	Total	1123188				404807				63,9
BTEX 2	B	41862,9				20701,15				50,5
	T	11137,9				2540,5				77,2
	E	4206,6	30	100	0,1	306,65	15	50	0,2	92,7
	X (m,p)	999,2				104,3				89,6
	X (o)	328,8				41,85				87,3
	Total	58535,4				23694,45				59,5
BTEX 3	B	8922,95				8,03				99,9
	T	2602,45				2,95				99,9
	E	1039,85	15	50	0,2	1,13	0,3	1	10	99,9
	X (m,p)	236,35				ND				100
	X (o)	70,65				ND				100
	Total	12872,25				12,1				99,9
BTEX 4	B	4,36				3,47				20,4
	T	22,29				1,62				92,7
	E	45,62	0,3	1	10	ND	0,3	1	10	100
	X (m,p)	9,82				ND				100
	X (o)	3,41				ND				100
	Total	85,51				5,09				94,0
BTEX 5	B	1,65				ND				100
	T	3,03				ND				100
	E	4,89	0,3	1	10	ND	0,3	1	10	100
	X (m,p)	ND				ND				100
	X (o)	ND				ND				100
	Total	9,57				ND				100

ND: Não detectável; LD: Limite de detecção; FD: Fator de diluição; VI: Volume inicial da amostra; PD: Porcentagem de diminuição da quantidade de BTEX da amostra inicial em relação à amostra final. USEPA-SW 846 método 8021B.

Tabela 2. Crescimento de bactérias na ausência e na presença de 4 diferentes concentrações de BTEX em meio Bushnell-Haas (modificado).

Cepa	Glicose 0,1% (µL)	BTEX (µL/3mL)			
	12	5	10	15	20
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	++	-	-	-	-
<i>BGN</i>	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	+++	++	+	+	+
<i>Moraxella sp</i>	++	-	-	-	-
<i>Brevundimonas diminuta</i>	+++	-	-	-	-
<i>A. lwoffii, BGN, P. putida, Moraxella sp, B. diminuta</i>	+++	++	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+++	++	++	+	+

(+): turvação positiva, crescimento fraco

(++): turvação positiva, crescimento moderado

(+++): turvação positiva, crescimento intenso

(-): turvação negativa, ausência de crescimento

Tabela 3. Frequências de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleo (MN) em células meristemática de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de BTEX, antes e após o processo de biodegradação.

ENSAIOS	AC	MN	
CONTROLE	Negativo	0.31 ± 0.14	0.04 ± 0.07
	Positivo	1.59 ± 0.57	2.99 ± 1.01
	Branco	1.17 ± 0.48**	0.18 ± 0.21
BTEX 1	Não Biodegradado	3.21 ± 0.72	0.31 ± 0.30
	Biodegradado	2.15 ± 0.81**	0.12 ± 0.14*
BTEX 2	Não Biodegradado	2.87 ± 0.56	0.33 ± 0.30
	Biodegradado	1.74 ± 0.55**	0.16 ± 0.16
BTEX 3	Não Biodegradado	1.83 ± 0.39	0.08 ± 0.13
	Biodegradado	1.94 ± 0.78	0.25 ± 0.21
BTEX 4	Não Biodegradado	4.11 ± 1.09	0.36 ± 0.49
	Biodegradado	1.62 ± 0.61**	0.10 ± 0.14*
BTEX 5	Não Biodegradado	1.61 ± 0.54	0.20 ± 0.18
	Biodegradado	1.33 ± 0.42	0.14 ± 0.13

* Redução estatisticamente significativa, de acordo com o teste de Mann-Whitney (p<0.05).

** Redução altamente significativa, de acordo com o teste estatístico de Mann-Whitney (p<0.01).

Tabela 4. Frequência de micronúcleo (MN) e a média de escores observados em células HTC expostas às concentrações de BTEX, antes e após o processo de biodegradação.

ENSAIOS		MN	ESCORES
CONTROLE	Negativo	6.67 ± 1.63	10.00 ± 2.65
	Positivo	113.50 ± 16.79	244.33 ± 22.37
	Branco	16.33 ± 2.34	40.33 ± 3.06*
BTEX 1	Não Biodegradado	26.83 ± 1.72	91.67 ± 8.39
	Biodegradado	27.17 ± 4.12	50.00 ± 11.53*
BTEX 2	Não Biodegradado	20.00 ± 2.53	68.33 ± 15.82
	Biodegradado	18.33 ± 3.33	40.33 ± 7.51*
BTEX 3	Não Biodegradado	17.17 ± 2.48	44.67 ± 5.51
	Biodegradado	17.83 ± 2.93	24.00 ± 4.58*
BTEX 4	Não Biodegradado	17.50 ± 2.35	54.33 ± 4.73
	Biodegradado	18.00 ± 0.89	30.33 ± 10.21*
BTEX 5	Não Biodegradado	18.67 ± 1.97	46.67 ± 9.07
	Biodegradado	20.33 ± 3.01	24.33 ± 3.79*

* Redução estatisticamente significativa, de acordo com o teste de t Student ($p < 0.05$).

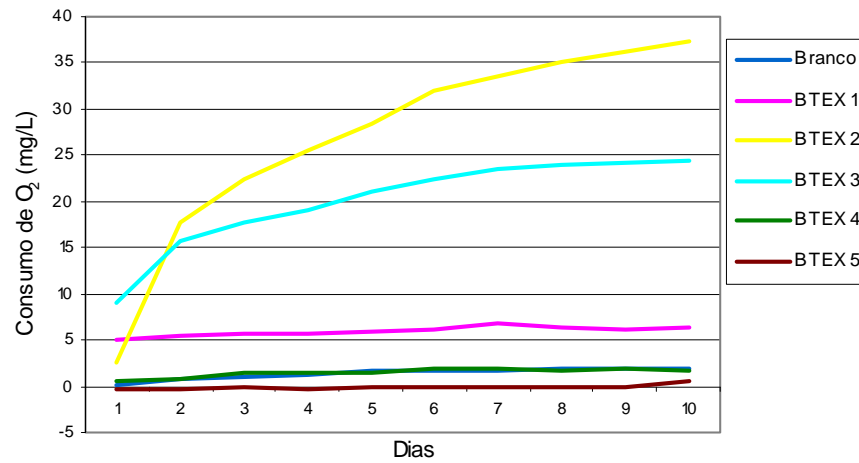


Figura 1. Valores médios do consumo de O_2 , de cada uma das concentrações de BTEX (mg/L), pelas bactérias presentes na solução, durante os 10 primeiros dias de experimento.

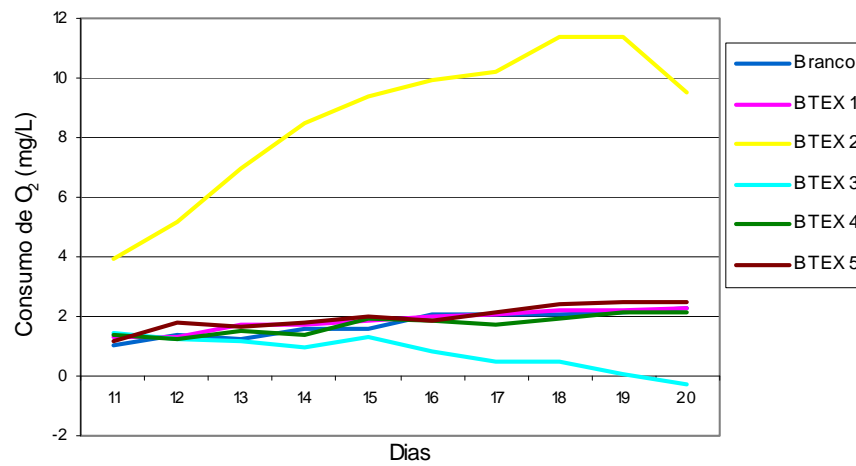


Figura 2. Valores médios do consumo de O_2 , de cada uma das concentrações de BTEX (mg/L), pelas bactérias presentes na solução, durante os 10 últimos dias de experimento.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Pelos resultados obtidos nos ensaios realizados com diferentes concentrações da mistura BTEX, com os sistemas testes *Allium cepa* e células HTC, mantidas em cultura, pode-se concluir:

- BTEX é uma mistura de hidrocarbonetos com potencial genotóxico para células de meristemas radiculares de *A. cepa* e células HTC, mantidas em cultura;
- A mistura BTEX foi mutagênica para células meristemáticas de *A. cepa* para todas as concentrações testadas. A mutagenicidade dessa mistura foi observada, também para células HTC, mas somente para as concentrações próximas a da solubilidade dos seus constituintes em água.
- Análises químicas quantitativas das diferentes concentrações da mistura BTEX, antes e após o processo de biodegradação, mostraram um decréscimo nas concentrações dos componentes, após biodegradação.
- Avaliações de genotoxicidade e mutagenicidade, realizadas com células meristemáticas e F₁ de *A. cepa*, indicaram que o processo de biodegradação por microrganismos foi eficiente na biodegradação da mistura aquosa do BTEX, por diminuir os efeitos genotóxicos e mutagênicos, indicando que os compostos da mistura foram degradados em metabólitos não tóxicos para as células.
- Ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, realizados com células HTC, indicaram que o processo de biodegradação por microrganismos foi eficiente na biodegradação da solução aquosa do BTEX, por diminuir os efeitos genotóxico e manter os

resultados não mutagênicos da mistura, indicando que o BTEX foi degradado em metabólitos não tóxicos para as células.

➤ Pela análise microbiológica do consórcio microbiano usado como agente de biodegradação, é possível concluir que este consórcio foi composto, exclusivamente, por bactérias.

➤ Dentre as bactérias identificadas no consórcio, a *Pseudomonas putida* foi a única espécie capaz de biodegradar, com eficiência, o BTEX.

➤ O efluente bruto de refinaria de petróleo usado neste trabalho contém microrganismos capazes de degradar o BTEX, caracterizando-se em um importante material a ser utilizado em programas de descontaminação ambiental por esta mistura.

➤ As concentrações mais elevadas de BTEX não foram totalmente degradadas pelo consórcio, apresentando, por isso, uma ação indutora de alterações mutagênicas nas células expostas, o que indica a necessidade de um tempo superior a 20 dias de biodegradação para a total degradação do BTEX presente nas concentrações mais altas testadas.

➤ A espécie *A. cepa* e células HTC caracterizaram-se em eficientes sistemas testes para detecção de efeitos tóxicos induzidos pelo BTEX.

➤ Ensaios de aberrações cromossômicas e de MN, realizados com o organismo teste *Allium cepa* constituíram ferramentas bastante sensíveis na detecção de danos ao DNA induzidos pela mistura BTEX.

➤ O ensaio do cometa foi uma ferramenta bastante sensível na detecção de danos genotóxicos da mistura BTEX.

➤ O teste do MN constituiu uma metodologia bastante eficiente na avaliação de danos mutagênicos de células HTC expostas ao BTEX.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITIO, K.; WADA, H. Behavioral approaches to toluene intoxication. **Environmental Research**, San Diego, v.62, p.53-62, 1993.

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

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. Michigan: Academic Press, 1994. 302 p.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. San Diego: Academic Press, 1999, 453p.

ALEXANDER, R. R.; TANG, J.; ALEXANDER, M. Genotoxicity is unrelated to total concentration of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in soils undergoing biological treatment. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.31, p.150-154, 2002.

ANNESER, B.; EINSIEDL, F.; MECKENSTOCK, R.U.; RICHTERS, L.; WISOTZKY, F.; GRIEBLER, C. High-resolution monitoring of biogeochemical gradients in a tar oil-contaminated aquifer. **Applied Geochemistry**, Oxford, v. 23, p. 1715-1730, 2008.

ARNAIZ, R.R. **Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos**. 2 ed. México: [s.n.], 1995. 267p.

ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, M.; AHMAD, A. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, Amsterdam, v.514, p.105-113, 2002.

ATLAS, R. M. Applicability of bioremediation to eastern European pollution problems. In: TRAINING WORKSHOP OF ICS-UNIDO ON "SOIL ENVIRONMENTAL ASSESMENT AND BIOREMEDIATION TECHNOLOGIES", 1997.

(ATSDR) AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for xylenes**. Atlanta: ATSDR, 1993. 209 p.

(ATSDR) AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for xylenes**. Atlanta: ATSDR, 1995.

(ATSDR) AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for ethylbenzene**. Atlanta: ATSDR, 1999. 238 p.

(ATSDR) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **INTERACTION PROFILE FOR: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX)**. 2004, 137p.

AU, W.W.; RAMANUJAM, V.M.S.; WARD JR., J.B.; LEGATOR, M.S. Chromosome aberrations in lymphocytes of mice after sub-acute low-level inhalation exposure to benzene, **Mutation Research**, Amsterdam, v.260, p. 219–224, 1991.

BAMFORTH, S.M; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 80, p.723–736, 2005.

BARLIE, F.B. **Introduction to *in vitro* cytotoxicology**: mechanism and methods. Boca Raton: CRC press, 1994.

BARRETO, G.E.S.; OLIVEIRA, E.S.; VILLAR, F.A.G.A.; SANTOS, G.S.; LIMA, R.M.F.; COSTA, S.L.; COSTA, M.F.D.; EGITO, E.S.T.; EL-BACHÁ, R.S. Investigation of toxic

factors affecting cells of rat brains exposed to 3-methylcatechol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.50, n.5, p.839-849, 2007.

BARTHE, R. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. **Fems Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 12, p. 155-172, 1986.

BELLINI, M.F.; ANGELI, J.P.F.; MATUO, R.; TEREZAN, A.P.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-K1 and HTC cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v.20, p.355-360, 2006.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.34 (Suppl.1), p. 65-68, 2003.

BERTHEUSSEN, K.; YOUSEF, M.I.; FIGENSCHAU, Y. A new sensitive cell culture test for the assessment of pesticide toxicity. **Journal of Environment Science and Health, Part B**, New York, v.32, p.195-211, 1997.

BEZRUKOV, V. F.; LAZARENKO, L. M. Environmental impact on age-related dynamics of karyotypical instability in plants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 520, p. 113-118, 2002.

BHUPATHIRAJU, V. K.; KRAUTER, P.; HOLMAN, H. N.; CONRAD, M. E.; DALEY, P. F.; TEMPLETON, A. S.; HUNT, J. R.; HERNANDEZ, M.; ALVAREZ-COHEN, L. Assessment of in-situ bioremediation at a refinery waste-contaminated site and an aviation gasoline contaminated site. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 13, p. 79–90, 2002.

BIANCHI, J. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Malation, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e células de mamíferos**. 2008. 165f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

BIRD, M.G.; GREIM, H.; SNYDER, R.; RICE, J.M. International symposium: Recent advances in benzene toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v.153–154, p.1–5, 2005.

BISCARDI, D.; DE FUSCO, R.; FERETTI, D.; ZERBINI, I.; IZZO, C.; ESPOSITO, V.; NARDI, G.; MONARCA, S. Genotoxic effects of pesticide-treated vegetable extracts using

the *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests. **Annali d'igiene Sperimentale**, Roma, v. 15, n. 6, p.1077-1084, 2003.

BITTON, G.; GERBA, C. P. **Ground water. Pollution Microbiology**. N.Y.: John Wiley & Sons., 1984, 377p.

BOEIRA, J.M.; DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A. Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells *in vitro*. **Pharmacology & toxicology**, Amsterdam, v.89, n.6, p.287-294, 2001.

BOUWER, E.; DURANT, N.; WILSON, L.; ZHANG, W.; CUNNINGHAM, A. Degradation of xenobiotic compounds in situ: capabilities and limits. **Fems Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 307-317, 1994.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, Oxford, v.20, n.4, p.245-254, 2005.

BRUSICK, D.J. **Principles of Genetic Toxicology**. New York: Plenum Press, 1987, 284p.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**, Manaus, v.36, n.3, p.357-364, 2006.

BUSHRA ATEEQ, M.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, W. A. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 514, p. 105-113, 2002.

CARDOZO, T. R.; ROSA D. P.; FEIDEN, I. R.; ROCHA, J. A. V.; OLIVEIRA, N. C. D.; PEREIRA, T. S.; PASTORIZA, T. F.; MARQUES, D. M.; LEMOS, C. T.; TERRA, N. R.; VARGAS, V. M. F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research**, Amsterdam, v.603, p. 83–96, 2006.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford, v.72, n.5, p.722-725, 2008.

CARVALHO, T.U. Cultura de Células Animais. In: BENCHIMOL, M. (Org.). **Métodos de Estudo da Célula**. Rio de Janeiro: FENORTE/UENF, cap.2, 1996, p. 45-58.

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

CETESB. **Relatório de qualidade das águas subterrâneas no Estado de São Paulo 2001 – 2003**, São Paulo: CETESB, 2004, 137 p.

CHAUHAN, L. K.; SAVENA, P. M.; GUPTA, S. K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environment and Experimente Botany**. Elmsford. v. 42p., 191-189, 1999.

CHEN, H.; RUPA, D.S.; TOMAR, R.; EASTMOND, D.A. Chromosomal loss and breakage in mouse bone marrow and spleen cells exposed to benzene *in vivo*. **Cancer Research**, Baltimore, v.54. p.3533–3539, 1994.

CHEN, C.S.; HSEU, Y.C.; LIANG, S.H.; KUO, J.-Y.; CHEN, S.C. Assessment of genotoxicity of methyl-tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.153, p. 351–356, 2008.

CHEON, J. Y.; LEE, J. Y.; LEE, K. K. Characterization of the hydrogeologic environment at a petroleum hydrocarbon contaminated site in Korea. **Environmental Geology**, Berlin, v.45, p. 869- 883, 2004.

CHIANG, C. Y.; SALANITRO, J. P.; CHAI, E. Y.; COLTHART, J. D.; KLEIN, C. L. Aerobic biodegradation of benzene, toluene and kylene in a sand aquifer: data analysis and computer modeling. **Ground Water Monitoring Remote and Remediations**, Dublin, v. 27, n. 6, p. 823-834, 1989.

CLAXTON, L.D.; MATTHEWS, P.P.; WARREN, S.H. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity, **Mutation Research**, Amsterdam, v.567, p. 347–399, 2004.

CORSEUIL, H.X.; ALVAREZ, P.J.J. Natural bioremediation perspective for BTX contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Water Science & Technology**, Oxford, v. 34, p.311-318, 1996.

CORVI, R.; ALBERTINI, S.; HARTUNG, T.; HOFFMANN, S.; MAURICI, D.; PFUHLER, S.; BENTHEM, J.; VANPARYS, P. ECVAM retrospective validation of *in vitro* micronucleus test (MNT). **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 271–283, 2008.

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

CRISTALDI, M.; IERADI, L.A.; UDROIU, I.; ZILLI, R. Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 559, p. 1–9, 2004.

DABNEY, B. **REPROTEXT data base**, Vol.22, Denver: Micromedex Inc., 1994.

DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Metabolic activation of chemicals to mutagenic carcinogens by human hepatoma microsomal extracts in chinese hamster ovary cells (*in vitro*). **Mutagenesis**, Oxford, v.8, p.11-15, 1993.

DEAN, B.J. Genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. **Mutation Research**, Amsterdam, v.47, p.75-97, 1978.

DEAN, B. J. Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. **Mutation Research**, Amsterdam, v.154, p.153-181, 1985.

DEAN, R.; BYNUM, G.; KRAM, D.; SCHNEIDER, E.L. Sister-chromatid exchange induction by carcinogens in HTC cells. An *in vitro* system which does not require addition of activating factors. **Mutation Research**, Amsterdam, v.74, p. 477-483, 1980.

DECORDIER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. The *in vitro* micronucleus test: From past to future. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 607, p. 2–4, 2006.

DI-PAOLO, C. **Aplicação do Ensaio Cometa ao estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à β -naftoflavona.** 2006. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Oceanografia Biológica) – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2006.

DIXON, D.R.; WILSON, J.T. Genetics and marine pollution. **Hydrobiologia**, The Hague, v. 420, p. 29-43, 2000.

DUARTE-DAVIDSON, R.; COURAGE, C.; RUSHTON, L.; LEVY, L. Benzene in the environment: an assessment of the potential risks to the health of the population, **Occupational And Environmental Medicine**, London, v.58, p. 2–13, 2001.

(EC) ENVIRONMENT CANADA. **Priority substances list assessment report on toluene.** Quebec: Environment Canada, 1993. 26 p.

EGITO, L.C.M.; MEDEIROS, M.G.; MEDEIROS, S.R.B.; AGNEZ-LIMA, L.F. Cytotoxic and genotoxic potential os surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, n.2, p.435-441, 2007.

EL-DEMERDASH, F.M.; YOUSEF, M.I.; ELAGAMY, E.I. Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (*in vitro*). **Journal of Environment Science and Health, Part B**, New York, v.36, p.29-42, 2001.

EWEIS, J.B.; ERGAS, S.J.; CHANG, D.P.Y.; SCHROEDER, E.D. **Bioremediation Principles.** WCB/McGraw-Hill, 1998, 530p.

FALCÓ, I.P.; MOYA, M.N. **Analysis of volatile organic compounds in water. In: NOLLET, L.M.L. (Ed.). Handbook of water analysis.** New York: CRC Press, 2007, p.599-666.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 600, p. 58–66, 2006.

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

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

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W.P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The human micronucleus project - an international collaborative study on the use of micronucleus technique for measuring DNA damages in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 428, p. 271-283, 1999.

FERETTI, D.; ZERBINI, I.; CERETTI, E.; VILLARINI, M.; ZANI, C.; MORETTI, M.; FATIGONI, C.; ORIZIO, G.; DONATO, F.; MONARCA, S. Evaluation of chlorite and chlorate genotoxicity using plant bioassays and *in vitro* DNA damage tests. **Water Research**, New York, v. 42, p. 4075-4082, 2008.

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

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.88, n.3, p. 252-259, 2007.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a standart 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.

FLORIN, I.; RUTBERG, L.; CURVALL, M. Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames test. **Toxicology**, Limerick, v.18, p.219-232, 1980.

GAD, S. C. Primary hepatocyte culture as an *in vitro* toxicologic system for the liver. In: GAD, S. C. **In Vitro Toxicology**. 2 ed., New York: Taylor & Francis, 2000. 410 p.

GHIORSE, W. C.; WILSON, J. L. Microbial ecology of the terrestrial subsurface. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 33, p. 107-172, 1988.

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

GRADY, C. P. L. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 27, p. 660-674, 1985.

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

GRANT, W.F. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system, **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, NC, US: National Institute of Environmental Health Sciences, v.99, p.273-291, 1978.

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

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

GREEN, M. **Academic American Encyclopedia**, Danbury: Grolier Electronic Publishing, 1988.

GRISOLIA, C.K.; OLIVEIRA, A.B.B.; BONFIM, H.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M.N. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.2, p.334-338, 2005.

GROVER, I.S.; DHINGRA, A.K.; ADHIKARI, N.; LADHAR, S.S. Genotoxicity of pesticides, in: M.L. MENDELSON, R.J. ALBERTINI Eds., **Mutation and the Environment: Part E**, Wiley Liss, New 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.

GUILLOUZO, A. Liver cells models in *in vitro* toxicology. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, NC, US: National Institute of Environmental Health Sciences, v.106, p.511-532, 1998.

GUIMARÃES, E.T.; DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; CALDINI JR, N.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; SALDIVA, P.N.H. Detection of genotoxic potential of air pollution in the city of São Paulo (Brazil) with *Tradescantia pallida* using *Tradescantia* micronucleus assay (Trad-MCN). **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 44, p. 1-8, 2000.

GUSTAVINO, B.; BUSCHINI, A.; MONFRINOTTI, M.; RIZZONI, M.; TANCIONI, L.; POLI, P.; ROSSI, C. Modulating effects of humic acids on genotoxicity induced by water disinfectants in *Cyprinus carpio*. **Mutation Research**, Amsterdam, v.587, p.103-113, 2005.

GUZMÁN, P.; SOTELO-REGIL, R.C.; MOHAR, A.; GONSEBATT, M.E. Positive correlation between the frequency of micronucleated cells and dysplasia in papanicolaou smears, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.41, p.339–343, 2003.

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

HAMMER, K.D. Metabolite ratio of toluene-exposed rotogravure printing plant workers reflects individual mutagenic risk by sister chromatid exchanges. **Mutation Research**, Amsterdam, v.519, p.171–177, 2002.

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

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA – effects in single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, Germany, v.90, n.2-3, p.183-188, 1997.

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.; CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M.D.; TUCKER, J.D.; VANPARYS, PH.; MACGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.18, p. 277–291. 1991.

HENDERSON, L.; BRUSICK, D.; RATPAN, F.; VEENSTRA, G. A review of the genotoxicity of ethylbenzene. **Mutation Research**, Amsterdam, v.635, p. 81–89, 2007.

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

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

HUNKELER, D.; HÖHENER, P.; ZEYER, J. Engineered and subsequent intrinsic in situ bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer. **Journal of Contaminant Hydrology**, Amsterdam, v. 59, p. 231– 245, 2002.

HUTCHINS, S.R.; SEWELL, G.W.; KOVACS, D.A.; SMITH, G.A. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions, **Environmental Science and Technology**, Easton, v.25, p. 68-76, 1991.

INAZAKI, T.H. **Avaliação da biodegradação de efluentes com substâncias persistentes antes e após tratamento eletrolítico para proposta de tratamento físico-biológico alternativo**. 127f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, 2003.

(IARC) International Agency for Research on Cancer, IARC Monograph, **Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Industrial Chemicals**, vol. 77, 2000, p. 227–266.

IRWIN, R.J.; VANMOUWERIK, M.; STEVENS, L.; SEESE, M.D.; BASHAM, W. **Environmental Contaminants Encyclopedia**, Fort Collins: Water Resources Division, 1997.

JOHNSON, S.J.; WOOLHOUSE, K.J.; PROMMERA H.; BARRYA, D.A.; HRISTOFI N. Contribution of Anaerobic Microbial Activity to Natural Attenuation of Benzene in Groundwater. **Engineering Geology**. Edinburgh, v. 2186, p. 1-7, 2003.

KAO, C. M.; WANG, C. C. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. **Water Research**, New York, v. 34, n.13, p. 3413 – 3423, 2000.

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.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, Amsterdam, v.363, p.89-96, 1996.

KNOWLES, B.B.; HOWWE, C.C.; ADEN, D.P. Human hepatocellular carcinoma cell secretes the major plasma protein and hepatitis B surface antigen. **Science**, Washington, v. 209, p. 497-499, 1980.

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

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

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

KURÁS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by barck water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Chemosphere**, Oxford., v. 107, p. 211-221, 2006.

LEITE, E.A. Solventes orgânicos. In: OGA, S. (Ed.). **Fundamentos de toxicologia**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 1996, p.187-229.

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

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

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

LEWINSKA, A.; WNUK, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Carlton, v.34, p. 781-786, 2007.

LOVLEY, D. R. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 18, p. 75-81, 1997.

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

MACKAY, D.; SHIU, W.Y.; CHING MA, K. **Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals: Volume I - Monoaromatic Hydrocarbons, Chlorobenzenes, and PCBs**. Boca Raton: CRC Press, 1992, 697 p.

MAILA, M. P.; CLOETE, T. E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants – perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 55, p. 1-8, 2005.

MALATESTA, M.; PERDONI, F.; SANTIN, G.; BATTISTELLI, S.; MULLER, S.; BIGGIOGERA, M. Hepatoma tissue culture (HTC) cells as a model for investigating the effects of low concentrations of herbicide on cell structure and function. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v.22, p.1853-1860, 2008.

MARIANO, A.P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 147f. Tese de Doutorado em Geociências e

Meio Ambiente. Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2006.

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

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluents using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, Tokyo, v.69, n.4, p.399-408, 2004.

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

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n.1, p.148-158, 2006.

MAZZUCO, L. M. **Atenuação natural de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados com óleo diesel**. 86f. 2004. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MCGREGOR, D.B.; BROWN, A.; CATTANACH, P. Responses of the L5178Y tk+/tk- mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 Coded chemicals. **Environmental and Molecular Mutagenis**, New York, v.12, p.85-154, 1988.

MCGREGOR, D. The genetic toxicology of toluene. **Mutation Research**, Amsterdam, v.317, p.213-228, 1994.

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.

(MEDITEXT) MEDICAL MANAGEMENT. Xylene (mixed isomers). In: TOMES CPS tm SYSTEM. **Toxicology, occupational medicine and environmental series**. Englewood: Micromedex, 2000.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Embrapa-CNPMA, 1997, 246p.

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

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, Amsterdam, v.339, p.135-147, 1998.

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

MORALES, M.M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.60, n.2, p.33-36, 2008.

MULLIN, A.H.; NATARAJ, D.; REN, J.-J.; MULLIN, D.A. Inhaled benzene increases the frequency and length of *lacI* deletion mutations in lung tissues of mice. **Carcinogenesis**, Oxford, v.19, n.10, p.1723-1733, 1998.

MURATA, M.; TSUJIKAWA, M.; KAWANISHI, S. Oxidative DNA Damage by Minor Metabolites of Toluene May Lead to Carcinogenesis and Reproductive Dysfunction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.261, p.478-483, 1999.

NADIM, F.; HOAG, G. E.; LIU, S.; CARLEY, R. J.; ZACK, P. Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: an overview. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, Amsterdam, v.26, p.169-178, 2000.

NAKHLA, G. Biokinetic modeling of in situ bioremediation of BTX compounds – impact of process variable and scaleup implications. **Water Research**, New York, v.37, p.1296 - 1307, 2003.

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

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM). **Hazardous Substances Data**, Denver: Micromedex Inc., 1988.

NESTMANN, E.R.; LEE, E.G.H. Mutagenicity of constituents of pulp and papermill effluent in growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, Amsterdam, v.119, p.273-280, 1983.

NILAN, R.A. Potential of plant genetic systems for monitoring and screening mutagens. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, NC, US: National Institute of Environmental Health Sciences, v.27, p. 181-196, 1978.

(NLM) NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Hazardous Substances Data Bank**, Denver: Micromedex Inc., 1994.

(NTP) NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. **Toxicology and carcinogenesis studies of xylenes (mixed) (60% m-xylene, 14% p-xylene, 9%-xylene, and 17% ethylbenzene) in F334/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)**. Research Triangle Park: National Toxicology Program. 1986.

(NTP) NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. **Toxicology and carcinogenesis studies of ethylbenzene in F344/N rats and B6C3F1 mice**. Inhalation studies, Research Triangle Park: National Toxicology Program, 1996, 466p.

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

(OFA). OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT. **“Alternatives to animal use in research, testing and education”**. Ota Publ. N° OTA-BA-273. Washington DC. US. Government Printing Office. 1986.

OLAHARSKI, A.; SOTELO, R.; SOLORZA-LUNA, G.; GONSEBATT, M.E.; GUZMAN, P.; MOHAR, A.; EASTMOND, D.A. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis, **Carcinogenesis**, Oxford, v.27, p.3317–3343, 2006.

OLIVEIRA, R.J.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, A. F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-K1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v.20, p. 1225-1233, 2006.

(OPS) ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Hidrocarburos aromáticos y salud: el estado del arte. In: MENDES, R. Salud ocupacional em la industria del petróleo. Bogotá, 1996.

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

PATRA, M.; SHARMA, A. Relative efficacy of *Allium cepa* and *Allium sativum* in anaphase-telophase test screening metal genotoxicity. **Biologia**, Lahore, v.57, p.409-414, 2002.

PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M.; CORSEUIL, H.X.; SCHNEIDER, M.R.; LINHARES, M.M. **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo**. Salvador: NEAMA, 2002, 246p.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, Oxford, v.5, n.4, p. 289-302, 2000.

PHILLIPS, T. M.; LIU, D.; SEECH, A. G.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analyses and toxicity tests. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 24, p. 132-139, 2000.

PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R. L. Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 62, p. 415-420, 2005.

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátidas hermanas.** 1978. 276f. Tese (Doutorado), Universidade de Complutense, Madrid.

RABELLO-GAY, M. N. Testes com organismos superiores. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e critérios de avaliação,** Ribeirão Preto – SP. Sociedade Brasileira de Genética, 1991, p. 59-75.

RAJAGOPALAN, H.; JALLEPALLI, P.V.; RAGO, C.; VELCULESCU, V.E.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B.; LENGAUER, C. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability, **Nature**, London, v.428, p. 77–81, 2004.

RANDERATH, K.; RANDERATH, E.; ZHOU, G. D.; SUPONPONG, N.; HE, L. Y., MCDONALD, T. J., DONNELLY, K. C. Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered from contaminated lake sediments as assayed by three different methods. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 33, p. 303-312, 1999.

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.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *A. cepa* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, Lund, v. 118, 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. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.418, p.113-119, 1998.

RÉGIS, G. **Tratamento eletrolítico das águas residuárias de uma indústria produtora de antioxidante de borracha visando sua biodegradação.** 117f. Tese de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, 2000.

REUSSER, D. E.; ISTOK, J. D.; BELLER, H. R.; FIELD, J. A. In situ transformation of deuterated toluene and xylene to benzylsuccinic acid analogues in BTEX-contaminated aquifers. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 36, p. 4127-4134, 2002.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. 356 p.

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

RÖLING, W. F. M.; VERSEVEL, H. W. Natural attenuation: What does the subsurface have in store? **Biodegradation**, Dordrecht, v.13, p. 53–64, 2002.

ROMA-TORRES, J.; TEIXEIRA, J. P.; SILVA, S.; LAFFON, B., CUNHA, L. M.; MÉNDEZ, J.; MAYAN, O. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 604, p. 19-27, 2006.

ROOS, P. H.; TSCHIRBS, SEBASTIAN; PFEIFER, FRANK; WELGE, P.; HACKC, A.; WILHELM, M.; BOLT, H. M. Risk potentials for humans of original and remediated PAH-contaminated soils: application of biomarkers of effect. **Toxicology**, Limerick, v. 205, p. 181–194, 2004.

ROZGAJ, R.; KAŠUBA, V.; BROZOVIĆ, G.; JAZBEC; A. Genotoxic effects of anaesthetics in operating theatre personnel evaluated by the comet assay and micronucleus test. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v.212, p. 11–17, 2009.

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

SAFAROVA, V.I.; SAPELNIKOVA, S.V.; DJAZHENKO, E.V.; TEPLOVA, G.I.; SHAJDULINA, G.F.; KUDASHEVA, F.K. Gas chromatography–mass spectrometry with headspace for the analysis of volatile organic compounds in waste water. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.800, n.1–2, p.325–330, 2004.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p. 201-223.

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.

SCOW, K. A.; HICKS, K. A. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 16, p. 246-253, 2005.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, n.2, p.201-222, 1995.

SILVA, R. L. B.; BARRA, C. M.; MONTEIRO, T. C. N.; BRILHANTE, O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis conseqüências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.18, n.6, p.1599-1607, 2002.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424 p.

SILVA, L.R.; FERREIRA, M.M. Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.3, p.312-318, 2003.

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

SINZ, M.W. *In vitro* metabolism: hepatocytes. 1999. In: Woolf, T.F. (Ed.), **Handbook of Drug Metabolism**. New York: Marcel Dekker, pp. 401-424.

SMITH, M.T.; ROTHMAN, N. Biomarkers in the molecular epidemiology of benzene-exposed workers, **Journal of Toxicology And Environmental Health**, Washington, v.61, p. 439–445, 2000.

SUL, D.; LEE, D.; IM, H.; OH, E.; KIM, J.; LEE, E. Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene, **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.134, p.87–95, 2002.

SWIERENGA, S.H.H; HEDDLE, J.A.; SIGAL, E.A.; GILMAN, J.P.W.; BRILLINGER, R.L.; DOUGLAS, G.R.; NESTMANN, E.R. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories. IV. Chromosome aberrations and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 246, p. 301-322, 1991.

TAVARES, D.C. **Estudos da possível ação genotóxica do alcalóide boldina em sistemas de células de mamífero "in vitro" e "in vivo"**. 1991. 205f. Tese (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade do Estado de São Paulo, Ribeirão Preto, 1991.

THIRIOT-QUIÉVREUX, C. Review of the literature on bivalves cytogenetics in the last ten years. **Cahiers de Biologie Marine**, Paris, v.43, p.17-26, 2002.

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

TOKUNAGA, I; GOTOHDA, T; ISHIGAMA, A; KITAMURA, O.; KUBO, S. Toluene inhalation induced 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation as the peroxidative degeneration in rat organs. **Legal Medicine**, Tokyo, v.5, p.34-41, 2003.

TOMPA, A.; MAJOR, J.; JAKAB, M.G. Monitoring of benzene exposed workers for genotoxic effects of benzene: improved working-condition-related decrease in the frequencies of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v.304, p. 159–165, 1994.

UNIVERSITY OF WASHINGTON. **Teratogen Information System**, Denver: Micromedex Inc., 1990.

(USEPA) U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Oil and Hazardous Materials/Technical Assistance Data System (OHM/TADS)**. Denver: Micromedex Inc.: 1985.

(USEPA) U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Quality Criteria for Water**. Washington, D.C: Office of Water Regulations and Standards, 1986.

(USEPA) U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Water Quality Criteria Summary List** . Based on Quality Criteria for Water Denver: EPA Water Quality Office, 1991.

(USEPA) U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Region IX preliminary remediation goals (PRGs) second half 1995**. San Francisco: U.S. Environmental Protection Agency, 1995 a.

(USEPA) U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Region III Risk- Based Concentration Table**. Philadelphia: Environmental Protection Agency, 1995 b.

(USEPA) U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Toxicological review of toluene (CAS No. 108-88-3)**. Washington: USEPA, EPA/635/R-05/004, 2005, 107p.

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

VAN'T HOF, J.; SCHAIRER, L.A. *Tradescantia* assay system for gaseous mutagens: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v.99, p.303-315, 1982.

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

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected

by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 90, p. 42–51, 2008.

VOGEL, E.W. **Assessment of chemically-induced genotoxic events. Prospectives and Limitations**. Leiden, The Netherlands: Universitaire Pers Leiden, vol.2, 1982, 24p.

WALDEN, T.; SPENCE, L. Risk-based BTEX screening criteria for a groundwater irrigation scenario. **Human and Ecological Risk Assessment**, Philadelphia, v.3, n.4, p.699–722, 1997.

WANG, S.; WANG, X. The Tradescantia-micronucleus test on the genotoxicity of UV-B radiation. **Mutation Research**, Amsterdam, v.426, p.151–153, 1999.

WATERS, M. D.; STACK, H. F.; BRADY, A. L.; LOHMAN, P. H. M.; HAROUN, L.; VAINIO, H. Use of computerized data listings and activity profiles of genetic and related effects in the review of 195 compounds. **Mutation Research**, Amsterdam, v.205, p.295-312, 1988.

WHYSNER, J. Benzene-induced genotoxicity, **Journal of Toxicology And Environmental Health**, Washington, v.61, p. 347–351, 2000.

WHYSNER, J.; VIJAYARAJ REDDY, M.; ROSS, P.M.; MOHAN, M.; LAX, E.A. Genotoxicity of benzene and its metabolites. **Mutation Research**, Amsterdam, v.566, p.99–130, 2004.

(WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 52: Toluene**, Geneva: World Health Organization, 1986.

(WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 150: Benzene**, Geneva: World Health Organization, 1993.

(WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 190: Xylenes**, Geneva: World Health Organization, 1997.

(WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Air Quality Guidelines**, Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2000.

YARDLEY-JONES, A.; ANDERSON, D.; LOVELL, D.P.; JENKINSON, P.C. Analysis of chromosomal aberrations in workers exposed to low level benzene. **British Journal of Industrial Medicine**, London, v.47, n.1, p.48-51, 1990.

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

ZUCCO, F.; DE ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v.18, p.153-163, 2004.

Rio Claro, 13 de abril de 2009.

Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo

Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales