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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DE
AMOSTRAS DE ÁGUAS DE RECURSOS HÍDRICOS QUE RECEBEM
EFLUENTES URBANOS E INDUSTRIAIS DO PÓLO CERAMISTA DA
CIDADE DE SANTA GERTRUDES – SP**

RENATA CARITÁ

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

Março - 2010

RENATA CARITÁ

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E
MUTAGÊNICO DE AMOSTRAS DE ÁGUAS DE RECURSOS
HÍDRICOS QUE RECEBEM EFLUENTES URBANOS E
INDUSTRIAIS DO PÓLO CERAMISTA DA CIDADE DE
SANTA GERTRUDES – SP**

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).

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales

Rio Claro
Março/2010

575.1 Caritá, Renata
C277av Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de
amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes
urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa
Gertrudes - SP / Renata Caritá. - Rio Claro : [s.n.], 2010
187 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

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

1. Genética. 2. Mutagênese ambiental. 3. Allium cepa. 4.
Oreochromis niloticus. 5. Teste do micronúcleo. 6. Ensaio do
cometa. 7. Biomonitoramento ambiental. I. Título.

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

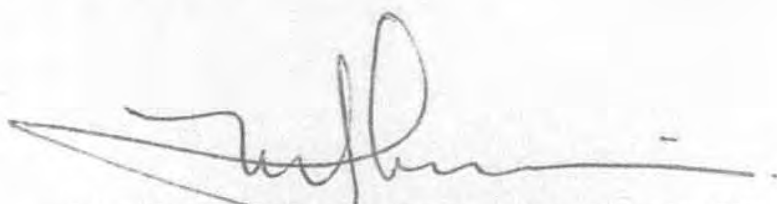
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO defendida em 31.03.2010

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DE
AMOSTRAS DE ÁGUAS DE RECURSOS HÍDRICOS QUE RECEBEM
EFLUENTES URBANOS E INDUSTRIAIS DO PÓLO CERAMISTA DA CIDADE
DE SANTA GERTRUDES - SP”**

RENATA CARITÁ

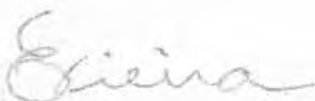
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof.ª. Dr.ª. Maria Aparecida Marin-Morales



Prof.ª. Dr.ª. Silvia Tamie Matsumoto



Prof. Dr. Edson Guilherme Vieira

Pelo amor, dedicação, apoio e confiança,
aos meus amados pais, *Francisco* e
Lourdes, dedico este trabalho.

Ao meu eterno amor, *Vinicius*, por ser
companheiro e amigo, parceiro e confidente,
compreensivo e divertido, por estar presente
em todos os momentos.

*“Há duas formas para viver sua vida:
uma é acreditar que não existe
milagre. A outra é acreditar que todas
as coisas são um milagre”*
(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

À *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro.*

Ao *Departamento de Biologia*, do Instituto de Biociências, em especial a todos os professores e funcionários, por ter fornecido subsídio para que este trabalho pudesse ser realizado e pelos anos de convivência.

Ao *Laboratório de Mutagênese* por fornecer toda a estrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa e aprimoramento de meus conhecimentos.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP*, pela bolsa concedida (Proc. 08/52388) e a confiança no projeto.

Ao *CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)* pela bolsa concedida nos quatro primeiros meses de trabalho.

Ao *Centro de Estudos Ambientais – CEA*, pela disponibilização dos equipamentos necessários para a realização das análises físico-químicas, em especial, às técnicas *Eleni* e *Francisca* pelo acompanhamento nos experimentos.

Aos *professores do Programa de Pós-Graduação*, área de Biologia Celular e Molecular, por terem contribuído para minha formação.

À minha orientadora, *Prof. Dra. Maria Aparecida Marin Morales*, por todos os ensinamentos, correções, exemplos e orientação.

À *Profa. Dra. Dejanira Franceschi de Angelis* pelo auxílio e confiança nos nossos projetos.

À *Cristiane M. Mileo*, pelo auxílio nos esquemas e mapas e pela amizade. E à *Lucila, Neuzinha* e *Nega* por toda ajuda e bons momentos de descontração.

Aos técnicos de laboratório *Sandra, Gerson* e *Anderson*, por todo auxílio.

Meus agradecimentos à Prefeitura Municipal de Santa Gertrudes, na pessoa da *Sra. Karina Roberta Gobi* do Departamento de Água e Esgoto, pela autorização das coletas de águas e todo apoio prestado.

Ao *Sr. Waldomiro Silva Prado* por autorizar a realização das coletas na propriedade que administra.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente a *Deus*, por me encher de graças todos os dias, ser meu guia, meu alimento, minha fortaleza. *E eis que Ele faz novas todas as coisas.*

Ao meu amado pai, *Francisco*, por ser um exemplo de caráter, pelos ensinamentos e sabedoria, pelo apoio e confiança, pelos cuidados e amor dedicados incondicionalmente a mim, por sempre me encher de beijos e por ter me ensinado os verdadeiros valores da vida.

À minha amada mãe, *Lourdes*, por estar sempre pronta a ajudar, por me mostrar como ser forte, paciente e bondosa, por me ensinar a ter fé, pela paciência e dedicação, por ser doce e amiga, por me escutar sempre, por estar sempre presente em todos os meus passos.

Na imensidão do Universo, é um presente dividir o mesmo espaço e tempo com vocês!

Aos meus padrinhos, *tio Dé* e *tia Neia*, por sempre me ajudarem a ter tudo o que conquistei, pela paciência com minhas ausências, por me guiar no caminho de Deus.

À toda a minha família: tios (*Tião* e *Dora*, *Dirceu* e *Rose*, *Tonhão*, *Neu*, *Gusto*, e *Zé* - saudades), meus primos (*Lú* Lemão, *Frango* (Vitor), *Deda* e *Tim*, *Vita* e *Zé*, *Bel* e *Marcelo*, *Rô* e *Dane*, *Tatô*), meus priminhos (*Lê*, *Bruno*, *Rafa* e *Má*) e meus sobrinhos de coração (*Gabi*, *Bi*, *Nike*, *Vi* e *Dú*), pelos momentos de bom humor e descontração e por, simplesmente, fazerem parte da minha vida.

Ao meu eterno namorado, *Vinicius*, pela companhia e indispensável ajuda nas coletas (eu confesso, sem ele esse trabalho seria quase impossível... afinal não é nada fácil coletar 50 litros de água poluída e mal cheirosa por ponto) e, também, pela paciência em suportar meus desesperos, por me levar para tomar sorvetes no auge da minha ansiedade, por me fazer amar os cavalos, pelas mensagens e surpresas nos mais inesperados momentos, pelas conversas e duras, por me fazer rir, por estar ao meu lado. *E por simplesmente me escolher pra juntos construirmos nossa história.*

Às avós de coração *Dida* e *Cida* pelo exemplo de vida e por todo o carinho.

Aos queridos Sogrão (*Gú*), Sogrona (*Lú*), cunhado *Guguinha*, titia *Rô* (risos) e todos os integrantes dessa minha nova família, baladeira e animada, por terem me proporcionado ótimos momentos de descontração.

Às minhas amigas *Lari Benites*, *Talissa*, *Dânia*, *Camila (Bid)*, *Naty Ortolani*, *Nat Basso* e *Marília* pela amizade sincera e gratuita, por todo o carinho.

Ao querido amigo, *Yves (Vico)* por ser exemplo de força e superação.

Aos amigos *Bruniko (Preto)* e *Nat*, *Pil* e *Irmã*, *Dú* (Henrique) e *Aninha*, *Porco* (Júlio) e *Michelli*, *Binho*, *Carol* e *Diego*, *Murilo* e *Paty*, *Marquinhos* e *Bruna*, *João*

Paulo, Yuri, Thi, Baketa, Testê, Beiço, enfim... pelos xurras, festas e eventos sempre tão animados e divertidos.

À *Thiellen, Lidia, Binho e Nat* pela amizade e deliciosos momentos de fofoca, e à *família Samuqueira* pela alegria contagiante.

Às minhas queridas amigas *Cíntia Martins e Tabata Vidal*, pelas conversas, pelas dicas fundamentais, por sermos inseparáveis, pela confiança e correspondência, pela verdadeira amizade.

À *Marin*, minha orientadora, pelos mais de sete anos de convivência, pela paciência e confiança, por ter me ensinado muito do que sei, pelas oportunidades, pelos conselhos e amizade, por estar sempre de portas abertas, por respeitar meu modo de ser e por sempre encarar até mesmo os sufocos com bom humor.

À *Carmem*, pela amizade e alegria, por rir deliciosamente todas as manhãs trazendo uma vibração contagiante “para nossa ida pro tronco”.

Aos companheiros: *Rei, Thi, Si, e Mari* pelos divertidos momentos de trabalho.

Aos mutantes, por fazer do laboratório um ambiente gostoso para trabalhar, por ser um grupo com um espírito de cooperação e amizade. Acredito que mais do que colegas de trabalho, fizemos muitas amizades verdadeiras:

Bárbara, por ser minha dupla de bagunça, por me permitir paparicar o Fredinho, pelas sempre preciosas explicações de aulas;

Bruna, pelas conversas, companheirismo e ajuda;

Cintya, por ser sempre tão doce, paciente e pronta, por ser uma *Flor*;

Cris/Nádia: pelas divertidas descontrações no laboratório, pelas lutas com os peixes;

Dânia, minha comadre, por estar sempre presente, pelas dicas, conselhos e ajuda;

Dani, por ser engraçada e excelente companhia para os passeios de fim de semana;

Gui, por fazer meu dia mais feliz (risos);

Jana, por ser divertida;

Jaque, pelas conversas e conselhos;

Lívia, por me mostrar que eu sou normal (risos), por ser divertida;

Márcia, pela deliciosa risada e por sempre me ajudar e dar ótimas dicas;

Matheus, pelas inúmeras pentelhações e brincadeiras, pela paciência, por ser tão previsível e me chamar de louca sempre, por ser meu amigo famoso (o Garoto Natura);

Nádia/Cris pelos bons e divertidos momentos com os peixes, pela companhia;

Raquel : por me mostrar que devo ser quietinha (risos);

Tati, pelas conversas e bons momentos;

Thaís, por sempre estar pronta a me ajudar com os artigos, fotos e cometa, pelas gargalhadas sempre tão animadoras, pela paciência em ainda ser minha eterna companheira de trabalho;

Sandroca pelas conversas e alegria.

A todos vocês, muito obrigada por terem ajudado direta ou indiretamente na construção desta dissertação e, principalmente, por fazerem parte da minha vida.

RESUMO

A mutagenicidade é um efeito tóxico que danifica o material genético da célula, causando alterações no DNA ou no cromossomo. Existem inúmeras substâncias presentes em complexos de efluentes domésticos e industriais que podem causar sérios prejuízos no material genético. Testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para estudos de monitoramento, que tem por finalidade avaliar a extensão da poluição ambiental e as reações dos organismos vivos frente a esta poluição. Águas que recebem descargas de diferentes fontes poluidoras, como efluentes industriais e urbanos, na sua maioria, são impactadas por misturas complexas compostas de químicos diversos. O córrego Santa Gertrudes e rios associados recebem efluentes industriais, de uma série de indústrias cerâmicas, e domésticos do município de Santa Gertrudes, SP. Os efluentes cerâmicos possuem efeito tóxico, sobretudo devido à presença de metais resultantes do processo de esmaltação dos revestimentos cerâmicos. As espécies *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* têm se mostrado bastante eficiente na avaliação da genotoxicidade ambiental. Neste trabalho foi avaliada a qualidade da água dos córregos Santa Gertrudes, Caju, Itaqui e do ribeirão Claro, por meio de testes desenvolvidos com estes bioindicadores. Pelos resultados obtidos, pudemos observar que os compostos presentes nas águas destes rios apresentam potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico para os dois organismos-teste. O teste com bulbos de *A. cepa* mostrou uma inibição no desenvolvimento das raízes, devido às substâncias tóxicas presente em águas coletadas após o despejo de efluentes. As amostras dos pontos correspondentes ao local de emissão de efluentes também induziram elevados índices de AC e MN em células meristemáticas de *A. cepa*, para todas as coletas realizadas. O ponto de coleta localizado após a confluência do córrego Santa Gertrudes com o ribeirão Claro apresentou um aumento nos índices de alterações, sobretudo para as coletas de agosto e novembro de 2008, indicando um possível sinergismo das substâncias presentes em cada um destes rios, principalmente observado nos meses de menores registros de chuva. Foi verificada, também, nas células da região F₁ uma fixação dos danos induzidos nas células meristemáticas, comprovado pelos altos índices de MN. As águas destes pontos também induziram MN e danos no DNA em *O. niloticus*, indicando a potencialidade genotóxica e mutagênica dessas amostras. Os resultados deste estudo alertam para

os riscos que os despejos de efluentes domésticos e industriais caracterizam para os corpos hídricos, principalmente pela complexa constituição química que apresentam.

Palavras-chave: mutagenicidade. genotoxicidade. teste do micronúcleo. ensaio do cometa. *Allium cepa*. *Oreochromis niloticus*. monitoramento ambiental.

ABSTRACT

Mutagenicity is a toxic effect that damages the genetic material of the cell, causing alterations in either the DNA or the chromosome. There are several substances present in complexes of domestic and industrial effluents that may cause serious damage to the genetic material. Biological tests of toxicity and genotoxicity are essential for monitoring studies, which aims at assessing the extension of the environmental pollution and the reaction of the living organisms to this pollution. Waters that receive discharges from different sources of pollution, such as urban and industrial effluents, are mostly impacted by complex mixtures composed by several chemicals. Santa Gertrudes stream and associated rivers receive domestic effluents from the municipality of Santa Gertrudes (SP, Brazil) and industrial effluents from several ceramic industries. The ceramic effluents have toxic effects mainly due to the presence of metals resulting from the enameling process of ceramic coating. *Allium cepa* and *Oreochromis niloticus* species are very efficient in evaluating environmental genotoxicity resulting from pollution. In this study, the quality of the water of the Santa Gertrudes, Caju, Itaqui and Claro streams was assessed by tests developed with these bioindicators. Based on the results, we could observe that the compounds present in the waters are potencialy toxic, cytotoxic, genotoxic and mutagenic to both test organisms. The tests with bulbs of *A. cepa* showed an inhibition in root development due to the toxic substances present in the waters collected after the discharge of the effluents. Likewise, the samples from the effluent emission sites induced high indices of CA and MN in meristematic cells of *A. cepa* for all the collections made. The collection site located after the confluence of the Santa Gertrudes and Claro streams presented an increase in the alteration indices, especially for the August and November 2008 collections, indicating a possible synergism of the substances present in each one of these rivers, mainly observed in the months of lowest records of rainfall. A fixation of the damages induced in the meristematic cells was also verified in the cells of the F₁ region, which was proved by the high MN

indices found. For these sites, the induction of MN and DNA damages of *O. niloticus* was also observed, indicating a genotoxic and mutagenic potential of these samples. The results of this study are a warning for the risks that domestic and industrial effluent discharges may cause to water resources, mainly due to their complex chemical constitution.

Key-words: mutagenicity. genotoxicity. micronucleus test. comet assay. *Allium cepa*. *Oreochromis niloticus*. environmental monitoring.

LISTA DE ABREVIACÕES

AC	Aberrações Cromossômicas
Al	Alumínio
As	Arsênico
Ba	Bário
Be	Berílio
Ca	Cálcio
CdCl₂	Cloreto de cádmio
CN	Controle Negativo
Cd	Cádmio
ClO₂	Dióxido de cloro
Co	Cobalto
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	Controle Positivo
CPF	Chlorpirifo
Cr	Cromo
Cu	Cobre
CuSO₄	Sulfato de cobre
DBO₅	Demanda Bioquímica de Oxigênio após 5 dias de exposição
DMSO	Dimetilsulfóxido
DWSF	Solução Fracionada de Diesel e Água (Diesel Water Soluble Fraction)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> ou ácido etilenodiamino tetra-acético
Fe	Ferro
HCl	Ácido Clorídrico
Hg	Mercúrio
HgCl₂	Cloreto de Mercúrio
HMA	Hidrocarboneto monoaromático
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
IM	Índice Mitótico
MeHg	Metilmercúrio

Mg	Magnésio
MMS	Metilmetano sulfonato
Mn	Manganês
MN	Micronúcleo
Mo	Molibdênio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaClO	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
Ni	Níquel
NH₃	Amônia
NOQ	4-nitro-1-óxido-quinoline
NPE	Nonilfenol etoxilato
NP	4-nonylphenol
OD	Oxigênio Dissolvido
Pb	Chumbo
Pb(NO₃)₂	Nitrato de chumbo
PCB	Bifenila policlorada
pH	Potencial Hidrogeniônico
Sb	Antimônio
Se	Selênio
Sr	Estrôncio
STD	Sólidos Totais Dissolvidos
TBT	Tributiltin
TC	Tratamento Contínuo
Ti	Titânio
U	Urânio
VM 2	Valor máximo estabelecido para corpos d'água de Classe 2
VM 3	Valor máximo estabelecido para corpos d'água de Classe 3
Zn	Zinco

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2. OBJETIVOS.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1. Estudos de biomonitoramento e qualidade da água.....	22
3.2. Contaminação aquática por metais pesados.....	23
3.3. Mutagênese ambiental.....	27
3.4. Utilização do sistema-teste de <i>Allium cepa</i> para monitoramento ambiental.....	30
3.4.1. Teste de raízes de cebola para avaliação da toxicidade ambiental.....	32
3.4.2. Teste de aberrações cromossômicas.....	33
3.5. O uso de <i>Oreochromis niloticus</i> como organismo teste.....	34
3.6. Teste do micronúcleo.....	36
3.7. Ensaio do cometa.....	38
3.8. Área de estudo.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. Material.....	41
4.2. Métodos.....	41
4.2.1. Bioensaios de toxicidade com bulbos de <i>Allium cepa</i>	41
4.2.2. Bioensaios com sementes de <i>Allium cepa</i>	42
4.2.2.a. Forma de análise dos resultados.....	43
4.2.3. Bioensaios com <i>Oreochromis niloticus</i>	44
4.2.3.a. Teste do micronúcleo.....	44
4.2.3.b. Ensaio do cometa.....	46

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Determinação de parâmetros físico-químicos das amostras de águas coletadas.....	47
5.2. Teste de raízes de cebola para avaliação de toxicidade ambiental.....	52
5.3. Artigo 1: O uso do teste do micronúcleo e do ensaio de cometa em peixes em avaliações da contaminação de ambientes dulcícolas	65
5.4. Artigo 2: Efeito genotóxico e mutagênico de amostras de águas coletadas em rios que recebem efluentes urbanos e industriais de um pólo ceramista, por meio do sistema-teste <i>Allium cepa</i>	111
5.5. Artigo 3: Efeitos genotóxicos e mutagênicos de amostras de águas de rios que recebem efluentes urbanos e de indústrias cerâmicas, utilizando o organismo-teste <i>Oreochromis niloticus</i>	140
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	166
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	168

1. INTRODUÇÃO GERAL

O aumento da descarga de químicos no ambiente tem afetado o equilíbrio dos ecossistemas e, conseqüentemente, tem chamado a atenção de diversos pesquisadores e agências governamentais quanto aos perigos que essas substâncias podem caracterizar para a saúde dos organismos vivos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Muitos problemas de saúde humana, incluindo alguns tipos de câncer, vêm sendo atribuídos à presença de diversos contaminantes no meio ambiente (FATIMA; AHMAD, 2006).

Diversas substâncias químicas apresentam afinidade de ligação com o material genético de organismos vivos, promovendo alterações ou danos na fita de DNA, sendo chamados de agentes genotóxicos ou mutagênicos (BOER; HOEIJMAKERS, 2000). O termo genotoxicidade é usado para caracterizar diversos efeitos de um agente sobre o DNA, como a formação de adutos de DNA, lesões na fita de DNA, síntese de DNA não programada e trocas entre cromátides irmãs, enquanto que mutagenicidade é caracterizada pela indução de mutação no nível gênico ou cromossômico. É considerado que efeitos genotóxicos podem ser transitórios, por serem passíveis de reparo, e que os efeitos mutagênicos são persistentes, se caracterizando em uma alteração permanente no conteúdo ou na estrutura do material genético de um organismo (DEARFIELD et al., 2002).

Amostras ambientais, na sua maioria, são misturas complexas por serem compostas por diversos contaminantes derivados de atividades antropogênicas diferentes (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Estas misturas interagem entre si tornando-se, por sinergismo, muitas vezes mais tóxicas do que cada um dos seus componentes. Para avaliar os efeitos de misturas complexas, têm sido aplicados testes de toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade com microorganismos,

plantas, peixes e células de mamíferos, em combinação com análises químicas (SMAKA-KINCL et al., 1996; OHE et al., 2003; CHRISTOFOLETTI, 2009; ZEGURA et al., 2009).

O despejo de efluentes domésticos da cidade de Santa Gertrudes sem tratamento prévio e o despejo de efluentes industriais, sobretudo de inúmeras indústrias cerâmicas, são as principais fontes poluidoras dos recursos hídricos da região de Santa Gertrudes, SP (RUSSO, 1997). Estes efluentes industriais possuem substâncias que podem causar danos aos organismos da biota associada, como os corantes usados na esmaltação cerâmica, que contêm óxidos de Al, Co, Zr, Si, Cr, Zn, Ni, Ca e Sn; os esmaltes, que contêm SiO_2 , B_2O_3 , Na_2O e PbO ; as resinas sintéticas, que contêm compostos orgânicos; e as tintas, que contêm Pb, Ca, Si, Al, Fe, Cr e Mn; além de haver também sólidos finos em suspensão, como argilas, restos de fritas e silicatos (BERNARDIN, 2006).

Os organismos-teste são agentes biológicos usados em testes genéticos e para o monitoramento da poluição ambiental, pois agem como receptores biológicos diretos dos químicos presentes no ambiente (FERNANDES et al., 2009). Cardozo et al. (2006) observaram, pelo ensaio com *Salmonella* e testes de micronúcleos em células V79, que amostras de águas coletadas em rios contaminados por compostos orgânicos apresentaram potencial mutagênico. Quando os autores realizaram ensaios isolados, com cada um dos compostos químicos presentes nas águas, observaram que os resultados foram negativos, de modo que a mutagenicidade da água foi atribuída à ação conjunta dos compostos nela presentes.

Para uma melhor avaliação de amostras ambientais, que geralmente são caracterizadas por misturas complexas, há a necessidade de realização de análises mais diversificadas, para que se possa estimar, mais eficientemente e rapidamente, uma agressão e, assim, permitir ações eficazes para evitar danos maiores que esta agressão possa promover no ambiente (WHO, 2001). Vem sendo cada vez mais usadas as análises feitas com bioindicadores, para avaliação de comprometimento ambiental, pela eficiência que estes organismos apresentam em discriminar variações decorrentes de estresses antrópicos dos efeitos decorrentes de oscilações naturais (MARKET, 2007).

As plantas superiores apresentam características que as tornam excelentes modelos genéticos para a avaliação de poluentes ambientais, sendo freqüentemente utilizadas em estudos de monitoramento (SHARMA; PANNEER-SELVAN, 1990;

LEME; MARIN-MORALES, 2009). Esta característica não é devida, apenas, a alta sensibilidade em detectar agentes mutagênicos em diferentes ambientes, mas também pela possibilidade que oferecem de avaliar diversos *endpoints*, que vão desde mutações de ponto até aberrações cromossômicas (AC), em células de diferentes órgãos e tecidos, como raízes e pólen (GRANT, 1994).

Dentre as espécies vegetais, *Allium cepa* tem sido amplamente utilizada para a avaliação de danos cromossômicos e distúrbios no ciclo mitótico, devido às boas condições de análise de seus cromossomos, como, por exemplo, seu tamanho grande e em número reduzido (FISKESJÖ, 1985), além de uma alta sensibilidade em detectar químicos ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2009). As alterações cromossômicas podem ser observadas em todas as fases do ciclo celular e são consideradas evidências de efeito mutagênico induzido por agentes clastogênicos ou aneugênicos (VIDAKOVIĆ-CIFREK et al., 2002, LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Vem sendo desenvolvidos diversos testes com *Allium cepa*, dentre eles os de toxicidade (FISKESJÖ, 1985; PALACIO et al., 2005; BARBERIO et al., 2009; GUERRA, 2009), de genotoxicidade e mutagenicidade (FISKESJÖ, 1985; RANK; NIELSEN, 1994; FATIMA; AHMAD, 2006; MIGID et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; GANA et al., 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; VUJOŠEVIĆ et al., 2008; HOSHINA et al., 2009; RADIC et al., 2010). Células meristemáticas de *A. cepa* são indicadas para a determinação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de diferentes substâncias (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; MAZZEO, 2009; ROBERTO, 2009), caracterizando-se um material indicado para análises de poluição de recursos hídricos pela sensibilidade na avaliação da qualidade da água (SMAKA-KINCL et al., 1996, RADIC et al., 2010).

Os peixes são considerados bons organismos-teste para estudos de monitoramento da qualidade das águas (HARSHBARGER; CLARK, 1990). Muitas espécies de peixes são indicadas para este fim, ampliando as possibilidades de estudo, por estarem amplamente distribuídas geograficamente, além de serem altamente sensíveis às mudanças ambientais (RODRIGUEZ-CEA et al., 2003).

Oreochromis niloticus é uma espécie que responde, rapidamente, às alterações ambientais (VIJAVAN et al., 1996), por isso, é usada em biomonitoramentos por diversos pesquisadores (MANNA, 1986; GRISOLIA;

CORDEIRO, 2000; GRISOLIA; STARLING, 2001; ÇAVAS; GÖZÜKARA, 2003; ÇAVAS; GÖZÜKARA, 2005; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006; HOSHINA et al., 2008; KÖNEN; ÇAVAS, 2008; VENTURA et al., 2008; GRISOLIA et al., 2009; KHAW et al., 2009; ROCHA et al., 2009).

2. OBJETIVOS

Pelo exposto acima, existe uma real necessidade de estabelecer metodologias que possam alertar sobre os impactos sofridos pelos ecossistemas e, conseqüentemente, pelos seres vivos. Pela necessidade de se avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de águas que recebem efluentes urbanos e industriais, há também uma eminente necessidade de avaliação dos recursos hídricos das imediações da cidade de Santa Gertrudes, por ser esta uma região com o mais importante pólo ceramista do país. Como toda indústria, as cerâmicas também lançam resíduos no ambiente, e por isso devem ser avaliados, quanto aos seus efeitos sobre os organismos expostos. Este trabalho teve como objetivo:

- Avaliar, por meio de análises químicas, as concentrações de metais e/ou outras substâncias tóxicas presentes nas águas dos recursos hídricos da região de Santa Gertrudes, após emissão de efluentes industriais e urbanos;
- Analisar o potencial tóxico das amostras de água coletadas nos recursos hídricos da região, por meio do teste de alterações do desenvolvimento de raízes em bulbos de *Allium cepa*;
- Investigar o potencial citotóxico (análise do índice mitótico e morte celular), genotóxico (teste de aberrações cromossômicas) e mutagênico (teste do micronúcleo) de amostras de águas de diversos pontos ao longo do curso do córrego Santa Gertrudes, do córrego Itaqui, do córrego do Cajú e de pontos do Ribeirão Claro, caracterizados como área de influência de atividade ceramista, em células meristemáticas do organismo-teste (*Allium cepa*);
- Investigar a potencialidade mutagênica (teste do micronúcleo) de amostras de águas de diversos pontos ao longo do curso do córrego Santa Gertrudes, do

córrego Itaqui, córrego do Caju e de pontos do Ribeirão Claro sob células F_1 do organismo-teste *Allium cepa*;

- Determinar a potencialidade dessas águas em induzir a formação de micronúcleos em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*;
- Analisar os danos no DNA, por meio do teste do cometa em *Oreochromis niloticus*;
- Avaliar os efeitos sinérgicos das substâncias presentes nos efluentes despejados ao longo destes recursos hídricos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Estudos de biomonitoramento e qualidade da água

A água é um dos fatores essenciais para a manutenção das funções vitais dos organismos vivos e pelo aumento populacional crescente tem, cada vez mais, seu consumo aumentado. Desta forma, tem sido encorajado o uso racional deste recurso, com o intuito de conservar a qualidade dessas águas, uma vez que já é sabido que se trata de um recurso mineral finito (BIAGINI et al., 2009).

No Brasil, a qualidade da água é regulamentada desde 17 de março de 2005 (Resolução n.357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA) (BRASIL, 2005). Esta regulamentação classifica as águas e determina os parâmetros físicos e químicos toleráveis, buscando o controle da disposição de poluentes no meio ambiente em níveis que não ofereçam riscos aos organismos (BARBERIO et al., 2009). Contudo, há uma preocupação sobre a precisão dos níveis de tolerância estabelecidos, uma vez que alguns estudos têm mostrado que para alguns parâmetros, como efeitos genotóxicos, têm sido observados efeitos significativos, mesmo quando os valores da contaminação são inferiores aos permitidos (MATSUMOTO et al., 2006).

O córrego Santa Gertrudes, córrego Itaqui e córrego do Caju são corpos d'água da bacia do Piracicaba, considerados de Classe 2 (CETESB, 2009). Nesta classificação se enquadram as águas destinadas ao consumo humano, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário; à irrigação de hortaliças e plantas frutíferas e de parques; à aquicultura e atividade de pesca (BRASIL, 2005). O ribeirão Claro, a jusante da captação de água para o abastecimento da cidade de Rio Claro, até a confluência com o córrego Santa Gertrudes, enquadra-se como recurso hídrico superficial de

classe 3, caracterizados por águas destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional, à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras e à dessedentação de animais (CETESB, 2009). Estes corpos d'água, dentre outros critérios de qualidade das águas estabelecidos pelo Artigo 16 da resolução 357/05 do CONAMA, não devem apresentar materiais flutuantes, incluindo espumas não naturais.

A poluição dos recursos hídricos é um problema mundial (VARGAS et al., 2001; VIGANÒ et al., 2002; OHE et al., 2003; MONTE EGITO et al., 2007; MATSUMOTO et al., 2006; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; ROCHA et al., 2009; HOSHINA et al., 2009; ZADIC et al., 2010). A contaminação aquática por despejos industriais e domésticos é, atualmente, uma grande preocupação para a saúde pública (MARIA et al., 2003), sobretudo devido as misturas complexas presentes nos efluentes que são lançados nas águas superficiais destinadas ao consumo humano (MUMTAZ, 1995; DEWHURST et al., 2002). Estas misturas tóxicas podem conter metais pesados, agrotóxicos e outras substâncias que, juntas, podem agravar as condições ambientais e, conseqüentemente, afetar todos os organismos aquáticos (HOSHINA et al., 2009).

Estudos de monitoramento ambiental são utilizados em todo o mundo e trazem informações relevantes quanto à qualidade das águas dos recursos hídricos. Como exemplo, pode-se citar os estudos realizados com os rios Pó, Ticino e Lambro (Itália) (VIGANÒ et al., 2002), o rio Noyyal (Índia) (RAJAGURU et al., 2003), o rio Paraíba do Sul (Brasil) (SOUZA; FONTANETTI, 2006), o rio Guaecá (Brasil) (LEME et al., 2008), o rio Rasina (Sérvia) (VUJOŠEVIĆ et al., 2008), o rio Atibaia (Brasil) (HOSHINA et al., 2009); o Rio Tietê (Brasil) (ROCHA et al., 2009), o rio Sava (Croácia) (RADIC et al., 2010), o córrego dos Cristais (Brasil) (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008), as lagoas da Turquia (Akgol e Paradeniz do Delta Goksu) (ERGENCE et al., 2007), o Estuário Sado (Portugal) (COSTA et al., 2008) e águas do mar próximas à Estação Brasileira Comandante Ferraz na Antártida (NGAN et al., 2007).

3.2. Contaminação aquática por metais pesados

Os metais estão intimamente relacionados com a manutenção da vida, uma vez que muitos deles participam de uma série de processos fisiológicos. Contudo, se

estes mesmos metais estiverem em excesso, eles podem alterar as atividades vitais dos organismos (PATRA et al., 2004).

Nas últimas décadas, a contaminação ambiental por metais pesados tem aumentado muito, principalmente com o desenvolvimento da indústria moderna (STEINKELLNER et al., 1998; MARCANO et al., 2002), além de serem também eliminados por atividades de contaminações agrícolas e urbanas (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004).

Um dos efeitos mais sérios da contaminação ambiental por metais pesados é a bioacumulação dos poluentes nos organismos vivos. Animais e plantas podem concentrar os metais em níveis extremamente superiores aos encontrados no ambiente, possibilitando o transporte dos contaminantes para diversos níveis da cadeia alimentar (PAPAGIANNIS et al., 2004).

Os metais pesados caracterizam uma classe de poluentes com ação mutagênica (CHRISTOFOLETTI, 2008), genotóxica e citotóxica. Segundo Fiskesjö (1983) e Minissi e Lombi (1997), os efeitos genotóxicos dos metais sobre as plantas podem ser avaliados pela indução de alterações na estrutura e no número cromossômico e também por distúrbios no aparato mitótico.

Estudos realizados com tilápias do Nilo (*O. niloticus*) mostraram que os metais podem se acumular nos tecidos destes organismos, sobretudo nas brânquias, fígado e músculos (BIRUNGI et al., 2007; YILMAZ et al., 2007), sendo que o cobre, o zinco, o cromo e o manganês são os metais que mais se acumulam nos tecidos desta espécie (BIRUNGI et al., 2007). A acumulação de metais pesados, em diferentes espécies de peixes, depende dos hábitos alimentares (AMUNDSEN et al., 1997; ROMEOA et al., 1999; PORTO et al., 2005), do tamanho e idade dos indivíduos (LINDE et al., 1998; AL-YOUSUF et al., 2000), bem como do habitat da espécie (CANLI; ATLI, 2003).

O alumínio (Al) constitui um dos maiores poluentes dos solos e águas, sendo transferido entre os organismos via trófica, podendo, assim, causar sérios problemas tanto aos ecossistemas como à saúde humana (KREWSKI et al., 2007; ACHARY et al., 2008). Este metal, que chega ao homem pela via alimentar ou pela água, possui ação neurotóxica (PATRA et al., 2000). Em plantas, possui efeito altamente citotóxico (PEJCHAR et al., 2008), agindo no citoesqueleto, de modo a interromper o crescimento das raízes e causar mudanças na morfologia radicular (VOUTSINAS et al., 1997). Ensaios realizados por Achary et al. (2008) demonstraram que o Al, em

doses de 1-200 μ M, causou estresse oxidativo em células de raízes de *Allium cepa*, dados estes posteriormente complementados pelos estudos com as concentrações de 200-800 μ M, onde o Al induziu danos no DNA e morte celular de células de raízes desta planta (ACHARY; PANDA, 2009).

Metais pesados como chumbo (Pb) e cádmio (Cd) diminuem o índice mitótico (IM) e reduzem o número de células em metáfase e anáfase (WIERZBICKA, 1989; SAMARDAKIEWICZ; WOŹNY, 2005; FUSCONI et al., 2006). Adicionalmente, estes metais induzem C-metáfases, aderência cromossômica e pontes cromossômicas (WIERZBICKA, 1988; ZHANG; XIAO, 1998; JIANG; LIU, 2000; SAMARDAKIEWICZ; WOŹNY, 2005).

Foi comprovada a ação do Cd sobre os fusos mitóticos de células meristemáticas de *Allium cepa*, pela alta freqüência observada de anormalidades como metáfases multipolares, atrasos e pontes cromossômicas e distribuição desigual dos cromossomos (FUSCONI et al., 2006). Marcano et al. (2006) e Fusconi et al. (2007) afirmam, ainda, que a interferência na normalidade dos fusos mitóticos pode levar à formação de MN e a inibição do IM, que indicam uma evidência indireta da genotoxicidade do Cd. Além destas alterações, foram observadas, em plantas, quebras cromossômicas e danos no DNA, mostrando o potencial clastogênico deste metal (ZHANG; YANG, 1994; CARDOVA ROSA et al., 2003; SETH et al., 2008).

Além do Cd causar danos aos microtúbulos do fuso mitótico de vegetais superiores, como mostrado acima, este metal também age sobre organismos aquáticos. De acordo com estudos de Almeida et al. (2001), que avaliaram o impacto do Cd sobre tilápias, o metal promove estresse nestes organismos, causando alterações metabólicas, como: diminuição da atividade de algumas enzimas, diminuição da glicólise do tecido muscular; redução das concentrações de proteínas totais no fígado e na musculatura branca desses peixes.

O Pb é um elemento químico que apresenta propriedades tóxicas para os organismos vivos, como, por exemplo, efeitos genotóxicos (GUERRA, 2009), que podem induzir atrasos cromossômicos, núcleos com cromatina mais condensada (SAMARDAKIEWICZ; WOŹNY, 2005) e células binucleadas, em consequência da inibição da citocinese (WIERZBICKA, 1989). Para avaliar danos genéticos promovidos pelo chumbo, Cestari et al. (2004) e Ferraro et al. (2004) ofereceram, como única fonte de alimento a *Hoplias malabaricus*, presas contaminadas com uma

solução de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Essa contaminação dos peixes, via trófica, levou a uma indução de danos genéticos e de MN nas suas células sanguíneas.

Os efeitos do Pb e Cd sobre os microtúbulos já eram conhecidos (WIERZBICKA, 1988; LIU et al., 1994; LIU et al., 2003), mas estudos posteriores mostraram que o cromo (Cr) também afeta o ciclo mitótico (GLIŃSKA et al., 2007) e induz a formação de MN e AC em vegetais superiores como *A. cepa* (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; MATSUMOTO et al., 2006), MN em *Vicia faba*, *Lemna minor* e *Tradescantia* (KNASMÜLLER et al., 1998; STEINKELLNER et al., 1998; SAMARDAKIEWICZ; WOŹNY, 2005).

O cobre (Cu) é considerado um elemento essencial para o bom funcionamento do organismo (SORENSEN, 1991), sendo co-fator de vários sistemas enzimáticos (MAZON, 1999). Entretanto, em elevadas concentrações, este elemento pode ser extremamente tóxico para os organismos. Bulbos de *A. cepa* tratados com sulfato de cobre (CuSO_4), em diferentes concentrações, resultaram em células portadoras de aderência cromossômica, além de promoverem uma diminuição do IM, diretamente proporcional ao aumento das concentrações de CuSO_4 (FISKESJÖ, 1988).

O Cu, quando presente em elevadas concentrações na água, é capaz de intoxicar os organismos aquáticos. A forma iônica deste metal é, geralmente, a mais tóxica (GROSSEL et al., 2002). Uma vez que o alvo deste metal parece ser a homeostase do sódio, intoxicações por Cu leva a uma alteração na absorção de cloretos e na excreção de compostos nitrogenados. Dentre os distúrbios causados aos peixes expostos ao Cu, podemos citar, segundo Roméo et al. (2000), efeitos citotóxicos e genotóxicos em eritrócitos e, segundo Çavas et al. (2005), a formação de MN e outras anormalidades nucleares. No peixe *Carassius auratus gibelio* a exposição ao Cu induziu freqüências de 0,92% de MN nos eritrócitos, enquanto que o Cd 1,75% (ARKHIPCHUK; GARANKO, 2005).

O ferro (Fe) é tido como elemento essencial para todas as formas de vida, uma vez que é um componente chave na manutenção da homeostase celular, sendo utilizado como co-fator de diversas enzimas (PEDROZO; LIMA, 2001). Estudos realizados por Rashed (2001), no lago Nasser (Egito), determinaram a concentração de alguns metais em tecidos de tilápias, inclusive o Fe, com o intuito de avaliar a poluição causada por metais. Foram observados elevados níveis de Fe nos tecidos do estômago de peixes deste ambiente aquático. Segundo os autores, a

contaminação deste recurso hídrico por Fe deve estar relacionada ao aumento das descargas da agricultura nesta região, a qual inclui fertilizantes químicos e biocidas.

O níquel (Ni) é utilizado por muitos organismos nas atividades metabólicas e organização estrutural. É introduzido nos recursos hídricos pela descarga de efluentes domésticos e industriais, mas também pela erosão do solo e de rochas (SAWASDEE; KÖHLER, 2009). Estudos realizados em *A. cepa* e *Vicia faba* expostas a efluentes de curtume contendo Ni e Cr mostraram que estes compostos afetam os aminoácidos e/ou a molécula de DNA, acarretando em um decréscimo dos IM e, conseqüentemente, do crescimento das raízes (CHANDRA, GUPTA, 2002; CHANDRA et al., 2004)

O zinco (Zn) é um metal essencial para os organismos superiores, por ser um importante neurotransmissor (HERSHFINKEL et al., 2007). Porém, quando este metal se encontra em concentrações muito altas ele pode ser perigoso. O íon Zn^{+2} livre em solução é altamente tóxico para plantas, invertebrados e peixes. Um estudo realizado por Muyssen et al. (2006) mostrou que a concentração de $6\mu M$ de Zn^{+2} ocasionou a morte de 93% de *Daphnia magna* adultas expostas a esta solução.

O mercúrio (Hg) é considerado um poluente perigoso para as atividades biológicas, conferindo alto risco ambiental. Estudos conduzidos em plantas e animais de laboratório mostraram que o mercúrio tem a capacidade de inibir a formação do fuso mitótico, levando a uma distribuição anormal dos cromossomos, poliploidias e aneuploidias (PATRA et al., 2004). Esta ação resultaria da forte afinidade do mercúrio pelos grupos sulfidrilas das proteínas do fuso (DE FLORA et al., 1994). Investigações realizadas com bulbos de *A. cepa*, tratados com cloreto de mercúrio ($HgCl_2$), demonstraram, ainda, que este metal foi capaz de produzir uma elevada freqüência de células portadoras de aderências cromossômicas (FISKESJÖ, 1988).

3.3. Mutagênese Ambiental

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 meiose (THIRIOT-QUIÉVREUX, 2002).

Os testes citogenéticos são bastante adequados para a identificação de efeitos perigosos de substâncias sobre organismos vivos, em diferentes

concentrações e em diversos tempos de exposição. Estes testes são também utilizados no biomonitoramento da extensão da poluição e na avaliação dos efeitos de substâncias tóxicas e mutagênicas sobre os organismos, no ambiente natural (MORAES, 2000).

Como o ambiente vem sofrendo severas interferências em decorrência dos resíduos das atividades humanas, é de suma importância a avaliação do comprometimento ambiental, gerado por esta poluição. Muitos testes biológicos vêm sendo desenvolvidos para este fim, sendo que muitos deles têm se mostrado muito eficientes, por serem capazes de estimar as reações dos organismos vivos à contaminação ambiental, além de possibilitar a avaliação dos efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes presentes no meio ambiente (MORAES, 2000; ROOS et al., 2004; FERETTI et al., 2008). Desta forma, segundo Fiskesjö (1985), a escolha de testes adequados, tanto pela eficiência como pela exeqüibilidade, rapidez e fácil reprodução, podem ser úteis para a garantia e manutenção dos ambientes.

O entendimento das propriedades físicas e químicas de um composto genotóxico, bem como os seus efeitos sobre as células, constituem importantes informações para se avaliar o comprometimento hereditário, deletério ou mesmo a potencialidade de ação letal que o produto exerce sobre os organismos expostos (RABELLO-GAY et al., 1991).

A genética toxicológica é uma importante área de pesquisa, que investiga a potencialidade de agentes diversos agirem sobre o material genético dos organismos. É sabido que, embora ocorram mutações espontâneas, a maioria delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais os organismos e, inclusive, o homem podem estar expostos (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004).

A preservação do meio ambiente e a prevenção dos impactos que este meio pode sofrer são preocupações constantes e crescentes no mundo atual. Muitas mudanças ocorridas no material genético podem não acontecer de imediato (VOGEL, 1982), sendo então de difícil observação, o que pode caracterizar um risco futuro para a saúde dos organismos (TAVARES, 1991).

Os efeitos genotóxicos são caracterizados pela capacidade de um agente promover alterações no DNA de uma célula, sendo que estas alterações são ou não passíveis de correção pelo sistema de reparo celular. Quando estas alterações não são devidamente reparadas pelo sistema celular, podem levar a mutações, cujos

efeitos podem ser desde a inviabilidade celular até o desenvolvimento de processos carcinogênicos (FERNANDES, 2005). Atualmente, a genotoxicidade vem sendo avaliada por diversos testes, realizados com vários organismos, e que resultam em informações seguras e precisas, quanto à potencialidade em causar lesão no DNA.

A mutagenicidade é a capacidade de um agente promover um efeito tóxico sobre o material genético de uma célula, causando uma mudança no DNA ou nos cromossomos da mesma. Diferentes substâncias químicas podem ser consideradas mutagênicas e esta mutagenicidade pode ser dada por diversos modos de ação, tais como reação direta com o DNA nuclear; incorporação do DNA durante a replicação celular; interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisão incorreta da célula (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; MATSUMOTO et al., 2006). Os chamados agentes mutagênicos podem, então, acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que podem estar 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 celular, determinando, assim, o aparecimento do câncer (RIBEIRO et al., 2003).

Existem mais de 200 testes de curta duração, utilizando uma ampla variedade de organismos-teste (bactérias, insetos, plantas e animais, tanto em testes *in vitro* como *in vivo*), com a finalidade de avaliar poluentes ambientais potencialmente causadores de danos (VANZELLA, 2006). Na maioria dos testes, a detecção da potencialidade mutagênica de uma substância baseia-se na observação de AC estruturais ou numéricas, formação de MN, trocas entre cromátides-irmãs e avaliação de danos do DNA. Pelas análises, podem-se estabelecer três principais classes de danos: mutagênico, quando as mutações ocorrem no gene (também conhecida como mutação de ponto). Neste caso, ocorrem alterações na sequência do DNA de um determinado gene; clastogênico, referente a alterações na estrutura cromossômica, resultando em ganho, perda ou rearranjo de porções cromossômicas; e aneuploidia, referente ao ganho ou perda de cromossomos intactos (HOUK, 1992).

É de grande importância conhecer os processos mutacionais e os fatores que os produzem, pois isto possibilita administrar e minorar riscos (SILVA et al., 2003), além de servir na identificação e análise de substâncias que são capazes de interagir com o material genético dos organismos (MAZZEO, 2009). Diferentes espécies têm se mostrado eficientes como bioindicadores do comprometimento

ambiental, por serem capazes de detectar, por meio de processos bioquímicos específicos, os efeitos sinérgicos de mistura de contaminantes presentes no ambiente (ROOS et al., 2004; FERETTI et al., 2008).

Resultados provenientes de bioensaios podem ser extrapolados para outros organismos, já que o alvo toxicológico é o DNA, molécula presente em todas as formas celulares vivas. Segundo Houk (1992), compostos que se mostram reativos com o DNA de uma espécie podem produzir efeitos semelhantes em outras espécies e perturbações no material genético podem causar efeitos deletérios severos e irreversíveis aos organismos.

3.4. Utilização do sistema-teste de *Allium cepa* para monitoramento ambiental

Vegetais superiores constituem um importante material para testes genéticos usados para monitoramento de poluentes, sendo, atualmente, reconhecidos como bons indicadores de efeitos citogenéticos e mutagênicos de substâncias químicas ambientais (GRANT, 1982; YI; MENG, 2003).

Os sistemas-teste de plantas podem detectar a genotoxicidade mais rápida e eficientemente do que ensaios com animais, são mais simples e econômicos, podem ser utilizados com sucesso em biomonitoramento ambiental (YI; MENG, 2003; BEZRUKOV; LAZARENKO, 2002) e são considerados bons indicadores de efeitos tóxicos, pois respondem com uma alta sensibilidade produzindo poucos resultados falso-positivos (GRANT, 1994). Estes organismos respondem às alterações ambientais, exibindo altas frequências de células portadoras de aberrações que, freqüentemente, estão associadas a instabilidades genéticas, decorrentes de exposição a condições desfavoráveis (BEZRUKOV; LAZARENKO, 2002).

As células de meristemas radiculares de plantas constituem eficientes materiais para a detecção de clastogenicidade de poluentes ambientais, especialmente para monitoramento *in situ* de contaminantes da água, sendo que, dentre os parâmetros microscópicos, a formação de MN é o mais eficiente. (MA et al., 1995). Dentre as espécies vegetais, a espécie *Allium cepa* tem sido, freqüentemente, utilizada na avaliação dos efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico de várias substâncias (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985; MATSUMOTO et al., 2006; LEME; MARIN-MORALES, 2009), 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; NIELSEN, 1998; PATRA; SHARMA, 2002; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; FERNANDES et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009), além de serem facilmente corados e observados (KURÁS et al., 2006).

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 avaliações de poluentes ambientais. Muitos *endpoints* podem ser monitorados por meio das análises destas células, tais como indução de AC e cromatídicas, troca entre cromátides irmãs, alterações no índice mitótico e formação de MN (MIGID et al., 2007).

Testes com *A. cepa* são comumente usados e bastante adequados por oferecer parâmetros microscópicos como aderências cromossômicas, pontes e fragmentações cromossômicas, anáfases prematuras, C-metáfases, que são eventos indicadores indiretos de mutagenicidade, além de quebras cromossômicas e formação de MN, que são indicadores diretos de alterações no conteúdo genético das células (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008). Estes testes são usualmente utilizados para monitoramento dos potenciais efeitos sinérgicos de misturas de poluentes, incluindo metais pesados e químicos hidrofílicos e lipofílicos (FISKESJÖ, 1985; GROVER; KAUR, 1999; RANK et al., 2002; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; RADIC et al., 2010).

A espécie *A. cepa* constitui um dos mais antigos sistemas para análise de AC (NILAN, 1978). Seu uso foi introduzido por Levan (1938), ao demonstrar alterações no fuso mitótico pela colchicina e a indução de alterações cromossômicas por diferentes soluções de sais orgânicos (LEVAN, 1945). Deste então, inúmeros trabalhos vêm sendo realizados para a avaliação de contaminações ambientais (COTELLE et al., 1999; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; GRISOLIA et al., 2005; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA et al., 2009).

Para Grant (1982), *A. cepa* é um eficiente sistema-teste, rotineiramente, utilizado para analisar o potencial genotóxico de químicos ambientais, devido a sua sensibilidade e boa correlação com sistemas-teste de mamíferos. A sensibilidade do

teste de mutagenicidade com *Allium* foi calculada, por Rank e Nielsen (1993), como sendo superior em 82% aos resultados obtidos com roedores.

Estudos realizados por Caritá e Marin Morales (2008), também mostram uma eficiência do teste de *A. cepa* na avaliação de contaminantes de recursos hídricos. Os autores apontaram a presença de substâncias tóxicas com a potencialidade de induzir efeitos clastogênicos e aneugênicos, como quebras e perdas cromossômicas, em águas que receberam efluentes industriais, especificamente de indústria têxtil (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008). Outros estudos mostraram que ensaios de AC na anáfase e telófase tem se mostrado um teste de genotoxicidade de alta confiabilidade (SMAKA-KINCL et al., 1996; NATARAJAN, 2002; KONUK et al., 2007; LEME et al., 2008; YILDIZ; ARIKAN, 2008; HOSHINA et al., 2009).

3.4.1. Teste de raízes de cebola para avaliação da toxicidade ambiental

Testes de toxicidade são ensaios empregados para a avaliação de efeitos de compostos químicos sobre os organismos vivos. Estes testes são realizados sob condições padronizadas e reprodutíveis e estabelecem limites de concentração ou quantidade de substâncias químicas aceitáveis no ambiente (RAND; PETROCELLI, 1985). Os organismos vivos utilizados nos testes de toxicidade funcionam como “biosensores”, que respondem à presença de contaminantes (ESPÍNOLA et al., 2003). Desta forma, testes de toxicidade representam uma ferramenta para avaliações dos efeitos de agentes tóxicos sobre organismos vivos, fundamentando-se no princípio da resposta dos organismos, frente à dose do tóxico a que foram submetidos (JARDIM, 2004).

Inúmeros testes toxicológicos são utilizados para avaliar as concentrações e o tempo de exposição necessário para que os agentes tóxicos possam produzir efeitos adversos sobre os organismos (GUERRA, 2009). Dentre estes testes, o cultivo direto de bulbos, em soluções preparadas com químicos diversos ou em amostras de águas naturais contaminadas, caracteriza-se em um interessante teste de toxicidade, pois permite avaliar os efeitos tóxicos de compostos químicos e monitorar ambientes com suspeita de contaminação (RIBEIRO, 1999).

O método de cultivo direto de bulbos de cebola foi desenvolvido por Fiskesjö (1983, *apud* RIBEIRO, 1999), onde o autor expôs os bulbos a amostras de água coletadas no rio Bräan (Suécia). O autor verificou que o crescimento das raízes desses bulbos foi inibido pela presença de substâncias tóxicas dissolvidas nessas

águas. A partir de então, este teste tem sido amplamente utilizado e se mostra uma ferramenta simples e confiável para a avaliação dos efeitos finais de misturas complexas, podendo servir como uma indicação preliminar dos riscos que estes contaminantes podem representar aos ecossistemas (RIBEIRO, 1999).

3.4.2. Teste de aberrações cromossômicas (AC)

As AC são caracterizadas por mudanças na estrutura normal de um cromossomo ou no número total de cromossomos, podendo ocorrer espontaneamente ou como resultado da exposição a agentes físicos ou químicos (RUSSEL, 2002). Alterações cromossômicas estruturais podem ser induzidas por diversos fatores, como quebras no DNA, inibição da síntese de DNA e replicação alterada do DNA (SWIERENGA et al., 1991; ALBERTINI et al., 2000; FERETTI et al., 2008). Já as aberrações cromossômicas numéricas, como aneuploidia e poliploidia, são conseqüências de segregações anormais de cromossomos, podendo ocorrer tanto espontaneamente como pela ação de um agente aneugênico (ALBERTINI et al., 2000). A maioria das AC 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 ações clastogênicas ou aneugênicas. A ação aneugênica é decorrente da inativação de estruturas citoplasmáticas, como o fuso mitótico (FENECH, 2000), que leva a uma segregação anormal dos cromossomos, tendo como conseqüência desta anormalidade a formação de células aneuplóides ou poliplóides (ALBERTINI et al., 2000). Já a ação clastogênica é caracterizada pela indução de quebras cromossômicas durante a divisão celular (FENECH, 2000), ocasionando alterações cromossômicas estruturais (ALBERTINI et al., 2000). Desta forma, AC apresentam a parte visível de uma grande variedade de alterações no material genético, resultantes da atuação de diferentes mecanismos de reparo das quebras do DNA (OBE et al., 2002). Segundo Mateuca et al. (2006), as vantagens do teste de AC não se restringem, apenas, a possibilidade de identificação dos diferentes tipos de alterações dos cromossomos, mas também oferece a possibilidade de estimar, precisamente, os modos de ação dos químicos testados (GROVER; KAUR, 1999).

A espécie *A. cepa* é um bom organismo-teste para ensaios de AC, pois além de apresentar as características cromossômicas já citadas, como cromossomos grandes, em baixo número e morfologia bem definida, fornece um rápido exame dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de químicos ambientais (GRANT, 1982; GRANT, 1994; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008, HOSHINA et al., 2009; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Este teste tem sido amplamente usado em ensaios de avaliação de amostras ambientais complexas, tais como águas de rios (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; EGITO et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009, ROCHA et al., 2009; RADIC et al., 2010), lagos (GRISOLIA et al., 2005; ERGENE et al., 2007; CHRISTOFOLETTI, 2008), esgotos industriais e domésticos (GROVER; KAUR, 1999; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009), resíduos como lodos de esgoto (CARITÁ, 2007) e solos contaminados (COTELLE et al., 1999), bem como em solos *landfarming* anteriormente contaminados com lodo de refinaria de petróleo (SOUZA et al., 2009).

As células meristemáticas de *A. cepa* podem quantificar uma série de parâmetros morfológicos e citogenéticos, incluindo a morfologia e o crescimento da raiz, a determinação do índice mitótico, bem como a indução de MN e de anormalidades no ciclo celular, como anáfases iniciais, C-metáfases, aderências cromossômicas, pontes e fragmentações cromossômicas. Estas alterações podem evidenciar ou até servirem como indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético dos organismos expostos a agentes genotóxicos (QUINZANI-JORDÃO, 1978; VIDA KOVIĆ-CIFREK et al., 2002; EVSEEVA et al., 2003; EGITO et al., 2007).

O acúmulo de dados obtidos com *A. cepa*, pela ampla aplicação deste teste nos últimos anos, permite o estabelecimento de uma correlação entre a mensuração de AC observadas com a potencialidade de desenvolvimento de câncer (BONASSI; AU, 2002). Segundo Obe et al. (2002), sabe-se hoje que organismos com elevadas frequências de AC apresentam também um risco significativo de desenvolvimento de câncer.

3.5. O uso de *Oreochromis niloticus* como organismo teste

Os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática e podem ser utilizados para

estimar a periculosidade de substâncias químicas, bem como para detectar poluição ambiental (POWERS, 1989; MATSUMOTO et al., 2006; VENTURA et al., 2008).

Os peixes desempenham importantes funções na cadeia trófica, sendo capazes de acumular substâncias tóxicas pela exposição direta nas águas de mares e rios contaminados, ou de maneira indireta, por meio da cadeia alimentar (MINISSI et al., 1996; ATEEQ et al., 2002). Os alimentos constituem a principal rota de exposição humana a substâncias tóxicas e peixes têm sido reconhecidos como vetores de tais substâncias (AL-SABTI; METCALFE, 1995), já que muitas espécies de peixes constituem uma importante fonte de proteína e nutrientes para a dieta humana.

Al-Sabti e Metcalfe (1995) afirmam que peixes são amplamente utilizados em avaliações ambientais, por apresentar, quando expostos a substâncias químicas perigosas, metabolismo similar aos vertebrados superiores, devido à proximidade evolutiva que possuem. Os resultados obtidos, por exemplo, em testes de teratogênese e carcinogênese, podem ser utilizados como indicativos de efeitos semelhantes para outros vertebrados, inclusive para humanos (HARSHBARGER; CLARK, 1990).

Uma espécie de peixe é tida como ideal para estudos de genotoxicidade e mutagenicidade se apresentar ampla distribuição, for sensível na detecção dos poluentes, mesmo que em baixas concentrações, e permitir a captura de indivíduos sem prejudicar a conservação da espécie (SANCHEZ-GALAN et al., 1998).

Dentre as espécies de peixes utilizadas como organismos-teste, o gênero *Oreochromis* tem sido largamente empregado na genética toxicológica (GRISOLIA; STARLING, 2001; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003). A espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) constitui um excelente modelo para ensaios laboratoriais, pela sua alta sensibilidade na detecção de poluentes, por responder, rapidamente, a alterações ambientais, sendo, por isso, freqüentemente utilizada na investigação de contaminantes presentes nos ecossistemas aquáticos (VIJAYAN et al., 1996).

O. niloticus é um peixe de água doce, onívoro e de origem africana, com distribuição mundial ampla, comumente encontrado em diversos estuários do mundo (VIJAYAN et al., 1996). Esta espécie foi introduzida em alguns açudes do Nordeste e em algumas regiões do Sudeste brasileiro (TANAKA, 2001), sendo, atualmente, uma

importante espécie de peixe comercializável no sudeste do Brasil (VIJAYAN et al., 1996).

3.6. Teste do micronúcleo (MN)

Os MN são estruturas resultantes de danos não reparados ou reparados erroneamente nas células parentais (RIBEIRO et al., 2003), facilmente visualizados nas células filhas como uma estrutura similar ao núcleo principal, porém, de tamanho reduzido (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Sabe-se que MN são resultantes de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal durante o ciclo de divisão celular (FENECH, 2000). Fragmentos cromossômicos podem ser derivados de quebras cromossômicas, decorrentes da ação clastogênica de uma substância (YI; MENG, 2003), ou a partir de pontes cromossômicas que, quando se rompem, podem também originar esses fragmentos (FISKESJÖ, 1993). Por outro lado, perdas cromossômicas são conseqüências da inativação dos fusos mitóticos durante a divisão celular, caracterizado por um efeito aneugênico de uma substância (UHL et al., 2003).

Os MN podem ser observados em qualquer tipo de célula ou fase do ciclo celular. Uma vez que os danos são induzidos no primeiro ciclo, eles serão visíveis como MN no segundo ciclo ou no ciclo subsequente à divisão celular (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Para que uma estrutura composta de material genético seja considerada um MN, ela deve apresentar algumas características tais como, um diâmetro com cerca de 1/16 a 1/3 do diâmetro do núcleo principal da célula; podendo esta proporção ser ainda ampliada para 1/30, nos casos dos organismos-teste que apresentam cromossomos pequenos (como, por exemplo, os peixes); 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, uma coloração mais intensa (FENECH, 2000).

O teste do MN vem sendo considerado, por muitos autores, como uma das mais promissoras técnicas de avaliação de efeitos mutagênicos induzidos por agentes químicos (RIBEIRO et al., 2003; MATSUMOTO et al., 2006). Este teste vem sendo utilizado amplamente tanto em animais (CRISTALDI et al., 2004; 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, SOUZA et al., 2009), sendo, comumente, aplicado para avaliar a indução de AC estruturais e numéricas por agentes clastogênicos e aneugênicos.

Entre os parâmetros citológicos observados em células meristemáticas de raízes de plantas, para a detecção de danos ocasionados por poluentes ambientais, a formação de MN é considerada o *endpoint* mais efetivo e simples (MA et al., 1995). Esses autores apontam também uma alta eficiência na utilização de células F₁ para a contagem de MN, já que, quando comparadas às células meristemáticas, 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 de DNA dessas células seriam visualizados na forma de MN nas suas células filhas, que nesse caso, correspondem às células F₁ citadas anteriormente (MA et al., 1995).

O teste de MN tem sido aplicado, com sucesso, em eritrócitos de peixes (HOSE et al., 1987; GRISOLIA; STARLING, 2001; SOUZA; FONTANETTI, 2006; HOSHINA et al., 2008; VENTURA et al., 2008; OLIVEIRA-MARTINS; GRISOLIA, 2009). Os eritrócitos de peixes são especialmente preferidos para este teste, pois sendo células nucleadas, os MN podem ser interpretados como resultado de atividade clastogênica ou aneugênica dos contaminantes. Assim sendo, este teste com peixes pode ser considerado como um indicador bastante sensível para a detecção de mutagenicidade provocada por exposição crônica a contaminantes aquáticos (AL-SABTI; METCLAFE, 1995; LEMOS et al., 2005).

Mais recentemente, foi mostrado por Guzmán et al. (2003) e Olaharski et al. (2006), que o MN pode também ser usado como um parâmetro adicional no estabelecimento do risco do câncer. Os autores mostraram uma correlação positiva entre a presença de MN e o desenvolvimento de câncer, pois foi observado que quando há um aumento da instabilidade genômica, há também registros de uma alta frequência de MN (RAJAGOPALAN et al., 2004).

Além da análise de micronúcleos, outras anormalidades nucleares podem ser observadas em eritrócitos de peixes. Carrasco et al. (1990) classificaram as anormalidades como: “blebbed”, “lobed”, “notched” e núcleos vacuolizados. Alguns autores sugerem que essas anomalias devem ser contabilizadas concomitantemente à análise de micronúcleos, contudo ainda não há um consenso sobre o tipo de

morfologia nuclear que pode ser considerada análoga ao micronúcleo, isto é, resultantes da ação de um agente mutagênico, uma vez que os mecanismos da formação de tais lesões ainda não estão totalmente esclarecidos (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003).

3.7. Ensaio do cometa

Nas últimas décadas têm sido desenvolvidas diversas metodologias para avaliação de danos ao DNA e, dentre elas, o ensaio de cometa tem sido considerado como uma eficiente ferramenta para tal finalidade (LEME; MARIN-MORALES, 2008). O ensaio do cometa é um método de estudo genotóxicológico 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 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). É considerado um teste sensível, rápido e eficiente e, quando comparado com outros testes de genotoxicidade, ainda apresenta vantagens pela detecção de pequenos danos no DNA, pelo requerimento de pequeno número de células, por sua flexibilidade e precisão, pela fácil aplicação, reprodutibilidade e pelo curto período de tempo para a realização do experimento (KOSZ-VNENCHAK; ROKOSK, 1997; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; BELPAEME et al., 1998; TICE et al., 2000, BÜCKER et al., 2006).

O ensaio do cometa tem sido considerado como um método indicado para detectar mudanças muito pequenas na estrutura de DNA, tais como as atividades de reparo, o modo de seu empacotamento e sua integridade (KOPPEN et al., 1999).

Monteith e Vanstone (1995) compararam os resultados de genotoxicidade obtidos pelo ensaio do cometa com outras técnicas *in vitro* (aberrações cromossômicas e mutações em células pulmonares V79 de hamsters chineses) e *in vivo* (micronúcleos de medula óssea em camundongos e reparo de DNA em ratos) e demonstraram que o teste do cometa é tão eficiente quanto os demais na detecção de danos no DNA.

O ensaio do cometa tem se mostrado uma técnica adequada para o biomonitoramento ambiental e para avaliações de genética toxicológica em geral (DARROUDI; NATARAJAN, 1993; MCNAMEE et al., 2000; TICE et al., 2000).

Estudos realizados por diversos autores (KOSZ-VNENCHAK; ROKOSZ, 1997; MATSUMOTO et al., 2006) conferiram alta eficiência do teste na detecção da genotoxicidade de contaminantes aquáticos, pela aplicação do referido teste em diversos organismos, tanto em testes *in situ* (AL-SABIT et al., 1995) como *in vivo* (MATSUMOTO et al., 2006).

A técnica do ensaio do cometa vem sofrendo mudanças ao longo do tempo, tendo o seu desenvolvimento decorrente, principalmente, dos trabalhos de Östling e Johanson (1984), que desenvolveram a metodologia de eletroforese em micro-gel e ao de Singh et al. (1988), que aperfeiçoaram a técnica atribuindo-lhe maior sensibilidade com o uso de solução alcalina. Atualmente, muitos grupos têm publicado normas e critérios para a realização dos ensaios, com o objetivo de estabelecer protocolos de alta qualidade, para a obtenção de dados válidos, reproduzíveis e fidedignos (KLAUDE et al., 1996; BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005; DI-PAOLO, 2006).

A aplicação do ensaio de cometa em várias espécies de peixes tem se mostrado muito satisfatória, destacando a sensibilidade das células sanguíneas aos efeitos genotóxicos induzidos por agentes químicos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; GONTIJO et al., 2003). Muitos estudos vêm sendo realizados utilizando-se esta técnica (BÜCKER et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI 2007; VENTURA et al. 2008) e em todos eles, o teste mostrou-se bastante eficaz na detecção dos efeitos danosos dos compostos testados.

3.8. Área de estudo

A bacia do córrego Santa Gertrudes situa-se no município de Santa Gertrudes, localizado na zona fisiográfica do rio Piracicaba, entre as coordenadas geográficas 22° 25' e 22° 32' LAT S e 47° 35' e 47° 28' LONG W (RUSSO, 1997). O córrego Santa Gertrudes é afluente, pela margem esquerda, do Ribeirão Claro, constituindo-se em um dos principais tributários da bacia hidrográfica deste ribeirão. O Ribeirão Claro, por sua vez, é afluente esquerdo do rio Corumbataí (RUSSO, 1997).

A água distribuída à população de Santa Gertrudes provém dos mananciais superficial e subterrâneo da cidade de Santa Gertrudes. A água superficial é captada no córrego Santa Gertrudes, a montante dos despejos de efluentes industriais e

domésticos da cidade. A água subterrânea é captada em poços tubulares profundos (RUSSO, 1997).

O córrego do Caju é afluente esquerdo do córrego Santa Gertrudes, cuja confluência destes córregos ocorre à jusante da captação de água da estação de tratamento (a cerca de dois metros da captação). Nos períodos de seca, muitas vezes, o córrego do Caju invade o córrego Santa Gertrudes e a captação é feita nas águas do córrego do Caju.

Como já exposto, o córrego Santa Gertrudes recebe efluentes domésticos e industriais da cidade de Santa Gertrudes, que vêm comprometendo, substancialmente, a qualidade de suas águas. Dentre os tributários deste rio, temos os efluentes domésticos do município, lançados “*in natura*” a cerca de 2 km a jusante do ponto de captação para abastecimento e efluentes de uma série de indústrias cerâmicas. A partir do ponto de despejo dos efluentes, caracteriza-se um ambiente impróprio para a utilização da água em qualquer atividade humana, sendo que este comprometimento se estende até sua foz no Ribeirão Claro (RUSSO, 1997).

Outro córrego dessa bacia é o córrego Itaqui, que também se localiza na região de Santa Gertrudes e é afluente esquerdo do Ribeirão Claro (a jusante da confluência com o córrego Santa Gertrudes). O córrego Itaqui abastece os tanques de um centro de pesca esportiva e é circundado por várias indústrias cerâmicas, que lançam seus efluentes em suas águas. Os efluentes líquidos destas indústrias apresentam um alto potencial poluidor por apresentarem substâncias tóxicas derivadas da lavagem dos tanques de esmaltação. Dentre os resíduos da esmaltação estão, principalmente, os íons Cu^{+2} , Cr^{+6} , Fe^{+3} , Co^{+2} , Ni^{+2} e U^{+6} , principais responsáveis pela toxicidade do efluente, que podem comprometer, severamente, as águas do córrego Itaqui (RUSSO, 1997).

As emissões gasosas, provenientes do processo de queima das indústrias de revestimentos cerâmicos, têm sido estudadas, principalmente devido à liberação, na atmosfera, de contaminantes como o flúor. A quantidade desses contaminantes depende, além do ciclo de queima das peças cerâmicas, da gênese e da composição das matérias-primas minerais (FERRARI et al., 2003). O flúor emitido na atmosfera pelas indústrias cerâmicas, durante o período das chuvas, pode transformar-se em fluoretos (chuvas ácidas) e contaminar solos e rios (FERRARI et al., 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Durante os anos de 2008 e 2009 foram realizadas quatro coletas de água: novembro de 2008 (estação quente e seca), fevereiro de 2009 (estação quente e úmida) e agosto de 2008 e de 2009 (estação fria e seca), em sete pontos específicos, sendo o primeiro no córrego do Caju (Ponto 1: antes da confluência com o córrego Santa Gertrudes), três no córrego Santa Gertrudes (Ponto 2: próximo a captação de água pela Estação de Tratamento de Água; Ponto 3: após a confluência do córrego do Caju e Ponto 4: após o recebimento do efluente urbano e industrial), dois no Ribeirão Claro (Ponto 5: a montante da confluência do córrego Santa Gertrudes e Ponto 6: a jusante da confluência do córrego Santa Gertrudes) e um no córrego Itaqui (Ponto 7: após o despejo de efluente industrial) (Figuras 1 e 2).

Os materiais biológicos utilizados como sistemas–teste constituíram de sementes de *Allium cepa* (cebola) de mesmo lote, variedade Baia periforme; bulbos de *A. cepa*; e espécimes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia).

As sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação e os bulbos ao desenvolvimento radicular nas diversas amostras de água coletadas, e os espécimes de *O. niloticus* foram expostos, em aquários, às águas dos pontos de coletas, para a avaliação da potencialidade citotóxica, genotóxica e mutagênica destas águas.

4.2. Métodos

4.2.1. Bioensaios de toxicidade com bulbos de *Allium cepa*

A avaliação da toxicidade, realizada pelos ensaios de desenvolvimento de raiz de bulbos de *Allium cepa*, seguiu os procedimentos descritos por Fiskesjö (1985

apud RIBEIRO, 1999). Foram selecionados bulbos de tamanho semelhante, com, aproximadamente, cerca de dois centímetros de diâmetro, que foram acondicionados em tubos de ensaio (2 cm de diâmetro por 20 cm de comprimento, com capacidade para 80 mL).

Para a realização do experimento, foram adotados alguns parâmetros de controle. Foram selecionados bulbos que apresentavam os melhores aspectos, isto é, com ausência de traumas e deformidades naturais, descartando-se também bulbos ressecados ou portadores de indícios de contaminação por fungos. Para a tomada de resultados, foram considerados dez bulbos de uma série de doze expostos ao tratamento, de modo que os bulbos que apresentaram os feixes de raízes visualmente mais longas e mais curtas foram descartados ao final do experimento.

Os bulbos foram preparados antes do início do teste, com a retirada de folhas secas mais externas e restos de tecidos e raízes, tomando-se o cuidado de manter intacto o anel de primórdios radiculares. Os bulbos foram lavados em água corrente e mantidos imersos em água para evitar a desidratação dos primórdios radiculares, sendo, posteriormente, transferidos para os tubos de ensaio, contendo as amostras de água coletadas nos sete pontos específicos.

Os ensaios controle foram realizados com água mineral (controle negativo) e com uma solução de sulfato de cobre (25 mg/L) (controle positivo). Após cinco dias de exposição, as raízes de cada bulbo foram medidas com auxílio de régua milimetrada.

O experimento foi realizado em temperatura ambiente e protegido da incidência direta da luz do sol. As amostras testadas, que foram armazenadas sob refrigeração (4°C), só foram utilizadas após estabilizar a sua temperatura com a temperatura ambiente. Os tubos de ensaio foram, diariamente, completados com água das respectivas amostras, para restabelecer o volume perdido por absorção e/ou evaporação.

4.2.2. Bioensaios com sementes de *Allium cepa*

Para os testes de instabilidades celulares e cromossômicas, foi realizado um tratamento contínuo (TC), onde as sementes foram expostas à germinação em placas de Petri umedecidas com as sete amostras de águas das coletas (uma placa para cada ponto estabelecido).

Os testes controle foram desenvolvidos submetendo as sementes de *A. cepa* à água ultrapura (controle negativo), ao metilmetano sulfonato (MMS) a 9×10^{-5} M e ao herbicida trifluralina, na concentração de 0,19 ppm (controles positivos).

Após a coleta de meristemas, as raízes foram fixadas em Carnoy 3:1 (três partes de etanol para uma de ácido acético – 3:1), por 6 a 18 horas em temperatura ambiente.

4.2.2.a. Forma de Análise dos Resultados:

- Análise dos Efeitos Citotóxicos, Genotóxicos e Mutagênicos:

Para estas análises, foram confeccionadas dez lâminas com meristemas radiculares de *A. cepa*, para cada amostra de água coletada. Para as análises citológicas, os meristemas foram submetidos à reação de Feulgen e as lâminas foram confeccionadas pela técnica comum de esmagamento suave. As lamínulas foram retiradas com nitrogênio líquido e as lâminas montadas em Enthelan (confeção de lâminas permanentes). De cada lâmina foram analisadas, em microscopia de luz, aproximadamente 500 células.

Os efeitos citotóxicos foram avaliados pelas alterações observadas nos Índices Mitóticos (I.M.) de todas as amostras, em relação aos testes controles. O índice mitótico foi obtido pela relação entre as células em divisão celular e o total de células observadas, seguindo a fórmula:

$$\text{I.M.} = \frac{\text{Número total de células em divisão}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

Os efeitos genotóxicos e mutagênicos foram analisados pela verificação das anormalidades encontradas em células em divisão, considerando a porcentagem de irregularidades em metáfases (aderência, perdas, C-metáfase), em anáfases (desorganizadas, multipolares, com pontes, perdas, atrasos cromossômicos, etc), células com fragmentos cromossômicos, células portadoras de micronúcleos e células multinucleadas.

As melhores figuras das anormalidades observadas, para cada amostra, foram fotodocumentadas em microscópio Leica, para registro e comprovação dos resultados. Os dados foram submetidos à análise estatística (Mann-Whitney), para a verificação da significância dos mesmos.

- Análise de micronúcleos em células F₁ (região não meristemática)

Para a análise de micronúcleos em células F₁ (região não-meristemática) foi seguido o protocolo estabelecido por Ma et al. (1995). Esta análise foi realizada para todas as raízes expostas as amostras de água e para os testes controles (negativo e positivos).

As raízes foram submetidas ao reagente de Schiff (reação de Feulgen), igualmente à metodologia aplicada para as células meristemáticas. As raízes foram seccionadas acima da região meristemática (aproximadamente um milímetro). Essa porção seccionada (região F₁) foi coberta por lamínulas e, igualmente, preparada pelo método suave de esmagamento. As lamínulas foram, então, retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas em Enthelan, para serem, posteriormente, analisadas e fotodocumentadas.

4.2.3. Bioensaios com *Oreochromis niloticus*

Espécimes de *Oreochromis niloticus* foram transferidos do tanque de criação de peixes, com sistema de aeração e filtragem, para aquários, onde foram mantidos sob aeração e aclimatados a 23°C. Para cada período de coleta foram montados nove grupos experimentais (sete pontos de coleta e dois controles) com cinco peixes em cada aquário, com capacidade para 50 litros de água cada.

O controle positivo foi feito injetando, intraperitonealmente, em cada espécime 3cc de ciclofosfamida/50g de peixe. O controle negativo foi realizado, expondo os peixes à água de poço artesiano, após os peixes terem recebido, por injeção intraperitoneal, 3cc de soro fisiológico/50 g de peixe, para descartar a contabilização de possíveis efeitos falso positivos no controle positivo, em decorrência de estresse causado pela prática da injeção. Após completar 96 horas de tratamento, foram coletadas, por punção sanguínea, amostras de sangue de todos os indivíduos, utilizando seringas descartáveis (tipo insulina - 1mL), previamente “lavadas” com heparina.

4.2.3.a. Teste do micronúcleo (MN)

Para o teste do MN com sangue de peixes, as lâminas foram confeccionadas por meio da técnica de esfregaço (extensões sanguíneas), sendo a primeira gota descartada, para evitar a contaminação do material. Foram realizadas três extensões sanguíneas para cada espécime de *O. niloticus*. As lâminas foram fixadas

em etanol absoluto por dez minutos e, após 24 horas, submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N a 60°C, por 11 minutos. Imediatamente após a hidrólise, as lâminas foram submetidas ao reativo de Schiff, por duas horas.

Foram analisados 1000 eritrócitos por peixe, nos quais foram determinadas as frequências de células micronucleadas e portadoras de anormalidades nucleares. Na identificação de MN foram adotados alguns critérios para a análise, como boa preservação e coloração do citoplasma e do núcleo; MN e o núcleo principal dentro do mesmo citoplasma; ausência de conexão entre núcleo e MN; diâmetro máximo do MN não ultrapassando a 1/3 do núcleo e a manutenção da esfericidade do núcleo e MN (HUBER et al., 1983).

Também foi considerado neste trabalho, a presença de anormalidades nucleares, segundo a classificação de Carrasco et al. (1990) e outras não classificadas pelo autor, como núcleo “broken-egg”, conforme descrito abaixo:

- núcleo do tipo “blebbed”, que corresponde a uma evaginação relativamente pequena do envoltório nuclear, a qual aparenta conter cromatina;
- núcleo do tipo “lobed”, correspondendo a núcleos com evaginações maiores. Alterações morfológicas do núcleo foram incluídas nesta categoria, como por exemplo, aumento da superfície nuclear, formando múltiplos lóbulos, caracterizando um núcleo disforme;
- núcleo do tipo “notched”, descrito como uma invaginação da membrana. De acordo com o autor, citado acima, os núcleos “notched” parecem não conter material nuclear no local invaginado;
- núcleo vacuolizado, descrito como o núcleo que apresenta uma região desprovida de material genético;
- “broken-egg”, seriam estruturas que podem estar unidas ao núcleo principal da célula por uma porção nucleoplasmática.

As anormalidades descritas acima foram consideradas conjuntamente na análise estatística.

A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, o qual possibilita a comparação dos tratamentos com o controle negativo, bem como dos tratamentos entre si. O teste foi feito com 0,05 de nível de significância.

Os melhores resultados foram fotodocumentados para ilustração dos resultados.

4.2.3.b. Ensaio do Cometa

Para realização do ensaio do cometa, foi utilizada a metodologia descrita por Singh et al. (1988), com algumas modificações. Primeiramente, as lâminas foram mergulhadas em agarose normal 1,5% a 60°C, secas e armazenadas em geladeira. Amostras de 3µL de sangue de peixes foram diluídas em 1000µL de solução fisiológica de vertebrados e as lâminas montadas com 10µL desta suspensão celular adicionados a 120µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em uma solução de lise (1mL triton X-100, 10mL de DMSO e 89mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução de estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, ~8,0g de NaOH sólido, 10g de lauryl sarcosinato sódico para 1L), em geladeira por, no mínimo, uma hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese contendo tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH 12.1) à 4°C, na qual permaneceram por 20 minutos, antes da corrida de eletroforese em corrente 49V e 300mA. Após os 20 minutos de corrida, as lâminas foram neutralizadas em tampão (Tris 0,4M-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, secas a temperatura ambiente e fixadas com etanol 100% por 10 minutos. A coloração foi realizada com brometo de etídio (0,02mg/mL).

Para cada peixe foram analisados, aleatoriamente, 100 nucleóides, com a utilização de microscópio de fluorescência Leica, filtro B – 34 (excitação: $\lambda = 420\text{nm}$ – 490nm , barreira: $\lambda = 520\text{nm}$), em objetiva de 40x. Os nucleóides foram classificados, visualmente, segundo Kobayashi et al. (1995), de acordo com a migração dos fragmentos em classe 0, ausência de dano visível; classe 1, pequeno dano (cauda menor que uma vez o tamanho do nucleóide); classe 2, médio dano (cauda com tamanho de uma a duas vezes o tamanho do nucleóide); classe 3, grande dano (cauda com tamanho maior que duas vezes o tamanho do nucleóide).

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 escores de cada tratamento foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis, para comparação dos resultados dos tratamentos com o controle negativo, bem como dos tratamentos entre si.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação de parâmetros físico-químicos das amostras de águas coletadas

As tabelas 1, 2, 3 e 4 apresentam os resultados das análises físico-químicas realizadas com as amostras de água coletadas em pontos específicos dos recursos hídricos: córrego do Cajú (ponto 1), córrego Santa Gertrudes (pontos 2, 3 e 4), Ribeirão Claro (pontos 5 e 6) e córrego Itaqui (ponto 7).

Na coleta de novembro de 2008, as águas do Ponto 5 se encontraram com uma coloração bastante escura. Foi observada também que as águas do ponto 6 (após a confluência do ponto 5 com o ponto 4) ainda se mantinham escuras e com presença de espumas não naturais (Figura 3). Na coleta de fevereiro e agosto de 2009 foi observado, nas águas coletadas no ponto 6, novamente a presença de espuma. As águas dos pontos 5 e 6, quando aeradas para a realização dos ensaios com os peixes, formavam muita espuma, mostrando que aquela espuma observada no ponto 6 era decorrente de algum lançamento efetuado antes do ponto 5, mas só observável no ponto 6, provavelmente decorrente do turbilhamento natural destas águas neste ponto (Figura 4 e 5). Estas observações servem de alerta sobre a possibilidade de estar sendo lançados, no local, produtos que podem estar causando impactos nestas águas e, conseqüentemente, nos organismos presentes nestes ecossistemas, além de estarem alterando as características paisagísticas naturais deste ambiente.

A cor de uma amostra de água pode estar associada ao grau de redução que a luz sofre ao atravessar este ambiente. Esta redução se dá por absorção de parte da radiação eletromagnética, devido à presença de sólidos dissolvidos, principalmente material em estado coloidal orgânico e inorgânico como, por

exemplo, substâncias naturais resultantes da decomposição de compostos orgânicos como folhas, esgotos sanitários, efluentes industriais (como tanino, anilina, lignina, celulose, óxido de ferro e manganês, abundantes em diversos tipos de solo) (CETESB, 2010).

A turbidez é o grau de atenuação de intensidade que um feixe de luz sofre ao atravessar uma amostra de água. As partículas que provocam turbidez nas águas são maiores que o comprimento de onda da luz branca. Esta redução se dá por absorção e espalhamento, devido à presença de sólidos em suspensão, tais como partículas inorgânicas (areia, silte, argila) e de detritos orgânicos, algas, bactérias e plâncton em geral. Os esgotos sanitários e diversos efluentes industriais também provocam elevações na turbidez das águas. Alta turbidez reduz a fotossíntese da vegetação submersa e de algas, que por sua vez pode suprimir a produtividade de peixes. Sendo assim, a turbidez influencia as comunidades biológicas aquáticas e afeta, adversamente, o uso doméstico, industrial e recreacional das águas (CETESB, 2010).

As análises de turbidez, realizadas com as amostras de águas coletadas neste trabalho, mostraram que os maiores valores foram observados para o ponto 5 (99,5 UNT em agosto de 2008 e 87,1 UNT em agosto de 2009). Estas águas também apresentavam grandes quantidades de sólidos totais dissolvidos, corroborando os valores de turbidez encontrados.

O pH atua adversamente sobre os organismos aquáticos que estão adaptados às condições de neutralidade, de modo que as alterações bruscas do pH podem acarretar no desaparecimento de determinados organismos aquáticos (GERTEL, et al., 2003). A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos naturais pode ser direta, devido a seus efeitos sobre a fisiologia das diversas espécies, e indireta, contribuindo para a precipitação de elementos químicos tóxicos como metais pesados ou ainda interferindo na solubilidade de nutrientes (CETESB, 2010). Desta forma, a resolução CONAMA 357/05 estabelece para os corpos hídricos de água doce um valor de pH variável entre 6,0 e 9,0 (BRASIL, 2005). Os valores de pH encontrados nas amostras de águas coletadas nos rios em estudo ficaram dentro dos limites estabelecidos para as classes 1, 2 e 3, com exceção do ponto 5, em agosto de 2008 (pH 5,23), e do ponto 2, em novembro de 2008 (pH 5,7).

A tilápia pode sobreviver em águas ácidas (com baixo pH), contudo o pH recomendado para o bom crescimento desta espécie está entre 6,5 e 9. Águas com

baixo pH não são propícias para o crescimento do fitoplâncton, zooplâncton e bactérias detritívoras, organismos estes importantes para a manutenção do ambiente ideal para o crescimento das tilápias (BIRUNGI et al., 2007).

A condutividade corresponde à capacidade da água em conduzir corrente elétrica e depende das concentrações de íons dissolvidos e da temperatura. À medida que mais sólidos dissolvidos são adicionados, a condutividade específica da água aumenta. Desta forma, a condutividade indica a quantidade de sais existentes na coluna d'água e, portanto, representa uma medida indireta da concentração de poluentes. Em geral, níveis superiores a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ indicam ambientes impactados (CETESB, 2010). Os valores observados para todas as coletas dos pontos 4, 5, 6 e 7 foram superiores a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Os valores de sólidos totais dissolvidos (STD) encontrados para os pontos 5 e 6, nas amostras coletadas em agosto e novembro de 2008, foram superiores a 500 mg/L, valor máximo permitido para corpos d'água superficiais de classe 1, 2 e 3 segundo a Resolução CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005). Os sólidos presentes nos recursos hídricos, em quantidades acima do permitido, podem causar danos aos peixes e à vida aquática. Isto acontece, porque estes sólidos podem se sedimentar no leito dos rios e destruir os organismos situados em posições estratégicas da teia trófica; danificar leitos de desova de peixes; além de reter bactérias e resíduos orgânicos no fundo dos rios, promovendo decomposição anaeróbia (CETESB, 2010) e eutrofização.

A adequada provisão de oxigênio dissolvido (OD), essencial para a manutenção de processos de autodepuração em sistemas aquáticos naturais, indica a capacidade de um corpo d'água natural manter as condições satisfatórias para a vida aquática (CETESB, 2010). Pela análise deste parâmetro, é possível interpretar inúmeros fatores bióticos e abióticos, como balanço entre produção (fotossíntese) e consumo do oxigênio (respiração) pela comunidade (MATHEUS et al., 1995). O limite de OD para a tilápia do Nilo está em 0,01 mg/L. Embora esta espécie possa sobreviver em condições de oxigênio muito baixas, isto não significa que ela se desenvolva bem, pois para o bom crescimento dos peixes a quantidade de OD ideal é acima de 2 mg/L (NADLA; PICKERING, 2004).

Os valores de OD, observados para os pontos 4, 5 e 6 foram baixos (inferiores a 5 mg/L) para todas as amostras coletadas (com exceção do ponto 6 na coleta de fevereiro de 2009). Provavelmente, estas amostras apresentam baixos

índices de OD por receberem grandes cargas de matéria orgânica e resíduo industrial (GERTEL et al., 2003), o que demandou também grandes quantidades de oxigênio para a sua decomposição (BIRUNGI et al., 2007).

A DBO_5 representa a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica presente em uma amostra, por meio da decomposição microbiana aeróbia. Esta decomposição normal leva a formação de produtos finais inorgânicos e estáveis, num período de cinco dias (CETESB, 2010). Os maiores aumentos de DBO em um corpo d'água são provocados por despejos de origem predominantemente orgânica. A presença de alto teor de matéria orgânica pode induzir à completa extinção do oxigênio na água, provocando sérias alterações sobre a comunidade aquática (GUERRA, 2009). As amostras analisadas neste estudo, no geral, apresentaram valores superiores de DBO_5 ao valor máximo permitido, com exceção do ponto 1, nas coletas de agosto e novembro de 2008.

Os dados obtidos para a análise de fósforo total mostraram valores superiores, para todas as amostras e em todas as coletas realizadas, quando comparadas com os valores permitidos pela Resolução 357/05 do CONAMA (BRASIL, 2005). O fósforo aparece em águas naturais, devido, principalmente, às descargas de esgotos sanitários, efluentes industriais e drenagem agrícola (CETESB, 2010). Altas concentrações de fosfatos na água estão associadas com a eutrofização, podendo acarretar no desenvolvimento de algas e outras plantas aquáticas indesejáveis para reservatórios de água (CETESB, 1997).

Foram verificados, também, valores superiores de amônia para as amostras de água coletadas nos pontos 4, 5 e 6, nas estações fria e seca e quente e seca. Os recursos hídricos têm diversas fontes de nitrogênio que vão desde a descarga de esgotos sanitários, efluentes de indústrias químicas, petroquímicas, siderúrgicas, farmacêuticas, conservas alimentícias, matadouros, frigoríficos e curtumes, até o escoamento das águas pluviais pelos solos fertilizados (CETESB, 2010).

O nitrogênio pode ser encontrado nas águas sob as formas de nitrogênio orgânico, amoniacal, nitrito e nitrato, sendo que a presença de cada uma destas formas pode ser associada a uma característica poluidora. Segundo a CETESB (2010), quando uma amostra de água, coletada em um rio poluído, apresenta valores de nitrogênio orgânico e amoniacal acima dos limites permitidos, significa que o foco de poluição se encontra próximo do local de coleta. Porém, se pelas análises

químicas desta amostra for detectado altos valores de nitrito e nitrato, pode-se inferir que as descargas de esgotos se encontram distantes do local amostrado.

A amônia é uma importante substância a ser considerada na classificação da qualidade das águas, pois provoca o consumo de OD, quando oxidada biologicamente, além de ser um tóxico bastante restritivo às condições de vida dos organismos aquáticos, sobretudo dos peixes. Os nitratos são tóxicos que podem causar a metahemoglobinemia infantil, uma doença letal para crianças (CETESB, 2010), o que justifica a importância do cumprimento da resolução, que trata dos valores estabelecidos desses parâmetros no padrão de potabilidade das águas.

O flúor é um elemento químico tão reativo que nunca é encontrado em sua forma elementar na natureza, sendo normalmente encontrado na sua forma combinada como fluoreto (CETESB, 2010). O flúor emitido na atmosfera pelas indústrias cerâmicas, durante o período das chuvas, pode se transformar em fluoretos e contaminar solos e rios, por meio de chuvas ácidas (FERRARI et al., 2003).

Foram encontrados, em águas de alguns pontos, valores de fluoretos acima dos estabelecidos pela Legislação. Na coleta de agosto de 2008, os pontos 1 e 7 apresentaram altos valores de fluoreto (1,02 e 1,2 mg/L, respectivamente), porém ainda menores que o limite máximo estabelecido pelos órgãos ambientais. Na coleta de novembro de 2008, o ponto 1 apresentou valor superior ao estabelecido (1,97 mg/L) e na coleta de agosto de 2009 os pontos 5, 6 e 7 mostraram valores de fluoreto também acima dos estabelecidos pela Legislação (1,77, 1,99, 1,68 mg/L respectivamente).

As emissões de metais têm aumentado devido, principalmente, às atividades industriais, agrícolas e urbanas, o que tem causado impactos severos nos ecossistemas (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2005). Dentre os metais analisados, os encontrados em maiores quantidades foram alumínio (Al), chumbo (Pb) e zinco (Zn). Os maiores valores medidos foram do alumínio em fevereiro de 2009 (estação úmida e quente). O aumento da concentração de alumínio, na coleta de fevereiro de 2009, pode estar associado com o período de chuvas e, portanto, com a alta turbidez (CETESB, 2010). Os íons coloridos importantes do processo de esmaltação cerâmica (Cu^{+2} , Cr^{+6} e Ni^{+2}) foram encontrados também na maioria das

amostras de água coletadas, porém em quantidades abaixo das permitidas pela resolução 357/05 do CONAMA (BRASIL, 2005).

Os dados pluviométricos da região, medidos na cidade de Rio Claro-SP, nos períodos de coleta encontram-se na tabela 5 (Fonte: CEAPLA, Rio Claro).

5.2. Teste de raízes de cebola para avaliação da toxicidade ambiental

Os valores obtidos no teste de toxicidade, realizados por meio do comprimento de raízes de bulbos de *A. cepa*, mostraram uma maior inibição no desenvolvimento das raízes expostas às águas dos pontos 4, 5, 6 e 7. Os bulbos expostos as águas dos pontos 1 e 3 também apresentaram inibição no desenvolvimento, mas, apenas, para as coletas da estação fria e seca (Tabela 6, Figuras 6 e 7).

Os testes de germinação de bulbos, realizados com as amostras de águas dos tratamentos, em geral, mostraram uma maior inibição de crescimento para as águas que apresentaram os maiores valores de condutividade. Na coleta de agosto de 2008, por exemplo, em que foram observados valores de condutividade de 373, 1025, 780 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para os pontos 4, 5 e 6 respectivamente, as raízes dos bulbos atingiram uma média de 0,2 cm de comprimento para o ponto 4, 0,11 para o ponto 5 e 1,16 para o ponto 6, enquanto que o controle negativo exibiu um comprimento de 3,37 cm. O aspecto geral dos bulbos de *A. cepa*, após os cinco dias de exposição na coleta de agosto de 2008, encontra-se ilustrado na Figura 6.

A inibição do crescimento radicular pode ocorrer pela indução de estresse salino, por duas razões principais: diminuição da pressão de turgidez necessária ao crescimento celular, devido ao baixo potencial osmótico do meio externo; e a subsequente morte celular, devido à toxicidade dos íons em solução. Bernstein e Ayers (1953 *apud* SHANNON; GRIEVE, 1999) testaram a tolerância de bulbos de *A. cepa* à salinidade. Os autores verificaram que o declínio da produtividade teve seu início na condutividade de 1,4 dS/m e a diminuição da produtividade, em 50%, ocorreu na condutividade de 4,1 dS/m.

Outro fator que influencia o desenvolvimento das raízes é a presença de metais nas amostras analisadas. Embora a toxicidade dos metais possa variar de acordo com o genótipo da planta e as condições do experimento, os metais considerados mais tóxicos para plantas e microorganismos são o mercúrio (Hg), o

cobre (Cu), o níquel (Ni), o chumbo (Pb), o cobalto (Co) e o cádmio (Cd) (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1984).

Em relação aos efeitos na divisão celular, os metais podem ser divididos em metais com efeitos bastante severos (Cd, Cu, Hg, Cr, Co, Ni, Be), com efeitos marcado (Zn, Al, Mn, Fe, Se, Sr, Sb, Ca, Ti) e os com efeito relativamente menor (Mg, As, Mo, Ba, Pb) (PATRA et al., 2004). Metais pesados podem inibir o crescimento de raízes como resultado de distúrbios no ciclo celular. Estudos realizados com os metais zinco, cobre, manganês, ferro, cádmio e chumbo, em diferentes concentrações, mostrou que estes metais inibiram o desenvolvimento de raízes de *A. cepa* (BOROFFICE, 1990; LERDA, 1992; FISKESJÖ, 1997). Assim também, águas do rio Toledo, testadas com diferentes concentrações de cobre, zinco e chumbo (0,1–50ppm), mostraram o potencial de inibição que estes metais exercem sobre as raízes dos bulbos desta planta (PALACIO et al., 2005).

Foram observados, também, altos índices de contaminação por alumínio (Al) em todas as amostras coletadas. Esta contaminação pode ser decorrente da composição do solo da região, que é rica em Al, característica comum observada em solos de cerrado. Acredita-se que a maior consequência fisiológica da toxicidade do Al seja a interrupção do crescimento da raiz das plantas e a mudança na morfologia radicular, sugerindo que o citoesqueleto seja a estrutura alvo, uma vez que causam o rompimento do aparato mitótico, por meio da inibição da polimerização dos microtúbulos (VOITSINAS et al., 1997).

Análises citogenéticas realizadas por Fiskesjö (1983; 1988), com bulbos de *A. cepa* tratados com sais de alumínio, demonstraram que este tratamento levou ao desenvolvimento de duas estruturas citoplasmáticas oblongas hialinas, formadas por material extravasado do núcleo. O autor sugere que a genotoxicidade do alumínio se deve à dissolução nuclear e a aderência cromossômica.

Segundo Guerra (2009), a absorção pelas plantas de metais pesados presentes em misturas complexas pode ser diferente da verificada com cada um dos elementos avaliados isoladamente. Este fato ocorre em função das diversas interações entre os contaminantes, que podem ser independentes, antagonistas ou sinérgicas, de modo que a resposta das espécies ao excesso de metais pesados pode se dar de diferentes formas (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 1992).

Dessa forma, diversos fatores podem inibir o desenvolvimento das raízes dos bulbos de *Allium cepa*, sendo que em amostras ambientais há uma mistura de

compostos que ainda podem ter um efeito sinérgico, aumentando o potencial de ação da amostra testada. Este ensaio de toxicidade demonstrou o potencial tóxico dos agentes presentes nestas águas, por meio da inibição do desenvolvimento das raízes dos bulbos de *A. cepa*.

O teste com bulbos de *A. cepa*, para a detecção de poluição em corpos d'água, constitui um recurso prático, de baixo custo e de boa sensibilidade, capaz de indicar a presença de substâncias tóxicas ou inibidores biológicos no meio aquático, servindo como um sistema de alerta para identificação de alterações na qualidade da água de recursos hídricos.

Tabela 1: Análise físico-química das amostras coletadas nos pontos específicos dos rios analisados neste estudo, em agosto de 2008

Parâmetro	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	VM 2	VM 3
Cor aparente (Ptco)	134	148	116	621	1242	780	373	75	75
Turbidez (UNT)	15,5	11	11,2	69,1	99,5	46,1	72,6	100	100
Salinidade (‰)	0,03	0,02	0,03	0,18	0,51	0,38	0,05	<0,5	<0,5
Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	68	57	19	373	1025	780	107	<100	<100
Oxigênio Dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ O}_2$)	7,5	7,63	7,48	3,83	3,04	3,74	7,01	> 5	> 4
pH	6,6	6,22	6,41	6,67	5,23	6,25	6,46	6 - 9	6 - 9
Sólidos Totais Dissolvidos ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	45	35	47	243	687	507	70	500	500
Nitrato ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,6	0,4	0,8	1,4	3,1	1,8	0,8	10	10
Nitrito ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,004	n.d.	0,031	0,049	0,075	0,056	0,009	1	1
Amônia ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,24	0,25	0,55	18,2	14,2	14,8	0,39	3,7 [#]	13,3 [#]
Fósforo Total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	124	41,8	49,23	266,2	349,1	231,8	40,68	0,1	0,15
Fluoreto ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	1,02	0,04	0,09	0,23	0,49	0,98	1,2	1,4	1,4
DBO ₅ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ O}_2$)	4,5	6,5	7,1	21	12,4	44	6,7	5	10
Metais									
Alumínio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,4898*	0,1872*	0,3986*	0,4652*	0,4655*	0,3985*	1,166*	0,1	0,2
Cádmio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,001	0,01
Chumbo ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	n.d.	0,0080	0,0289*	0,0136	0,0215*	0,0227*	n.d.	0,01	0,033
Cobre ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	n.d.	n.d.	0,0020	0,0040	0,009*	0,0047	n.d.	0,009	0,013
Cromo ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	n.d.	n.d.	n.d.	0,0020	0,0040	n.d.	0,0087	0,05	0,05
Níquel ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	n.d.	0,0060	0,0040	0,0077	0,012*	0,0082	0,0057	0,025	0,025
Zinco ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,0194*	0,0134	0,0225*	0,0434	0,0404	0,0288*	0,0281*	0,18	5

Sendo: **P1**: Ponto 1 (Córrego do Caju: antes da confluência com o córrego Santa Gertrudes); **P2**: Ponto 2 (Córrego Santa Gertrudes: próximo a captação de água pela Estação de Tratamento de Água); **P3**: Ponto 3 (Córrego Santa Gertrudes: após a confluência do córrego do Caju); **P4**: Ponto 4 (Córrego Santa Gertrudes: após o recebimento do efluente urbano e industrial); **P5**: Ponto 5 (Ribeirão Claro: a montante da confluência do córrego Santa Gertrudes); **P6**: Ponto 6 (Ribeirão Claro: a jusante da confluência do córrego Santa Gertrudes); **P7**: Ponto 7 (Córrego de Itaquí: após o despejo de efluente industrial); **VM 2**: valor máximo estabelecido para corpos d'água de classe 2 (BRASIL, 2005); **VM 3**: valor máximo estabelecido para corpos d'água de classe 3 (BRASIL, 2005); **#**Valores de amônia estabelecidos para pH menor ou igual a 7,5; *Valores acima do valor máximo permitido para corpos d'água de classe 2.

Tabela 2: Análise físico-química das amostras coletadas nos pontos específicos dos rios analisados neste estudo, em novembro de 2008

Parâmetro	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	VM 2	VM 3
Cor aparente (Ptco)	149	224	94	516	704	578	240	75	75
Turbidez (UNT)	18,4	16	9,69	62,5	53,5	36,1	32,6	100	100
Salinidade (‰)	0,03	0,02	0,04	0,15	0,67	0,46	0,07	<0,5	<0,5
Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	74	40	83	318	1329	941	143	<100	<100
Oxigênio Dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ O}_2$)	8,12	7,24	7,36	2,70	2,88	3,34	7,23	> 5	> 4
pH	6,21	5,7	6,39	6,67	7,27	7,44	6,74	6 - 9	6 - 9
Sólidos Totais Dissolvidos ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	48	26	54	207	864	610	93	500	500
Nitrato ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,6	0,4	0,7	1,9	2,4	1,7	0,5	10	10
Nitrito ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,008	0,005	0,022	0,054	0,058	0,036	0,013	1	1
Amônia ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,25	0,24	0,39	6,7	9,4	9,0	0,48	3,7 [#]	13,3 [#]
Fósforo Total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	31,8	12,4	15,3	888,7	1248,1	1209	25,9	0,1	0,15
Fluoreto ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	1,97	0,09	0,17	0,38	0,42	0,52	0,62	1,4	1,4
DBO ₅ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ O}_2$)	4,4	11	10,2	144	80	44	8,2	5	10
Metais									
Alumínio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,3546*	0,1799*	0,1551*	0,2935*	0,1958*	0,1823*	0,3601*	0,1	0,2
Cádmio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,001	0,01
Chumbo ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0286*	0,0686*	n.d.	0,01	0,033
Cobre ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0022	0,0018	n.d.	0,009	0,013
Cromo ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	n.d.	n.d.	0,0010	n.d.	0,0030	0,0040	0,0030	0,05	0,05
Níquel ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,0056	0,0038	0,008	n.d.	0,0070	0,0073	n.d.	0,025	0,025
Zinco ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,0084	0,0076	0,0217	0,0214	0,0289	0,0167	0,0048	0,18	5

Sendo: **P1**: Ponto 1 (Córrego do Caju: antes da confluência com o córrego Santa Gertrudes); **P2**: Ponto 2 (Córrego Santa Gertrudes: próximo a captação de água pela Estação de Tratamento de Água); **P3**: Ponto 3 (Córrego Santa Gertrudes: após a confluência do córrego do Caju); **P4**: Ponto 4 (Córrego Santa Gertrudes: após o recebimento do efluente urbano e industrial); **P5**: Ponto 5 (Ribeirão Claro: a montante da confluência do córrego Santa Gertrudes); **P6**: Ponto 6 (Ribeirão Claro: a jusante da confluência do córrego Santa Gertrudes); **P7**: Ponto 7 (Córrego de Itaquí: após o despejo de efluente industrial); **VM 2**: valor máximo estabelecido para corpos d'água de classe 2 (BRASIL, 2005); **VM 3**: valor máximo estabelecido para corpos d'água de classe 3 (BRASIL, 2005); [#]Valores de amônia estabelecidos para pH menor ou igual a 7,5; *Valores acima do valor máximo permitido para corpos d'água de classe 2.

Tabela 3: Análise físico-química das amostras coletadas nos pontos específicos dos rios analisados neste estudo, em fevereiro de 2009

Parâmetro	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	VM 2	VM 3
Cor aparente (Ptco)	255	115	176	207	273	218	289	75	75
Turbidez (UNT)	28,1	12	20,8	20,5	31,1	25,8	43	100	100
Salinidade (‰)	0,03	0,02	0,03	0,05	0,09	0,06	0,05	<0,5	<0,5
Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	73	55	64	101	184	131	119	<100	<100
Oxigênio Dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ O}_2$)	7,05	6,94	6,6	4,45	4,28	6,30	6,98	> 5	> 4
pH	6,14	6,10	6,18	6,34	6,62	6,70	6,52	6 - 9	6 - 9
Sólidos Totais Dissolvidos ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	47	36	41	66	120	85	76	500	500
Nitrato ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,8	0,3	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8	10	10
Nitrito ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,014	0,004	0,008	0,028	0,016	0,037	0,019	1	1
Amônia ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,58	0,14	0,31	1,61	2,19	1,68	0,46	3,7 [#]	13,3 [#]
Fósforo Total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	13,7	12,9	15,6	325,3	257,4	174,7	17,8	0,1	0,15
Fluoreto ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,01	1,4	1,4
DBO ₅ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ O}_2$)	8,4	9,3	5,9	46	46	36	8,4	5	10
Metais									
Alumínio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,9131*	0,1210*	0,2499*	0,2207*	1,190*	0,8632*	0,7317*	0,1	0,2
Cádmio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,001	0,01
Chumbo ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,0288*	0,0221*	n.d.	n.d.	0,0176*	0,0486*	n.d.	0,01	0,033
Cobre ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	n.d.	0,0020	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,009	0,013
Cromo ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,0010	0,0017	0,0040	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,05	0,05
Níquel ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,0078	0,0078	0,0060	n.d.	0,0078	0,0073	0,0047	0,025	0,025
Zinco ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,0035	0,0028	0,0026	0,0067	0,0121	0,1007	0,0068	0,18	5

Sendo: **P1**: Ponto 1 (Córrego do Caju: antes da confluência com o córrego Santa Gertrudes); **P2**: Ponto 2 (Córrego Santa Gertrudes: próximo a captação de água pela Estação de Tratamento de Água); **P3**: Ponto 3 (Córrego Santa Gertrudes: após a confluência do córrego do Caju); **P4**: Ponto 4 (Córrego Santa Gertrudes: após o recebimento do efluente urbano e industrial); **P5**: Ponto 5 (Ribeirão Claro: a montante da confluência do córrego Santa Gertrudes); **P6**: Ponto 6 (Ribeirão Claro: a jusante da confluência do córrego Santa Gertrudes); **P7**: Ponto 7 (Córrego de Itaquí: após o despejo de efluente industrial); **VM 2**: valor máximo estabelecido para corpos d'água de classe 2 (BRASIL, 2005); **VM 3**: valor máximo estabelecido para corpos d'água de classe 3 (BRASIL, 2005); **#**Valores de amônia estabelecidos para pH menor ou igual a 7,5; *Valores acima do valor máximo permitido para corpos d'água de classe 2.

Tabela 4: Análise físico-química das amostras coletadas nos pontos específicos dos rios analisados neste estudo, em agosto de 2009

Parâmetro	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	VM 2	VM 3
Cor aparente (Ptco)	146	134	115	596	987	712	307	75	75
Turbidez (UNT)	17,9	10,3	12,0	63,5	87,1	39,9	68,1	100	100
Salinidade (‰)	0,03	0,03	0,03	0,13	0,38	0,29	0,04	<0,5	<0,5
Condutividade ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	67	57	72	146	824	585	101	<100	<100
Oxigênio Dissolvido ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{O}_2$)	8,1	7,66	7,7	4,77	4,27	3,80	7,26	> 5	> 4
pH	6,6	6,31	6,61	6,88	7,06	6,97	6,33	6 - 9	6 - 9
Sólidos Totais Dissolvidos ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	43	37	49	94	55	42	69	500	500
Nitrato ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,5	0,3	0,6	0,5	0,5	0,3	0,3	10	10
Nitrito ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,006	0,004	0,006	0,011	0,009	0,007	0,003	1	1
Amônia ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,16	0,19	0,17	9,4	11,4	7,5	0,20	3,7 [#]	13,3 [#]
Fósforo Total ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	31,8	12,4	15,3	888,7	1248,1	1209	25,9	0,1	0,15
Fluoreto ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,52	n.d.	0,22	n.d.	1,77	1,99	1,68	1,4	1,4
DBO ₅ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{O}_2$)	7,4	6,0	7,7	106	114	90	8,8	5	10
Metais									
Alumínio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,1333 [*]	0,1721	0,0953	0,1390 [*]	0,1032 [*]	0,0699	0,0617	0,1	0,2
Cádmio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,001	0,01
Chumbo ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,0340 [*]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0247 [*]	0,01	0,033
Cobre ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0023	n.d.	n.d.	0,009	0,013
Cromo ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,05	0,05
Níquel ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0093	n.d.	n.d.	0,025	0,025
Zinco ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,0174	0,0213	0,0223	0,6346 [*]	0,0582	0,0573	0,0329	0,18	5

Sendo: **P1**: Ponto 1 (Córrego do Caju: antes da confluência com o córrego Santa Gertrudes); **P2**: Ponto 2 (Córrego Santa Gertrudes: próximo a captação de água pela Estação de Tratamento de Água); **P3**: Ponto 3 (Córrego Santa Gertrudes: após a confluência do córrego do Caju); **P4**: Ponto 4 (Córrego Santa Gertrudes: após o recebimento do efluente urbano e industrial); **P5**: Ponto 5 (Ribeirão Claro: a montante da confluência do córrego Santa Gertrudes); **P6**: Ponto 6 (Ribeirão Claro: a jusante da confluência do córrego Santa Gertrudes); **P7**: Ponto 7 (Córrego de Itaquí: após o despejo de efluente industrial); **VM 2**: valor máximo estabelecido para corpos d'água de classe 2 (BRASIL, 2005); **VM 3**: valor máximo estabelecido para corpos d'água de classe 3 (BRASIL, 2005); **#**Valores de amônia estabelecidos para pH menor ou igual a 7,5; ^{*}Valores acima do valor máximo permitido para corpos d'água de classe 2.

Período de coleta	Precipitação pluviométrica (mm)
Agosto /2008	54,4
Novembro/2008	86,4
Fevereiro/2009	225,3
Agosto/2009	85,0

Tabela 5: Dados pluviométricos referentes aos períodos de coleta. Nota: os valores foram obtidos por meio do cálculo das médias dos valores diários.

Tratamento	Agosto 2008	Novembro 2008	Fevereiro 2009	Agosto 2009
CN	3,37±0,95	3,3±0,58	2,91±0,96	3,18±0,99
CP	0,11± 0,16	0,1±0,01	0,07±0,1	0,02±0,02
P1	2,05±1,51	2,6±0,06	2,31±1,39	1,98±1,44
P2	3,15±1,04	3,16±0,37	2,75±1,15	2,59±1,85
P3	2,49±1,07	2,07±0,5	2,01±1,32	1,99±1,51
P4	0,2±0,21	2,03±0,17	1,68±1,39	0,99±1,14
P5	0,11±0,21	1,68±1,22	2,16±1,12	0,94±0,76
P6	1,16±1,1	1,88±0,47	2,07±1,46	1,31±1,39
P7	2,27±1,33	2,25±1,35	2,24±1,07	2,79±1,49

Tabela 6: Média do comprimento das raízes de bulbos de *Allium cepa* expostos a germinação em águas dos sete pontos de coleta, realizados em agosto de 2008, novembro de 2008, fevereiro de 2009 e agosto de 2009. Sendo: Média ± DP; **CN:** controle negativo; **CP:** controle positivo; **P1:** ponto 1; **P2:** ponto 2; **P3:** ponto 3; **P4:** ponto4; **P5:** ponto 5; **P6:** ponto 6 e **P7:** Ponto 7.

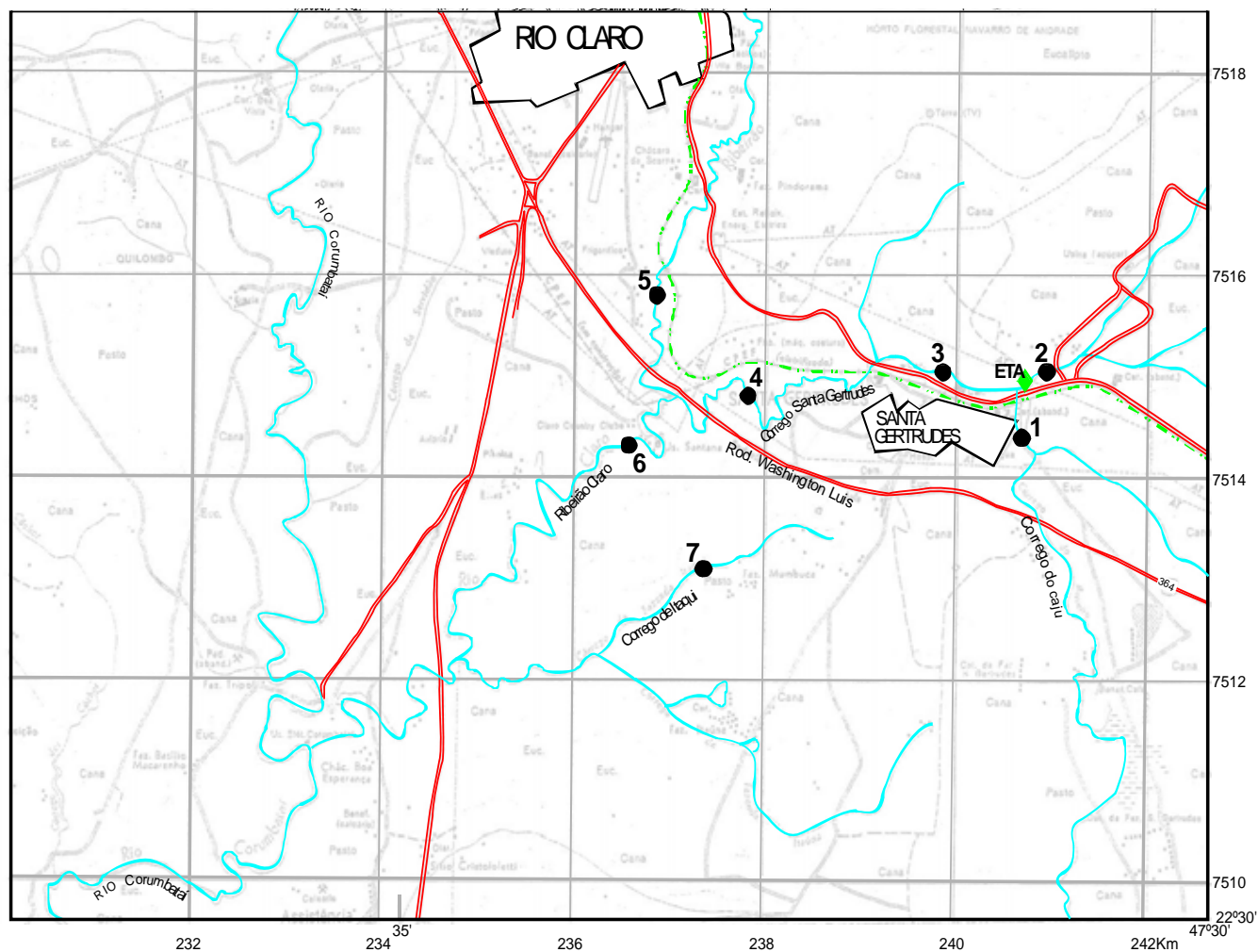


Figura 1: Bacia do córrego Santa Gertrudes e localização dos pontos de coleta.



Figura 2: Fotos dos pontos de coleta. **P1:** ponto 1; **P2:** ponto 2; **P3:** ponto 3; **P4:** ponto 4; **P5:** ponto 5; **P6:** ponto 6 e **P7:** ponto 7. A seta indica um dos pontos de despejo de efluentes.



Figura 3: Fotos dos pontos 5 e 6, coleta de novembro de 2008, mostrando a coloração escura das águas de ambos os pontos



Figura 4: Fotos do ponto 6, coleta de fevereiro de 2009, com a presença de espuma, não naturais, no leito do rio. A seta indica o acúmulo de espuma nas pedras.

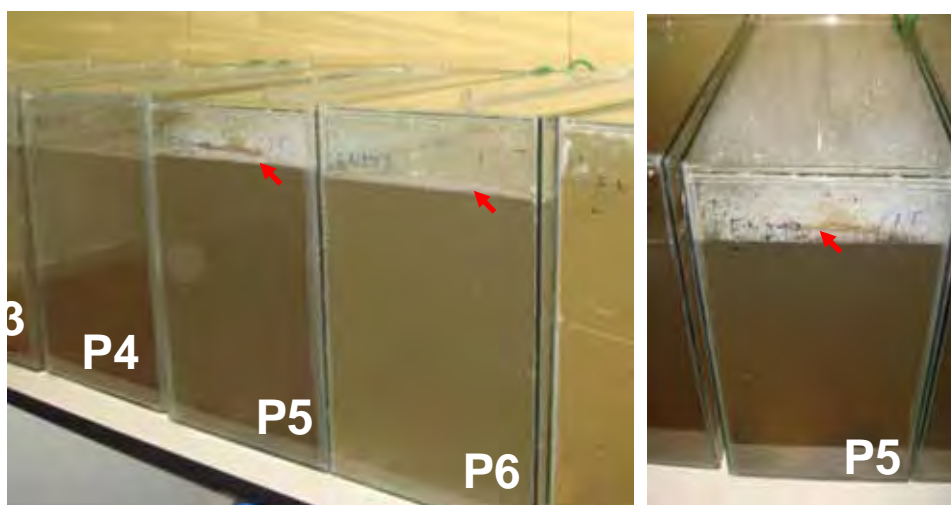


Figura 5: Fotos de águas coletadas, submetidas à aeração, para a realização dos experimentos com *Oreochromis niloticus* (coleta de agosto de 2009). Observar a formação de espumas sobre a superfície da amostra dos pontos 5 e 6 (setas).

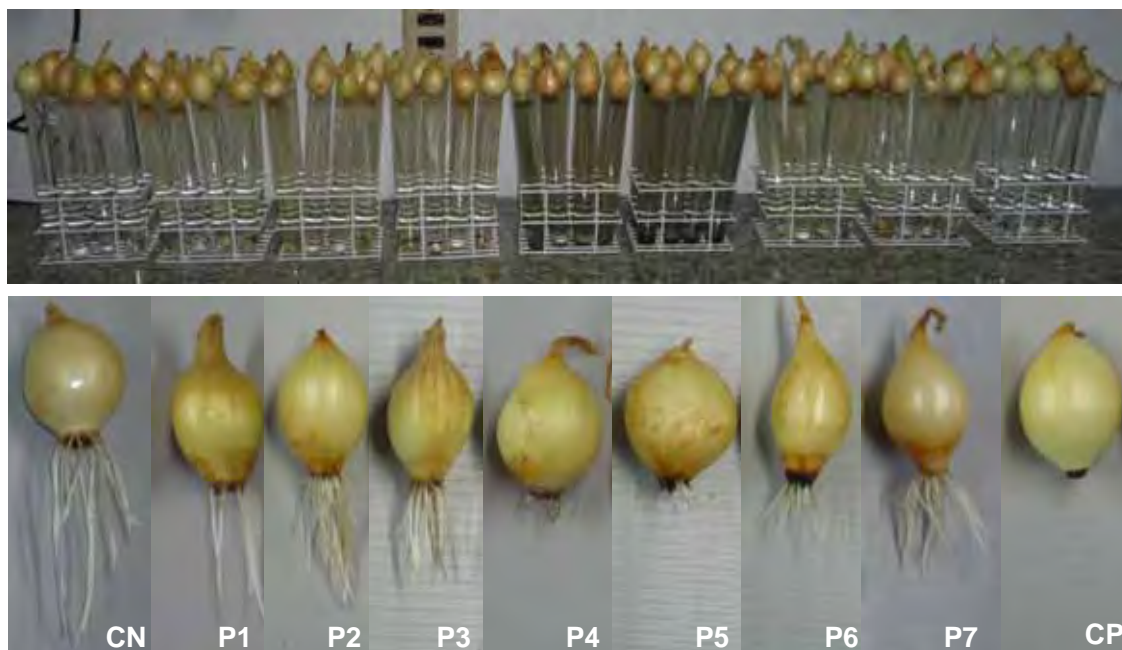


Figura 6: Desenvolvimento de raízes nos bulbos de *Allium cepa* expostos aos diferentes pontos de coleta (coleta de agosto de 2008). **CN:** controle negativo; **P1:** ponto 1; **P2:** ponto 2; **P3:** ponto 3; **P4:** ponto 4; **P5:** ponto 5; **P6:** ponto 6; **P7:** ponto 7, **CP:** controle positivo.

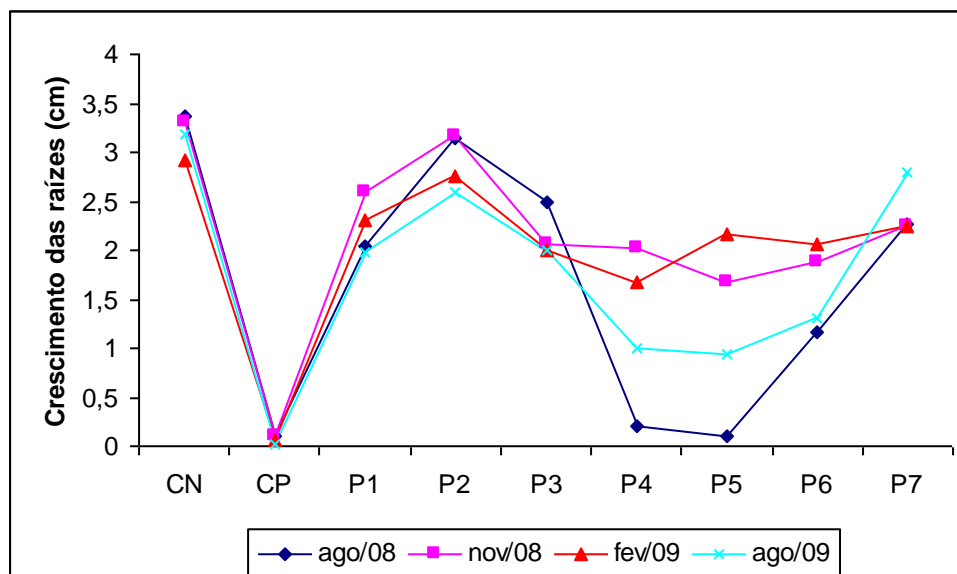


Figura 7: Média dos comprimentos das raízes de bulbos de *Allium cepa* expostos as amostras de água coletadas em agosto de 2008, novembro de 2008, fevereiro de 2009 e agosto de 2009. **CN:** controle negativo; **CP:** controle positivo; **P1:** ponto 1; **P2:** ponto 2; **P3:** ponto 3; **P4:** ponto 4; **P5:** ponto 5; **P6:** ponto 6 e **P7:** ponto 7.

5.3. ARTIGO 1: O uso do teste do micronúcleo e do ensaio do cometa em peixes para avaliações da contaminação de ambientes dulcícolas

Renata Caritá; Thaís Cristina Casimiro Fernandes; Maria Aparecida Marin-Morales

5.4. ARTIGO 2: Efeito genotóxico e mutagênico de amostras de águas coletadas em rios que recebem efluentes urbanos e industriais de um pólo ceramista por meio do sistema-teste *Allium cepa*

Renata Caritá; Maria Aparecida Marin-Morales

5.5. ARTIGO 3: Efeitos genotóxicos e mutagênicos de amostras de águas de rios que recebem efluentes urbanos e de indústrias cerâmicas, utilizando o organismo-teste *Oreochromis niloticus*

Renata Caritá; Maria Aparecida Marin-Morales

O uso do teste do micronúcleo e do ensaio do cometa em peixes para avaliações da contaminação de ambientes dulcícolas

Renata Caritá¹, Thaís 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

Um grande número de substâncias tóxicas, proveniente de diversas fontes, como efluentes industriais, drenagem agrícola, derrames acidentais de químicos, esgotos domésticos, entre outros, é lançado nos ambientes aquáticos. Nos últimos anos, vários bioindicadores têm sido usados em estudos de avaliação ambiental, conferindo uma ampla diversidade de análises capazes de ampliar os níveis de detecção do comprometimento ambiental, de forma mais rápida e segura, caracterizando-se em eficientes estratégias para a manutenção e conservação do meio ambiente. Os peixes são organismos muito utilizados nas avaliações de toxicidade ambiental, por apresentarem ampla distribuição geográfica, alta sensibilidade às mudanças ambientais e participarem de diferentes níveis tróficos. Desta forma, ensaios com peixes têm sido aplicados em programas de monitoramento, em testes laboratoriais de toxicidade e como indicadores biológicos da qualidade dos ambientes aquáticos em todo mundo. Historicamente, os principais *endpoints* utilizados para a avaliação de genotoxicidade ambiental tem sido as aberrações cromossômicas e nucleares e a formação de micronúcleo. Mais recentemente, a avaliação de danos no DNA pelo ensaio do cometa tem se mostrado, também, um método muito sensível e versátil para este fim. Os peixes têm sido usados como bioindicadores em vários estudos de avaliação da potencialidade tóxica das mais diversas classes de poluentes, como HPAs, metais pesados, agrotóxicos, entre outros agentes, bem como para avaliar o efeito de misturas complexas sobre os organismos expostos. Pelas vantagens da utilização de ensaios com peixes, na avaliação da contaminação ambiental, eles também têm sido amplamente utilizados nas avaliações dos impactos causados por agentes genotóxicos e mutagênicos.

Palavras-chave: recursos hídricos, genotoxicidade, mutagenicidade, biomonitoramento ambiental, anormalidades nucleares.

1. INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos são usados, em todo mundo, para diversas finalidades, como abastecimento de água, geração de energia, irrigação, navegação, aquicultura e harmonia paisagística [1]. Paradoxalmente, um grande número de substâncias tóxicas é lançado nesse ambiente, em decorrência das crescentes atividades industriais, agrícolas, de derrames acidentais de químicos, de esgotos domésticos, entre outros [2]. Além disso, recebem, indiretamente, agentes químicos provenientes das águas de chuva ou de substâncias carregadas pelo escoamento superficial dos solos, o que caracteriza os recursos hídricos como destino final de todos os resíduos decorrentes de ação antropogênica [3].

Desde a década de 70, pesquisadores e gestores de recursos hídricos da Europa Ocidental e América do Norte argumentam que as metodologias tradicionais de classificação de águas, baseadas em características físicas, químicas e bacteriológicas, não são suficientes para atender aos usos múltiplos da água [4]. Para a realização de avaliações eficientes, é de fundamental importância a aplicação de análises integradas, que associem respostas de metodologias tradicionais aos aspectos biológicos do sistema [5,6].

Nos últimos anos, tem sido intensificado o uso de ensaios com bioindicadores para as avaliações dos comprometimentos ambientais, sendo que os organismos mais adequados para esta análise são aqueles capazes de diferenciar as oscilações naturais (mudanças fenológicas, ciclos sazonais de chuva e seca) das variações decorrentes de estresses antrópicos [7]. Segundo Who [8], a aplicação de análises diversificadas em amostras ambientais pode auxiliar na detecção, mais rápida, dos impactos, proporcionando condições de evitar danos maiores ao ambiente. O uso de biomarcadores permite a identificação de interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos e a mensuração de efeitos sub-letais. Essa última característica identifica a necessidade de aplicação de ações tanto remediadoras como preventivas. Por esta razão, existe hoje um grande interesse em associar análises com biomarcadores às análises convencionais nos programas de avaliação da contaminação ambiental [9].

Os peixes são organismos muito utilizados nas avaliações de toxicidade ambiental, por apresentarem características especiais como, por exemplo, ampla

distribuição geográfica [10] e alta sensibilidade às mudanças ambientais. Somado a essas características, como participam de diferentes níveis tróficos, são importantes também para as avaliações do potencial de bioacumulação de um dado poluente, como os metais pesados e os compostos orgânicos [11]. Como os peixes fazem parte da alimentação humana, eles podem afetar, diretamente, a nossa saúde, o que torna o seu uso ainda mais atrativo para os programas de biomonitoramento da poluição aquática [12,13]. Desta forma, estes organismos têm sido amplamente utilizados em avaliações laboratoriais de toxicidade e como indicadores biológicos da qualidade de recursos hídricos [14].

Para que uma espécie de peixe possa ser considerada um bom organismo indicador da qualidade da água, ela deve ser residente, ou seja, não apresentar migração trófica ou reprodutiva, ser constante no ambiente e os espécimes selecionados para o experimento não devem apresentar displasias e/ou tumores/neoplasias externamente detectáveis nos tecidos analisados [15]. Sanchez-Galan et al. [16] acrescentam que, para que uma espécie seja ideal para estudos de genética toxicológica, é necessário que esta se encontre distribuída nos diversos ecossistemas; apresente alta sensibilidade na detecção de poluentes, mesmo quando estes estiverem presentes em baixas concentrações no ambiente; seja adequada para ensaios laboratoriais; e permita captura de indivíduos em populações naturais, sem o comprometimento da conservação da espécie.

Dentre os efeitos ou danos observados em peixes, decorrentes da exposição a poluentes ambientais, passíveis de serem quantificados e/ou qualificados estão: mutações genéticas, mudanças de comportamento, deformações e disfunções físicas (incluindo disfunções na reprodução), displasias, câncer ou tumores/neoplasias e morte [17].

Em peixes, os principais parâmetros utilizados como biomarcadores são: análises enzimáticas, produtos de biotransformação, avaliações de estresse oxidativo, avaliações hematológicas, imunológicas, reprodutivas, endócrinas, neuromusculares, fisiológicas, morfológicas e genéticas [18].

Muitas espécies de peixes são usadas como sentinelas para a avaliação da qualidade da água [19,20], por oferecer diversos parâmetros de avaliação. Os parâmetros genéticos, que são indicados para a identificação dos efeitos dos poluentes e para a avaliação das alterações do potencial tóxico ou genotóxico dos

contaminantes, oferecem importantes informações sobre a característica ambiental, após um impacto sofrido [9]. Quando um organismo se expõe a um agente genotóxico, ele pode sofrer alterações no material genético, observáveis sobre dois aspectos: a. presença de aberrações cromossômicas estruturais e b. alterações na expressão gênica, devido a mutações decorrentes de dano no DNA, fato este que pode demandar um longo período de tempo para se expressar [21].

Segundo Kligerman [22], os primeiros pesquisadores a utilizarem peixes na avaliação de efeitos mutagênicos de agentes químicos foram Tsoi (1970, 1974) e Longwell (1976), sendo este último o primeiro a usar a análise citogenética para avaliar danos cromossômicos de peixes coletados em ambientes poluídos.

O teste do micronúcleo e anormalidades nucleares e o ensaio do cometa são importantes ferramentas utilizadas para avaliar danos no material genético de organismos expostos a substâncias químicas com potencialidade genotóxica e mutagênica, sendo que estes testes são aplicados, com sucesso, em espécies peixes.

2. ANÁLISES DE DIFERENTES *ENDPOINTS*, UTILIZANDO PEIXE COMO BIOINDICADOR

2.1. Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo é um ensaio citogenético comumente usado em vários sistemas biológicos, para o monitoramento de genotoxicidade ambiental [23].

Os micronúcleos são massas de cromatina citoplasmática com o aspecto de pequenos núcleos, constituídos principalmente por fragmentos cromossômicos ou por cromossomos inteiros que se atrasam durante a migração anafásica e que são detectados em células interfásicas, mediante técnicas simples de coloração, aparecendo no citoplasma como pequeno fragmento basófilo [24] (Fig.1). O MN derivado de perda cromossômica se dá devido a um evento aneugênico relacionado ao aparelho mitótico, enquanto o MN derivado de fragmentos cromossômicos ocorre após quebras cromossômicas, devido a um evento clastogênico. Os micronúcleos podem ser vistos em qualquer tipo de célula, tanto somática como germinativa [25].

São considerados micronúcleos clássicos, as estruturas circulares de mesma refração que o núcleo, não ligadas a esse e com um tamanho correspondente a 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula. No caso específico dos peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos seus cromossomos, a proporção de tamanho passa para a faixa de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo [26] (Fig.2).

O teste do micronúcleo foi originalmente desenvolvido para mamíferos, mas foi, subsequentemente, modificado para aplicação em peixes [26-29]. Este teste é aplicável em peixes marinhos e de água doce e, além de serem avaliados em eritrócitos, podem também ser analisados em células de rim, fígado e brânquias [30].

Vários estudos têm mostrado que eritrócitos de peixes têm alta incidência de micronúcleos, após exposição a diversos poluentes sobre condições de campo [31-33] e de laboratório [34-38].

Em geral, para a realização do ensaio do micronúcleo, podem ser amostradas células de vários tecidos como brânquias e epitélio [38], fígado [39], rim [10,40,41] e sangue periférico [40-48]. No entanto, Hayashi et al. [30] afirmam que células de brânquias são mais sensíveis a agentes indutores de micronúcleos do que as células hematopoiéticas.

A aplicação do teste do micronúcleo em eritrócitos de peixe é muito popular. Os tecidos de proliferação de eritrócitos estão localizados nos órgãos hematopoiéticos, sendo que, nos peixes, o rim anterior é o principal deles. O timo e o endotélio do coração e dos vasos sanguíneos são os locais de menor atividade hematopoiética [49]. Segundo Schlegel e MacGregor [50], enquanto os eritrócitos micronucleados dos órgãos hematopoiéticos refletem um dano genotóxico que ocorreu durante um tempo equivalente ao ciclo celular, os da circulação periférica refletem eventos que ocorreram em um tempo igual ao da vida útil dos eritrócitos circulantes. Portanto, a aplicação do teste do micronúcleo em amostras de sangue periférico é especialmente indicada para as condições de exposição crônica. Este é o caso, por exemplo, de estudos ecotoxicológicos, *in situ*, utilizando tanto espécies marinhas como de água doce.

Os peixes são sensíveis aos efeitos de contaminantes ambientais, sendo que algumas espécies respondem de maneira similar à resposta dos mamíferos [26], podendo, então, ser usados para avaliar possíveis propriedades genotóxicas de

agentes físicos e químicos. Os ensaios de micronúcleo em peixes têm se mostrado bem adequados, quando usados para a avaliação do potencial genotóxico de várias substâncias como a aflatoxina B1, as bifenilas policloradas - PCBs [42], o benzo[a]pireno [42,45], o cádmio [10], o cromo [43,46], o mercúrio e o selênio [43], a mitomicina C [40,44], a ciclofosfamida [10] e o raio-X [44].

O teste do micronúcleo não consiste na mera observação das frequências de eritrócitos micronucleados, mas no estudo das variações destas frequências. Normalmente, a comparação é feita entre os animais "controle" e os animais de laboratório expostos a agentes tóxicos; animais de locais poluídos com os de área protegida; ou, finalmente, peixes que vivem à jusante de uma fonte de poluição, com aqueles que vivem à montante [25].

Estudos de micronúcleos realizados com peixes de laboratório requerem um conhecimento prévio da cinética de hematopoiese destes organismos. Desta forma, deve ser considerada a duração do ciclo celular de eritroblastos, o tempo necessário para a sua maturação e aparecimento na circulação e a vida útil dos eritrócitos. É provável que o ciclo celular sofra variações entre as espécies e, como os peixes são animais pecilotérmicos, este depende também da temperatura da água. Quando as células atingem a fase de reticulócitos (conhecido em mutagênese como eritrócitos policromáticos), eles são liberados na circulação periférica, onde irão amadurecer para eritrócitos normocromáticos [25].

Segundo a revisão acima citada, parece que ocorre um pico de eritrócitos micronucleados entre 1-5 dias após a exposição a um agente genotóxico, sendo que, na maioria das espécies, este pico parece ocorrer entre segundo e terceiro dia [25]. As frequências de micronúcleos observadas em eritrócitos policromáticos de sangue periférico são análogas às frequências obtidas em rim anterior, diferentemente das frequências de micronúcleos de eritrócitos normocromáticos circulantes [49].

As alterações na hematopoiese podem também alterar as respostas do teste do micronúcleo, caracterizando um possível fator de confusão na interpretação dos resultados. Vários agentes genotóxicos, em determinadas concentrações, possuem propriedades citotóxicas, resultando em uma parada da eritropoiese. Assim, não só a produção de eritrócitos é afetada, como também a dos eritrócitos micronucleados, o que pode levar a um falso resultado negativo. Por outro lado, se o sangue de

animais de laboratório é amostrado com muita frequência, a eritropoiese é estimulada, resultando em um grande aumento de eritrócitos policromáticos na circulação periférica. Desta forma, os eritrócitos micronucleados, anteriormente formados, são diluídos, com uma diminuição da sua frequência [25].

Os parâmetros do sangue são considerados indicadores fisio-histopatológicos do corpo inteiro e, conseqüentemente, é um importante diagnóstico das condições estruturais e funcionais do peixe exposto a uma determinada substância tóxica [51]. Porém, a ausência de estudos sobre a caracterização de células sanguíneas e de outros valores hematológicos, em diferentes espécies de peixes, provavelmente, seja a maior barreira para se usar esta ferramenta na investigação do efeito de contaminantes nestes animais, assim como a escassez de métodos padronizados, diferenças entre sexo e idade, qualidade da água e métodos de captura, podem ser variáveis que dificultam a interpretação dos resultados. Por esta razão, é difícil a comparação de resultados obtidos entre diferentes espécies e entre diferentes situações de estudos [52].

Devido a sua importância, o teste do micronúcleo em organismos aquáticos necessita ainda de maiores esclarecimentos. No entanto, por ser um método de fácil e rápida execução, o teste de micronúcleo, em peixes, é considerado mais adequado para estudos de mutagênese ambiental do que a contagem de aberrações cromossômicas durante a metáfase [25].

2.2. Anormalidades Nucleares

Foram encontradas em muitos trabalhos variações na morfologia nuclear de eritrócitos de peixes [28,53,54], que são interpretadas por Ayllon e Garcia-Vasquez [37] como lesões nucleares análogas aos micronúcleos. Alguns autores afirmam que essas anormalidades são induzidas por compostos genotóxicos [28,37,55-59].

Alterações morfológicas no envoltório nuclear de eritrócitos de peixe foram descritos por Carrasco et al. [29] como “blebbed” (núcleos que apresentam uma pequena evaginação nuclear, que parece conter cromatina), “lobed” (núcleo que apresenta uma evaginação maior que os núcleos em “blebbed”) e “notched” (núcleo que apresenta uma invaginação pronunciada) e alterações nucleares como núcleos

vacuolizados (núcleo que apresenta uma região desprovida de material genético – vacúolo) e micronúcleos, que podem ser únicos ou múltiplos no citoplasma (Fig.3).

Recentemente, tem sido dada considerável atenção à expressão simultânea de anormalidades nucleares, tais como brotos nucleares e “blebbeds” e a indução de micronúcleos [38,46,59,60]. Tem sido sugerido que problemas na segregação dos cromossomos ou a amplificação de genes, por meio de quebra-fusão-ponte, poderiam causar núcleos do tipo “lobed” ou “blebbed” durante a eliminação do DNA amplificado do núcleo [61-63]. Contudo, ainda não é totalmente esclarecido o mecanismo de formação dessas alterações nucleares, sendo necessárias, para a avaliação dessas hipóteses, informações que ofereçam evidências adicionais às já conhecidas [38]. Mesmo assim, estudos indicam que as anormalidades nucleares são induzidas em resposta a exposição a contaminantes [40,61,64-66].

2.3. Ensaio do cometa

Estudos de genotoxicidade ambiental, utilizando peixes como bioindicador, têm oferecido um especial suporte para as investigações de contaminantes genotóxicos que possam alterar o sucesso reprodutivo, os padrões genéticos e a dinâmica populacional de organismos expostos à poluição [67,68]. Historicamente, os principais *endpoints* utilizados para a avaliação de genotoxicidade ambiental têm sido as aberrações cromossômicas, as trocas entre cromátides-irmãs e a formação de micronúcleo [69-72]. Mais recentemente, a avaliação de danos no DNA pelo ensaio do cometa tem se mostrado um método muito sensível e versátil para este fim.

O ensaio cometa é uma técnica capaz de detectar danos de DNA em células individuais. É um teste muito utilizado, pela facilidade de aplicação; por ter baixo custo; pelo tempo reduzido para obtenção de resultados; e por permitir a detecção de danos diretos no DNA [73]. São utilizados dois protocolos principais para execução do ensaio do cometa, onde a variação se dá, basicamente, pela diferença do pH utilizado no teste (versão neutra e versão alcalina) [74]. Östling e Johanson [75] foram os primeiros a desenvolver a técnica de eletroforese em microgel para detectar danos no DNA em célula individual, sob condições de pH neutro. Subseqüentemente, Singh et al. [76] desenvolveram uma técnica de microgel que

envolve eletroforese sob condições alcalinas (pH 13). Com a elevação do pH, a sensibilidade do teste foi aumentada, podendo-se visualizar, além das quebras de fita dupla e *crosslink*, visualizadas na versão neutra, as quebras de fita simples e os sítios álcali-lábeis [74,77,78]. A partir de então, tem sido usada, em peixes, a versão alcalina do ensaio do cometa para estudos de monitoramento *in situ* e em laboratórios, para avaliar a genotoxicidade de contaminantes ambientais [79-81] (Fig. 4 e 5).

Estudos recentes realizados em peixes submetidos a condições experimentais mostraram diferentes conclusões, quanto à eficiência do ensaio cometa como biomarcador. Lopes-Poleza [82], trabalhando com *Hoplias malabaricus* submetida à água contaminada com metilmercúrio (MeHg), não observou diferença significativa entre o grupo tratado com MeHg e o grupo controle. Bombail et al. [32] estudando eritrócitos de peixes contaminados com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, observaram diferença significativa entre o grupo controle e os grupos contaminados. Ferraro et al. [83] aplicaram o ensaio cometa para testar dois contaminantes diferentes, o TBT (Tributiltin) e o chumbo, também em *H. malabaricus*. Os autores não encontraram diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com TBT, porém, para os peixes tratados com chumbo foi encontrada diferença entre os grupos. As explicações para tais diferenças podem ser várias, desde dosagem do químico a que o animal foi submetido, o que faz com que este não provoque danos diretos ao DNA e às proteínas do sistema de reparo [83], ou ainda, diferenças na idade e no sexo dos peixes expostos [82].

O ensaio do cometa foi eficiente para a avaliação de danos no DNA promovidos por contaminantes ambientais, tanto em peixes marinhos como dulcícolas, porém, estes estudos enfatizam que comparações entre áreas contaminadas devem ser feitas com cautela, pois não são fáceis de serem realizadas [84].

3. A APLICAÇÃO DE PEIXES COMO BIOINDICADORES PARA DETECÇÃO DE DIFERENTES CLASSES DE POLUENTES AMBIENTAIS

3.1. Agrotóxicos

A potencialidade da contaminação ambiental pode ser confirmada pelo número de substâncias químicas relacionadas com as atividades urbanas e agrícolas presentes nos ambientes aquáticos [46,85]. Dentre estes químicos, os agrotóxicos se destacam, por serem substâncias biocidas utilizadas para exterminar formas de vida consideradas praga para os humanos. Assim, não há agrotóxico inofensivo, e, por isso, são considerados importantes poluentes dos ambientes aquáticos [46,85]. Nesse grupo muito diversificado de compostos químicos incluem-se alguns fungicidas, inseticidas e herbicidas extremamente detrimental para o meio ambiente e para a saúde humana [86].

Os peixes e invertebrados aquáticos podem acumular os agrotóxicos em concentrações muito mais elevadas que aquelas encontradas nas águas, por meio de compostos que se bioacumulam [87]. As taxas de bioacumulação destes químicos vão depender da associação do químico com a cadeia alimentar, da sua persistência na água e das suas características físicas e químicas [48,88]. Segundo Frankart et al. [89], contaminações das águas por agrotóxicos, dissolvidos ou adsorvidos nas partículas do solo, podem afetar os organismos aquáticos.

Ensaio de micronúcleo e cometa realizados com *Oreochromis niloticus* por Ventura et al. [48], para avaliar o potencial mutagênico e genotóxico do herbicida atrazina, mostraram que esta substância, nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25µg/L, induziu micronúcleos em eritrócitos, sendo capaz de causar fragmentação no DNA. Com os dados obtidos, foi possível inferir que dosagens residuais do herbicida atrazina, resultante da lixiviação de solos de culturas próximas aos recursos hídricos, podem interferir negativamente na estabilidade dos ecossistemas aquáticos, sobretudo no material genético dos peixes.

Ali et al. [90] avaliaram o efeito do organofosforado chlorpirifo (CPF), utilizando a espécie *Channa punctatus* como organismo teste. Os resultados mostraram que a espécie é bastante sensível aos efeitos do químico, uma vez que todas as concentrações e tempos de exposição testados promoveram danos no DNA e micronúcleos nos eritrócitos. A avaliação de danos no DNA, utilizando

linfócitos e células de brânquias, feita pelo ensaio do cometa, mostrou que a promoção de danos foi maior após o quinto dia de exposição, seguido de um gradual declínio para os dias subseqüentes.

Estudos realizados com amostras de águas do Rio Morcille (França), contaminado por uma mistura de agrotóxicos, utilizados por três anos consecutivos em vinhedos, mostrou, por meio do ensaio do cometa em eritrócitos circulantes, uma resposta pronunciada de danos no DNA, indicando uma alta sensibilidade da espécie *Salmo trutta fario* e um alto nível de exposição aos compostos genotóxicos presentes neste rio [91]. Posteriormente, foram realizados estudos com espécimes de *Phoxinus phoxinus* expostos a água corrente contaminada com uma mistura de diuron e azoxystrobyn, dois dos principais pesticidas encontrados nas águas do rio Morcille. Os autores verificaram um aumento de danos no DNA de três a cinco vezes, quando comparados ao controle, após a exposição crônica dos peixes às concentrações ambientais dos pesticidas (1-2µg/L de diuron e 0,5-1µg/L de azoxystrobyn). Após um mês de exposição, o dano no DNA dos peixes voltou ao nível basal, sugerindo possível envolvimento dos mecanismos de reparo e/ou processos de morte celular [91].

Estudos realizados por Cavalcante et al. [92] revelaram que 10µg/L de Roundup® foi suficiente para promover danos significativos no DNA, quando avaliaram eritrócitos e células de brânquia da espécie *Prochilodus lineatus*, após seis horas de exposição ao agrotóxico. Contudo, após 24 horas de exposição, os eritrócitos voltaram a apresentar níveis basais de danos. Já nas células das brânquias, após 24 horas de exposição, o dano no DNA aumentou em relação ao controle negativo. Dessa maneira, os autores sugerem que a diferença verificada entre os eritrócitos e as células das brânquias pode estar relacionada com o fato das células de brânquias terem um sistema de reparo mais lento que os eritrócitos e, conseqüentemente, haver uma maior promoção de dano nestas células. No entanto, Çavas e Könen [93] verificaram um aumento dose dependente de micronúcleos, anormalidades nucleares e danos no DNA, quando expuseram o peixe *Carassius auratus* a três doses do Roundup® (5, 10 e 15 ppm), em intervalos de 48, 96 e 144 horas.

Könen e Çavas [94] avaliaram os efeitos genotóxicos do herbicida trifluralina (concentrações de 1, 5 e 10 µg/L), por meio do teste do micronúcleo em eritrócitos

de *O. niloticus*. Após exposição dos organismos, os autores observaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos em todos os tratamentos com trifluralina, indicando o potencial genotóxico deste herbicida para peixes.

3.2. Metais pesados

Entre os poluentes mais prejudiciais ao ecossistema estão os metais pesados. Estes elementos, que existem naturalmente no ambiente, são necessários em concentrações mínimas para a manutenção da saúde dos seres vivos. No entanto, se as concentrações desses metais excederem às necessidades metabólicas, poderão induzir efeitos celulares deletérios.

Nos últimos anos, tem aumentado, drasticamente, as emissões de metais pesados no ambiente, causando impactos severos nos ecossistemas. As principais atividades responsáveis pela contaminação por metais pesados são as atividades industriais, agrícolas e urbanas [95]. Um dos efeitos mais drásticos da contaminação ambiental por metais pesados é a bioacumulação e biomagnificação dos poluentes pelos organismos vivos [96]. A bioacumulação é o acúmulo de qualquer substância química nas células em concentrações mais elevadas que as encontradas no meio. A bioacumulação pode ser direta, quando a absorção orgânica se dá diretamente dos compostos presentes no ambiente, sendo denominada bioconcentração, ou indiretamente pela alimentação, denominada biomagnificação [97].

Animais e plantas podem concentrar os metais em níveis extremamente superiores aos encontrados no ambiente. Este acúmulo pode possibilitar o transporte dos contaminantes para diversos níveis da cadeia alimentar. Este efeito culmina na ocorrência das altas taxas de contaminação nos níveis mais altos da teia trófica [96]. A contaminação dos ecossistemas aquáticos com metais pesados tem chamado à atenção de pesquisadores do mundo todo, que vêm avaliando, constantemente, os efeitos e modo de ação desses contaminantes sobre os organismos vivos [98,99].

Dentre os metais lançados no ambiente, o mercúrio é o que tem o maior potencial tóxico. De todos os metais pesados, o mercúrio e, em menor escala o cádmio, foram os responsáveis por graves acidentes de contaminação ambiental [82].

As formas inorgânicas do mercúrio, ao atingirem os ambientes aquáticos, podem sofrer reações, principalmente por microorganismos, resultando em compostos organomercuriais, como o metilmercúrio, que são mais tóxicos que as formas inorgânicas. O metilmercúrio é facilmente absorvido por peixes e outros animais aquáticos, o que leva a uma deposição e acúmulo dessa substância nos tecidos destes organismos. A principal via de acesso do mercúrio em humanos se dá pela ingestão de organismos aquáticos contaminados, particularmente peixes. Desta forma, o metilmercúrio acaba sendo a forma química normalmente ingerida pelo homem [82].

Ayllon e Garcia-Vasquez [37], estudando os efeitos do nitrato de mercúrio em *Phoxinus phoxinus* e *Poecilia latipinna*, obtiveram resultados diferentes para estas duas espécies. O nitrato de mercúrio se mostrou altamente genotóxico para *P. latipinna*, uma vez que baixas doses do metal (0,17mg/Kg) já foram capazes de induzir freqüências significativas de micronúcleos e anormalidades nucleares. Em contraste, não foram detectadas freqüências significativas dessas alterações para *P. phoxinus* tratados com as mesmas doses. Segundo os autores, a diferença interespecífica observada pode ser atribuída à maior sensibilidade do *P. latipinna* ao mercúrio. A ausência de resposta à ação do mercúrio na espécie *P. phoxinus* também foi relatada por Sanchez-Galan et al. [54]. Sendo assim, *P. latipinna* se mostrou uma espécie alvo válida para realização de testes de genotoxicidade com metais pesados.

Ensaio *in vitro* realizados por Al-Sabti [100], com a espécie *Carassius gibelio*, mostraram que compostos de mercúrio são genotóxicos para esta espécie, enquanto que ensaios *in vivo* (em exposições direta e indireta) mostraram genotoxicidade destes compostos para as espécies *Boleophthalmus dussumieri*, *P. phoxinus* e *Salmo trutta* [54,101].

Os altos níveis de mercúrio encontrados no rio Madeira (Amazônia-Brasil), decorrentes tanto de intensa atividade de mineração na região como de processos biogeoquímicos [102,103], mostraram, segundo Porto et al. [24], efeitos genotóxicos para três espécies de peixes da Amazônia. O efeito genotóxico foi avaliado por meio do teste do micronúcleo, realizado com peixes coletados em dois rios da bacia Amazônica, o rio Madeira (área poluída) e o rio Solimões (área não poluída). A freqüência de micronúcleos nas espécies *Prochilodus nigricans* (peixe detritívoro),

Mylossoma duriventris (peixe onívoro) e *Hoplias malabaricus* (peixe piscívoro) do rio Madeira foi significativamente superior às frequências das mesmas espécies do rio Solimões. Segundo os mesmos autores, a frequência de micronúcleos nas espécies piscívoras foi quase cinco vezes maior que as espécies detritívoras ou onívoras. O autor sugere que a maior frequência de micronúcleos observada em *H. malabaricus* deve estar relacionada com a poluição por mercúrio, uma vez que estes peixes são carnívoros e estão sujeitos aos efeitos de biomagnificação, além deles também habitarem pequenos riachos onde o baixo pH e condutividade favorecem a produção e bioacumulação do metilmercúrio [24].

Experimentos realizados por Sanchez-Galan et al. [104] verificaram que os metais pesados Cd e Hg, quando injetados intra-peritonealmente, promovem a indução de micronúcleos em enguias (*Anguilla anguilla*). No entanto, experimentos com espécies coletadas nos locais contaminados por esses metais não mostraram resultados significativos, quanto à indução dessas alterações. Desta forma, os autores relatam que, apesar dos compostos serem comprovadamente genotóxicos para peixes, a espécie *A. anguilla* não se mostrou sensível para detecção de poluição *in situ* em ecossistemas de água doce.

Ayllon e Garcia-Vasquez [37] verificaram que as espécies *P. phoxinus* e *P. latipinna* foram sensíveis aos efeitos do cádmio injetado intraperitonealmente, apresentando índices significativos de anormalidades nucleares, mas não de micronúcleos. O mesmo potencial genotóxico do cádmio foi verificado também por outros autores para *O. mykiss* [105], *O. niloticus* [106] e *Salmo trutta* [54].

A exposição ao cádmio, pelo método de imersão (20 e 40 ppm em aquários), também mostrou efeitos genotóxicos, pela indução de micronúcleos em *S. trutta*, *A. anguilla* e *P. phoxinus*, três espécies que habitam ecossistemas de água doce [10]. Também foi possível verificar que das três espécies, *Salmo trutta* é mais indicada para ensaios de biomonitoramento, uma vez que se mostrou mais sensível aos compostos testados [10].

Talapatra e Banerjee [107] analisaram a frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de brânquias e de rins do peixe *Labeo bata* que se desenvolvem em pisciculturas de Calcutá, e que utilizam esgoto sem pré-tratamento como fonte de alimento. Estes esgotos são contaminados com vários metais, dentre eles Cr, Zn, Cu, Pb, Mn e Fe. Neste estudo foram notificadas altas

freqüências de micronúcleos e de anormalidades nucleares nos eritrócitos das brânquias e dos rins dos peixes expostos.

Estudos realizados por Matsumoto et al. [46] com águas de rios que recebem efluentes de curtume contaminados com cromo mostraram que o cromo, na concentração de 0,01 mg/L em água, induziu alterações nucleares e micronúcleos em eritrócitos circulantes, além de promover quebras no DNA, observadas pelo ensaio do cometa. A Legislação ambiental brasileira e a OMS aceitam contaminações dos recursos hídricos por cromo de até 0,05 mg/L, concentração esta cinco vezes maior do que a considerada mutagênica no trabalho acima citado.

No estudo realizado por Cestari et al. [108], para avaliar danos genéticos promovidos pelo chumbo, as presas da espécie *H. malabaricus* foram contaminadas com uma solução de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, por meio de injeção intraperitoneal. O volume da solução injetado na presa foi ajustado para que a dose ingerida pelos predadores fosse de $21\mu\text{gPb}^{+2}/\text{g}$ de peso. Foram oferecidos aos indivíduos da espécie *H. malabaricus*, como única fonte de alimento, presas previamente contaminadas com chumbo. Esses espécimes foram expostos por 64 dias e, durante esse período, receberam 13 doses da solução de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ incorporadas ao alimento. Após o tratamento, foram coletadas amostras de sangue de *H. malabaricus* para a realização do ensaio do cometa. Os resultados mostraram uma indução de danos genéticos nos organismos expostos ao metal. Experimentos semelhantes realizados por Ferraro et al. [83] mostraram que espécimes de *H. malabaricus*, expostos ao chumbo pela alimentação com *Astyanax* contaminados, apresentaram um aumento significativo de dano no DNA, quando analisados pelos ensaios do cometa e de anormalidades nucleares dos eritrócitos. Contudo, não foi observada a indução significativa de micronúcleo nos peixes testados. Estes estudos mostraram que o ensaio do cometa foi eficiente na detecção de danos no DNA, promovidos pela exposição crônica de Pb^{+2} , e que a espécie *H. malabaricus* pode ser um eficiente modelo natural para monitoramento dos efeitos do chumbo [83,108].

3.3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)

Ao longo dos anos, a indústria petrolífera vem sendo considerada uma das grandes fontes de energia para o planeta, sendo caracterizada como uma atividade

essencial para a manutenção do estilo de vida de grande parte da população humana.

O petróleo bruto é uma mistura complexa de vários hidrocarbonetos, compostos de nitrogênio e oxigênio e metais pesados, sendo que a quantidade de componentes depende da área de extração do mesmo [109]. O petróleo pode ser transformado em diversos produtos como, por exemplo, os combustíveis. A toxicidade do petróleo e seus derivados é principalmente atribuída as partículas solúveis [110], que contém compostos polares de baixo peso molecular, como os hidrocarbonetos monoaromáticos (HMAs) (benzeno, tolueno e xileno) e pequenos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) [111].

Os derivados do petróleo são utilizados em diversas atividades por todo o planeta [112], necessitando, assim, de diversos meios de transporte para chegarem aos seus destinos finais. Desta forma, justifica-se a preocupação global que se tem com os impactos que os derrames de óleo possam causar nos ecossistemas aquáticos, pois, nestas contaminações, uma grande quantidade de hidrocarbonetos aromáticos é depositada no ambiente, podendo alterar a vida de toda a biota associada [113].

Os peixes podem entrar em contato com os derivados do petróleo por diferentes vias. As principais vias de contaminação destes organismos se dão pela respiração (por meio de trocas gasosas e iônicas, via brânquias) e pela alimentação, que ocorre entre os diversos níveis tróficos [114]. A biotransformação de HPAs pelos peixes promove o aparecimento de compostos intermediários com potencial de toxicidade aguda, o que pode levar os organismos à morte [3,115,116], e potencial genotóxico, que pode induzir danos no material genético dos indivíduos expostos [116].

Alguns trabalhos têm mostrado os efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo em peixes de água doce, pela detecção de quebras da fita e formação de adutos do DNA [81], aumento na quantidade de micronúcleos [117], assim como a indução de anormalidades nucleares [118].

Estudos realizados com petróleo bruto mostraram que este composto induz uma série de alterações genéticas e teratogênicas em peixes. Beršienė et al. [46] observaram alta indução de micronúcleo e brotos nucleares nos peixes da espécie

Perca fluviatilis L., após dez dias de tratamento com 0,5ppm de petróleo bruto. Contudo, a exposição a 1ppm de petróleo bruto mostrou uma baixa indução de genotoxicidade (micronúcleos e brotos nucleares) na espécie estudada. Hose e Brown [119] relataram que os HPAs, derivados do derrames de óleo em Prince William Sound (março de 1989), promoveram aberrações anafásicas em embriões de peixes. Longwell [120] observou maiores frequências de aberrações cromossômicas e malformações em embriões de *Gadus morhua* e *Pollachius virens* coletados em área de derrames de petróleo do que de regiões não impactadas por este composto. Assim também, elevados níveis de micronúcleos foram detectados em *Platyichthys flesus*, oito meses depois do derrame no terminal Büttingé no mar Báltico [121].

Estudos realizados por Oliveira-Martins e Grisolia [122] detectaram, por meio do teste com a espécie *O. niloticus*, genotoxicidade para efluentes de oito postos de gasolina de Brasília – DF (Brasil). Os efluentes não induziram a formação de micronúcleos em eritrócitos, mas aumentaram os índices de anormalidades nucleares e de mortalidade dos peixes. Os resultados indicam que o pré-tratamento realizado com os efluentes dos postos de gasolina, antes da descarga no sistema de esgoto, não foi totalmente eficaz, pois o efluente ainda continha compostos tóxicos que foram detectados nos organismos expostos.

Estudos realizados por Vanzella et al. [123], utilizando-se da técnica de micronúcleo e cometa, mostraram que compostos de uma solução fracionada de diesel e água (DWSF) induziram danos genotóxicos em peixes da espécie *Prochilodus lineatus*. Os autores expuseram os organismos-teste à solução (DWSF) por 6, 24, 96 horas e 15 dias, simulando um derrame de petróleo em condições tropicais. Este estudo mostrou altos índices de nucleóides com dano, para o teste do cometa, em todos os tratamentos. Outros estudos realizados com o teste do cometa em organismos aquáticos, para avaliação do comprometimento de recursos hídricos contaminados por petróleo, demonstraram que os compostos derivados de petróleo também induziram altos índices de danos no DNA [32,115,124,125].

Segundo Shailaja et al. [126], o nitrito é capaz de aumentar a toxicidade de HPAs, tornando-os mais hepatotóxico. Os autores trataram indivíduos da espécie *Oreochromis mossambicus* com nitrito; com fenantreno, seguido de exposição a águas com e sem nitrito. Após seis dias de exposição, foi realizado o ensaio do

cometa com células do fígado destes peixes. Os autores verificaram dano no DNA de, aproximadamente, 92% das células dos indivíduos submetidos ao fenantreno e ao nitrito, enquanto que os peixes expostos somente ao nitrito apresentaram cerca de 9% e os somente ao fenantreno 23%.

A avaliação do impacto da contaminação da água do mar da região da Estação Brasileira Comandante Ferraz (Baía do Almirantado) na Antártica e, conseqüentemente, dos organismos marinhos expostos, é complexa, uma vez que a água do mar desta região contém misturas complexas de poluentes, tais como HPAs e efluentes de esgoto [127]. A estação Comandante Ferraz é a principal fonte de HPAs do local, devido ao transporte e ao uso de combustível nesta área [128]. Foi aplicado o teste do micronúcleo e de outras anormalidades nucleares em eritrócitos do peixe *Trematomus newnesi*, para analisar o potencial genotóxico de águas coletadas na Antártica, nas proximidades da estação. Espécimes que foram coletados em um local sem contaminação foram expostos, em laboratório, durante sete dias, às águas coletadas em diversos pontos: Ponto Plaza, distante da estação e presumidamente livre de poluentes (grupo A); em frente aos tanques de combustível (grupo B); e em frente à descarga de águas residuais (grupo C). Foram observados micronúcleos e outras anormalidades nucleares para todos os pontos avaliados, sendo que a indução de micronúcleo foi estatisticamente significativa nos grupos B e C, quando comparados ao grupo controle [127]. Neste mesmo estudo, foram realizados ensaios com exposição *in situ*, onde os peixes foram mantidos, por 12 dias, em gaiolas submersas nos mesmos pontos. A análise dos dados mostrou a ocorrência das anormalidades nucleares e de micronúcleos para todos os ensaios realizados e, novamente, indicou índices estatisticamente significativos de micronúcleos para o ponto C, quando comparados ao grupo controle. Os autores concluíram, baseados em ambos os testes realizados, que as águas próximas ao tanque de combustível e à descarga de águas residuais da estação brasileira na Antártica induziram a formação de micronúcleos e outras anormalidades nos peixes da espécie *T. newnesi* [127].

3.4. Outros agentes

Atualmente, não é possível quantificar e qualificar todos os compostos produzidos pelas atividades humanas, mas é estimado que cerca de 70.000

substâncias foram introduzidas no meio ambiente sem que se tenha estudado, devidamente, os seus efeitos sobre os organismos expostos e que, aproximadamente, 500 novos compostos sejam lançados anualmente no ambiente.

O nonilfenol etoxilato (NPE) é um composto químico usado na produção de surfactantes não-iônicos, lubrificantes, polímeros de estabilização, antioxidantes, detergentes, tintas e na formulação de vários agrotóxicos, como inseticidas e herbicidas. Este agente tem sido encontrado em ambientes aquáticos, particularmente em sedimentos, esgotos e águas de rios [129,130]. No ambiente aquático, ocorre a decomposição do NPE em 4-nonylphenol (NP), que é um composto químico mais estável e persistente [131-134]. Estudos realizados por Rivero et al. [20] mostraram que as concentrações de 1µL/L, 10µL/L, 16µL/L de NP não apresentaram genotoxicidade e mutagenicidade para *O. niloticus*, quando realizados os testes de micronúcleo e do cometa. Contudo, segundo os autores, foram observados altos índices de citotoxicidade da NP nos eritrócitos periféricos de *O. niloticus* tratados com as concentrações de 10 e 16µL/L, pelo aumento da frequência de anormalidades nucleares.

Diekmann et al. [135] expuseram a espécie *Danio rerio* (zebrafish) em diversas concentrações de 4-nitro-1-óxido-quinoline (NOQ). Após exposição, os hepatócitos e células das brânquias foram submetidos ao ensaio do cometa e os eritrócitos circulantes ao teste do micronúcleo. Os resultados do ensaio do cometa mostraram um aumento dose dependente dos índices de danos. O teste do micronúcleo também revelou altos índices de micronúcleos para todos os indivíduos expostos, sendo maior a indução quanto mais alta as concentrações testadas (1,1 e 2,9 µg/L).

Resultados obtidos por Ayllon e Garcia-Vasquez [37] mostraram, para *Phoxinus phoxinus* e *Poecilia latipinna*, que a colchicina e a mitomicina C induziram micronúcleos e anormalidades nucleares nestes peixes. Porém, os autores relatam que a ciclofosfamida induziu a formação de anormalidades nucleares, mas não de micronúcleos. Em outras espécies como *Clarias gariepinus*, *Cheirodon interruptus*, *Heteropneustes fossilis*, *Notobranchius rachowi*, tanto a mitomicina C como a ciclofosfamida induziram a formação de micronúcleo em eritrócitos periféricos [27,44,69,136]. Grisolia e Cordeiro [137] verificaram maior sensibilidade de *Tilapia rendalli* à ciclofosfamida e a mitomicina do que *Oreochromis niloticus* e

Cyprinus carpio. Ayllon e Garcia-Vasquez [138], em ensaios utilizando *Oncorhynchus mykiss*, verificaram que a espécie apresentou resultados diferentes, quando testaram diferentes compostos, sendo que a ciclofosfamida induziu aumento na frequência de micronúcleos e de anormalidades nucleares e o metilmetano sulfonato não. A mitomicina induziu somente aumento na frequência de anormalidades nucleares e os compostos N-etil-N-nitrosurea, acrilamida e colchicina ocasionaram aumento nos índices de micronúcleos, mas não de anormalidades nucleares.

A ciclofosfamida pode ser tanto metabolizada como auto-transformada em um metabólito ativo [139], sendo necessária a exposição por, pelo menos, seis dias consecutivos ou três dias de exposição mais três de recuperação para induzir um aumento significativo na frequência de anormalidades nucleares [64]. Em experimentos *in vivo*, Çavas e Ergene-Gözükara [38] expuseram *O. niloticus* a ciclofosfamida, para utilização como controle positivo, a uma concentração de 4mg/L por 24, 48 e 72 horas e obtiveram frequências significativas de micronúcleos em todos os tratamentos, quando comparados ao controle negativo.

Buschini et al. [140] aplicaram o teste do micronúcleo e ensaio do cometa em eritrócitos de *Cyprinus carpio*, para detectar um possível efeito genotóxico de água potável tratada com desinfetante. Espécimes jovens foram expostos em represas experimentais, construídas dentro da estação de potabilização Castiglione del Lago (Perugia, Itália). Nesta estação, a água do lago Trasimero é normalmente tratada e desinfetada com hipoclorito sódico, dióxido de cloro e ácido peracético, antes de ser distribuída para a população. Para a realização dos testes, foi coletado sangue periférico, após diferentes tempos de exposição: antes da introdução do desinfetante e 3 horas, 10 dias e 20 dias após a aplicação. O teste do cometa mostrou uma resposta imediata, isto é, dano no DNA induzido após três horas de exposição, e o teste de micronúcleos mostrou as maiores frequências no tempo de maior exposição. Desinfetantes clorados, isto é ClO_2 e NaClO , parecem representar a maior fonte de clastogenicidade e aneugenicidade dos produtos utilizados na desinfecção da água, como verificado no teste do micronúcleo e no ensaio do cometa. Esses resultados são coincidentes com a formação de halogenados adsorvíveis (AOX), formados após o tratamento da água com desinfetantes

clorados, observados nas amostras de águas coletadas nas diversas fases do experimento e no projeto piloto realizado anteriormente pelos autores [141].

3.5. Biomonitoramento

As atividades humanas têm provocado, ao longo dos anos, grandes impactos ambientais. O crescente desenvolvimento industrial, urbano e agrícola tem levado a um aumento considerável na produção de resíduos que são dispostos no ambiente, expondo os seres vivos a ações de numerosos agentes potencialmente tóxicos, que podem provocar efeitos fisiológicos, bioquímicos, patológicos e genéticos adversos [142].

O teste do micronúcleo tem sido usado como indicador biológico *in situ* de contaminação ambiental por diversos autores, como Hose et al. [53], Carrasco et al. [29], Minissi et al. [31], Sanchez-Galan et al. [104] e Rodriguez-Cea et al. [10].

Avaliações por meio do ensaio do micronúcleo e do cometa em *O. niloticus*, realizadas por Rocha et al. [143], indicaram diferenças de genotoxicidade para diferentes pontos amostrados ao longo do rio Tietê (São Paulo, Brasil). O maior potencial genotóxico nas águas do Tietê foi verificado próximo à represa Billings, indicando um maior impacto das descargas de efluentes da cidade de São Paulo nesta região, quando comparado às demais regiões. A diluição dos tributários ao longo do curso do rio resulta em uma diminuição da genotoxicidade dos contaminantes. Estes resultados corroboram as conclusões de diversos estudos baseados em outros parâmetros de toxicidade de rios [144-149]. Tem sido observado nas águas do rio Tietê, próximo à cidade de São Paulo e principalmente próximo a represa Billings, muitos casos de contaminação por metais pesados e compostos orgânicos, como bifenila policlorada (PCB), pesticidas organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) [145]. Estes resultados corroboram os estudos de Almeida e Rocha [149], para *Chironomus xanthus* e *Hyalella azteca*, que observaram índices mais altos de mortalidade entre os organismos expostos aos sedimentos da represa Billings do que àqueles expostos aos sedimentos da represa de Promissão. Ao analisar a toxicidade de amostras de sedimentos dos locais represados do rio Tietê, após passagem do rio pela cidade de São Paulo, por meio de ensaios de toxicidade parcialmente crônica com larvas de *Danio rerio*,

Fracácio et al. [146] observaram que estes locais apresentavam condições inapropriadas para o crescimento dos organismos estudados. O uso de peixes como bioindicador permitiu que os autores concluíssem que a qualidade dos sedimentos das represas do rio Tietê melhora conforme se distancia da região metropolitana de São Paulo, indicando que as substâncias que impactam o rio têm sua origem nas atividades desenvolvidas na metrópole paulistana [143,146,148].

Viganò et al. [150], para avaliação da qualidade do rio Pó (Itália), após recebimento dos tributários rio Ticino e rio Lambro, coletaram peixes das espécies *Chondrostoma sœtta*, *Leuciscus cephalus* e *Barbus plebejus* nos dois rios e observaram uma tendência de aumento na frequência dos eritrócitos micronucleados para os peixes coletados no rio Lambro, quando comparados aos do rio Ticino. Contudo, apenas para o *C. sœtta* a diferença foi estatisticamente significativa. Estes resultados corroboram as frequências de eritrócitos micronucleados encontrados para a espécie truta arco-íris, em outro estudo realizado no mesmo rio por De Flora et al. [151]. Estes dados mostraram uma maior potencialidade das águas do rio Lambro causarem impactos na qualidade das águas do rio Pó.

Estudos realizados por Souza e Fontanetti [60], com *Oreochromis niloticus* expostos a amostras de águas do rio Paraíba do Sul (São José dos Campos, SP, Brasil), mostraram diferenças no potencial genotóxico deste rio em períodos específicos do ano. Foi observado um aumento significativo de micronúcleos nas coletas realizadas em meses de clima seco e frio, no ponto que corresponde à descarga da refinaria de petróleo, e ausência de alterações significativas nos meses de clima seco e quente e quente e úmido. Os autores acreditam que o tratamento dos efluentes da refinaria minimiza, mas não impede completamente, o impacto ambiental causado pela descarga desses efluentes. Resultados semelhantes foram encontrados por Hoshina et al. [47], que analisou amostras de águas coletadas em cinco pontos diferentes do rio Atibaia (São Paulo, Brasil) em uma área sob a influência de efluentes de uma refinaria de petróleo. Os resultados obtidos mostraram que os tratamentos usados pela refinaria diminuíram o dano citogenético, observados em *O. niloticus*, mas não o eliminaram totalmente, uma vez que foram observados danos no material genético induzidos em quatro dos cinco pontos amostrados desse rio.

Em estudos com eritrócitos de sangue periférico e células epiteliais de *O. niloticus*, realizados por Çavas e Ergene-Gözükara [38], foi avaliado o efeito genotóxico de efluentes de uma refinaria de petróleo e de uma fábrica que utiliza cromo em suas atividades. Os peixes tratados com os efluentes da indústria não apresentaram índices significativos de anormalidades nucleares, com exceção de células binucleadas para as concentrações de 5 e 20%, após o sexto dia de exposição. Já os peixes submetidos aos efluentes da refinaria de petróleo apresentaram aparente indução de formação de anormalidades nucleares, com exceção de núcleo do tipo “notched”.

Estudos realizados por Andrade et al. [152], utilizando o teste do cometa em eritrócitos de tainha e bagre do mar, para testar diferentes concentrações de MMS em duas diferentes temperaturas (25 e 37°C), mostraram que há uma predisposição a um aumento de dano do DNA conforme aumenta a temperatura. A comparação dos dados com exposição dos eritrócitos de ambas as espécies a MMS, em diferentes tempos e temperaturas, mostrou que a temperatura é um fator ambiental importante que pode influenciar a integridade do DNA e a sua sensibilidade aos agentes genotóxicos. Os autores afirmam que a principal contribuição deste estudo é a informação sobre a necessidade de cautela na interpretação dos parâmetros biológicos, pois parâmetros ambientais, como as oscilações de temperaturas decorrentes das variações sazonais, podem levar a falsas interpretações dos resultados obtidos. Afirmam, ainda, a necessidade de se incluir um bom teste controle em todos os estudos de biomonitoramento [152].

Estudos realizados por Ergene et al. [66] com peixes *Clarias gariepinus*, *Alburnus orontis* e *Mugil cephalus*, coletados em lagoas da Turquia (Akgol e Paradeniz do Delta Goksu), contaminadas com metal pesado (como Cu, Cd, Ni e Pb) e agrotóxicos, mostraram uma frequência significativa de eritrócitos micronucleados e de anormalidades nucleares. Os dados mostraram também a existência de diferenças interespecíficas entre as respostas dos peixes, onde a espécie *C. gariepinus* apresentou os mais altos índices de indução de alterações e *A. orontis* os menores. Segundo os autores essa diferença pode estar relacionada aos hábitos alimentares dessas duas espécies, uma vez que a contaminação por metais tem uma forte associação com o comportamento alimentar das espécies.

Rajaguru et al. [153], no seu estudo com águas do rio Noyyal (Índia) contaminadas por efluentes industriais e urbanos, avaliou o potencial genotóxico de seis pontos do rio (distantes 130 Km entre si). Alevinos de *Cyprinus carpio* foram expostos às amostras das águas coletadas por 24, 48 e 72 horas. Foram realizadas coletas de sangue para a realização do ensaio do cometa. Todas as amostras de águas coletadas nos diversos pontos do rio induziram índices significativos de danos no DNA, em relação ao controle, com exceção das águas coletadas antes do distrito industrial de Coimbatore. Os resultados mostraram a presença de compostos genotóxicos no rio Noyyal e um aumento do comprometimento da qualidade de suas águas, proporcional aos impactos promovidos pelas duas cidades industriais (Coimbatore e Tirupur), que despejam seus efluentes domésticos e industriais sem tratamento adequado.

Pantaleão et al. [154] avaliaram a contaminação das águas da bacia do rio Japaratuba (SE, Brasil), após o recebimento de efluente de uma indústria petroquímica, em dois pontos que apresentavam diferentes graus de contaminação. Os principais contaminantes desse efluente são hidrocarbonetos mono (HMAs) e policíclicos aromáticos (HPAs), alquilfenóis, metais (arsênico, bário, cádmio, ferro, manganês, zinco, chumbo e mercúrio) e variantes do processo químico, como os inibidores de corrosão. Nesse estudo foram coletadas amostras de sangue de peixes das espécies *Astyanax binocularis* e *Hoplias malabaricus*, residentes em dois locais do rio Japaratuba, sendo um próximo ao despejo de efluente e outro próximo à foz do rio. O controle ambiental foi feito com peixes coletados no rio Jacarecica, por este ser considerado não impactado. Após coleta do material, foi realizada a avaliação do potencial genotóxico por meio do teste do micronúcleo. Os resultados mostraram índices significativos apenas para os espécimes de *A. binocularis* coletados nos dois pontos do rio Japaratuba, quando comparados aos peixes coletados no rio Jacarecica. Os autores verificaram que o teste do micronúcleo é uma técnica útil para os ensaios de biomonitoramento da qualidade das águas e corroboram dados de Grisolia e Starling [155]; Palhares e Grisolia [44] e Rodriguez-Cea et al. [10], que afirmam que diferentes espécies de peixes podem apresentar diferenças de sensibilidade a contaminantes ambientais.

Costa et al. [156] monitoraram os sedimentos do Estuário Sado (Portugal) em três diferentes áreas, sendo o local A próximo a uma área de proteção ambiental, o

local B próximo do porto Setúbal (contaminantes urbanos e portuários) e local C uma área potencialmente contaminada por efluentes industriais e por escoamento agrícola. Para a avaliação do potencial genotóxico, espécimes de *Solea senegalensis* foram expostos a amostras de sedimento em tanques contendo dois litros de sedimentos e doze litros de água limpa, por 14 e 28 dias. Amostras de sangue foram coletadas, antes da exposição e após os dois períodos, para a realização do teste de anormalidades nucleares (micronúcleos, brotos nucleares e núcleos lobulados) e do ensaio do cometa. Os resultados obtidos mostraram índices significativos de anormalidades nucleares para as três amostras de sedimento, após 28 dias de exposição, e para o sedimento C, após 14 dias. Em relação ao ensaio do cometa, taxas significativas de danos foram observadas para os ensaios realizados, após 14 e 28 dias, com todas as amostras de sedimentos coletados. Os autores inferem que as alterações observadas nos peixes expostos aos sedimentos B e C, sejam decorrentes da presença de HPAs, como o benzopireno, uma vez que este composto foi detectado nas análises químicas realizadas com as amostras. Outra hipótese levantada para os altos índices de alterações encontradas é que as mesmas estejam relacionadas ao efeito acumulativo dos contaminantes no ambiente.

4. CONCLUSÃO

Baseado nas informações desta revisão é possível concluir que peixes podem ser utilizados como bioindicadores para estudos da contaminação ambiental por diversos agentes genotóxicos e mutagênicos. Existem diferentes métodos para esta avaliação, dentre eles o teste de micronúcleos e o ensaio do cometa. Ambos os testes têm se mostrado sensíveis e de rápido diagnóstico, pela fácil execução. Além disso, foi possível verificar que existem diferenças na sensibilidade das espécies aos contaminantes, de modo que algumas espécies são mais indicadas para estes ensaios do que outras, o que leva a uma sugestão de aplicação deste testes em mais de uma espécie para o mesmo estudo. Desta forma, ensaios com peixes tem se mostrado uma importante ferramenta para o biomonitoramento de recursos hídricos, bem como para avaliação da potencialidade de diversas substâncias que podem atuar como contaminantes ambientais.

5. REFERÊNCIAS

- [1] D.S.L. Moraes, B.Q. Jordão, Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana, *Rev. Saúde Pública*. 36 (2002) 370-374.
- [2] M.N. Rashed, Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake, *Environ. Int.* 27 (2001) 27-33.
- [3] A.N. Jha, Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat. Res.* 552 (2004) 1-17.
- [4] J. Cairns Jr, J.R. Pratt, A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates, in: D.M. Rosenberg, V.H. Resh (Org.), *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*, Chapman & Hall, New York, 1993, pp.10-27.
- [5] J.L. Metcalfe, Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrates communities: history and present status in Europe, *Environ. Pollut.* 60 (1989) 101-139.
- [6] D.M. Rosenberg, V.H. Resh (Org.) *Freshwater Biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. Chapman & Hall, New York, 1993.
- [7] B. Markert, Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in environment, *J. Trace Elem Med. Biol.* 21 (2007) 77-82.
- [8] WHO. World Health Organization. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. *Environ. Health Criteria*. Geneva: WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2001. v.222, 238p.
- [9] T.B. Jesus, C.E.V. Carvalho, Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg), *Oecol. Bras.* 12 (2008) 680-693.
- [10] A. Rodriguez-Cea, F. Ayllon, E. Garcia-Vazquez, Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56 (2003) 442–448.
- [11] C.T. De Lemos, N.R. Terra, Poluição: Causas, efeitos e controle, in: J. Silva, B. Erdtmann, J.A.P. Henriques, (Ed.) *Genética Toxicológica*. Alcance, Porto Alegre, 2003. pp.119-137.
- [12] P. Rajaguru, L. Vidya, B. Baskarasethupathi, P.A. Kumar, M. Palanivel, K. Kalaiselvi, Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay, *Mutat. Res.* 517 (2002) 29-37.
- [13] W. Zhou, E.J. Horstick, H. Hirata, J.Y. Kuwada, Identification and expression of voltage-gated calcium channel beta subunits in Zebrafish, *Dev. Dyn.* 237 (2008) 3842-3852.

- [14] M.F.N. Ferreira, Avaliação da toxicidade dos efluentes líquidos do sistema integrado de tratamento do Pólo Petroquímico do Sul sobre a morfogênese de larvas de *Pimephales promelas* Rafinesque, 1820, Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica), FURG, Rio Grande, 1992, 107p.
- [15] L.R. Malabarba, E.H.L. Pereira, J.F.P. Silva, W. Bruschi Jr., F. Flores-Lopes, Avaliação da qualidade da água através da frequência de anomalias morfológicas em peixes. Estudo de caso do lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS - Série Zoologia. 17 (2004) 97-128.
- [16] S. Sanchez-Galan, A.R. Linde, J.I. Izquierdo, E. Garcia-Vazquez, Micronuclei and fluctuating assymetry in Brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems, Mutat. Res. 42 (1998) 219-225.
- [17] H. Bergman, Assessment protocols for the identification and quantification of injury to fishery resources. Progress Report, Washington, US Department of Interior, 1985.
- [18] R. Van Der Oost, J. Beyer, N.P.E. Vermeulen, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, Environ. Toxicol. Pharmacol. 13 (2003) 57-149.
- [19] W.A. Ramsdorf, Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR), Dissertação (Genética), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007, 127p.
- [20] C.L.G. Rivero, M.F.N. Barbosa, J.G. Dorea, C.K. Grisolia, Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: ciclidae), Ecotoxicol. 17 (2008) 732-737.
- [21] L.R. Shugart, Molecular markers to toxic agents, in: M.C. Newman, C.H. Jagoe (Eds.), Ecotoxicology - a hierarchical treatment, Lewis, Boca Raton, 1996, pp.133-161.
- [22] A.D. Kligerman, Fishes as biological detectors of the effects genotoxic agents, in: J.A. Heddle (Ed), Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology, Academic Press, New York, 1982, pp.435-456.
- [23] J. Mersch, M.N. Beauvais, The micronucleous assay in the zebra mussel, *Deissena polymorpha*, to *in situ* monitor genotoxicity in freshwater environments, Mutat. Res. 383 (1997) 141-149.
- [24] J.I.R. Porto, C.S.O. Araújo, E. Felberg, Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species, Environ. Res. 97 (2005) 287-292.

- [25] I. Udroi, The micronucleus test in piscine erythrocytes, *Aquat. toxicol.* 79 (2006) 201-204.
- [26] K. Al-Sabti, C.D. Metcalfe, Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, *Mutat. Res.* 343 (1995) 121-135.
- [27] R.K. Das, N.K. Nanda, Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluents, *Mutat. Res.* 175 (1986) 65-71.
- [28] C.D. Metcalfe, Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40 (1988) 489-495.
- [29] K.R. Carrasco, K.L. Tilbury, M.S. Mayers, Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47 (1990) 2123-2136.
- [30] M. Hayashi, T. Ueda, K. Uyeno, K. Wada, N. Kinae, K. Saotome, N. Tanaka, A. Takai, Y.F. Sasaki, N. Asano, T. Sofuni, Y. Ojima, Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms, *Mutat. Res.* 399 (1998) 125-133.
- [31] S. Minissi, E. Ciccotti, M. Rizzoni, Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* Teleostei pisces from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater, *Mutat. Res.* 367 (1996) 245-251.
- [32] V. Bombail, D. Aw, E. Gordon, J. Batty, Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland, *Chemosphere.* 44 (2001) 383-392.
- [33] C. Russo, L. Rocco, M.A. Morescalchi, V. Stingo, Assessment of environmental stress by the micronucleus test and Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57 (2004) 168-174.
- [34] R.N. Hooftman, W.K. de Raat, Induction of nuclear anomalies micronuclei in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methane sulphonate, *Mutat. Res.* 104 (1982) 147-152.
- [35] G.K. Manna, G. Banerjee, S. Gupta, Micronucleus test in the peripheral erythrocytes of the exotic fish, *Oreochromis mossambica*, *Nucleus.* 28 (1985) 176-179.
- [36] F.E. Matsumoto, I.M.S. Cólus, Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide and vinblastine sulfate, *Genet. Mol. Biol.* 23 (2000) 489-492.

- [37] F. Ayllon, E. Garcia-Vazquez, Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test, *Mutat. Res.* 467 (2000) 177-186.
- [38] T. Çavas, S. Ergene-Gözükara, Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents, *Aquat toxicol.* 74 (2005) 264-271.
- [39] S.S. Rao, T. Neheli, J.H. Carey, V.W. Cairns, Fish hepatic micronuclei as an indication of exposure to genotoxic environmental contaminants, *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12 (1997) 217-222.
- [40] D. Palhares, C.K. Grisolia, Comparasion between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment, *Genet. Mol. Biol.* 25 (2002) 281-284.
- [41] J. Baršienė, V. Dedonytė, A. Rybakovas, L. Andreikėnaitė, O.K. Andersen, Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil, *Aquat. Toxicol.* 78S (2006) S99-S104.
- [42] K. Al-Sabti, Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals, *Cytobios.* 47 (1986) 147-154.
- [43] K. Al-Sabti, M. Franko, B. Andrijani, S. Knez, P. Stegnar, Chromium induced micronuclei in fish, *J. Appl. Toxicol.* 14 (1994) 333-336.
- [44] I.B. Bahari, F.M. Noor, N.M. Daud, Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*, *Mutat. Res.* 313 (1994) 1-5.
- [45] C. Gravato, M.A. Santos, Genotoxicity biomarkers association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55 (2003) 352-358.
- [46] S.T. Matsumoto, M.S. Mantovani, M.I.A. Malagutti, A.L. Dias, I.C. Fonseca, M.A. Marin-Morales, Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips, *Genet. Mol. Biol.* 29 (2006) 148-158.
- [47] M.M. Hoshina, D.F. Angelis, M.A. Marin-Morales, Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent, *Mutat. Res.* 656 (2008) 44-48.
- [48] B.C. Ventura, D.F. Angelis, M.A. Marin-Morales, Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay, *Pest. Biochem. Physiol.* 90 (2008) 42-51.

- [49] A.A. Soldatov, Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system, *J. Evol. Biochem. Physiol.* 41 (2005) 272-281.
- [50] R. Schlegel, J.T. Macgregor, The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fisher 344 rats: implications for cytogenetic screening, *Mutat. Res.* 127 (1984) 169-174.
- [51] N.P. Adhikari, X. Pehg, A. Alizadeh, S. Ganti, S.K. Nayak, S.K. Kumar, Multiscale modeling of the surfactant mediated synthesis and supramolecular assembly of cobalt nanodots, *Phys. Rev. Lett.* 93 (2004) 18301- 18304.
- [52] R.E. Klinger, V.S. Blazer, C. Echevarria, Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Aquaculture*. 47 (1996) 225-233.
- [53] J.E. Hose, J.N. Cross, S.G. Smith, D. Diehl, Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of Southern California, *Mar. Environ. Res.* 22 (1987) 167–176.
- [54] S. Sanchez-Galan, A.R. Linde, E. Garcia-Vazquez, Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 43 (1999) 301-304.
- [55] N.L. Rudd, S.E. Williams, M. Evans, U.G.C. Hennig, D.I. Hoar, Kinetochore analysis of micronuclei allows insights into the actions of colcemid and mitomycin C, *Mutat. Res.* 261 (1991) 57-68.
- [56] M. Pacheco, M.A. Santos, Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on juvenile eel *Anguilla anguilla* L., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38 (1997) 252-259.
- [57] J.W. Parton, M.L. Garriott, An evaluation of micronucleus induction in bone marrow and in hepatocytes isolated from collagenase perfused liver or from formalin-fixed liver using 4-week-old rats treated with known clastogens, *Environ. Mol. Mutagen.* 29 (1997) 379–385.
- [58] C. Gravato, M.A. Santos, β -Naphthoflavone liver EROD and erythrocytic nuclear abnormality induction in juvenile *Dicentrarchus labrax* L., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52 (2002) 69-74.
- [59] T. Çavas, S. Ergene-Gözükara, Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells, *Mutat. Res.* 534 (2003) 93-99.
- [60] T.S. Souza, C.S. Fontanetti, Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent, *Mutat. Res.* 605 (2006) 87-93.

- [61] P.E. Tolbert, A.C. Shy, J.W. Allen, Micronuclei and other nuclear abnormalities in buccal smears: methods development, *Mutat. Res.* 271 (1992) 69-77.
- [62] N. Shimizu, N. Itoh, H. Utiyama, G.M. Vahl, Selective entrapment of extrachromosomally DNA by nuclear budding and micronucleation during the S-phase, *J. Cell Biol.* 140 (1998) 1307-1320.
- [63] N. Shimizu, T. Shimura, T. Tanaka, Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei, *Mutat. Res.* 448 (2000) 81-90.
- [64] M.G. Pacheco, M.A. Santos, Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of *Anguilla Anguilla* L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached Kraft pulp mill effluent, *Fresenius Environ. Bull.* 5 (1996) 746-751.
- [65] L. Serrano-Garcia, R. Montero-Montoya, Micronuclei and chromatid buds are the results of genotoxic events, *Environ. Mol. Mutagen.* 38 (2001) 38-45.
- [66] S. Ergene, T. Çavas, A. Çelik, N. Köleli, F.Kaya, A. Karahan, Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution, *Ecotoxicol.* 16 (2007) 385-391.
- [67] N.M. Belfiore, S.L. Anderson, Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: A review, *Mutat. Res.* 489 (2001) 97-122.
- [68] V. Larno, J. Laroche, S. Launey, P. Flammarion, A. Devaux, Responses of chub (*Leuciscus cephalus*) populations to chemical stress, assessed by genetic markers, DNA damage and cytochrome P450 1A induction, *Ecotoxicol.* 10 (2001) 145-158.
- [69] M.A. Campana, A.M. Panzeri, V.J. Moreno, F.N. Dulout, Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*, *Mutat. Res.* 438 (1999) 155-161.
- [70] P. Das, G. John, Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations *in vivo* in *Etroplus suratensis* (Bloch) following exposure to organophosphorus pesticides, *Toxicol. Lett.* 104 (1999) 111-116.
- [71] M.A. Farah, B. Ateeq, M.N. Ali, W. Ahmad, Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54 (2003) 25-29.
- [72] B. Velmurugan, T. Ambrose, M. Selvanayagam, Genotoxic evaluation of lambda-cyhalothrin in *Mystus gulio*, *J. Environ. Biol.* 27 (2006) 247-250.
- [73] C. Pax-Y-Miño, M.V. Dávalos, M.E. Sánchez, M. Arévalo, P.E. Leone, Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay, *Mutat. Res.* 516 (2002) 57-61.

- [74] J. Silva, V. Heuser, V. Andrade, Biomonitoramento Ambiental, in: J. Silva, B. Erdtmann, J.A.P. Henriques (Orgs.), *Genética Toxicológica*, Alcance, Porto Alegre, 2003, pp.167-170.
- [75] O. Östling, K.J. Johanson, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123 (1984) 291-298.
- [76] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184-191.
- [77] R.R. Tice, The Single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, in: D.H. Phillips, S. Venitt (Eds.), *Environmental Mutagenesis*. Bioscientific publishers, Oxford, 1995, pp.315-339.
- [78] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 3 (2000) 206-221.
- [79] A. Devaux, P. Flammarion, V. Bernardon, J. Garric, G. Monod, Monitoring of the chemical pollution of the River Rhône through the measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*), *Mar. Environ. Res.* 46 (1998) 257-262.
- [80] P. Flammarion, A. Devaux, S. Nehls, B. Migeon, P. Noury, J. Garric, Multibiomarker responses in fish from the Morcille River (France), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51 (2002) 145–153.
- [81] M.J. Winter, N. Day, R.A. Hayes, E.W. Taylor, P.J. Butler, J.K. Chipman, DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK, *Mutat. Res.* 552 (2004) 163-175.
- [82] S.C.G. Lopes-Poleza, Avaliação do efeito do metilmercúrio (CH_3Hg^+) em *Hoplias malabaricus* através da frequência de aberrações cromossômicas e do ensaios cometa e micronúcleo, Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2004, 54p.
- [83] M.V.M. Ferraro, A.S. Fenocchio, M.M. Cestari, M.S. Mantovani, P.M.M. Lemos, Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations, *Genet. Mol. Biol.* 27 (2004) 270-274.

- [84] R. F. Lee, S.A. Steinert, Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, *Mutat. Res.* 544 (2003) 43-64.
- [85] W.E. Pereira, J.L. Domagalski, F.D. Hostettler, L.R. Brown, J.B. Rapp, Occurrence and accumulation of pesticides and organic contaminants in river sediment, water and clam tissues from the San Joaquin River and tributaries, *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (1996) 172–180.
- [86] C. K. Grisolia, *Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução*. 1ª ed. Ulbra, Brasília, 2005. 394p.
- [87] D.R. Nimmo, Pesticides, in: G.M. Rand, S.R. Petrocelli (Eds.), *Fundamentals of Aquat. Toxicol.: Methods and Applications*, Hemisphere, New York, 1985, pp.335-373.
- [88] A. Spacie, J.L. Hamelink, Bioaccumulation, in: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (Eds.). *Fundamentals of Aquat. Toxicol.: Methods and Applications*, Hemisphere, New York, 1985, pp.495-525.
- [89] C. Frankart, P. Eullaffroy, G. Vernet, Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations, *Ecotoxicolo. Environ. Saf.* 53 (2002) 439-445.
- [90] D. Ali, N.S. Nagpure, S. Kumar, R. Kumar, B. Kushwaha, W.S. Lakra, Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 650-656.
- [91] S. Bony, C. Gillet, A. Bouchez, C. Margoum, A.Devaux, Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys, *Aquat. Toxicol.* 89 (2008) 197-203.
- [92] D.G.S.M. Cavalcante, C.B.R. Martinez, S.H. Sofia, Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655, 2008, 41-46.
- [93] T. Çavas, S. Könen, Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay, *Mutagen.* 22 (2007) 263-268.
- [94] S. Könen, T. Çavas, Genotoxicity testing of the herbicide Trifluralin and its commercial formulation Treflan® using the piscine micronucleus test, *Environ. Mol. Mutagen.* 49 (2008) 434-438.
- [95] S.T. Matsumoto, J. Rigonato, M.S. Mantovani, M.A. Marin-Morales, Evaluation of the genotoxic potential due to action of an effluent contaminated with chromium, by the comet assay in CHO-K1 cultures, *Caryol.* 58 (2005) 40-46.

- [96] I. Papagiannis, I. Kagalou, J. Leonardos, D. Petridis, V. Kalfakakou, Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece), *Environ. International*. 30 (2004) 357-362.
- [97] D.E. Hinton, S.W. Kullman, R.C. Hardman, D.C. Volz, P.J. Chen, M. Carney, D.C. Bencic, Resolving mechanisms of toxicity while pursuing ecotoxicological relevance?, *Marine Pollution Bulletin*, 51 (2005) 635-648.
- [98] H. Karadede, E. Unlu, Concentrations of some heavy metals in water, sediment and fish species from The Atatürk Dam Lake (Euphrates), Turkey, *Chemosphere*. 41 (2000) 1371-1376.
- [99] A. Wagner, J. Boman, Biomonitoring of trace elements in muscle and liver tissue of freshwater fish, *Spectroch. Acta Part B*. 58 (2003) 2215–2226.
- [100] K. Al-Sabti, Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells, *Mutat. Res.* 320 (1994) 157-163.
- [101] A.P. Krishnaja, M.S. Rege, Induction of chromosomal aberrations in fish *Boleophthalmus dussumieri* after exposure in vivo to mitomycin C and heavy metals mercury, selenium and chromium, *Mutat. Res.* 102 (1982) 71-82.
- [102] P.J. Lechler, J.R. Miller, L.D. Lacerda, D. Vinson, J.C. Bonzongo, W.B. Lyons, J.J. Warwick, Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River Basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichment?, *Sci. Total Environ.* 260 (2000) 87-96.
- [103] L. Maurice-Bourgoin, I. Quiroga, J. Chincheros, P. Courau, Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira rivers and mercury exposure to riparian Amazonia populations, *Sci. total Environ.* 260 (2000) 73-86.
- [104] S. Sanchez-Galan, A.R. Linde, F. Ayllon, E. Garcia-Vazquez, Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49 (2001) 139-143.
- [105] A. Castano, G. Carbonell, M. Carballo, C. Fernandez, S. Boleas, J.V. Tarazona, Sublethal effects of repeated intraperitoneal cadmium injections on rainbow trout, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41 (1998) 29-35.
- [106] G.K. Manna, A. Sadhukhan, Use of cells of gill and kidney of Tilapia fish in micronucleus test (MNT), *Curr. Sci.* 55 (1986) 498–501.
- [107] S.N. Talapatra, S.K. Banerjee, Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms, *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 210-215.

- [108] M.M. Cestari, P.M.M. Lemos, C.A.O. Ribeiro, J.R.M.A. Costa, E. Pelletier, M.V.M. Ferraro, M.S. Mantovani, A.S. Fenocchio, Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations, *Genet. Mol. Biol.* 27 (2004) 270-274.
- [109] H. Wake, Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment, *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 62 (2005) 131-140.
- [110] V.M.F. Almeida, E. Val, W.P. Duncan, A.L. Val, Crude oil effects on fish of the amazon: current status, in: *Tropical Fish: News and Reviews*, Vancouver: International Congress on The Biology of Fish, University of British Columbia, 2002, pp. 49-60.
- [111] M. Pacheco, A.M. Santos, Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49 (2001) 64-75.
- [112] P.H. Albers, Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons, in: D.J. Hoffman, B.A. Rattner, G.A. Burton Jr., J. Cairns Jr., (Eds.), *Handbook of Ecotoxicology*, Boca Raton, Flórida, 2002, pp. 341-371.
- [113] D. Hamoutene, J.F. Payne, A. Rahimtula, K. Lee, Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons, *Mar. Environ. Res.* 54 (2002) 471-474.
- [114] A.K. Kodo, Uso de biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do impacto do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce, Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006, 95p.
- [115] G. Frenzilli, V. Scarelli, I. Del Barga, M. Nigro, L. Förlin, C. Bolognesi, J. Sturve, DNA in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour, *Mutat. Res.* 552 (2004) 187-195.
- [116] V.L. Maria, A.C. Correia, M.A. Santos, *Anguilla anguilla* L. Biochemical and genotoxic responses to benzo[a]pyrene, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53 (2002) 86-92.
- [117] M.T. Llorente, A. Martos, A. Castano, Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp, *Ecotoxicol.* 11 (2002) 27-34.
- [118] M. Pacheco, M.A. Santos, Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40 (1998) 71-76.
- [119] J.E. Hose, E.D. Brown, Field applications of the piscine anaphase aberration test: lessons from the Exxon Valdez oil spill, *Mutat. Res.* 399 (1998) 167-178.

- [120] A.C. Longwell, A genetic look at fish eggs and oil, *Oceanus*. 20 (1977) 46-48.
- [121] J. Baršienė, J. Lazutka, J. Šyvokienė, V. Dedonytė, A. Rybakovas, A. Bjornstad, O.K. Andersen, Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and the North Seas, *Environ. Toxicol.* 19 (2004) 365-371.
- [122] Oliveira-Martins, C.R., C.K. Toxicity and genotoxicity of wastewater from gasoline stations. *Genet. Mol. Biol.*, 32 (2009) 853-856.
- [123] T.P. Vanzella, C.B.R. Martinez, I.M.S. Cólus, Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species, *Mutat. Res.* 631 (2007) 36-43.
- [124] G.I.V. Klobucar, M. Pavlica, R. Erben, D. Papes, Application of the micronucleus and the comet assay to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments, *Aquat. Toxicol.* 64 (2003) 15-23.
- [125] V.L. Maria, A.C. Correia, M.A. Santos, Genotoxic and biochemical responses in caged eel (*Anguilla Anguilla* L.) after short-term exposure to harbour waters, *Environ. International*. 29 (2003) 923-929.
- [126] M.S. Shailaja, R. Rajamanickam, S. Wahidulla, Formation of Genotoxic Nitro-PAH Compounds in Fish Exposed to Ambient Nitrite and PAH, *Toxicol. Sci.* 91 (2006) 440-447.
- [127] P.V. Ngan, V. Gomes, M.J.A.C.R. Passos, K.A. Ussami, D.Y.F. Campos, A.J.S. Rocha, B.A. Pereira, Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station "Comandante Ferraz," King George Island, *Polar Biol.* 30 (2007) 209-217.
- [128] C.C. Martins, M.C. Bicego, S. Taniguchi, R.C. Montone, Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica, *Antarctic Sci.* 16 (2004) 117-122.
- [129] L.B. Clark, R.T. Rosen, T.G. Hartman, J.B. Louis, I.H. Suffet, R.L. Lippincott, Determination of alkylphenol ethoxylates and their acetic acids derivatives in drinking water by particle beam liquid chromatograph/electroscopy, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 47 (1992) 167-180.
- [130] T. Tsuda, A. Takino, M. Kojima, K. Harada, T. Muraki, M. Tsuji, 4-Nonylphenols and 4-tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into lake Biwa, *Chemosphere*. 41 (2000) 757-762.
- [131] A. Sakai, p-Nonilfenol acts as a promoter in the BALB/3T3 cell transformation, *Mutat. Res.* 493 (2001) 161-166.

- [132] H.S. Kim, J.H. Shin, I.H. Kang, T.S. Kim, I.Y. Kim, J.H. Seok, M.Y. Pyo, S.Y. Han, Comparative estrogenic effects of nonylphenol by 3-day uterotrophic assay and female pubertal onset assay, *Reprod. Toxicol.* 16 (2002) 259-268.
- [133] C. Uguz, M. Iscan, A. Erguven, B. Isgor, I. Togan, The bioaccumulation of nonilfenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*), *Environ. Res.* 92 (2003) 262-270.
- [134] K. Sone, M. Hinago, A. Kitayama, J. Morokuma, N. Ueno, H. Watanabe, T. Iguchi, Effects of 17 B-estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos, *Gener. Comp. Endocrinol.* 138 (2004) 228-236.
- [135] M. Diekmann, P. Waldmann, A. Schnurstein, T. Grummt, T. R. Braunbeck, Nagel, On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test, *Aquat. Toxicol.* 68 (2004) 27-37.
- [136] J.C.M. Van Der Hoeven, I.M. Bruggeman, G.M. Alink, J.H. Koeman, The killfish *Notobranchius rachowi* a new animal in genetic toxicology, *Mutat. Res.* 97 (1982) 35-42.
- [137] C.K. Grisolia, C.M.T. Cordeiro, Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish, *Genet. Mol. Biol.* 23 (2000) 235-239.
- [138] F. Ayllon, E. Garcia-Vazquez, Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla*) by heavy metals, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49 (2001) 139-143.
- [139] M.A. Santos, M.G. Pacheco, The mutagenicity of cyclophosphamide, pulp mill effluents and its sediment on the Eel *Anguilla anguilla* L., *Sci Total Environ.* 171 (1995) 127-130.
- [140] A. Buschini, A. Martino, B. Gustavino, M. Monfrinotti, P. Poli, C. Rossi, M. Santoro, A.J.M. Dörr, M. Rizzoni, Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization, *Mutat. Res.* 557 (2004) 119-129.
- [141] S. Monarca, M. Rizzoni, B. Gustavino, C. Zani, A. Alberti, D. Feretti, I. Zerbini, Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using plant tests, *Environ. Mol. Mutagen.* 41 (2003) 353-359.
- [142] R.R. Arnaiz, Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos. 2 ed. México: [s.n.] 1995. pp.267.
- [143] P.S. Rocha, G.L. Luvizotto, T. Kosmehl, M. Böttcher, V. Storch, T. Braunbeck, H. Hollert, Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (2009) 1842-1848.

- [144] A.C.D. Bainy, E. Saito, P.S.M. Carvalho, V.B.C. Junqueira, Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site, *Aquat. Toxicol.* 34 (1996) 151-162.
- [145] A.C.D. Bainy, R.W. Bruce, J.S. John, Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from billings reservoir - São Paulo, Brazil, *Aquat. Toxicol.* 44 (1999) 289-305.
- [146] R. Fracácio, N.F. Verani, E.L.G. Espindola, O.Rocha, O. Rigolin-Sa, C.A. Andrade, Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae) exposed to the toxic sediments, *Brazilian Arch. Biol Technol.* 46 (2003) 685-695.
- [147] M. Leitão, E. Affonso, M. Silva, N. Meirelles, F. Rantin, A.Vercesi, V. Junqueira, I. Degterev, The liver monooxygenase system of Brazilian fresh-waterfish, *Comparative Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 126 (2000) 29-38.
- [148] S. Rodgher, E.L.G. Espíndola, O. Rocha, R. Fracácio, R.H.G. Pereira, M.H.S. Rodrigues, Limnological and ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the Tietê River (São Paulo, Brazil), *Brazilian J. Biol.* 6 (2005) 697-710.
- [149] C.A. Almeida, O. Rocha, Estudo comparativo da qualidade dos sedimentos dos reservatórios do Rio Tietê (SP), *J. Brazilian Soc. Ecotoxicol.* 1 (2006) 141-145.
- [150] L. Viganò, A. Camoirano, A. Izzotti, F. D'agostini, S. Polesello, C. Francisci, S. De Flora, Mutagenicity of sediments along the Po River and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas, *Mutat. Res.* 515 (2002) 125-134.
- [151] S. De Flora, M. Bagnasco, C. Bennicelli, A. Camoirano, A. Bojnemirski, B. Kurelec, Biotransformations of genotoxic agents in marine sponges. Mechanisms and modulation, *Mutagen.* 10 (1995) 357-364.
- [152] V.M. Andrade, T. Freitas, J. Silva, Comet assay using mullet. (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment, *Mutat. Res.* 560 (2004) 57-67.
- [153] P. Rajaguru, S. Suba, M. Palanivel, K.Kalaiselvi, Genotoxicity of a polluted river system measured using the Alkaline Comet Assay on fish and earthworm tissues, *Environ. Mol. Mutagen.* 41 (2003) 85-91.
- [154] S.M. Pantaleão, A.V. Alcântara, J.P.H. Alves, M.A. Spanó, The Piscine Micronucleus Test to Assess the Impact of Pollution on the Japaratuba River in Brazil, *Environ Mol. Mutagen.* 47 (2006) 219-224.
- [155] C.K. Grisolia, F.L.R.M. Starling, Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges, *Mutat. Res.* 491 (2001) 39-44.

- [156] P.M. Costa, J. Lobo, S. Caeiro, M. Martins, A.M. Ferreira, M. C. Caetano, Vale, T.A. Delvalls, M.H. Costa, Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): Effects of metallic and organic contaminants, *Mutat. Res.* 654 (2008) 29-37.
- [157] T.P. Galindo, L.M. Moreira, Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae), *Genet. Mol. Biol.* 32 (2009) 394-398.
- [158] C.K. Grisolia, C.L.G. Rivero, F.L.R.M. Starling, I.C.R. Silva, A.C. Barbosa, J.G. Dorea, Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake, *Genet. Mol. Biol.* 32 (2009) 138-143.
- [159] H. Kobayashi, C. Sugiyama, Y. Morikama, M. Hayashi, T. Sofuni. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gel electrophoresis, *MMS Comm.* 3 (1995) 103-115.

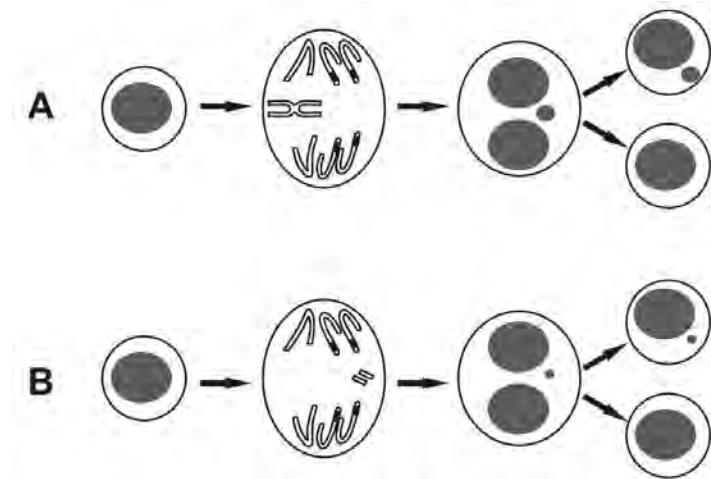


Figura 1: Diagrama da formação de micronúcleos a partir de um cromossomo inteiro [A] e por fragmento cromossômico [B].

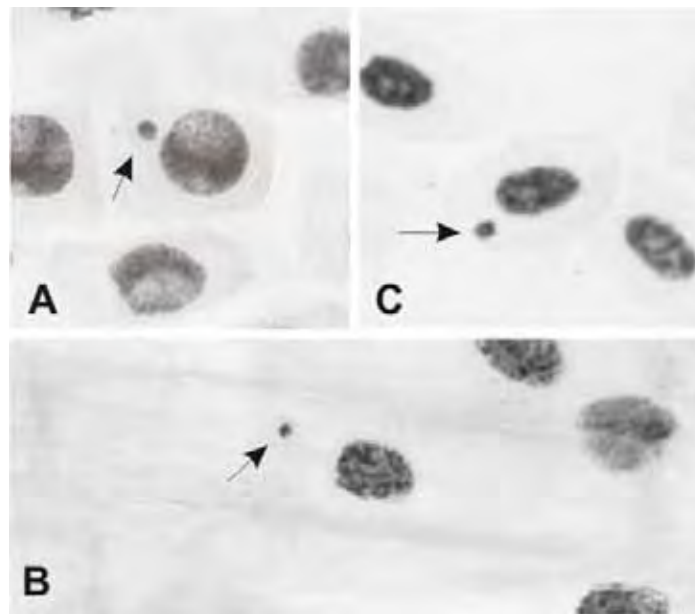


Figura 2: Células portadoras de micronúcleos. **A.** célula meristemática de *Allium cepa*; **B.** Célula da região F₁ de *Allium cepa*; **C.** Eritrócito de *Oreochromis niloticus*.

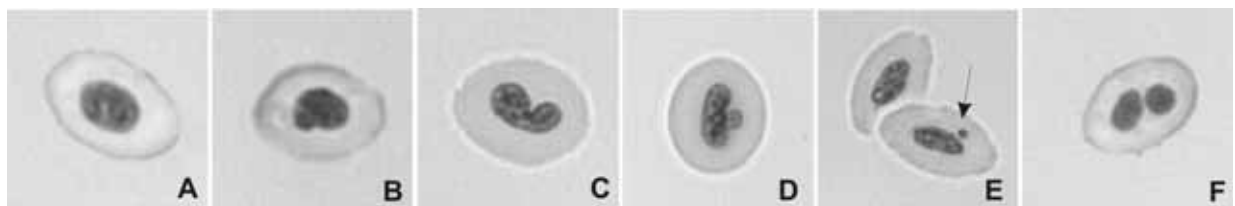


Figura 3: Anormalidades nucleares em eritrócitos circulantes de *Oreochromis niloticus*. **A.** Eritrócito normal; **B.** Núcleo do tipo "blebed"; **C.** Núcleo do tipo "notched"; **D.** Núcleo do tipo "lobed"; **E.** Eritrócito micronucleado (seta indica o micronúcleo); **F.** Célula Binucleada.

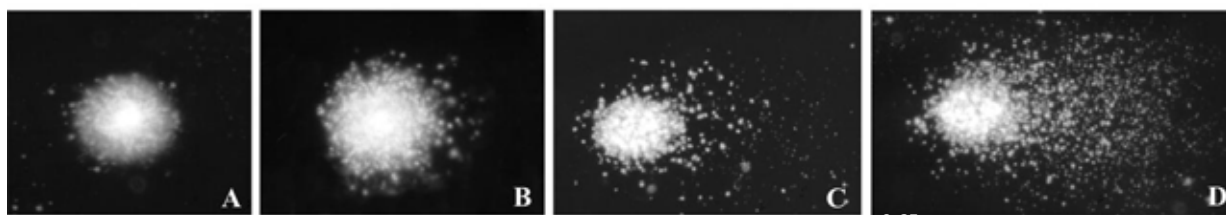


Figura 4: Danos no DNA observados em eritrócitos circulantes de *Oreochromis niloticus*, após a exposição ao herbicida trifluralina. **A.** Classe 0; **B.** Classe 1; **C.** Classe 2; **D.** Classe 3 [159].



Figura 5: Danos no DNA observados em células de brânquias de *Oreochromis niloticus*, após a exposição a um biosurfactante ramnolipídico. **A.** Classe 0; **B.** Classe 1; **C.** Classe 2; **D.** Classe 3 [159].

Tabela Anexa

Compilação dos trabalhos realizados com peixes, entre 2000 e 2009, para avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade de contaminantes aquáticos

ESPÉCIE	ENDPOINT	AGENTE	REFERÊNCIA
<i>Poecilia latipinna</i> <i>Phoxinus phoxinus</i>	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares (eritrócitos renais)	Metal pesado e outros agentes	[37]
<i>Pholis gunnellus</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (sangue periférico)	Biomonitoramento	[32]
<i>Tilapia rendalli</i> <i>Oreochromis niloticus</i> <i>Ciprinus carpio</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes)	Biomonitoramento	[155]
<i>Anguilla anguilla</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos renais)	Metal pesado	[104]
<i>Dicentrarchus labrax L.</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes)	HPA	[58]
<i>Chondrostoma söetta</i> , <i>Leuciscus cephalus</i> <i>Barbus plebejus</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes)	Biomonitoramento	[150]
<i>Garra rufa</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes)	Agrotóxico (Lambda-cialotrina)	[59]
<i>Cyprinus carpio</i>	Ensaio do cometa (sangue periférico)	Biomonitoramento	[153]
<i>Salmo trutta</i> <i>Anguilla anguilla</i> <i>Phoxinus phoxinus</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos renais)	Biomonitoramento Metal pesado	[10]
<i>Mugil sp.</i> <i>Netuma sp.</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (sangue periférico)	Biomonitoramento	[152]
<i>Cyprinus carpio</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (sangue periférico)	Desinfetante	[140]
<i>Hoplias malabaricus</i>	Ensaio do cometa (sangue periférico)	Metal pesado	[108]
<i>Danio rerio</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulante) e ensaio do cometa (hepatócitos e células de brânquia)	4-nitro-1-óxido-quinoline	[135]

<i>Hoplias malabaricus</i>	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (sangue periférico)	Metal pesado	[83]
<i>Leuciscus cephalus</i>	Ensaio do Cometa (hepatócitos)	Biomonitoramento	[81]
<i>Oreochromis niloticus</i>	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares (eritrócitos e células de brânquia)	Metal Pesado e HPA	[38]
<i>Barbus plebejus</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes)	Biomonitoramento	[31]
<i>Hoplias malabaricus</i> <i>Astyanax bimaculatus</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes)	Biomonitoramento	[154]
<i>Prochilodus nigricans</i> <i>Mylossoma duriventris</i> <i>Hoplias malabaricus</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes)	Metal pesado	[24]
<i>Perca fluviatilis L.</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes e células de brânquia)	HPA	[41]
<i>Oreochromis niloticus</i>	Teste do micronúcleo e alterações nucleares (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (sangue periférico)	Metal pesado	[43]
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Ensaio do cometa (hepatócitos)	HPA	[126]
<i>Oreochromis niloticus</i>	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares (eritrócitos circulantes)	Biomonitoramento	[60]
<i>Carassius auratus</i>	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (sangue periférico)	Agrotóxico (Roundup®)	[93]
<i>Clarias gariepinus</i> <i>Alburnus orontis</i> <i>Mugil Cephalus</i>	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares (eritrócitos circulantes)	Biomonitoramento	[66]
<i>Trematomus newnesi</i>	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares (eritrócitos)	HPA	[127]

<i>Labeo bata</i>	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares (eritrócitos de brânquia e rim)	Metal pesado	[107]
<i>Prochilodus lineatus</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (sangue periférico)	HPA	[123]
<i>Salmo trutta fario</i>	Ensaio do cometa (sangue periférico)	Biomonitoramento	[91]
<i>Phoxinus phoxinus</i>	Ensaio do cometa (sangue periférico)	Agrotóxicos: Diuron e Azoxystrobin	
<i>Prochilodus lineatus</i>	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (sangue periférico e células de brânquia)	Agrotóxico (Roundup®)	[92]
<i>Solea senegalensis</i>	Teste do micronúcleo, anormalidades nucleares (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (sangue periférico)	Contaminantes metálicos e orgânicos	[156]
<i>Oreochromis niloticus</i>	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares (eritrócitos circulantes)	Biomonitoramento	[47]
<i>Oreochromis niloticus</i>	Teste do micronúcleo (sangue periférico)	Agrotóxico (Trifluralina)	[94]
<i>Oreochromis niloticus</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (sangue periférico)	Nonylphenol	[20]
<i>Oreochromis niloticus</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (sangue periférico)	Agrotóxico (Atrazina®)	[48]
<i>Channa punctatus</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (linfócitos e células de brânquia)	Pesticida (Clorpirifós®)	[90]
<i>Bathygobius soporator</i>	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares (eritrócitos circulantes)	Biomonitoramento	[157]

<i>Geophagus brasiliensis</i> <i>Cichla temensis</i> <i>Astyanax bimaculatus</i> <i>Oreochromis niloticus</i> <i>Steindachnerina insculpta</i> <i>Hoplias malabaricus</i> <i>Cyprinus carpio</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (sangue periférico)	Biomonitoramento	[158]
<i>Oreochromis niloticus</i>	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares (eritrócitos circulantes)	HPA	[122]
<i>Oreochromis niloticus</i>	Teste do micronúcleo (eritrócitos circulantes) e ensaio do cometa (sangue periférico)	Biomonitoramento	[143]

Efeito genotóxico e mutagênico de amostras de águas coletadas em rios que recebem efluentes urbanos e industriais de um pólo ceramista por meio do sistema-teste *Allium cepa*

Renata Caritá¹; Maria Aparecida Marin Morales¹

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

RESUMO

Os efluentes domésticos e industriais são os maiores responsáveis pela contaminação dos recursos hídricos, pois carregam para as águas superficiais muitas substâncias tóxicas que podem promover alterações na biota exposta. O biomonitoramento ambiental pode ser feito por meio de testes realizados com diversos organismos. Os testes citogenéticos têm se mostrado indicados para estudos da extensão da poluição e para diagnosticar os efeitos de químicos sintéticos introduzidos em ambientes naturais. Neste trabalho foi avaliado o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de águas coletadas em rios que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes-SP (Brasil), por meio de testes realizados com meristemas de raízes de *Allium cepa*. A partir dos resultados obtidos, foi possível inferir que as águas do córrego Santa Gertrudes, após a passagem pela cidade de Santa Gertrudes, apresentaram ação citotóxica, genotóxica e mutagênica para o organismo-teste *Allium cepa*. As análises físico-químicas revelaram a presença de substâncias inorgânicas em níveis superiores às concentrações permitidas pela legislação brasileira, sobretudo de Al, NH₃ e fósforo total, para todas as coletas realizadas. As amostras de águas dos pontos correspondentes ao local de emissão de efluentes induziram elevados índices de AC e MN, para todas as coletas realizadas. O ponto referente à confluência do córrego Santa Gertrudes com o Ribeirão Claro apresentou um aumento nos índices de alterações, sobretudo para a coleta de agosto e novembro de 2008, indicando um possível efeito sinérgico entre as substâncias presentes em cada um destes rios, principalmente observado nos meses com menores índices pluviométricos. Além disso, foi verificada uma fixação dos danos induzidos nas células meristemáticas, nas células da região F₁ destas raízes, que exibiram altos índices de MN. Os resultados deste estudo alertam para os riscos que os despejos de efluentes domésticos e industriais caracterizam para os corpos hídricos, principalmente pela complexa constituição química que apresentam.

Palavras-Chave: citotoxicidade, células meristemáticas, aberrações cromossômicas, micronúcleos, células F₁ de plantas.

1. INTRODUÇÃO

A água é o constituinte básico de todas as células (60 a 90%), o que a caracteriza como uma substância indispensável à sobrevivência de todas as espécies do planeta. Para a maioria dos organismos, o suprimento de água é obtido em recursos hídricos superficiais, distribuídos pelos diversos ecossistemas terrestres.

O aumento populacional, os processos de urbanização e o desenvolvimento acelerado da industrialização, juntamente com as diversas formas de utilização e administração dos recursos hídricos, têm promovido uma intensa degradação ambiental, comprometendo a qualidade da água e a sobrevivência das espécies. As atividades humanas têm provocado grandes impactos nos ecossistemas aquáticos, sendo que as descargas de efluentes domésticos e industriais são consideradas as maiores fontes de poluição destes ambientes (JUNGCLAUS et al., 1978; STAHL, 1991; VEGA et al., 1996). Muitos efluentes contêm misturas tóxicas complexas como metais pesados, produtos industriais, agrotóxicos, derivados de petróleo, entre outras substâncias que, juntas, podem agravar as condições ambientais e conseqüentemente causar desequilíbrios em todos os organismos expostos (HOSHINA et al., 2009).

Ensaio de mutagenicidade permitem avaliar e entender a ação de agentes genotóxicos sobre os organismos, especialmente a ação sobre os ácidos nucléicos, particularmente sobre o DNA (PEREIRA et al., 2002). Dentre os sistemas testes vegetais mais utilizados para ensaios de mutagenicidade está a espécie *Allium cepa*. Esta espécie apresenta características importantes para testes com este fim, devido ao rápido crescimento de suas raízes, cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de tamanho grande e a alta sensibilidade para substâncias com potencial citotóxico e genotóxico (SMAKA-KINCL et al., 1996; EVANDRI et al., 2000; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

A espécie *A. cepa* tem se mostrado altamente indicada para monitorar o potencial tóxico, genotóxico e mutagênico de diversos agentes e para estimar o potencial sinérgico de misturas de poluentes (FISKESJÖ, 1985; RANK et al., 2002; EVSEEVA et al., 2003; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA et al., 2009, RADIC et al., 2010). Dentre os testes realizados com *A. cepa*, o do micronúcleo (MN) e de alterações cromossômicas (AC) fornecem resultados rápidos sobre os efeitos genotóxicos de substâncias químicas presentes no ambiente

(GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985; FISKESJÖ, 1988; FISKESJÖ, 1993; GRANT, 1994; NIELSEN; RANK, 1994; SMAKA-KINCL et al., 1996; LEME; MARIN-MORALES, 2008, LEME et al., 2008).

O córrego Santa Gertrudes recebe efluentes domésticos da cidade de Santa Gertrudes, lançados *in natura* nas suas águas e, juntamente com o córrego do Caju e córrego Itaqui, recebe também efluentes de uma série de indústrias cerâmicas, que juntas constituem o maior pólo ceramista do Brasil. Os efluentes líquidos destas indústrias possuem um alto potencial poluidor, por apresentarem substâncias tóxicas derivadas da lavagem dos tanques de esmaltação, como os íons Cu^{+2} , Cr^{+6} , Fe^{+3} , Co^{+2} , Ni^{+2} e U^{+6} (RUSSO, 1997). Além disso, no processo de queima dos revestimentos cerâmicos é emitido, na atmosfera, contaminantes como o flúor, que, durante o período das chuvas, pode se transformar em fluoretos e contaminar solos e rios da região, por meio de chuvas ácidas (FERRARI et al., 2003).

Com base neste exposto, foi avaliado, por meio do teste do MN e de AC, o comprometimento de rios que recebem efluentes domésticos e industriais, sobretudo do pólo ceramista, da região de Santa Gertrudes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

O Rio Piracicaba tem como afluente esquerdo a bacia do rio Corumbataí, que é abastecida pela sua margem esquerda pelo Ribeirão Claro. O Ribeirão Claro tem como afluentes esquerdos as sub-bacias do córrego Itaqui e do córrego Santa Gertrudes. O córrego Santa Gertrudes tem como afluente esquerdo o córrego do Caju. A bacia do córrego Santa Gertrudes situa-se no município de Santa Gertrudes e está localizado entre as coordenadas geográficas 22° 25' e 22° 32' LAT S e 47° 35' e 47° 28' LONG W (RUSSO, 1997).

2.2. Material

Foram coletadas amostras de água nos anos de 2008 e 2009, durante as estações quente e seca (novembro de 2008), quente e úmida (fevereiro de 2009) e fria e seca (agosto de 2008 e de 2009), em sete pontos específicos distribuídos ao longo dos cursos dos córregos Santa Gertrudes, do Caju, Itaqui e do Ribeirão Claro, como segue: Ponto 1 - córrego do Caju (antes da confluência com o córrego Santa

Gertrudes); Ponto 2 - córrego Santa Gertrudes (próximo a captação de água pela Estação de Tratamento de Água); Ponto 3 - córrego Santa Gertrudes (após a confluência do córrego do Caju); Ponto 4 – córrego Santa Gertrudes (após o recebimento do efluente urbano e industrial, predominantemente de indústrias cerâmicas); Ponto 5 - Ribeirão Claro (a montante da confluência do córrego Santa Gertrudes); Ponto 6 - Ribeirão Claro (a jusante da confluência do córrego Santa Gertrudes); e Ponto 7 - córrego Itaqui (após o despejo de efluente industrial cerâmico) (Figura 1).

O material biológico utilizado como sistema–teste constituiu de sementes de *Allium cepa* (cebola) de mesmo lote, variedade Baia periforme, que foram submetidas à germinação nas diversas amostras de água coletadas, para a avaliação da potencialidade citotóxica, genotóxica e mutagênica destas águas.

2.3. Métodos

As sementes de *A. cepa* foram expostas, continuamente, às diversas amostras de água coletadas nos sete pontos específicos, sendo uma placa de Petri para cada amostra. Os testes controle foram realizados com água de osmose reversa (controle negativo), metilmetano sulfonato (MMS) na concentração de 9×10^{-5} M e trifluralina na concentração de 0,19 ppm (controles positivos de ação clastogênica e aneugênica, respectivamente).

As raízes obtidas das germinações foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol PA : 1 parte de ácido acético PA, v:v), após atingirem cerca de dois cm, de comprimento. Os meristemas radiculares foram utilizados para a confecção de lâminas, que foram avaliadas quanto à presença de células portadoras de AC e aberrações nucleares. As lâminas foram preparadas de acordo com o descrito por Matsumoto et al. (2006) e coradas pela reação de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978). Seguindo o mesmo procedimento, foram confeccionadas, também, lâminas com a região F₁ das raízes (região não meristemática), para a análise de células portadoras de MNs (MA et al., 1995).

2.3.1. Indução de efeitos citotóxicos

Para a análise dos efeitos citotóxicos, foram preparadas com os meristemas radiculares, dez lâminas para cada amostra. Foram analisadas cerca de 500 células/lâmina e, assim, obtidos os índices de divisão celular (IM).

2.3.2. Indução de aberrações cromossômicas (AC) e nucleares

As anormalidades celulares observadas em células meristemáticas de sementes submetidas à germinação em águas das coletas foram divididas em dois grupos: 1. anormalidades cromossômicas, envolvendo alterações como C-metáfases, metáfases poliplóides, metáfases com aderências, metáfases com perdas cromossômicas, anáfases e telófases com atrasos, perdas de cromossomos inteiros e pontes cromossômicas (alterações genotóxicas) e 2. anormalidades como quebras cromossômicas e micronúcleos (alterações mutagênicas). Esta classificação foi assumida, conforme descrito por Caritá e Marin Morales (2008), por não se poder atribuir, com segurança, as derivações das anormalidades genotóxicas, uma vez que as células podem sofrer injúrias que as leve a morte em decorrência da alteração, ou podem, ainda, corrigir o “erro” promovido, não derivando assim em uma célula com mutação. A presença destas alterações, contudo, podem indicar que a substância tem ação sobre o material genético de células em divisão e, portando, são de ação genotóxicas.

2.3.3. Indução de micronúcleos (MN) nas células da região F₁

Para a análise de indução de MNs em células F₁, foram avaliadas dez lâminas e contabilizada a presença de células micronucleadas nestas lâminas.

Os valores obtidos em todos os testes foram comparados com os obtidos no controle negativo, por meio do teste estatístico Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

3. RESULTADOS

3.3.1. Indução de efeitos citotóxicos

Foram observadas, aproximadamente, 5000 células (500 células em cada lâmina) para cada ensaio realizado com as amostras de água coletadas. A tabela 1 mostra os índices mitóticos das células examinadas em todas as coletas. Na coleta de agosto de 2008, o controle positivo com MMS apresentou o menor IM (10,26%), enquanto que as sementes expostas as águas coletadas no ponto 6 foram as que apresentaram o maior índice (17,16%). As demais coletadas não apresentaram índices estatisticamente significativos, quando comparados ao controle negativo.

3.3.2. Indução de aberrações cromossômicas (AC) e nucleares

As sementes de *A. cepa* expostas às águas coletadas nos diversos pontos estudados exibiram altas frequências de AC genotóxicas, como: anáfases com ponte cromossômica, broto nuclear, perdas cromossômicas, células poliplóides, C-metáfases e aderências cromossômicas, sendo que as encontradas com maior frequência foram as pontes cromossômicas e os brotos nucleares, presentes em todas as lâminas analisadas.

Nas coletas realizadas na estação fria e seca (agosto de 2008 e agosto de 2009) a maioria das amostras apresentou índices estatisticamente significativos ($p < 0,05$) de AC genotóxicas, quando comparados com os resultados do controle negativo, sendo que o P4 foi o que apresentou os maiores valores (1,01% e 0,8%, respectivamente) em ambas as coletas. Nas demais estações (quente e seca e quente e úmida), os pontos 4, 5, 6 e 7 apresentaram valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo (Tabela 1, Figuras 2, 3, 4 e 5).

As células micronucleadas e as portadoras de quebras cromossômicas foram contabilizadas como AC mutagênicas. As análises estatísticas revelaram um efeito mutagênico para todas as amostras coletadas em agosto de 2008, com exceção do P3. Os maiores índices foram observados para o P6 (1,17%), seguido do P5 (0,93%) e do P4 (0,86%). Na coleta de novembro de 2008, foram observados índices significativos de mutagenicidade para as amostras coletadas nos pontos 4, 5, 6 e 7, sendo os maiores valores novamente observados para o P6 (0,81%). A amostra de fevereiro de 2009 apresentou menores índices de mutagenicidade, porém ainda estatisticamente significativos para os pontos 2, 4, 5, 6 e 7, sendo o mais alto índice registrado para o ponto 7 (0,38%). Por fim, as amostras coletadas em agosto de 2009 não apresentaram índices significativos de anormalidades cromossômicas mutagênicas, quando comparados ao controle negativo.

3.3.3. Indução de micronúcleos nas células da região F_1

Todas as amostras coletadas nos pontos 1, 4, 5, 6 e 7 apresentaram índices significativos de MN nas células da região F_1 . Índices significativos de micronúcleos também foram observados em amostras dos pontos 2 (em agosto de 2009) e do 3 (em agosto de 2008) (Tabela 2).

Em muitas amostras, foi possível observar que houve a indução significativa de MNs nas células F_1 , enquanto que as células meristemáticas não apresentaram valores significativos desta anormalidade. Isto foi observado para as amostras do ponto 3 (coleta de agosto de 2008) e do ponto 1 (coletas de novembro de 2008, fevereiro de 2009 e para a maioria das amostras da coleta de agosto de 2009). Estes resultados, provavelmente, são decorrentes de AC e nucleares que ocorreram nas células meristemáticas que progrediram para MN nas células da região F_1 .

4. DISCUSSÃO

Diversos autores têm mostrado que alterações no índice mitótico (SMAKA-KINCL et al., 1996; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008) e a indução de morte celular na espécie *A. cepa* (BIANCHI, 2008) podem constituir bons parâmetros para a avaliação de químicos ambientais.

O potencial citotóxico de um composto pode ser determinado pelo aumento ou diminuição do IM de células a ele expostas (FERNANDES et al., 2007). Índices mitóticos inferiores ao controle negativo podem indicar a presença de agentes, cuja ação tóxica compromete o crescimento e desenvolvimento dos organismos expostos. IMs superiores aos observados nos testes controle são resultados de indução de divisão celular e pode levar à proliferação celular descontrolada e até a tumorização (HOSHINA, 2002). Desta forma, o aumento ou a diminuição nos IM pode ser um importante indicador da ação de uma substância e pode ser usado para avaliar os níveis de poluição dos ambientes, especialmente por compostos tóxicos e citotóxicos (SMAKA-KINCL et al., 1996; HOSHINA, 2002).

Pelos resultados obtidos com águas dos rios que recebem efluentes da cidade de Santa Gertrudes, pudemos observar que apenas a amostra P6, (coleta de agosto de 2008), apresentou IM significativo, quando comparado ao controle negativo. Como este ponto de coleta está localizado após a confluência do córrego Santa Gertrudes com o Ribeirão Claro, inferimos que o efeito citotóxico observado seja decorrente de sinergismo entre as substâncias destes rios, uma vez que as amostras de P4 e P5, localizados antes da confluência, não apresentaram resultados significativos para este parâmetro. Nas demais amostras analisadas, não houve indução de morte celular e nem níveis significativos de alteração no IM, o que

indica que os compostos presentes nestes locais de coleta não apresentaram potencial citotóxico para as células de *A. cepa*.

Os dados referentes às análises de células portadoras de alterações cromossômicas, observadas nos ensaios realizados com *A. cepa*, foram divididos em duas categorias: as alterações cromossômicas genotóxicas (AC) (Figura 6) e as alterações cromossômicas mutagênicas (MN e quebras cromossômicas) (Figura 7).

Aberrações cromossômicas (AC) são reconhecidas como importantes conseqüências de ações genotóxicas de agentes químicos (NATARAJAN, 2002), aos quais muitos organismos, inclusive o homem, estão expostos. Estudos epidemiológicos têm mostrado que pessoas com elevadas freqüências de AC apresentam risco significativo de desenvolvimento de câncer (OBE et al., 2002). Por estas razões, têm sido desenvolvidos testes biológicos para avaliação de AC, como *endpoint* de agentes químicos, com a finalidade de garantir a qualidade ambiental (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; FERNANDES et al., 2007).

A análise das freqüências totais de AC, obtidas neste estudo, mostrou diferença significativa entre a maioria das amostras analisadas e o controle negativo. Esta análise indica a genotoxicidade dos compostos presentes nas amostras de água, mas não os mecanismos de ação destes sobre o material genético da célula. Analisando isoladamente cada tipo de aberração encontrada, podemos inferir sobre estes efeitos, classificando-os como de ação clastogênica ou aneugênica.

C-metáfases, cromossomos perdidos, atrasos cromossômicos e poliploidia são fenômenos que podem ser derivados de problemas nos microtúbulos citoplasmáticos (VIDAKOVIĆ-CIFREK et al., 2002; FERNANDES, 2005). Assim, estas alterações podem ser usadas como parâmetros de avaliação de efeitos genotóxicos de uma substância ou de um ambiente. Neste trabalho, foram registradas baixas freqüências destas alterações, para a maioria das coletas realizadas (agosto de 2008, fevereiro de 2009 e agosto de 2009), o que indicou que as substâncias presentes nestas águas não apresentam afinidade de interação com o fuso mitótico. Contudo, na coleta de novembro de 2008 foi observado um aumento no número de perdas cromossômicas e C-metáfases, para o ponto 5, indicando a presença de compostos com ação sobre o fuso.

As anáfases com pontes cromossômicas e os brotos nucleares foram AC observadas em maior freqüência, para todas as coletas realizadas. Segundo Salvadori et al. (2003), os brotos nucleares são estruturas semelhantes aos

micronúcleos, mas que permanecem ligados ao núcleo principal por uma conexão nucleoplasmática. Acredita-se que essa estrutura seja DNA amplificado, sendo eliminado do núcleo por um processo ativo, durante a fase S do ciclo celular (SHIMIZU et al., 1998; SHIMIZU et al., 2000; FERNANDES et al., 2007).

A formação de brotos nucleares está relacionada com a reorganização do envoltório nuclear, antes do cromossomo ter completado sua migração para o pólo da célula e, conseqüentemente, estar totalmente incorporado ao núcleo celular (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001). Quando alguns genes são amplificados, o material excedente pode gerar núcleos com alterações no seu contorno (*shaped formations*), estruturas estas que parecem ser as precursoras dos MNs (STOPPER; MÜLLER, 1997; SHIMIZU et al., 2000). Neste caso, o DNA excedente na célula, eventualmente, forma um broto que se desprende do núcleo, originando um MN. Este MN poderá, ainda, ser expulso da célula sob a forma de uma *mini cell*, que são pequenas porções citoplasmáticas portadoras de um reduzido conteúdo nuclear (FERNANDES et al., 2007).

Fernandes et al. (2007) sugerem que a eliminação de um micronúcleo é um indicativo de uma resposta fisiológica da célula. Contudo, como a duração do processo de brotamento nuclear e do processo de eliminação do micronúcleo são ainda pouco conhecidos (SHIMIZU et al., 2000; FERNANDES et al., 2007), não se pode afirmar que uma célula portadora de micronúcleo irá desencadear um processo de morte, ou está em processo inicial de eliminação do mesmo.

As pontes anafásicas consistem em pontes cromatídicas entre as porções cromossômicas que estão se separando durante a anáfase. Essas pontes, quando se quebram, podem resultar em perdas de material genético (LUO, 2004). A presença de pontes anafásicas, cromátides e cromossomos perdidos são fenômenos que podem ocorrer como conseqüência da aderência entre os cromossomos (MARCANO et al., 2004). Com a aderência, os cromossomos permanecem unidos e, quando separados, podem levar a uma ruptura ou a uma perda cromossômica (MARCANO et al., 1999), que neste último caso pode levar a aneuploidia e a poliploidia (FISKESJÖ, 1985; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007). Quando as pontes cromossômicas são resultantes de rearranjos estruturais, elas podem originar fragmentos cromossômicos (FISKESJÖ, 1993; GIACOMELLI, 1999). A formação de pontes cromossômicas e brotos nucleares são considerados eventos genotóxicos.

As células portadoras de micronúcleos e de fragmentos cromossômicos são consideradas *endpoints* de ação mutagênica, porque, mesmo sendo portadoras de alteração no material genético, não apresentam comprometimento visível da viabilidade celular, podendo haver, assim, a persistência da alteração ao longo de todo o ciclo de divisão. Segundo Hoshina (2005), os micronúcleos devem ser considerados como decorrentes de ação mutagênica, pois são observados em células interfásicas, portanto células que já passaram por um ciclo completo de divisão e cuja presença do MN confirma a viabilidade celular. As quebras cromossômicas também são classificadas como aberrações cromossômicas mutagênicas, pois evidenciam uma ação direta de um agente sobre o DNA, promovendo a sua uma fragmentação. Esses fragmentos resultantes podem decorrer, após a divisão celular, em MN, pois, por não serem portadores de centrômeros, não se ligam ao fuso, e não sofrem migração e incorporação ao núcleo celular (HOSHINA, 2005).

Apesar dos micronúcleos poderem se originar de perda de cromossomos inteiros, as perdas cromossômicas não podem ser classificadas como mutagênicas, pois a ausência de um cromossomo inteiro pode promover um sério comprometimento à célula, levando-a a morte. Por outro lado, quando cromossomos inteiros são perdidos, eles podem, em algum momento, se reincorporarem ao núcleo principal, pela capacidade de se ligar aos fusos mitóticos em outro evento de divisão (HOSHINA, 2005). Desta forma, se o MN for formado por um cromossomo inteiro e se sua síntese de DNA for sincrônica à síntese do DNA nuclear, poderá haver a reintegração do cromossomo do MN no genoma nuclear (GUSTAVINO et al., 1994).

Pelas nossas análises, foi possível observar que algumas células micronucleadas apresentavam assincronia de fase de divisão entre o núcleo e o MN. Fernandes et al. (2007) também observaram falta de sincronia entre a fase do ciclo celular do núcleo e MN, quando submeteram células meristemáticas de *A. cepa* ao herbicida trifluralina. Os autores concluíram que este herbicida promovia um dano irreparável à célula, pela impossibilidade do material do MN se reincorporar ao material genético no núcleo principal da célula.

Pelas análises físico-químicas realizadas com amostras de águas coletadas no P4, foi possível observar altas concentrações de amônia, fósforo total e alta DBO₅ para este local (Tabela 3). Estes resultados mostram um impacto causado pela grande disposição de matéria orgânica, sobretudo de descargas de esgotos

sanitários, efluentes industriais e drenagem agrícola. Este ponto também mostrou altos valores de metais, sobretudo de Al e Zn, substâncias estas capazes de induzir alterações no material genético das células. Pelos bioensaios realizados, observamos uma potencialidade genotóxica e mutagênica para as águas deste ponto, comprovada pelas altas frequências AC e MN registrados para as células expostas a germinação nestas águas. Estes efeitos, provavelmente, são decorrentes da ação sinérgica das substâncias que são lançadas neste local.

A presença de metais pesados nas águas deste local se deve, possivelmente, às descargas dos efluentes das indústrias cerâmicas. Os corantes usados na esmaltação cerâmica contêm óxidos de Al, Co, Zr, Si, Cr, Zn, Ni, Ca e Sn; os esmaltes contêm SiO_2 , B_2O_3 , Na_2O e PbO ; as resinas sintéticas contêm compostos orgânicos; e as tintas contêm Pb, Ca, Si, Al, Fe, Cr e Mn; além de haver também sólidos finos em suspensão, como argilas, restos de fritas e silicatos (BERNARDIN, 2006).

A contaminação por misturas complexas, sobretudo por metais, pode levar a respostas diferentes dos organismos, quando comparadas às respostas de contaminações por metais isolados, conforme citado por Guerra (2009) para absorção dos metais pesados pelas plantas. Este fato ocorre em função das diversas interações entre os contaminantes (independentes, antagonistas ou sinérgicas), que promove, também, diferentes respostas sobre os organismos (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 1992).

O alumínio é altamente citotóxico para as plantas (PEJCHAR et al., 2008). Provavelmente, a mais importante consequência fisiológica da sua toxicidade seja a interrupção do crescimento das raízes e a mudança na morfologia radicular. Estas ações sugerem que o citoesqueleto seja a estrutura alvo deste metal, pois o Al inibe a polimerização dos microtúbulos (VOUTSINAS et al., 1997). Segundo Fiskesjö (1983; 1988) a genotoxicidade do Al se deve à dissolução nuclear e aderência cromossômica.

O Pb é um metal genotóxico, que induz atrasos cromossômicos, núcleos heterocromatinizados (SAMARDAKIEWICZ; WOŹNY, 2005) e células binucleadas em consequência da inibição da citocinese (WIERZBICKA, 1989). O zinco é um metal altamente tóxico para plantas, invertebrados e peixes, sobretudo na forma de íon Zn^{+2} livre em solução (MUYSEN et al., 2006).

Os metais podem alcançar os ambientes aquáticos por meio de despejos de efluentes urbanos, agrícolas e industriais, e também em decorrência de processos naturais de lixiviação dos próprios constituintes do solo. O solo desta região é um solo típico de cerrado brasileiro, que possui uma alta quantidade de alumínio em sua composição. Esta característica pedológica justifica, de certa forma, a ocorrência de altos índices de Al em todas as amostras de águas coletadas. Foram observadas concentrações mais altas de alumínio para os pontos 1, 4, 5, 6 e 7, mostrando que o despejo dos efluentes intensificou ainda mais a contaminação por Al nestes recursos hídricos estudados. Assim, fica claro que a contaminação por Al se deu por dois fatores: característica do solo da região e poluição urbana e industrial.

O córrego Itaqui (P7) recebe o efluente de uma indústria cerâmica e tem um centro de pesca esportiva instalado em suas águas. Pelas análises químicas realizadas com as águas deste local, foi possível observar um índice de Al bastante superior ao permitido pela Legislação Brasileira (BRASIL, 2005), além da presença de outros compostos com potencial genotóxico e mutagênico (Tabela 1). Pelas análises realizadas com o organismo teste *A. cepa*, foram observados índices significativos de indução de AC e MN nas células das raízes dos organismos, quando expostos a águas deste ponto de coleta.

O Ribeirão Claro, após a passagem pela cidade de Rio Claro até a confluência com o córrego Santa Gertrudes, é considerado um rio de classe 3, apresentando altas concentrações de substâncias tóxicas. Este rio, ao longo do seu curso, recebe o despejo de diversos efluentes, além de afluentes com certa carga poluidora. No ponto onde as coletas foram realizadas (P5), foi observado, por diversas vezes, que as águas apresentaram, além de uma coloração atípica, a presença de espuma, comprovando os impactos que este rio vem sofrendo. Foram registrados para estas águas efeitos genotóxicos e mutagênicos, devido às altas frequências de AC e MN observadas nas células expostas a sua ação.

Pode ser observado um efeito sinérgico das substâncias presentes nas águas do P4 e P5 pelo aumento de aberrações celulares e nucleares registrados para as águas do P6 (coletas de agosto de 2008 e novembro de 2008). A ação conjunta das substâncias induziu a formação de MN e AC, sendo as pontes cromossômicas a AC presente em maior quantidade. Com estes dados, foi possível inferir que os rios impactados pelos efluentes urbanos e industriais não foram capazes de se autodepurarem antes da sua confluência, e, também, que a mistura

das substâncias presentes nas águas dos dois rios aumentou a potencialidade de induzir danos nas células do organismo exposto.

Além disso, foram observadas maiores induções de MN e AC nas coletas dos meses de agosto e novembro de 2008, quando comparadas à coleta de fevereiro de 2009. Este aumento pode ser um indicativo da maior concentração de poluentes, uma vez que nestes meses foram observados os menores registros de chuva. Contudo, essa maior indução de danos não foi observada para a coleta de agosto de 2009, provavelmente, devido ao fato deste ano ter sido atípico, com altos índices de precipitação registrados para este período. Este dado pode ser um indicativo de diferenças no potencial genotóxico dos rios em períodos específicos do ano, uma vez que nos períodos de seca, o nível de água diminui, favorecendo a alta concentração dos poluentes, enquanto que na estação chuvosa, eles ficam mais diluídos.

Em nossas análises, foram registradas as mais altas freqüências de micronúcleos nas células F_1 para as amostras de água dos pontos 4, 5, 6 e 7, em todas as coletas realizadas (Figura 8). Os índices significativos de MN, registrados para células F_1 podem estar relacionados com as altas freqüências de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN) registrados nas células meristemáticas do organismo teste *A. cepa*. As células F_1 são derivadas, por divisões mitóticas, de células meristemáticas (MA; XU, 1986). Desta maneira, os MN observados nas células F_1 podem ter se originado de danos não reparados ou reparados de modo incorreto, quando induzidos nas suas células parentais (RIBEIRO, 2003).

Uma substância capaz de induzir a formação de micronúcleos pode ser considerada uma substância clastogênica ou aneugênica (YI; MENG, 2003). As substâncias presentes nas águas dos rios estudados podem apresentar potencial de indução de micronúcleos tanto por ação aneugênica (distúrbios no fuso mitótico) como clastogênica (promoção de quebras cromossômicas). Pelas altas freqüências de pontes cromossômicas em anáfase e pela evidência das quebras dessas pontes, podemos inferir que as águas desses pontos acumularam substâncias, sobretudo, com potencialidade clastogênica. Por outro lado, nossos resultados mostraram MN de tamanhos variados e com diferentes graus de condensação, principalmente para os ensaios realizados com águas coletadas no ponto 4. Estes resultados sugerem que essas amostras, por serem constituídas de mistura complexa, podem ter tanto ter químicos de ação aneugênica como clastogênica.

5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo mostraram um potencial genotóxico e mutagênico para os rios sob a influência de atividades antrópicas, desenvolvidas na cidade de Santa Gertrudes. Estes recursos hídricos induziram altas frequências de AC e MN em células de raízes de *A. cepa* expostas a germinação em suas águas. O potencial genotóxico e mutagênico dessas águas se devem, sobretudo, ao despejo de efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes.

Foi observado que o potencial indutor de toxicidade aumentou logo após o despejo de efluentes urbanos e industriais (P4), e após a confluência (P6) de dois rios impactados (P4 e P5). O aumento de toxicidade registrado para o P6 serve de alerta para o potencial sinérgico das substâncias presentes nestas águas, em induzir alterações no material genético das células. O ponto 7, outro local que recebe efluentes cerâmicos, também se mostrou capaz de induzir alterações genotóxicas e mutagênicas nas células de *A. cepa*. Além disso, foi verificado que os danos causados nas células meristemáticas foram fixados na geração celular seguinte (células F₁), pelos altos índices de MN observados para as células F₁.

O despejo de esgoto doméstico *in natura* e de efluentes provenientes de indústrias cerâmicas pode representar um risco para os recursos hídricos, uma vez que estas misturas complexas possuem metais e outras substâncias que podem interagir e agir por sinergismo ou antagonismo, prejudicando toda a biota eventualmente exposta, além de alterar, drasticamente, a qualidade das águas dos rios. Desta forma, este estudo serve de alerta para os impactos que efluentes domésticos e industriais podem promover sobre os recursos hídricos, principalmente quando impactados por substâncias de ação desconhecidas e quando existem insuficiências de dados sobre a capacidade de autodepuração dos recursos hídricos envolvidos.

6. REFERÊNCIAS

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. **Suelos y Planta**, v.2, p.345-361, 1992.

BERNARDIN, A.M.; FELISBERTO, D.S.; DAROS, M.T.; RIELLA, H.G. Reaproveitamento de resíduos de polimento e de esmaltação para obtenção de cerâmica celular. **Cerâmica Industrial**, Santa Gertrudes, v.11, p.31-34, 2006.

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.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.** Brasília, 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**, Oxford, v.72, n.5, p.722-725, 2008.

EVANDRI, M.G.; TUCCI, P.; BOLLE, P. Toxicological evaluation of commercial mineral water bottled in polyethylene terephthalate: a cytogenetic approach with *Allium cepa*. **Food Additives and Contaminants**, London, v.17, p.1037-1045, 2000.

EVSEEVA, T.I.; GERASKIN, S.A.; SHUTOMOVA, I.I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, Oxford, v.68, p.235-248, 2003.

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, SP, 2005.

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

FERRARI, K.R.; FIGUEIREDO FILHO, P.M.; ALMEIDA, E.B.; DEL ROVERI, C.; CARVALHO, S.G.; BOSCHI, A.O.; ALMEIDA, M.; FRADE, P.; SOUSA CORREA, A.M.; ZANARDO, A. Determinação das emissões de fluoreto durante a queima de amostras de massas cerâmicas. **Cerâmica Industrial**, Santa Gertrudes, v.8, n.5-6, 2003.

FISKESJÖ, G. Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.59, p.508-511, 1983.

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

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

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

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

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. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v.310, n.2, p.175-185, 1994.

GUERRA, R.C. **Estudo do lodo gerado em reator biológico, pelo tratamento da água de produção do petróleo, no Terminal Marítimo Almirante Barroso, município de São Sebastião, SP. visando sua disposição final.** 2009. 126p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2009.

GUSTAVINO, B.; DEGRASSI, F.; FILIPPONI, R.; MODESTI, D.; TANZARELLA, C.; RIZZONI, M. Mitotic indirect non-disjunction in phytohemagglutinine-stimulated human lymphocytes. **Mutagenesis**, New York, v.9, p.17-21, 1994.

JUNGCLAUS, G.A.; LOPEZ-ÁVILA, V.; HITTERS, R.A. Organic compounds in an industrial wastewater: a case study of their environmental impact. **Environmental science and technology**, Easton, v.12, p.88-96, 1978.

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

HOSHINA, M.M. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de efluentes de refinaria de petróleo, por meio dos sistemas testes de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*.** 2005. 160 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2005.

HOSHINA, M.M.; MARIN-MORALES, M.A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.72, p.2090–2095, 2009.

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.

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**, New York, v.88, p.214-219, 2008.

LUO, L.Z. **Chromosome segregational defects: their origin, fate and contribution to genomic instability**. 2004. Dissertation (Mastering). School of Arts and Sciences, 2004.

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.

MA, T.H., XU, C., McCONNELL, H., RABAGO, E.V., ARREOLA, G.A., ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleous assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, Amsterdam, v.334, n.2, p.185-195, 1995.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; MONTIEL, X.; MORENO, P. Inhibición de la actividad biossintética nucleolar inducidas por el plomo en meristemas radiculares de cebolla (*Allium cepa*). **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidade del Zulia**, Zulia, v.16, p.476-487, 1999.

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

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.; 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, p.148-158, 2006.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. The Feulgen Reaction. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.30, n.6, p.665-676, 1978.

MUYSSSEN, B.T.A.; DE SCHAMPHELAERE, K.A.C.; JANSSEN, C.R. Mechanism of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, New York, v.77, p.393-401, 2006.

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

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

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTÍNEZ-LOPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS,

M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, Amsterdam, v.504, p.17-36, 2002.

PEJCHAR, P.; PLESKOT, R.; SCHWARZEROVÁ, K.; MARTINEC, J.; VALENTOVÁ, O.; NOVOTNÁ, Z. Aluminum ions inhibit phospholipase D in a microtubule-dependent manner. **Cell Biology International**, London, v.32, p.554-556, 2008.

PEREIRA, D.G.; CARVALHO, S.; FONSECA, C.A. Avaliação da genotoxicidade em planta do cerrado. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p.128-133, 2002.

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

SAMARDAKIEWICZ, S.; WOŹNY, A. Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v.83, p.289-295, 2005.

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

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **Journal of Cell Biology**, New York, v.140, p.1307-1320, 1998.

SHIMIZU, N.; SHIMUARA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutation Research**, Amsterdam, v.448, p.81-90, 2000.

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

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

STOPPER, H.; MÜLLER, S.O. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. **Toxicology in vitro**, Oxford, v.11, p.661-667, 1997.

RADIĆ, S.; STIPANIČEV, D.; VUJČIĆ, V.; RAJČIĆ, M.M.; ŠIRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.408, p.1228-1233, 2010.

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.

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

RUSSO, I.L. **A bacia hidrográfica do córrego São Joaquim e o abastecimento urbano de água de Santa Gertrudes (SP)**. 1997. 121f. Dissertação (Mestrado em Geociências) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 1997.

VEGA, M.M.; FERNANDEZ, T.B.; TARAZONA, J.V.; CASTANÕ, A. Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama River, Madrid, Spain. **Environmental Pollution**, Barking, v.93, p.135-139, 1996.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPES, D. Cytogenetic damage in Shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “High-density brines”. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, New York, v.43, p.284-291, 2002.

VOUTSINAS, G. ZARANI, F.E.; KAPPAS, A. The effect of environmental aneuploidy inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. **Cell Biology International**, London, v.21, n.7, p.411-418, 1997.

WIERZBICKA, M. Disturbances in cytokinesis caused by inorganic lead. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.29, p.123–133, 1989.

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

Amostra	Tratamento	IM	AC	MN
Controles	Negativo	12,34±1,66	0,21 ±0,07	0,20±0,16
	Positivo MMS	10,26*±2,11	0,55*±0,20	2,87*±0,86
	Positivo TRI	11,67±1,87	2,78*±0,81	1,39*±0,43
Coleta Agosto 2008	P1	11,58±1,73	0,52*±0,15	0,55*±0,14
	P2	13,91±2,84	0,47*±0,18	0,55*±0,12
	P3	13,16±1,08	0,71*±0,08	0,23±0,09
	P4	13,37±1,39	1,01*±0,25	0,86*±0,07
	P5	14,62±3,45	0,94*±0,13	0,93*±0,14
	P6	17,16*±1,46	0,82*±0,37	1,17*±0,13
	P7	11,89±3,50	0,77*±0,58	0,75*±0,14
Controles	Negativo	12,85±1,32	0,24 ±0,09	0,19±0,16
	Positivo MMS	11,14±1,32	0,88*±0,51	2,56*±0,35
	Positivo TRI	11,98±1,55	2,09*±0,34	0,99*±0,21
Coleta Novembro 2008	P1	12,13±0,78	0,57±0,26	0,31±0,15
	P2	12,43±0,70	0,32±0,16	0,29±0,09
	P3	12,03±1,23	0,36±0,14	0,35*±0,24
	P4	11,61 ±1,20	1,03*±0,16	0,78*±0,13
	P5	14,09±2,77	1,27*±0,29	0,70*±0,21
	P6	13,13±0,72	0,99*±0,44	0,81*±0,21
	P7	13,12±0,41	1,02*±0,42	0,76*±0,22
Controles	Negativo	13,37±1,78	0,23 ±0,22	0,17±0,09
	Positivo MMS	11,06±2,10	0,89*±0,36	3,83*±1,34
	Positivo TRI	12,08±1,89	1,98*±0,44	1,21*±0,65
Coleta Fevereiro 2009	P1	14,69±1,28	0,46±0,29	0,21±0,26
	P2	13,31±1,57	0,43±0,28	0,27±0,24
	P3	15,78±1,15	0,34±0,26	0,19±0,32
	P4	16,32 ±1,84	0,69*±0,63	0,31*±0,26
	P5	15,53±0,99	0,58*±0,32	0,32*±0,27
	P6	15,96±2,02	0,67*±0,26	0,37*±0,16
	P7	15,35±2,03	0,76*±0,27	0,38*±0,24
Controles	Negativo	14,90±2,02	0,36 ±0,14	0,18±0,16
	Positivo MMS	12,68±1,81	0,91*±0,41	2,73*±0,41
	Positivo TRI	13,09±2,02	2,07*±0,63	1,01*±0,53
Coleta Agosto 2009	P1	16,77±2,24	0,6*±0,3	0,16±0,22
	P2	17,14±1,74	0,64*±0,22	0,19±0,19
	P3	16,76±1,99	0,74*±0,4	0,12±0,13
	P4	15,51±2,02	0,8*±0,46	0,21±0,26
	P5	16,45±1,75	0,53±0,32	0,22±0,23
	P6	17,13±1,74	0,77*±0,38	0,17±0,21
	P7	15,72±1,79	0,71*±0,3	0,13±0,11

Tabela 1: Frequência de alterações celulares e cromossômicas (%) observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após a exposição em amostras de água coletadas em agosto de 2008 (estação fria e seca), novembro de 2008 (estação quente e seca), fevereiro de 2009 (estação quente e úmida) e agosto de 2009 (estação fria e seca).

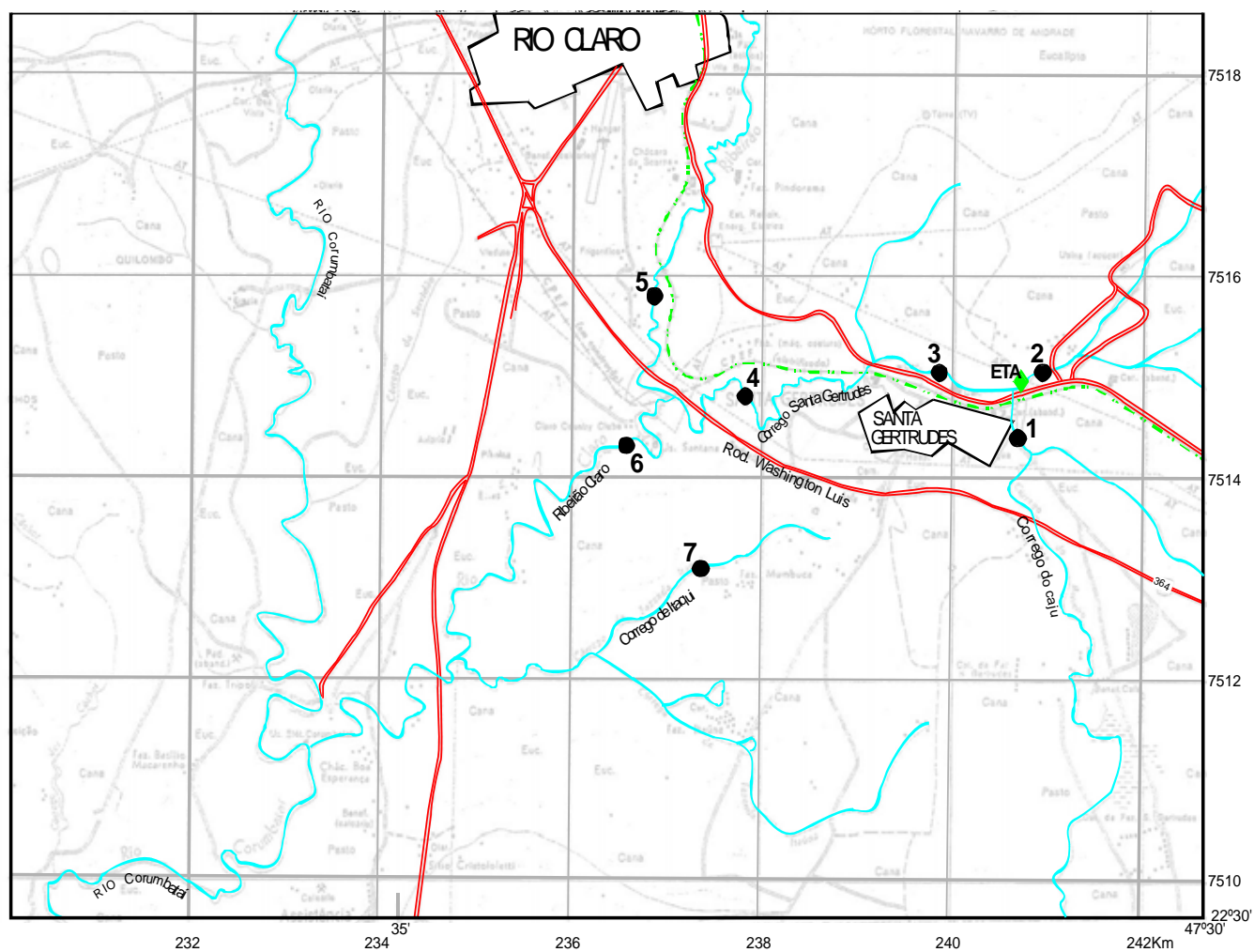
Amostra	Tratamento	MN (M)	MN (F ₁)
Controles	Negativo	0,20±0,16	0,31±0,26
	Positivo MMS	2,87*±0,86	2,57*±0,69
	Positivo TRI	1,39*±0,43	0,65*±0,32
Coleta Agosto 2008	P1	0,55*±0,14	0,55*±0,15
	P2	0,55*±0,12	0,30±0,16
	P3	0,23±0,09	0,61*±0,17
	P4	0,86*±0,07	0,51*±0,26
	P5	0,93*±0,14	0,5*±0,30
	P6	1,17*±0,13	0,77*±0,12
	P7	0,75*±0,14	0,62*±0,22
Controles	Negativo	0,19±0,16	0,21±0,19
	Positivo MMS	2,56*±0,35	2,99*±0,47
	Positivo TRI	0,99*±0,21	0,88*±0,32
Coleta Novembro 2008	P1	0,31±0,15	0,41*±0,25
	P2	0,29±0,09	0,33±0,12
	P3	0,35±0,24	0,37±0,21
	P4	0,78*±0,13	0,99*±0,33
	P5	0,70*±0,21	1,02*±0,32
	P6	0,78*±0,21	0,91*±0,29
	P7	0,76*±0,22	0,82*±0,32
Controles	Negativo	0,17±0,09	0,05±0,08
	Positivo MMS	3,83*±1,34	0,53*±0,29
	Positivo TRI	1,21*±0,65	0,77*±0,44
Coleta Fevereiro 2009	P1	0,21±0,26	0,26*±0,39
	P2	0,27*±0,24	0,16±0,15
	P3	0,19±0,32	0,12±0,13
	P4	0,31*±0,26	0,21*±0,19
	P5	0,32*±0,27	0,20*±0,18
	P6	0,37*±0,16	0,26*±0,2
	P7	0,38*±0,24	0,2*±0,16
Controles	Negativo	0,18±0,16	0,06±0,09
	Positivo MMS	2,73*±0,41	0,61*±0,33
	Positivo TRI	1,01*±0,53	0,95*±0,56
Coleta Agosto 2009	P1	0,16±0,22	0,20*±0,16
	P2	0,19±0,19	0,20*±0,18
	P3	0,12±0,13	0,12±0,1
	P4	0,21±0,26	0,24*±0,2
	P5	0,22±0,23	0,26*±0,24
	P6	0,17±0,21	0,33*±0,18
	P7	0,13±0,11	0,30*±0,23

Tabela 2: Frequência de células micronucleadas observadas em células meristemáticas (M) e da região F₁ de *Allium cepa*, após a germinação em amostras de água coletadas.

Tabela 3: Análise físico-química das amostras coletadas nos pontos específicos dos rios analisados neste estudo

	Parâmetros	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	VM 2	VM 3
Agosto de 2008	Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹ O ₂)	7,5	7,63	7,48	3,83	3,04	3,74	7,01	> 5	> 4
	Amônia (mg.L ⁻¹)	0,24	0,25	0,55	18,2	14,2	14,8	0,39	3,7 [#]	13,3 [#]
	Fósforo Total (mg.L ⁻¹)	124	41,8	49,23	266,2	349,1	231,8	40,68	0,1	0,15
	DBO ₅ (mg.L ⁻¹ O ₂)	4,5	6,5	7,1	21	12,4	44	6,7	5	10
	Alumínio (mg.L ⁻¹)	0,4898*	0,1872*	0,3986*	0,4652*	0,4655*	0,3985*	1,166*	0,1	0,2
Novembro de 2008	Chumbo (mg.L ⁻¹)	n.d.	0,0080	0,0289*	0,0136	0,0215*	0,0227*	n.d.	0,01	0,033
	Zinco (mg.L ⁻¹)	0,0194*	0,0134	0,0225*	0,0434	0,0404	0,0288*	0,0281*	0,18	5
	Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹ O ₂)	8,12	7,24	7,36	2,70	2,88	3,34	7,23	> 5	> 4
	Amônia (mg.L ⁻¹)	0,25	0,24	0,39	6,7	9,4	9,0	0,48	3,7 [#]	13,3 [#]
	Fósforo Total (mg.L ⁻¹)	31,8	12,4	15,3	888,7	1248,1	1209	25,9	0,1	0,15
Fevereiro de 2009	DBO ₅ (mg.L ⁻¹ O ₂)	4,4	11	10,2	144	80	44	8,2	5	10
	Alumínio (mg.L ⁻¹)	0,3546*	0,1799*	0,1551*	0,2935*	0,1958*	0,1823*	0,3601*	0,1	0,2
	Chumbo (mg.L ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0286*	0,0686*	n.d.	0,01	0,033
	Zinco (mg.L ⁻¹)	0,0084	0,0076	0,0217	0,0214	0,0289	0,0167	0,0048	0,18	5
	Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹ O ₂)	7,05	6,94	6,6	4,45	4,28	6,30	6,98	> 5	> 4
Agosto de 2009	Amônia (mg.L ⁻¹)	0,58	0,14	0,31	1,61	2,19	1,68	0,46	3,7 [#]	13,3 [#]
	Fósforo Total (mg.L ⁻¹)	13,7	12,9	15,6	325,3	257,4	174,7	17,8	0,1	0,15
	DBO ₅ (mg.L ⁻¹ O ₂)	8,4	9,3	5,9	46	46	36	8,4	5	10
	Alumínio (mg.L ⁻¹)	0,9131*	0,1210*	0,2499*	0,2207*	1,190*	0,8632*	0,7317*	0,1	0,2
	Chumbo (mg.L ⁻¹)	0,0288*	0,0221*	n.d.	n.d.	0,0176*	0,0486*	n.d.	0,01	0,033
Agosto de 2009	Zinco (mg.L ⁻¹)	0,0035	0,0028	0,0026	0,0067	0,0121	0,1007	0,0068	0,18	5
	Oxigênio Dissolvido (MG.L ⁻¹ O ₂)	8,1	7,66	7,7	4,77	4,27	3,80	7,26	> 5	> 4
	Amônia (mg.L ⁻¹)	0,16	0,19	0,17	9,4	11,4	7,5	0,20	3,7 [#]	13,3 [#]
	Fósforo Total (mg.L ⁻¹)	31,8	12,4	15,3	888,7	1248,1	1209	25,9	0,1	0,15
	DBO ₅ (mg.L ⁻¹ O ₂)	7,4	6,0	7,7	106	114	90	8,8	5	10
Agosto de 2009	Alumínio (mg.L ⁻¹)	0,1333*	0,1721	0,0953	0,1390*	0,1032*	0,0699	0,0617	0,1	0,2
	Chumbo (mg.L ⁻¹)	0,0340*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0247*	0,01	0,033
	Zinco (mg.L ⁻¹)	0,0174	0,0213	0,0223	0,6346*	0,0582	0,0573	0,0329	0,18	5

Sendo: **VM 2**: valor máximo estabelecido para corpos d'água de classe 2 (BRASIL, 2005); **VM 3**: valor máximo estabelecido para corpos d'água de classe 3 (BRASIL, 2005); **#**Valores de amônia estabelecidos para pH menor ou igual a 7,5; *Valores acima do valor máximo permitido para corpos d'água de classe 2.



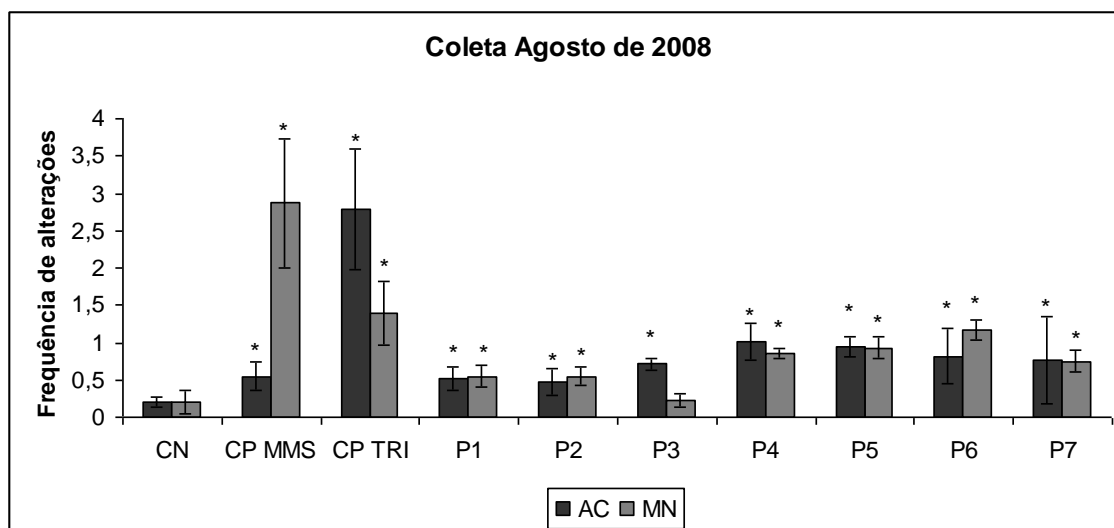


Figura 2: Frequência de alterações celulares e cromossômicas (%) observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição em amostras de água coletadas em agosto de 2008 (estação fria e seca). *diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Mann-Whitney. **CN:** controle negativo; **CP MMS:** controle positivo realizado com MMS; **CP TRI:** controle positivo realizado com trifluralina; **AC:** aberrações cromossômicas; **MN:** micronúcleos.

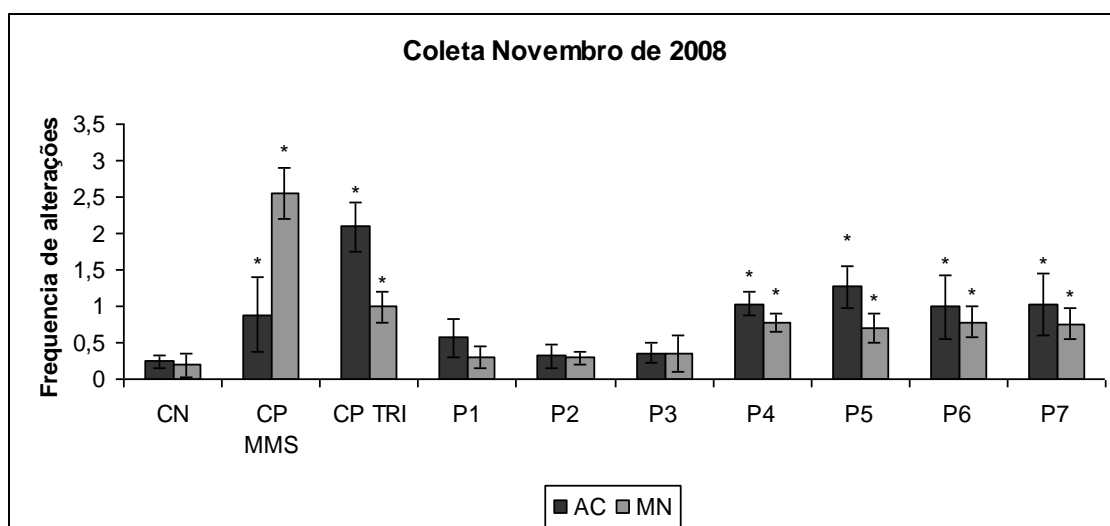


Figura 3: Frequência de alterações celulares e cromossômicas (%) observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição em amostras de água coletadas em novembro de 2008 (estação quente e seca). *diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Mann-Whitney. **CN:** controle negativo; **CP MMS:** controle positivo realizado com MMS; **CP TRI:** controle positivo realizado com trifluralina; **AC:** aberrações cromossômicas; **MN:** micronúcleos.

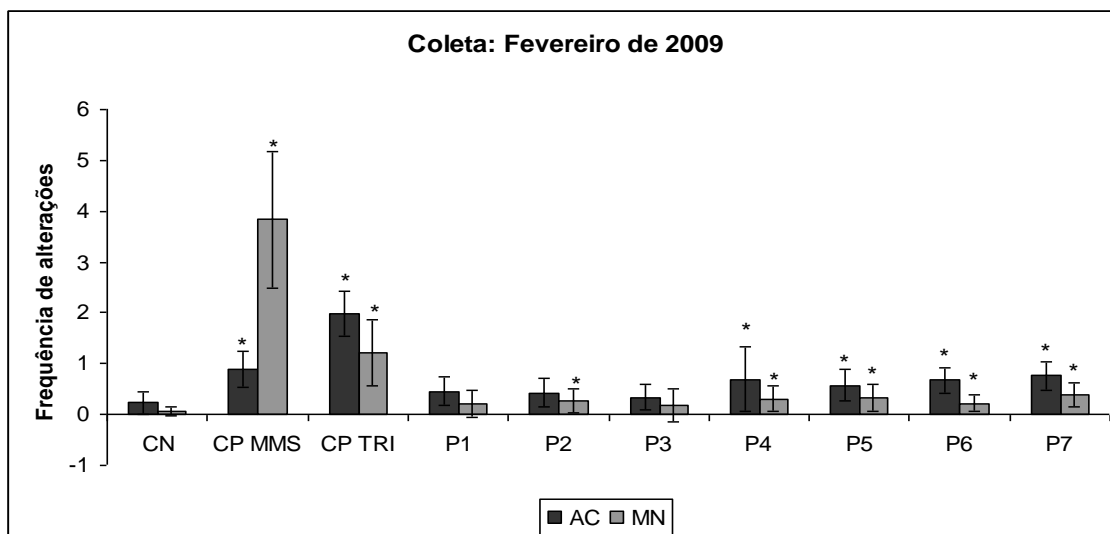


Figura 4: Frequência de alterações celulares e cromossômicas (%) observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição em amostras de água coletadas em fevereiro de 2009 (estação quente e úmida) *diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Mann-Whitney. **CN:** controle negativo; **CP MMS:** controle positivo realizado com MMS; **CP TRI:** controle positivo realizado com trifluralina; **AC:** aberrações cromossômicas; **MN:** micronúcleos.

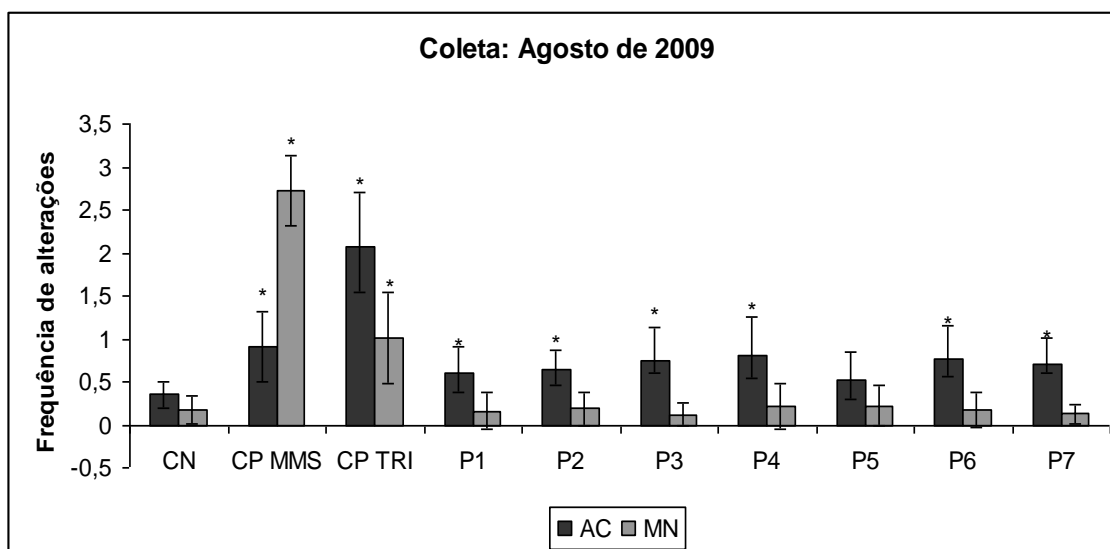


Figura 5: Frequência de alterações celulares e cromossômicas (%) observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição em amostras de água coletadas em agosto de 2009 (estação fria e seca). *diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Mann-Whitney. **CN:** controle negativo; **CP MMS:** controle positivo realizado com MMS; **CP TRI:** controle positivo realizado com trifluralina; **AC:** aberrações cromossômicas; **MN:** micronúcleos.

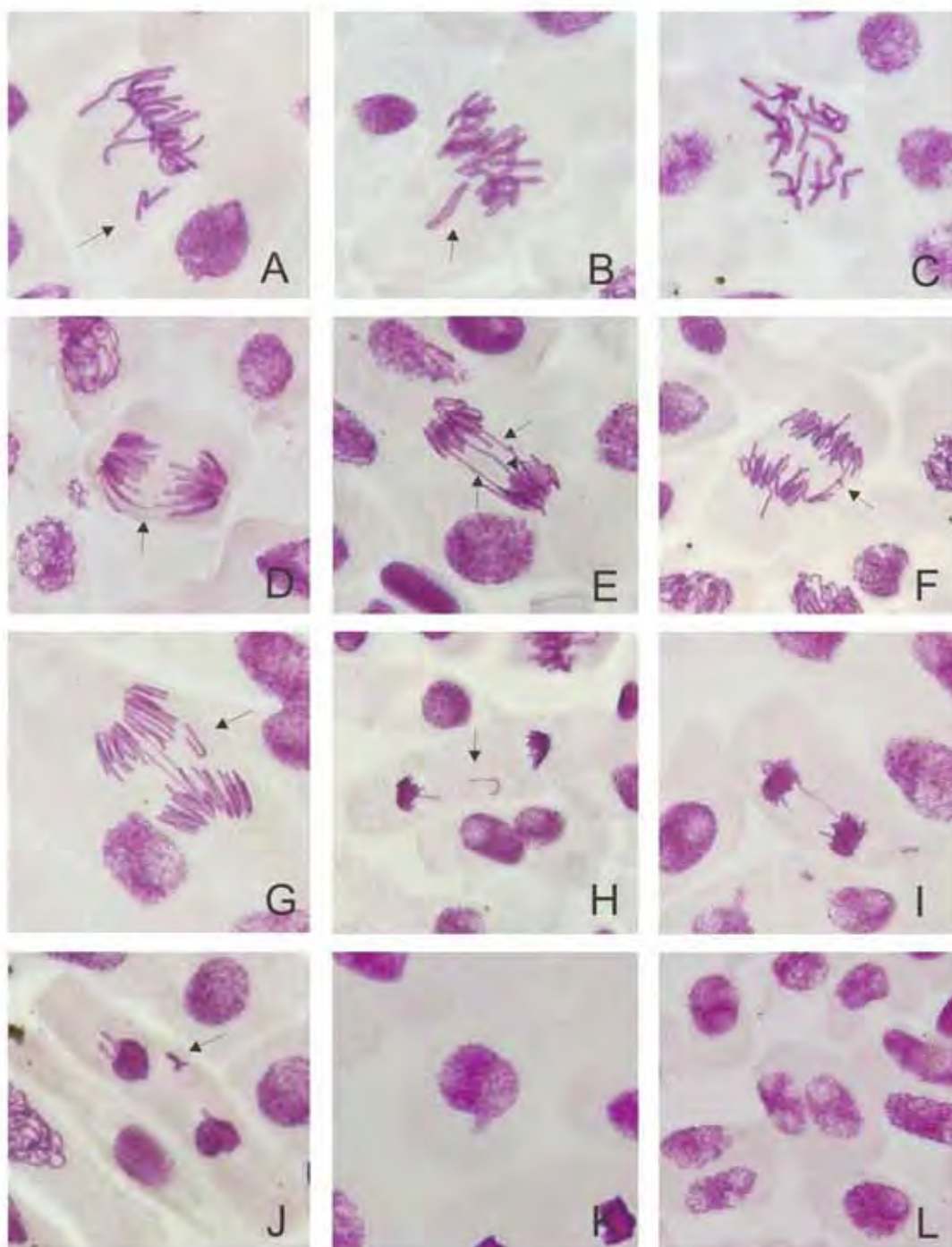


Figura 6: Alterações genotóxicas encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa*. **A. e B.** Metáfases com perda cromossômica; **C.** C-metáfase; **D. e E.** Anáfases com ponte cromossômica; **F.** Anáfase com ponte cromossômica, mostrando aderência cromatídica na região terminal dos cromossomos; **G. e H.** Anáfases com perda cromossômica; **I.** Telófase com ponte cromossômica; **J.** Telófase com perda cromossômica; **K.** Broto nuclear; **L.** Célula binucleada.

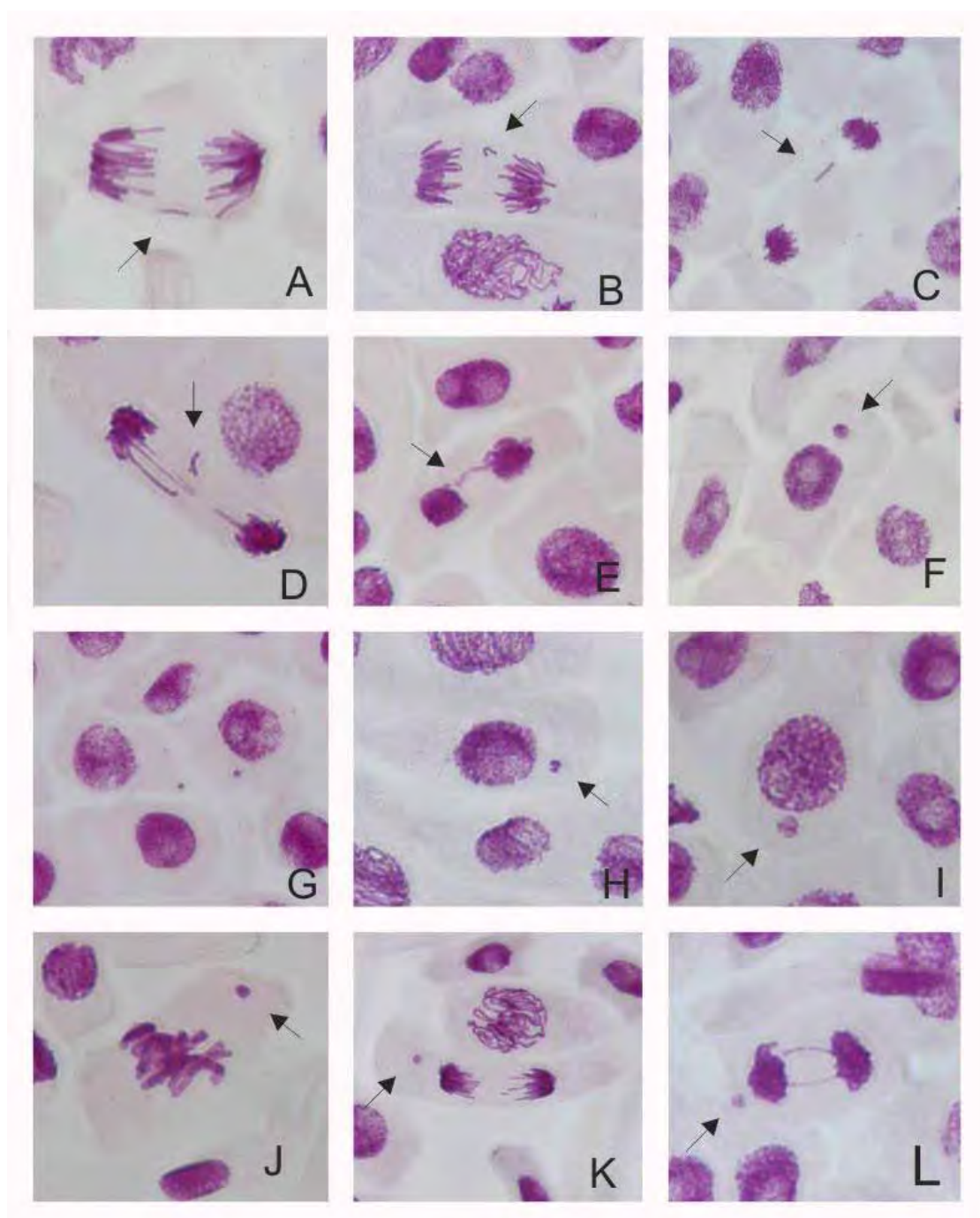


Figura 7: Alterações mutagênicas encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa*. **A., B. e C.** Anáfases com quebras cromossômicas; **D.** Telófase com atraso e quebra cromossômica; **E.** Telófase com quebra cromossômica; **F., G. e H.** Células micronucleadas; **I.** Prófase com micronúcleo; **J.** Metáfase com micronúcleo; **K.** Anáfase com micronúcleo e quebra; **L.** Telófase com ponte cromossômica e micronúcleo.

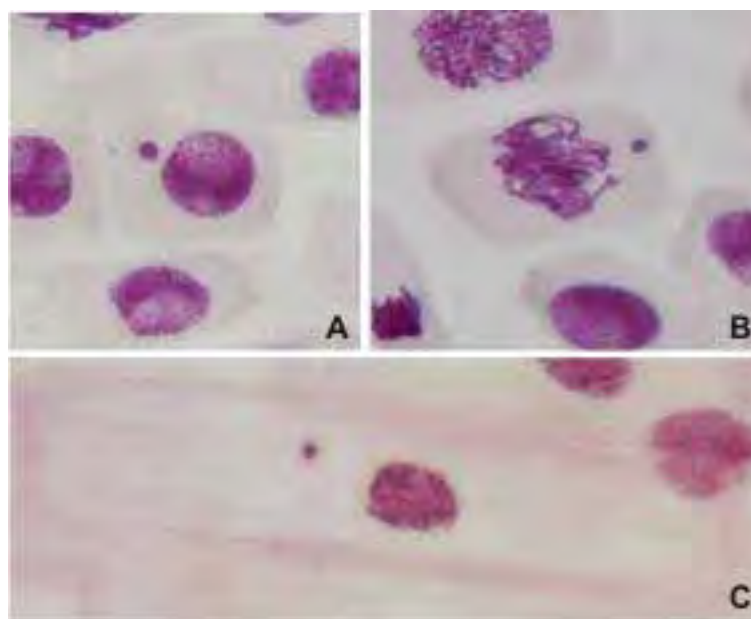


Figura 8: Alterações mutagênicas observadas em células de raízes de *Allium cepa*. **A.** célula meristemática micronucleada em interfase; **B.** célula meristemática micronucleada em metáfase; **C.** célula micronucleada da região F₁.

Efeitos genotóxicos e mutagênicos de amostras de águas de rios que recebem efluentes urbanos e de indústrias cerâmicas, utilizando o organismo-teste *Oreochromis niloticus*

Renata Caritá¹; Maria Aparecida Marin Morales¹

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

RESUMO

Os ambientes aquáticos têm sofrido severos impactos devidos, sobretudo, ao despejo de efluentes domésticos, agrícolas e industriais. Para a avaliação da qualidade das águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e de indústrias cerâmicas da cidade de Santa Gertrudes, foram realizados testes do micronúcleo, de anormalidades nucleares e o do ensaio do cometa em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Amostras de água foram coletadas em sete pontos diferentes ao longo do curso de rios situados na área de influência da cidade. Para a realização dos ensaios, espécimes de *O. niloticus* foram expostos, por 96 horas, às amostras de águas coletadas nos diversos pontos. Foi observado um maior comprometimento da qualidade das águas, após o despejo dos efluentes domésticos e industriais da cidade, e um potencial genotóxico e mutagênico para os efluentes lançados nestes recursos hídricos. A espécie *O. niloticus* se mostrou sensível e indicada para estudos de monitoramento ambiental de rios impactados por efluentes urbanos e industriais.

Palavras-chave: micronúcleo, anormalidades nucleares, ensaio do cometa, monitoramento ambiental, peixes como organismos testes.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos ambientes aquáticos tem sido considerada a poluição mais preocupante da atualidade. Esta preocupação tem como principal fator, o significativo aumento de lançamento de substâncias químicas nos recursos hídricos, o que pode estar colocando em risco toda a biota associada a estes ambientes.

A detecção de compostos potencialmente perigosos nas águas constitui uma árdua tarefa para os estudiosos da área ambiental, pois as contaminações ambientais são cada vez mais intensas e variadas, sendo que muitos químicos são ainda pouco conhecidos, quanto à ação que exercem sobre os organismos expostos. Por esta razão, vem sendo desenvolvida uma variedade de bioensaios, para melhor avaliar os efeitos que os poluentes promovem no meio biótico e abiótico, principalmente no ambiente aquático. Muitos organismos têm sido utilizados para avaliar a potencialidade mutagênica de efluentes industriais que são lançados em águas superficiais (KUNGOLOS et al., 2006; ŽEGURA et al., 2009).

Os peixes têm sido utilizados como bioindicadores dos efeitos da poluição ambiental (VAN DER OOST et al., 2003), devido às suas diferentes funções na cadeia trófica, à característica de acumular substâncias tóxicas, por responder a baixas concentrações de mutágenos (ÇAVAS et al., 2005; MATSUMOTO et al., 2006) e, ainda, responder precocemente às variações ambientais.

Diversos testes têm sido utilizados para a avaliação da genotoxicidade ambiental. Os testes do micronúcleo e o do ensaio do cometa têm sido aplicados em peixes, para determinar os efeitos mutagênicos e genotóxicos de poluentes aquáticos (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001; LEMOS et al., 2005; SOUZA; FONTANETTI, 2006; HOSHINA et al., 2008).

O teste de micronúcleo (MN) vem sendo usado, com grande sucesso, desde o final da década de 80, para avaliar a mutagenicidade de poluentes ambientais e de diferentes compostos químicos (KLOBUCAR et al., 2003). É amplamente utilizado para estimar danos citogenéticos induzidos por agentes físicos e químicos e pode ser facilmente aplicado em diversos organismos, como, por exemplo, os peixes (UDROIU, 2006).

MN são estruturas formadas por cromossomos inteiros ou por frações cromossômicas que não foram incorporados ao núcleo da célula filha, durante a divisão celular, e que aparece como uma estrutura circular pequena, com coloração semelhante ao núcleo principal da célula (BOMBAIL et al., 2001). O teste do MN

pode ser aplicado em qualquer tipo de célula e a sua visualização independe do ciclo celular, uma vez que os danos induzidos no primeiro ciclo serão visíveis, como MN, no segundo ciclo ou em ciclos subseqüentes da divisão celular (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Além dos micronúcleos, Carrasco et al. (1990) e Çavas e Ergene-Gozükara (2003) consideram a presença de alterações na morfologia nuclear uma resposta celular à exposição a substâncias mutagênicas. Outros estudos, entretanto, indicam que as AN são induzidas em resposta a exposição a contaminantes (TOLBERT et al., 1992; PACHECO; SANTOS, 1996; SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001; PALHARES; GRISÓLIA, 2002; ERGENE et al., 2007).

O ensaio do cometa é uma técnica considerada vantajosa para avaliações ambientais, quando comparada com outros testes de genotoxicidade, pois permite a detecção de pequenos danos no DNA utilizando um reduzido número de células, é de fácil aplicação, pode ser conduzido em um curto período de tempo e necessita de pequenas amostras da substância-teste (TICE et al., 2000). Desta maneira, o ensaio do cometa tem sido frequentemente aplicado, conjuntamente ao teste do MN, para estudos de monitoramento ambiental (RUSSO et al., 2004).

O córrego Santa Gertrudes recebe efluentes domésticos do município de Santa Gertrudes, lançados *in natura*, e efluentes de um *pool* de indústrias cerâmicas (RUSSO, 1997). O pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes é um dos maiores do país. Essas indústrias geram efluentes líquidos com alto potencial poluidor, por apresentarem inúmeras substâncias tóxicas, sobretudo metais pesados, derivadas de seus processos de esmaltação. Os principais poluentes destes efluentes são os metais Al, Ca, Co, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Si, Sn, Zn e Zr (RUSSO, 1997; BERNARDIN, 2006), embora eles também podem contaminar o ambiente pelo flúor, liberado no processo de queima dos revestimentos das cerâmicas. No período das chuvas, a contaminação por flúor fica ainda mais problemática, pois este elemento se transforma em fluoretos (chuvas ácidas), contaminando solos e rios da região (FERRARI et al., 2003).

Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade e o potencial genotóxico e mutagênico de águas coletadas em diversos pontos de rios que recebem a influência dos poluentes derivados das atividades urbanas e industriais da cidade de Santa Gertrudes, em diferentes estações do ano. As avaliações foram realizadas

pelos testes do MN e do ensaio do cometa, aplicados sobre o organismo-teste *Oreochromis niloticus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização da área de estudo

O Rio Piracicaba tem como afluente esquerdo a bacia do rio Corumbataí, que é abastecida pela sua margem esquerda pelo Ribeirão Claro. O Ribeirão Claro tem como afluentes esquerdos as sub-bacias do córrego Itaqui e do córrego Santa Gertrudes. O córrego Santa Gertrudes tem como afluente esquerdo o córrego do Caju. A bacia do córrego Santa Gertrudes situa-se no município de Santa Gertrudes e está localizado entre as coordenadas geográficas 22° 25' e 22° 32' LAT S e 47° 35' e 47° 28' LONG W (RUSSO, 1997).

2.2. Material

Foram coletadas amostras de água nos anos de 2008 e 2009, durante as estações quente e seca (novembro de 2008), quente e úmida (fevereiro de 2009) e fria e seca (agosto de 2009), em sete pontos específicos distribuídos ao longo dos cursos dos córregos Santa Gertrudes, do Caju, Itaqui e do Ribeirão Claro, como segue: Ponto 1 - córrego do Caju (antes da confluência com o córrego Santa Gertrudes); Ponto 2 - córrego Santa Gertrudes (próximo a captação de água pela Estação de Tratamento de Água); Ponto 3 - córrego Santa Gertrudes (após a confluência do córrego do Caju); Ponto 4 – córrego Santa Gertrudes (após o recebimento do efluente urbano e industrial, predominantemente de indústrias cerâmicas); Ponto 5 - Ribeirão Claro (a montante da confluência do córrego Santa Gertrudes); Ponto 6 - Ribeirão Claro (a jusante da confluência do córrego Santa Gertrudes); e Ponto 7 - córrego Itaqui (após o despejo de efluente industrial cerâmico) (Figura 1).

Foram utilizados, como organismo-teste, espécimes de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), popularmente conhecidos como tilápia do Nilo. Foram selecionados indivíduos com um tamanho médio de dez centímetros, para evitar diferenças intra-específicas decorrentes das variações de tamanho e idade. Previamente a realização dos ensaios biológicos, os peixes foram aclimatados em tanque, sob condições controladas e com sistemas de filtração e aeração

adequados, para evitar interferências decorrentes de estresse induzidos pelas condições experimentais.

Foram utilizados no experimento, nove aquários com capacidade de 50 litros cada, sendo um para o controle negativo, um para controle positivo e os demais destinados para cada um dos pontos de coleta. O controle negativo foi realizado com água de poço artesiano, o controle positivo foi desenvolvido injetando, intraperitonealmente, em cada espécime, 3cc de ciclofosfamida/50g de peixe. Os ensaios com as águas dos rios foram desenvolvidos, expondo-se os peixes às amostras de água coletadas. Todos os testes foram feitos com cinco peixes por aquário, durante 96 horas de exposição.

2.3. Teste do micronúcleo (MN) e de anormalidades nucleares (AN)

Após as 96 horas de exposição, foram coletadas amostras de sangue de todos os indivíduos, por meio da técnica de punção cardíaca, usando para este procedimento seringas previamente heparinizadas. O sangue coletado foi utilizado para a preparação de lâminas, pelo método do esfregaço. As lâminas foram fixadas em etanol absoluto, por dez minutos e, depois de 24 horas, submetidas à reação de Feulgen.

Foi analisado um total de 5000 eritrócitos por tratamento, sendo 1000 células por espécime (cinco espécimes por tratamento). Foi observada a frequência de células portadoras de micronúcleos e anormalidades nucleares. Os resultados obtidos foram comparados com o controle negativo, pelo teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

2.4. Ensaio do cometa

Para realização do ensaio do cometa, foi utilizada a metodologia descrita por Singh et al. (1988), com algumas modificações. Primeiramente, as lâminas foram mergulhadas em agarose normal 1,5% a 60°C, secas e armazenadas em geladeira. Amostras de 3µL de sangue de peixes foram diluídas em 1000µL de solução fisiológica de vertebrados e as lâminas montadas com 10µL desta suspensão celular adicionados a 120µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em uma solução de lise (1mL triton X-100, 10mL de DMSO e 89mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução de estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, ~8,0g de NaOH sólido, 10g de lauryl

sarcosinato sódico para 1L), em geladeira por, no mínimo, uma hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese, contendo tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH 12.1) à 4°C, qual permaneceram por 20 minutos, antes da corrida de eletroforese em corrente 49V e 300mA. Após os 20 minutos de corrida, as lâminas foram neutralizadas em tampão (Tris 0,4M-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, secas a temperatura ambiente e fixadas com etanol 100% por dez minutos. A coloração foi realizada com brometo de etídio (0,02 mg/mL).

Foram analisados, em microscópio (Epifluorescência Leica, filtro B – 34: excitação: $\lambda = 420\text{nm}-490\text{nm}$, barreira: $\lambda = 520\text{nm}$, objetiva de 40x), aleatoriamente, 100 nucleóides de cada peixe. Os nucleóides foram classificados visualmente, segundo a classificação de Kobayashi et al. (1995) e de acordo com a migração dos fragmentos, em: classe 0 (ausência de dano visível); classe 1 (pequeno dano - cauda menor que uma vez o tamanho do nucleóide); classe 2 (médio dano - cauda com tamanho de uma a duas vezes o tamanho do nucleóide); e classe 3 (grande dano - cauda com tamanho maior que duas vezes o tamanho do nucleóide). Os escores de cada tratamento foram verificados e submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis para comparação dos resultados entre os tratamentos e o controle negativo, bem como dos tratamentos entre si.

3. RESULTADOS

Durante as 96 horas de exposição dos peixes às águas dos diversos pontos de coleta, não foi observada mortalidade dos indivíduos expostos aos tratamentos. Devido às características adversas exibidas pela águas dos pontos 4, 5 e 6 (presença de espuma) e aos resultados das análises químicas, foram tomados alguns cuidados na montagem dos experimentos. As águas desses pontos foram diluídas (proporção 3:1), para se evitar uma alta toxicidade que poderia inviabilizar o desenvolvimento dos experimentos.

Os resultados obtidos na análise das lâminas de eritrócitos de *O. niloticus* foram divididos em duas categorias: os micronúcleos (MN) e as alterações nucleares (AN). Dentre as AN incluímos os núcleos do tipo *blebbed*, *lobed*, *notched* e *broken egg*, as células binucleadas, vacuolizadas e a cariólise (Figura 6). Os resultados para AN e MN são apresentados na Tabela 1 e Figura 2, 3 e 4.

Como esperado, o Ponto 4, referente a um dos pontos situados no córrego Santa Gertrudes (após o despejo de efluentes urbanos e industriais), apresentou os

maiores índices de MN e AN para todas as coletas realizadas. Pelas análises físico-químicas, foi possível verificar, para águas deste ponto de coleta, elevados índices de amônia, fósforo total, alumínio e zinco, concentrações estas acima da permitida pela resolução 357/05 do CONAMA (BRASIL, 2005).

Os pontos 2 (antes da captação de água) e 3 (logo após a captação) não apresentaram índices significativos de MN e AN. O ponto 1, apresentou índices significativos de AN ($0,67 \pm 0,33$), apenas para a coleta de novembro de 2008. Pelas análises físico-químicas, pudemos observar que estes pontos apresentaram variações, apenas, para os valores do alumínio.

Foram observados índices significativos de AN para as amostras de água coletadas nos pontos 5, 6 e 7, em todas as coletas realizadas. Contudo, valores significativos de MN foram observados apenas na coleta de agosto de 2009 (estação fria e seca). Nestes pontos também foi possível verificar elevados índices de amônia, fósforo total, alumínio, chumbo e zinco, concentrações estas acima das permitidas pela resolução CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) (Tabela 2).

Os peixes expostos às águas de todas as coletas exibiram seus eritrócitos com AN, sendo que os núcleos do tipo *notched* e *lobed* foram as que apareceram em maior frequência.

Pela aplicação da técnica do ensaio do cometa, foi possível verificar a potencialidade de indução de danos no DNA, decorrente da ação de substâncias genotóxicas, presentes nas águas dos rios da região de Santa Gertrudes (Figura 7). Foi observado um maior potencial genotóxico para as águas dos pontos 4, 5, 6 e 7, devido os altos números de nucleóides de classes 2 e 3. O ponto 4, novamente, foi o ponto que apresentou os maiores índices de dano no DNA (Tabelas 3, 4 e 5, Figura 5).

4. DISCUSSÃO

As águas superficiais recebem grandes quantidades de efluentes, sejam eles derivados da agricultura, da indústria ou de esgotos domésticos. Estudos de monitoramento ambiental podem detectar, por meio da utilização de bioindicadores, os impactos sofridos pelos corpos d'água. Dentre os organismos-testes mais usados para biomonitoramento do comprometimento dos recursos hídricos, destacam-se os peixes, que são considerados bons indicadores para a detecção de substâncias genotóxicas nestes ambientes (BÜCKER et al., 2006; SOUZA, FONTANETTI, 2006).

Pelos resultados obtidos nas coletas realizadas, observamos que houve a indução de elevadas freqüências de MN em eritrócitos expostos às águas dos pontos 4, 5, 6 e 7. Tais dados sugerem que essas águas apresentam potencial mutagênico, pois, segundo alguns autores (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; CORDEIRO, 2000; GRISOLIA; STARLING, 2001; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006; CHRISTOFOLETTI, 2008, HOSHINA et al., 2008), a alta indução de MN e AN em eritrócitos de peixes está associada a contaminações por químicos que agem sobre o material genético dos organismos expostos.

Dentre os pontos de coletas mais comprometidos, o P4 (situado após o recebimento dos efluentes urbanos e industriais) foi o que apresentou os maiores índices de MN, o que indica que os efluentes lançados antes deste local estão alterando a qualidade das águas do córrego Santa Gertrudes. Foi possível verificar também que este comprometimento se estende até a sua foz no Ribeirão Claro. Após a sua confluência com o Ribeirão Claro, é possível observar, novamente, a intensificação da potencialidade mutagênica (P6).

A indução de MN pode estar relacionada com atrasos cromossômicos durante a anáfase, caracterizados por um mau funcionamento do fuso (SCHMID, 1976; AL-SABTI; METCALFE, 1995; FERNANDES et al., 2007), ou devido à presença de fragmentos acêntricos, derivados de quebras cromossômicas (FRIEAUFF et al., 1998; MATSUMOTO et al., 2006). Desta forma, a presença de MN nos eritrócitos de peixes é um indicativo da presença de compostos com potencial mutagênico nas amostras de água analisadas.

Foram observadas alterações nucleares do tipo *lobed*, *notched*, *broken-egg* e *blebbed* para os eritrócitos dos peixes expostos às águas de todas as coletas realizadas, sendo observados, predominantemente, núcleos do tipo *notched* e *lobed*. As alterações nucleares do tipo *notched* e a presença de células vacuolizadas podem ser uma resposta celular a um evento de aneuploidia (GHANDIALLY, 1982). Contudo, o mecanismo de formação das AN ainda necessita de informações adicionais às já existentes, para que estas alterações possam ser totalmente esclarecidas e interpretadas (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005).

Os registros de presença de AN devem ser considerados como dados complementares aos registros de indução de MN, e ser considerados como *endpoint* de genotoxicidade, pois alguns autores sugerem que as AN sejam induzidas por

compostos genotóxicos (METCALFE, 1988; RUUD et al., 1991; PACHECO; SANTOS, 1997; PARTON; GARRIOTT, 1997; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ 2000; GRAVATO; SANTOS, 2002; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003).

Os parâmetros observados pelas análises químicas alertam para a necessidade de uma atenção especial para estes recursos hídricos, pois os comprometimentos observados sugerem uma possível interferência na qualidade de vida da biota associada a estes ambientes. Índices elevados de amônia, OD, DBO₅ podem acarretar em alterações nos níveis de oxigênio necessários para manter as condições satisfatórias da vida aquática. A presença de substâncias como a amônia, pode caracterizar um fator limitante para os peixes, pelo reconhecido efeito tóxico deste composto sobre estes organismos. Altos valores de fósforo total e STD também podem causar danos aos peixes e à vida aquática, interferindo na dinâmica dos ecossistemas e causando, por exemplo, o fenômeno da eutrofização (CETESB, 2010).

As concentrações de alumínio, zinco e chumbo, observadas para os pontos 4, 5, 6 e 7, se apresentaram, em algumas coletas, acima dos limites permitidos pela Legislação Brasileira (BRASIL, 2005). Estes valores de metais, provavelmente, sejam decorrentes dos compostos presentes nos efluentes cerâmicos.

A presença de metais pesados, como o cromo, cobre, ferro, chumbo, níquel e zinco nos ecossistemas aquáticos é uma preocupação, devido a sua toxicidade e genotoxicidade para diversas formas de vida. Estudos realizados por Ergene et al. (2007) sugerem que os efeitos genotóxicos observados, pelo teste do MN, em eritrócitos de peixes expostos a águas de uma lagoa da Turquia (no Delta Goksu) estejam relacionados com a presença de metais pesados presentes nas amostras de água.

Estudos realizados por Yabe e Oliveira (1998) registraram elevadas concentrações de alumínio e chumbo para as águas do Lago Igapó II (Londrina-PR). De acordo com esses autores, esses metais podem ser os responsáveis pelos danos no DNA dos eritrócitos de *Tilapia rendalli*, observados pelo ensaio do cometa.

Os efluentes industriais possuem uma natureza química muito complexa (CLAXTON et al., 1998), e, segundo White et al. (2002), é difícil identificar as substâncias tóxicas e genotóxicas existentes nestas amostras. Por essa razão, a ação dos compostos ou substâncias químicas presentes nas amostras coletadas nos rios da região de Santa Gertrudes é difícil de ser determinada, uma vez que

estes rios estão impactados por uma mistura complexa, que pode ter tanto substâncias de ação aneugênica como clastogênica.

Exposições a agentes genotóxicos, presentes no meio aquático, podem levar a perda da integridade do DNA, como demonstrado neste estudo, pelo elevado índice de quebras do material genético, que resultou em cometas de classes 1, 2 e 3. Um maior potencial genotóxico foi detectado para os pontos 4, 5, 6 e 7, pelos altos registros de cometas das classes 2 e 3. O ponto 4 foi, novamente, o ponto que apresentou os maiores índices de dano no DNA.

Os danos genotóxicos observados no ensaio do cometa, para os eritrócitos dos espécimes expostos, não corresponderam aos danos mutagênicos observados no teste do MN. Isto pode ser explicado 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 estrutura do material genético dos organismos.

Nossos resultados confirmaram a eficiência do ensaio do cometa, utilizando eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, para avaliações de comprometimento ambiental por poluentes diversos, por ser uma ferramenta bastante sensível para a detecção de genotoxicidade, corroborando com os resultados de Padrangi et al. (1995), Russo et al. (2004), Matsumoto et al. (2006), Ventura et al., 2008; Souza e Fontanetti (2006).

O. niloticus tem sido utilizado, com sucesso, para estudos de monitoramento ambiental. Avaliações, por meio do teste do MN e ensaio do cometa em *O. niloticus*, indicaram diferenças de genotoxicidade para diferentes pontos amostrados ao longo do rio Tietê (São Paulo, Brasil). O maior potencial genotóxico, para as águas deste rio, foi verificado próximo à represa Billings, indicando um maior impacto das descargas de efluentes da cidade de São Paulo nesta região, quando comparado às demais regiões (FRACÁCIO et al., 2003; RODGHER et al., 2005; ROCHA et al., 2009). Foi possível verificar também que a diluição dos tributários, ao longo do curso do rio, resulta em uma diminuição da genotoxicidade dos contaminantes (ROCHA et al., 2009). O uso de peixes como bioindicador permitiu que os autores (FRACÁCIO et al., 2003; RODGHER et al., 2005; ROCHA et al., 2009) concluíssem que a qualidade dos sedimentos das represas do rio Tietê melhora, conforme se distancia

da região metropolitana de São Paulo, indicando que as substâncias que impactam o rio têm sua origem nas atividades desenvolvidas na metrópole paulistana.

Trabalhos realizados por Hoshina et al. (2008), com *O. niloticus*, também reforçam a sensibilidade deste organismo-teste para avaliações ambientais. Espécimes expostos a amostras de águas coletadas em cinco pontos diferentes do rio Atibaia (São Paulo, Brasil), em área sob a influência de efluentes de uma refinaria de petróleo, mostraram a indução de danos no material genético para quatro dos cinco pontos amostrados desse rio. Os autores acreditam que os tratamentos usados pela refinaria minimizaram os efeitos genotóxicos dos efluentes, mas não eliminaram totalmente sua potencialidade de ação.

Estudos semelhantes, realizados por Souza e Fontanetti (2006), com amostras de águas do rio Paraíba do Sul (São José dos Campos, SP, Brasil), mostraram diferenças no potencial genotóxico deste rio em períodos específicos do ano. Foi observado um aumento significativo de MN nas coletas realizadas em meses de clima seco e frio, no ponto que corresponde à descarga da refinaria de petróleo, e ausência de alterações significativas nos meses de clima seco e quente e quente e úmido. Os autores acreditam que o nível de água diminui durante a estação seca, favorecendo a alta concentração dos poluentes neste recurso hídrico, enquanto que na estação chuvosa, os poluentes foram diluídos.

As análises realizadas neste trabalho mostraram uma maior indução de MN e danos no DNA para as coletas realizadas na estação fria e seca (agosto de 2009), corroborando os dados de Souza e Fontanetti (2006). Estes dados sugerem que neste período as águas apresentam uma maior potencialidade de indução de danos genotóxicos e mutagênicos nos organismos expostos, talvez pela maior concentração dos poluentes presentes nestes recursos hídricos nesta estação do ano.

5. CONCLUSÃO

Com base nestes dados, este estudo serve de alerta para o comprometimento que os despejos industriais e urbanos podem causar sobre os recursos hídricos. Segundo White e Rasmussen (1998), os esgotos municipais são misturas complexas, derivadas de associação de efluentes industriais e domésticos, que

contêm substâncias das mais variadas características. Essas substâncias, quando lançadas no ambiente aquático, podem causar danos aos organismos expostos, acarretando em impacto para todo o ecossistema.

Desta forma, fica evidente a necessidade de realizações constantes de monitoramento da qualidade das águas dos recursos hídricos. Além das análises físico-químicas devem ser realizadas avaliações utilizando bioindicadores, pois estes respondem de maneira mais real aos riscos que os poluentes ambientais possam promover sobre os ambientes naturais.

6. REFERÊNCIAS

- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, Amsterdam, v.343, p.121-135, 1995.
- AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v.467, p.177-186, 2000.
- BERNARDIN, A.M.; FELISBERTO, D.S.; DAROS, M.T.; RIELLA, H.G. Reaproveitamento de resíduos de polimento e de esmaltação para obtenção de cerâmica celular. **Cerâmica Industrial**, Santa Gertrudes, v.11, p.31-34, 2006.
- BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, Oxford, v.44, p.383-392, 2001.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Brasília, 2005.
- BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazônica**, Manaus, v.36, n.3, p.357-364, 2006.
- CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MAYERS, M.S. Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v.47, p.2123-2136, 1990.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v.534, p.93-99, 2003.
- ÇAVAS, T. GARANKA, K.K.; ARKHIPCHUK, V.V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium

chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.43, p.569-574, 2005.

CHRISTOFOLETTI, C.A. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. 2008. 118 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2008.

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

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>> Acesso: 25.jan.2010.

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

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

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.

FERRARI, K.R.; FIGUEIREDO FILHO, P.M.; ALMEIDA, E.B.; DEL ROVERI, C.; CARVALHO, S.G.; BOSCHI, A.O.; ALMEIDA, M.; FRADE, P.; SOUSA CORREA, A.M.; ZANARDO, A. Determinação das emissões de fluoreto durante a queima de amostras de massas cerâmicas. **Cerâmica Industrial**, Santa Gertrudes, v.8, n.5-6, 2003.

FRACÁCIO, R.; VERANI, N.F.; ESPINDOLA, E.L.G.; ROCHA, O.; RIGOLIN-SA, O.; ANDRADE, C.A. Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae) exposed to the toxic sediments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.46, p.685-695, 2003.

FRIEAUFF, W.; POTTER-LOCHER, F.; CORDIER, A.; SUTTER, W. Automatic analysis of the *in vitro* micronucleus test on V79 cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v.413, p.57-68, 1998.

GHANDIALLY, F.N. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. **Butterworths**, London, 1982, 971 p.

GRAVATO, C.; SANTOS, M.A. β -Naphthoflavone liver EROD and erythrocytic nuclear abnormality induction in juvenile *Dicentrarchus labrax* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.52, 69-74, 2002.

GRISOLIA, C.K.; CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, p.235-239, 2000.

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

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.

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.

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

KUNGOLOS, A.G.; BREBBIA, C.A.; SAMARAS, C.P.; POPOV, V. **Environmental Toxicology**. Southampton: WIT PRESS, 2006. 362p.

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.

LEMONS, N.G.; DIAS, A.L.; SILVA-SOUSA, A.T.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 19, p.197-201, 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, p.148–158, 2006.

METCALFE, C.D. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.40, 489-495, 1988.

PACHECO, M.G.; SANTOS, M.A. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of *Anguilla Anguilla* L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached Kraft pulp mill effluent. **Fresenius Environmental Bulletin**, Basel, v.5, p.746-751, 1996.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on juvenile eel *Anguilla anguilla* L., **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.38, p. 252–259, 1997.

PALHARES, D.; GRISÓLIA, C.K. Comparasion between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.25, p. 281-284, 2002.

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

PARTON, J.W.; GARRIOTT, M.L. An evaluation of micronucleus induction in bone marrow and in hepatocytes isolated from collagenase perfused liver or from formalin-fixed liver using 4-week-old rats treated with known clastogens. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.29, p.379–385, 1997.

ROCHA, P.S.; LUVIZOTTO, G.L.; KOSMEHL, T.; BÖTTCHER, M.; STORCH, V.; BRAUNBECK, T.; HOLLERT, H. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.72, p.1842-1848, 2009.

RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; ROCHA, O.; FRACÁCIO, R.; PEREIRA, R.H.G.; RODRIGUES, M.H.S. Limnological and ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the Tietê River (São Paulo, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.6, n.4, p.697-710, 2005.

RUDD, N.L.; WILLIAMS, S.E.; EVANS, M.; HENNIG, U.G.C.; HOAR, D.I. Kinetochore analysis of micronuclei allows insights into the actions of colcemid and mitomycin C. **Mutation Research**, Amsterdam, v.261, p.57–68, 1991.

RUSSO, I.L. **A bacia hidrográfica do córrego São Joaquim e o abastecimento urbano de água de Santa Gertrudes (SP)**. 1997. 121f. Dissertação (Mestrado em Geociências) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 1997.

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

SCHIMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLANENDER, A. (Ed.) **Principles and Methods for Their Detection**. New York: PLENUM PRESS, 1976, pp.31-53.

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

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.

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

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIAYMAE, 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.3, p.206-221, 2000.

TOLBERT, P.E.; SHY, A.C., ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear abnormalities in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, Amsterdam, v.271, p.69–77, 1992.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic toxicology**, New York, v.79, p.201-204, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.13, p. 57–149, 2003.

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.

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

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

YABE, M.I.S.; OLIVEIRA, E.O. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Química nova**, São Paulo, v.21, p.551-556, 1998.

ŽEGURA, B.; HEATH, E.; ČERNOŠA, A.; FILIPIČ, M. Combination of *in vitro* bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, Oxford, v.75, p.1453–1460, 2009.

Amostra	Tratamento	Micronúcleos	Alterações nucleares
Controles	Negativo	0,03±0,04	0,2±0,12
	Positivo	0,56*±0,14	1,16*±0,44
Coleta Novembro 2008	P1	0,13±0,10	0,67*±0,33
	P2	0,02±0,03	0,23±0,19
	P3	0,02±0,04	0,27±0,21
	P4	0,43*±0,20	0,83*±0,31
	P5	0,15±0,11	1,91*±0,32
	P6	0,14±0,05	0,71*±0,4
	P7	0,12±0,08	0,64*±0,12
Controles	Negativo	0,01±0,03	0,35±0,34
	Positivo	0,33*±0,11	1,88*±0,76
Coleta Fevereiro 2009	P1	0,05±0,04	0,57±0,49
	P2	0,03±0,02	0,41±0,56
	P3	0,03±0,05	0,39±0,43
	P4	0,18*±0,12	1,01*±0,83
	P5	0,11±0,08	1,66*±0,99
	P6	0,13±0,14	1,52*±0,87
	P7	0,14±0,17	1,23*±0,91
Controles	Negativo	0,04±0,05	0,34±0,22
	Positivo	0,45*±0,21	1,97*±0,96
Coleta Agosto 2009	P1	0,08±0,06	0,49±0,36
	P2	0,06±0,02	0,42±0,44
	P3	0,04±0,02	0,56±0,71
	P4	0,22*±0,09	1,02*±0,39
	P5	0,16*±0,07	0,99*±1,16
	P6	0,25*±0,11	1,18*±0,67
	P7	0,27*±0,08	1,14*±0,96

Tabela 1: Frequência de alterações nucleares e de células portadoras de micronúcleos (%) observadas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após a exposição por 96 horas a amostras de água coletadas em novembro de 2008 (estação quente e seca), fevereiro de 2009 (estação quente e úmida) e agosto de 2009 (estação fria e seca). Sendo: Média±DP; *diferença significativa em relação ao controle negativo ($p<0,05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 2: Análise físico-química das amostras coletadas nos pontos específicos dos rios analisados neste estudo em novembro de 2008, fevereiro de 2009 e agosto de 2009.

Coleta Novembro de 2008									
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	VM 2	VM 3
Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹ O ₂)	8,12	7,24	7,36	2,70	2,88	3,34	7,23	> 5	> 4
Amônia (mg.L ⁻¹)	0,25	0,24	0,39	6,7	9,4	9,0	0,48	3,7 [#]	13,3 [#]
Fósforo Total (mg.L ⁻¹)	31,8	12,4	15,3	888,7	1248,1	1209	25,9	0,1	0,15
DBO ₅ (mg.L ⁻¹ O ₂)	4,4	11	10,2	144	80	44	8,2	5	10
Alumínio (mg.L ⁻¹)	0,3546*	0,1799*	0,1551*	0,2935*	0,1958*	0,1823*	0,3601*	0,1	0,2
Chumbo (mg.L ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0286*	0,0686*	n.d.	0,01	0,033
Zinco (mg.L ⁻¹)	0,0084	0,0076	0,0217	0,0214	0,0289	0,0167	0,0048	0,18	5
Coleta Fevereiro de 2009									
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	VM 2	VM 3
Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹ O ₂)	7,05	6,94	6,6	4,45	4,28	6,30	6,98	> 5	> 4
Amônia (mg.L ⁻¹)	0,58	0,14	0,31	1,61	2,19	1,68	0,46	3,7 [#]	13,3 [#]
Fósforo Total (mg.L ⁻¹)	13,7	12,9	15,6	325,3	257,4	174,7	17,8	0,1	0,15
DBO ₅ (mg.L ⁻¹ O ₂)	8,4	9,3	5,9	46	46	36	8,4	5	10
Alumínio (mg.L ⁻¹)	0,9131*	0,1210*	0,2499*	0,2207*	1,190*	0,8632*	0,7317*	0,1	0,2
Chumbo (mg.L ⁻¹)	0,0288*	0,0221*	n.d.	n.d.	0,0176*	0,0486*	n.d.	0,01	0,033
Zinco (mg.L ⁻¹)	0,0035	0,0028	0,0026	0,0067	0,0121	0,1007	0,0068	0,18	5
Coleta Agosto de 2009									
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	VM 2	VM 3
Oxigênio Dissolvido (MG.L ⁻¹ O ₂)	8,1	7,66	7,7	4,77	4,27	3,80	7,26	> 5	> 4
Amônia (mg.L ⁻¹)	0,16	0,19	0,17	9,4	11,4	7,5	0,20	3,7 [#]	13,3 [#]
Fósforo Total (mg.L ⁻¹)	31,8	12,4	15,3	888,7	1248,1	1209	25,9	0,1	0,15
DBO ₅ (mg.L ⁻¹ O ₂)	7,4	6,0	7,7	106	114	90	8,8	5	10
Alumínio (mg.L ⁻¹)	0,1333*	0,1721	0,0953	0,1390*	0,1032*	0,0699	0,0617	0,1	0,2
Chumbo (mg.L ⁻¹)	0,0340*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0247*	0,01	0,033
Zinco (mg.L ⁻¹)	0,0174	0,0213	0,0223	0,6346*	0,0582	0,0573	0,0329	0,18	5

Sendo: **VM 2**: valor máximo estabelecido pelo CONAMA para corpos d'água de classe 2; **VM 3**: valor máximo estabelecido pelo CONAMA para corpos d'água de classe 3; **#**Valores de amônia estabelecidos para pH menor ou igual a 7,5; *Valores acima do valor máximo permitido para corpos d'água de classe 2.

Ponto de coleta	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore
CN	94	6	0	0	6
	89	10	1	0	12
	95	5	0	0	5
	92	7	1	0	9
	96	3	0	1	6
Média±DP	93,2±2,77	6,2±2,59	0,4±0,55	0,2±0,45	7,6±2,88
CP	12	29	34	25	184
	21	17	29	33	195
	8	26	37	29	187
	16	24	21	39	183
	13	19	17	51	206
Média±DP	14±4,85	23±4,95	27,6±8,47	35,4±10,1	191±9,62*
P1	86	8	4	2	22
	83	11	2	4	27
	76	11	5	8	45
	87	12	0	1	15
	79	9	8	4	37
Média±DP	82,2±4,66	10,2±1,64	3,8±3,03	3,8±2,68	29,2±11,9
P2	82	16	1	1	21
	91	8	0	1	11
	88	9	2	1	16
	83	11	3	3	26
	79	18	1	2	26
Média±DP	84,6±4,83	12,4±4,39	1,4±1,14	1,6±0,89	20±6,52
P3	78	17	0	5	32
	82	7	10	1	30
	76	9	10	5	44
	85	10	3	2	22
	74	10	9	7	49
Média±DP	79±4,47	10,6±3,78	6,4±4,62	4±2,45	35,4±10,9
P4	39	26	12	23	119
	42	19	14	25	122
	56	11	14	19	96
	43	13	20	24	125
	42	27	12	19	108
Média±DP	44,4±6,66	19,2±7,29	14,4±3,29	22±2,83	114±11,9*
P5	58	10	12	20	94
	47	25	14	14	95
	49	19	22	10	93
	51	23	14	12	87
	52	29	11	8	75
Média±DP	51,4±4,16	21,2±7,22	14,6±4,34	12,8±4,6	88,8±8,32*
P6	48	32	12	8	80
	44	18	13	25	119
	52	12	22	14	98
	57	20	15	8	74
	39	24	20	17	115
Média±DP	48±6,96	21,2±7,43	16,4±4,39	14,4±7,09	97,2±20,2*
P7	70	18	3	9	39
	62	12	12	14	78
	64	9	17	10	73
	66	14	11	9	63
	61	10	13	16	84
Média±DP	64,6±3,58	12,6±3,58	11,2±5,12	11,6±3,21	67,4±17,6*

Tabela 3: Danos ao DNA mensurados (média e desvio padrão) nos eritrócitos dos peixes expostos as águas coletadas em novembro de 2008. *valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método estatístico de Kruskal Wallis, com $p < 0,05$. Sendo: **CN**: controle negativo; **CP**: controle positivo.

Ponto de coleta	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore
CN	96	3	1	0	5
	92	7	0	1	10
	87	10	2	1	17
	94	6	0	0	6
	89	9	1	1	14
Média±DP	91,6±3,65	7±2,74	0,8±0,84	0,6±0,55	10,4±5,13
CP	24	22	27	27	157
	11	33	24	32	177
	18	26	29	27	165
	14	21	20	45	196
	27	18	19	36	164
Média±DP	18,8±6,69	24±5,79	23,8±4,32	33,4±7,5	171,8±15,3*
P1	77	16	3	4	34
	83	12	4	1	23
	84	9	2	5	28
	71	18	8	3	43
	87	11	2	0	15
Média±DP	80,4±6,39	13,2±3,70	3,8±2,49	2,6±2,07	28,6±10,64
P2	89	11	0	0	11
	85	9	2	4	25
	94	1	4	1	12
	81	12	3	4	30
	92	2	6	0	14
Média±DP	88,2±5,26	7±5,15	3±2,24	1,8±2,05	18,4±8,56
P3	77	11	8	4	39
	81	9	8	2	31
	79	13	2	6	35
	76	8	10	6	46
	72	19	8	1	38
Média±DP	77±3,39	12±4,36	7,2±3,03	3,8±2,28	37,8±5,54
P4	54	22	10	14	84
	49	10	26	15	107
	57	12	14	17	91
	51	23	16	10	85
	48	13	19	20	111
Média±DP	51,8±3,7	16±6,04	17±6	15,2±3,7	95,6±12,6*
P5	49	10	17	24	116
	52	19	16	13	90
	50	21	9	20	99
	56	12	14	18	94
	43	23	24	10	101
Média±DP	50±4,74	17±5,7	16±5,43	17±5,57	100±9,92*
P6	59	21	8	12	73
	43	26	16	15	103
	49	19	17	15	98
	51	18	15	16	96
	53	22	11	14	86
Média±DP	51±5,83	21,2±3,11	13,4±3,78	14,4±1,52	91,2±11,9*
P7	62	15	13	10	71
	75	12	4	9	47
	71	9	8	12	61
	69	11	7	13	64
	68	14	15	3	53
Média±DP	69±4,74	12,2±2,39	9,4±4,51	9,4±3,91	59,2±9,39*

Tabela 4: Danos ao DNA mensurados (média e desvio padrão) nos eritrócitos dos peixes expostos as águas coletadas em fevereiro de 2009. *valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método estatístico de Kruskal Wallis, com $p < 0,05$. Sendo: **CN:** controle negativo; **CP:** controle positivo

Ponto de coleta	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore
CN	97	2	1	0	4
	95	3	1	1	8
	96	2	2	0	6
	88	8	1	3	19
	95	4	2	0	8
Média±DP	94,2±3,56	3,8±2,49	1,4±0,55	0,8±1,3	9±5,83
CP	10	19	31	40	201
	16	22	29	33	179
	9	27	19	45	200
	14	33	37	16	155
	7	24	27	42	204
Média±DP	11,2±3,70	25±5,34	28,6±6,54	35,2±11,6	187,8±20,8*
P1	75	16	8	1	35
	82	9	5	4	31
	79	13	2	6	35
	85	7	5	3	26
	81	9	6	4	33
Média±DP	80,4±3,71	10,8±3,63	5,2±2,17	3,6±1,82	32±3,74
P2	81	15	3	1	24
	90	8	1	1	13
	82	9	5	4	31
	74	17	7	2	37
	85	14	0	1	17
Média±DP	82,4±5,86	12,6±3,91	3,2±2,86	1,8±1,3	24,4±9,84
P3	81	12	0	7	33
	79	8	10	3	37
	76	14	5	5	39
	82	11	6	1	26
	80	13	2	5	32
Média±DP	79,6±2,3	11,6±2,3	4,6±3,85	4,2±2,28	33,4±5,03
P4	39	10	26	25	137
	51	17	14	18	99
	47	13	23	17	110
	43	16	20	21	119
	40	19	13	28	129
Média±DP	44±5	15±3,54	19,2±5,63	21,8±4,66	118,8±15,04*
P5	52	31	7	10	75
	60	11	16	13	82
	57	18	5	20	88
	54	14	12	20	98
	48	24	14	14	94
Média±DP	54,2±4,6	19,6±8,02	10,8±4,66	15,4±4,45	87,4±9,21*
P6	40	23	19	18	115
	54	16	17	13	89
	39	24	20	17	115
	43	22	21	14	106
	55	19	17	9	80
Média±DP	46,2±7,73	20,8±3,27	18,8±1,79	14,2±3,56	101±15,83*
P7	67	13	12	8	61
	74	9	7	10	53
	59	17	11	13	78
	69	10	9	12	55
	62	12	8	18	82
Média±DP	66,2±5,89	12,2±3,11	9,4±2,07	12,2±3,77	65,8±13,37*

Tabela 5: Danos ao DNA mensurados (média e desvio padrão) nos eritrócitos dos peixes expostos as águas coletadas em agosto de 2009.*valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método estatístico de Kruskal Wallis, com $p < 0,05$. Sendo: **CN:** controle negativo; **CP:** controle positivo

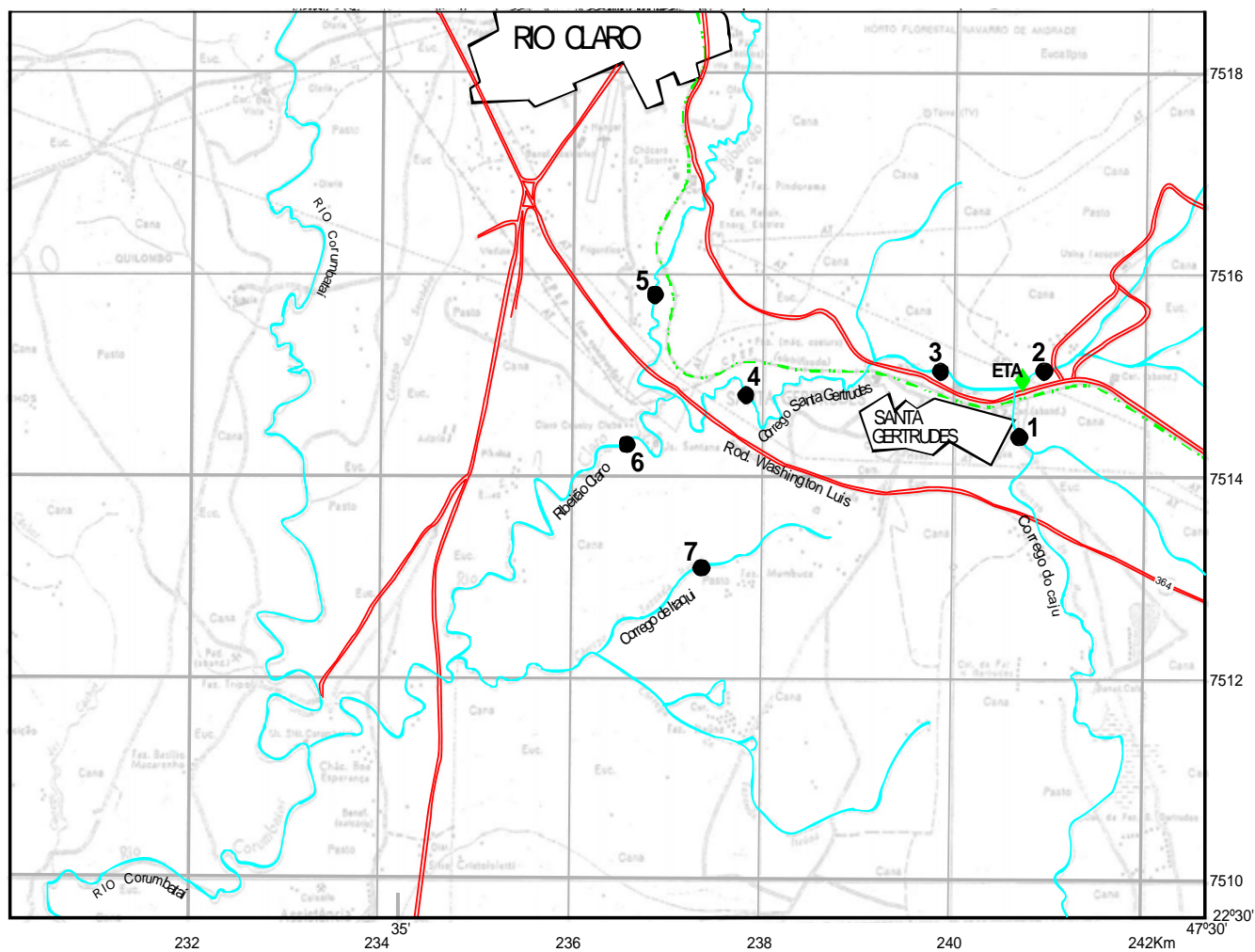


Figura 1: Bacia do Córrego Santa Gertrudes e localização dos pontos de coleta.

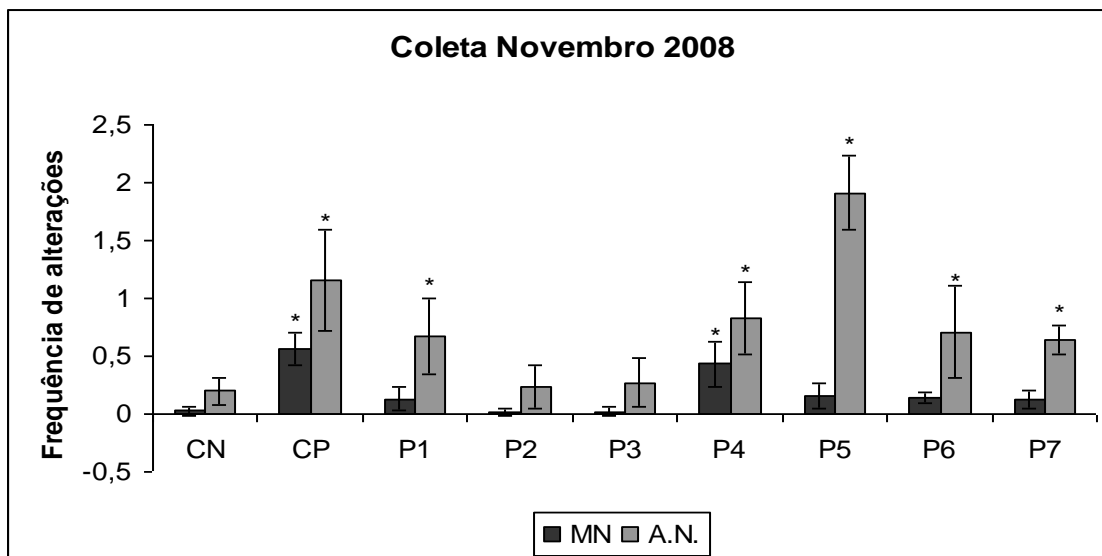


Figura 2: Frequência de alterações nucleares (AN) e de células portadoras de micronúcleos (%) observadas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após a exposição por 96 horas a amostras de água coletadas em novembro de 2008 (estação quente e seca). *diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. Sendo: **CN:** controle positivo, **CP:** controle positivo; **MN:** frequência de células micronucleadas e **AN:** frequência de alterações nucleares.

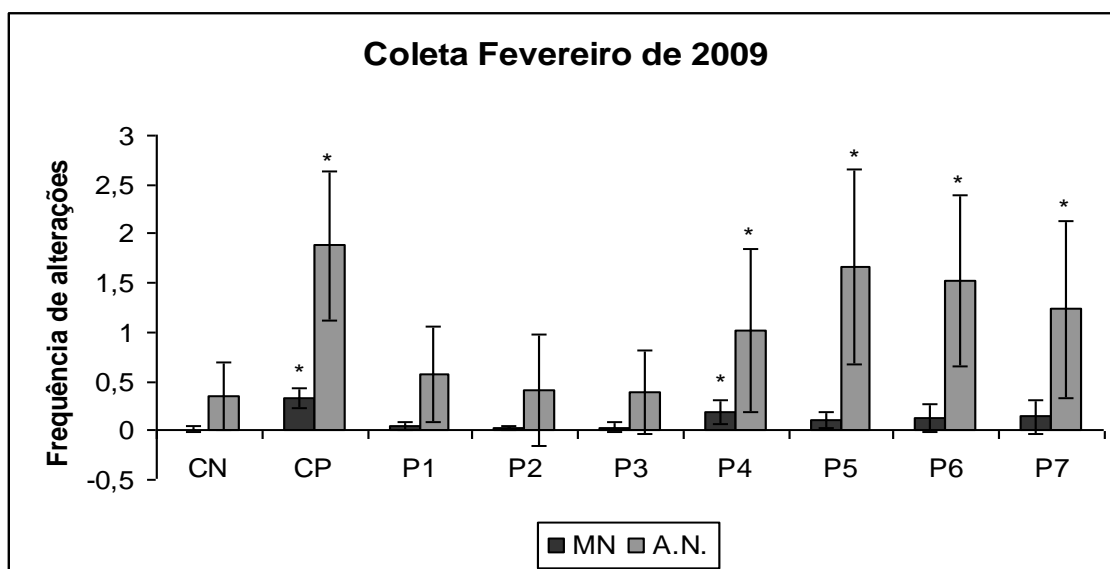


Figura 3: Frequência de alterações nucleares (AN) e de células portadoras de micronúcleos (%) observadas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após a exposição por 96 horas a amostras de água coletadas em fevereiro de 2009 (estação quente e úmida). *diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. Sendo: **CN:** controle positivo, **CP:** controle positivo; **MN:** frequência de células micronucleadas e **AN:** frequência de alterações nucleares.

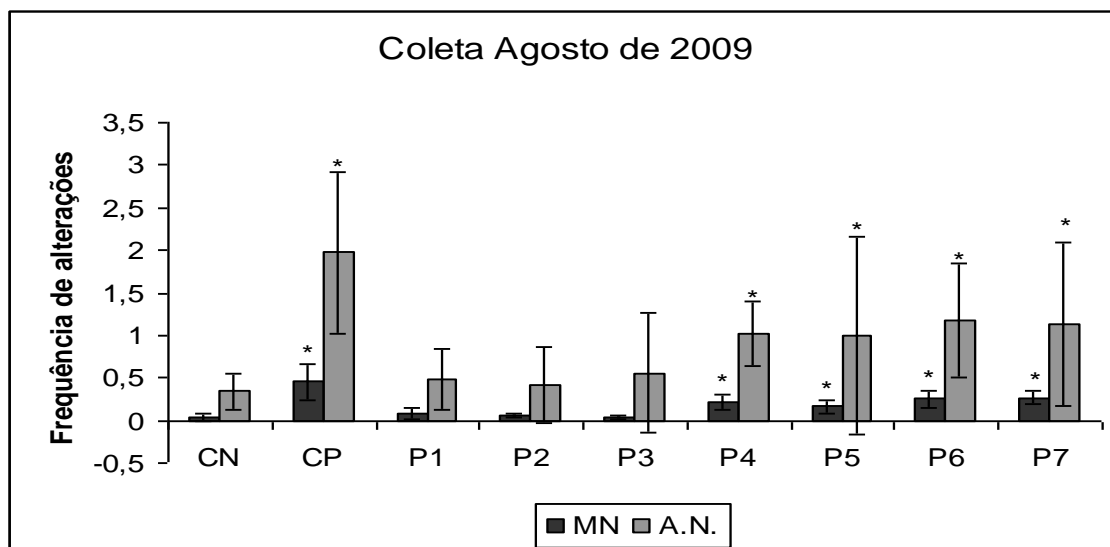


Figura 4: Frequência de alterações nucleares (AN) e de células portadoras de micronúcleos (%) observadas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após a exposição por 96 horas a amostras de água coletadas em agosto de 2009 (estação fria e seca). *diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. Sendo: **CN:** controle positivo, **CP:** controle positivo; **MN:** frequência de células micronucleadas e **AN:** frequência de alterações nucleares.

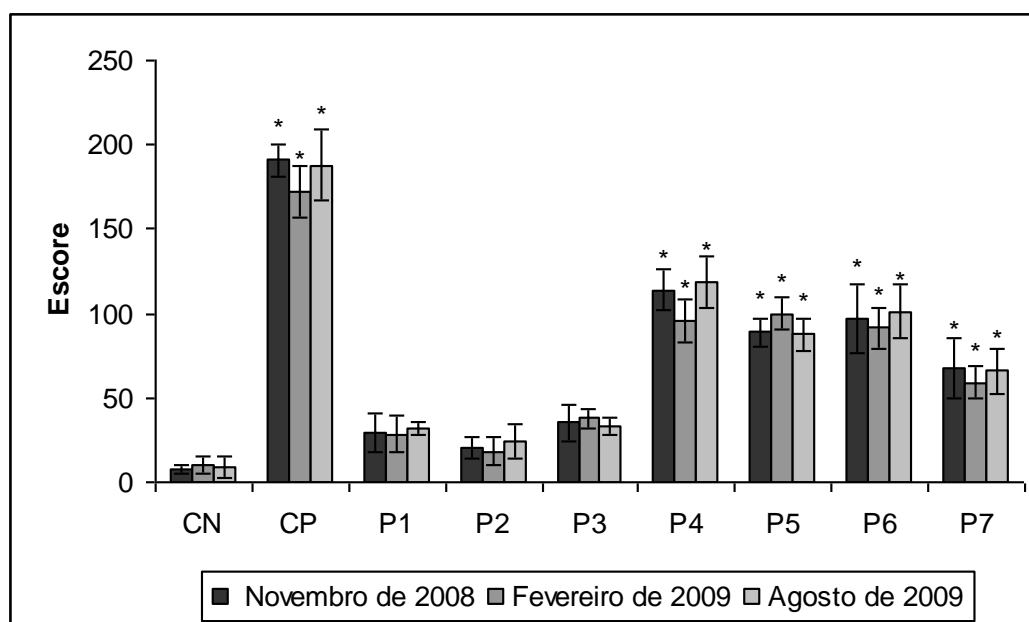


Figura 5: Comparação entre os escores obtidos para as três coletas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos por 96 h, às águas oriundas dos sete pontos de coleta. Coletas: novembro de 2008, fevereiro de 2009 e agosto de 2009. *diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. Sendo: **CN:** controle positivo, **CP:** controle positivo.

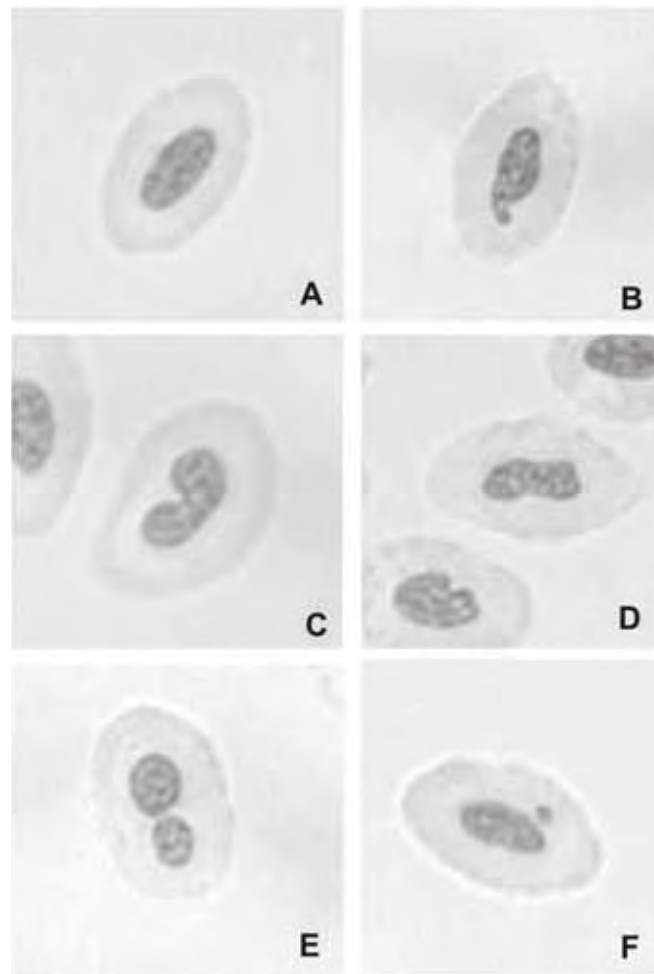


Figura 6: Eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos às águas coletadas nos rios da bacia do córrego Santa Gertrudes. **A.** Eritrócito normal; **B.** Núcleo do tipo “lobed”; **C.** Núcleo do tipo “notched”; **D.** Núcleo do tipo “blebbed”; **E.** Célula binucleada; **F.** Eritrócito micronucleado.



Figura 7: Classes de danos observadas no ensaio do cometa com *Oreochromis niloticus* expostos a diversas amostras de água coletadas. **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.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos resultados obtidos nos ensaios realizados com as diversas amostras de água coletadas no córrego Santa Gertrudes, Caju, Itaqui e Ribeirão Claro, com os sistemas-testes *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*, pode-se concluir:

- O despejo de efluentes urbanos e industriais da cidade de Santa Gertrudes compromete a qualidade das águas e interfere na vida aquática, uma vez que estes efluentes alteram as características físico-químicas dos recursos hídricos receptores;
- Os efluentes cerâmicos possuem grandes quantidades de metais que contribuem para uma maior toxicidade das águas e leva a indução de alterações cromossômicas e nucleares nos organismos expostos;
- Amostras ambientais constituem uma mistura complexa de substâncias capazes de induzir alterações genotóxicas e mutagênicas nos organismos-expostos;
- As amostras coletadas mostraram ação genotóxica e mutagênica para *A. cepa* e para *O. niloticus*;
- Bulbos de cebola constituem um eficiente bioensaio de toxicidade para avaliação dos poluentes presentes em amostras ambientais;
- O córrego Santa Gertrudes (após o despejo dos efluentes) mostrou maior potencialidade em induzir alterações nos organismos-teste, indicando o comprometimento dessas águas pelas substâncias lançadas;
- O Ribeirão Claro também apresentou elevadas frequências de alterações decorrentes, provavelmente, de despejos de efluentes industriais;

- O Ribeirão Claro apresentou um aumento nos índices de genotoxicidade e mutagenicidade, após a confluência com o córrego Santa Gertrudes, o que parece ser decorrente do efeito sinérgico das substâncias presentes nestes dois rios;
- O córrego de Itaquí apresentou elevadas frequências de alterações genotóxicas e mutagênicas, tanto no organismo teste *A. cepa* como em *O. niloticus*. Como este córrego só recebe efluentes industriais, derivados de atividades ceramistas, podemos concluir que todas as alterações celulares registradas foram decorrentes de contaminantes presentes nos efluentes destas indústrias;
- As alterações induzidas nos organismos-teste foram, possivelmente, causadas pelos metais encontrados acima das concentrações permitidas pela legislação em vigência no Brasil, sendo, provavelmente, os indutores dos efeitos genotóxicos e mutagênicos registrados para estas águas;
- As espécies *A. cepa* e *O. niloticus* caracterizaram-se em eficientes sistemas para estudos de biomonitoramento ambiental;
- Ensaio de AC e de MN, realizados com o organismo teste *A. cepa*, constituíram ferramentas bastante sensíveis para a detecção de danos ao DNA induzidos por poluição das águas;
- O ensaio do cometa foi uma ferramenta bastante sensível na detecção de danos genotóxicos das amostras coletadas;
- O teste do MN constituiu uma metodologia bastante eficiente na avaliação de danos mutagênicos em *O. niloticus* expostos;
- A utilização de bioindicadores se mostrou uma ferramenta bastante interessante para complementar os dados de análises físico-químicas em estudos de biomonitoramento ambiental.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARY, V.M.M.; JENA, S.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.70, p.300-310, 2008.

ACHARY, V.M.M.; PANDA, B.B. Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates. **Mutagenesis**, New York, v.25, n.2, p.201-209, 2009.

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.

ALMEIDA, J.A.; NOVELLI, E.L.B.; DAL PAI SILVA, M.; ALVES JÚNIOR, R. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Environmental Pollution**, Barking, v.114, p.169-175, 2001.

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

AL-YOUSUF, M.H.; EL-SHAHAWI, M.S.; AL-GHAIS, S.M. Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.256, p.87-94, 2000.

AMUNDSEN, P.A.; STALDVIK, F.J.; LUKIN, A.A.; KASHULIN, N.A.; POPOVA, O.A.; RESHETNIKOV, Y.S. Metal contamination in freshwater fish from the border region between Norway and Russia. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.201, p.211-224, 1997.

ARKHIPCHUK, W.; GARANKO, N.N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.62, p.42-52, 2005.

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

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

BARBÉRIO, A.; BARROS, L.; VOLTOLINI, J.C.; MELLO, M.L.S. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.69, n.3, p.837-842, 2009.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. **Suelos y Planta**, v.2, p.345-361, 1992.

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

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.

BIAGINI, F.R.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. The use of histological and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron**, New York, v.40, p.839-844, 2009.

BIRUNGI, Z.; MASOLA, B.; ZARANYIKA, M.F.; NAIGAGA, I.; MARSHALL, B. Active biomonitoring of trace heavy metals using fish (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator species. The case of Nakivubo wetland along Lake Victoria. **Physics and Chemistry of the Earth**, Oxford, v.32, p.1350-1358, 2007.

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 test. **Annali d'Igiene Sperimentale**, Roma, v.15, n.6, p.1077-1084, 2003.

BOER, J.; HOEIJMAKERS, H. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n. 3, pp. 453-460, 2000.

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

BOROFFICE, R.A. Cytogenetic effects of zinc and chromium on the onion (*Allium cepa*) root tip. **Nigerian Journal of Natural Science**, v.1/2, p.75-79, 1990.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Brasília, 2005.

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

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

CANLI, M.; ATLI, G. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. **Environmental Pollution**, Barking, v.121, n.1, p.129-136, 2003.

CARDOVA ROSA, E.V.; VALGAS, C.; SOUZA-SIERRA, M.M.; CORREA, A.X.R.; RADETSKI, C.M. Biomass growth, micronucleus induction, and antioxidant stress enzyme responses in *Vicia faba* exposed to cadmium in solution. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.22, p.645-649, 2003.

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. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de lodos provenientes de estações de tratamento de esgotos de grandes centros urbanos do estado de São Paulo, pela metodologia de aberrações cromossômicas em *Allium cepa***. 2007. 63p. Trabalho de Conclusão (Bacharel e Licenciatura – Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2007.

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.

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

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v.534, p.93-99, 2003.

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

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

CESTARI, M.M.; LEMOS, P.M.M.; RIBEIRO, C.A.O.; COSTA, J.R.M.A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M.V.M.; MANTOVANI, M.S.; FENOCCHIO, A.S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.27, p.2, p.270-274, 2004.

CHANDRA, S.; GUPTA, S.K. Genotoxicity of leachates of tannery solid waste in root meristem cells of *Allium cepa*. **J Ecophysio Occup Health**, v.2, p.225-234, 2002.

CHANDRA, S.; CHAUHAN, L.K.S.; PANDE, P.N.; GUPTA, S.K. Cytogenetic effects of leachates from tannery solid waste on the somatic cells of *Vicia faba*. **Environmental Toxicology**, New York, v.19, p.129-133, 2004.

CHRISTOFOLETTI, C.A. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. 2008. 118 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2008.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2008**. São Paulo: CETESB, 1997. 288p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2008**. São Paulo: CETESB, 2009. 531p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>> Acesso: 25.jan.2010.

COSTA, P.M.; LOBO, J.; CAEIRO, S.; MARTINS, M.; FERREIRA, A.M.; CAETANO, M.; VALE, C.; DELVALLS, T.A.; COSTA, M.H. Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): Effects of metallic and organic contaminants. **Mutation Research**, Amsterdam, v.654, p.29-37, 2008.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.F.; FÉRARD, J.F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil *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, p1-9, 2004.

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

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

De FLORA, S; BENNICELLI, C e BAGNASCO, M - Genotoxicity of mercury compounds: A review. **Mutation Research**. Amsterdam, v.317, p.57-79, 1994.

DEWHURST, R.E.; WHEELER, J.R.; CHUMMUN, K.S.; MATHER, J.D.; CALLAGHAN, A.; CRANE, M. The comparison of rapid bioassays for the assessment of urban ground water quality. **Chemosphere**, Oxford, v. 47, p.547-554, 2002.

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.

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

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

ESPINOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C. B. Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu. In: BRIGANTE, J.; ESPINOLA, E. L. G. (Org.) **Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi Guaçu**. São Carlos: Rima, 2003, p.129-148.

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

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

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

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, SP, 2005.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, 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**, New York, v.72, p.1680-1686, 2009.

FERRARI, K.R.; FIGUEIREDO FILHO, P.M.; ALMEIDA, E.B.; DEL ROVERI, C.; CARVALHO, S.G.; BOSCHI, A.O.; ALMEIDA, M.; FRADE, P.; SOUSA CORREA, A.M.; ZANARDO, A. Determinação das emissões de fluoreto durante a queima de amostras de massas cerâmicas. **Cerâmica Industrial**, Santa Gertrudes, v.8, n.5-6, 2003.

FERRARO, M.V.M.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M.; MANTOVANI, M.S. ; LEMOS, P.M.M. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.27, n.2, p.270-274, 2004.

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.

FISKESJÖ, G. Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.59, p.508-511, 1983.

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

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

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

FISKESJÖ, G. *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytologic parameters. In: WANG, W.; GORSUCH, J.W.; HUGHES, J.S. (Eds.). **Plants for**

Environmental Studies. Boca Ranton: CRC LEWIS PUBLISHERS, 1997. p. 308-333.

FUSCONI, A.; REPETTO, O.; BONA, E.; MASSA, N.; GALLO, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; BERTA, G. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.58, p.253–260, 2006.

FUSCONI, A.; GALLO, C.; CAMUSSO, W. Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L: cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution. **Mutation Research**, Amsterdam, v.63, p.9-19, 2007.

GANÁ, J.M.; ORDÓÑEZ, R.; ZAMPINI, C.; HIDALGO, M.; MEONI, S.; ISLA, M.I. Industrial effluents and surface waters genotoxicity and mutagenicity evaluation of a river of Tucuman, Argentina. **Journal of hazardous materials**, Amsterdam, v.155, p. 403-406, 2008.

GERTEL, P.; TAUKE-TORNISIELO, S.M.; MALAGUTTI, E.N. Water quality evaluation on São Joaquim and Ribeirão Claro stream, Microbasin of Corumbataí river, São Paulo State, Brazil. **Holos environment**, Rio Claro, v.3, n.2, p.103-119, 2003.

GLIŃSKA, S.; BARTCZAK, M.; OLEKSIK, S.; WOLSKA, A.; GABARA, B.; POSMYK, M.; JANAS, K. Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of *Allium cepa* L. roots treated with heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.68, p. 343-350, 2007.

GONTIJO, A.M.M.C.; BARRETO, R.E.; SPEIT, G.; Reyes, V.A.V.; VOLPATO, G.L.; SALVADORI, D.M.F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research**, Amsterdam, v.534, p.165-172, 2003.

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. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v.310, n.2, p.175-185, 1994.

GRISOLIA, C.K.; CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, p.235-239, 2000.

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

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.

GRISOLIA, C.K.; RIVERO, C.L.G.; STARLING, F.L.R.M.; SILVA, I.C.R.; BARBOSA, A.C.; DOREA, J.G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.32, p.138-143, 2009.

GROSSEL, M.; NIELSEN, C.; BIANCHINI, A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, New York, v.133, p.287-303, 2002.

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.

GUERRA, R.C. **Estudo do lodo gerado em reator biológico, pelo tratamento da água de produção do petróleo, no Terminal Marítimo Almirante Barroso, município de São Sebastião, SP. visando sua disposição final.** 2009. 126p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2009.

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.

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

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.

HERSHFINKEL, M.; SILVERMAN, W.F.; SEKLER, I. The zinc sensing receptor, a link between zinc and cell signaling. **Molecular Medicine**, Manhasset, v.13, p.331-336, 2007.

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

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.

HOSHINA, M.M.; MARIN-MORALES, M.A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by

river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.72, p.2090–2095, 2009.

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

HUBER, R.; STRENT, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosymetry. **Mutation Research**, Amsterdam, v.111, p.185-193, 1983.

JARDIM, G. M. **Estudos Ecotóxicológicos da Água e do Sedimento do Rio Corumbataí**, SP. Dissertação. (Mestrado). 2004. 138 f. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2004.

JIANG, W.; LIU, D. Effects of Pb^{+2} on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays* L. **Bulletin of environmental contamination and toxicology** New York, v.65, p.786-793, 2000.

KABATA-PENDIAS, A., PENDIAS, H. **Trace Elements in the Soils and Plants**. Boca Raton: CRC PRESS, 1984. 315p.

KHAW, H.L.; BOVENHUIS, H.; PONZONI, R.W.; REZK, M.A.; CHARO-KARISA, H.; KOMEN, H. Genetic analysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) selection line reared in two input environments. **Aquaculture**, Oxford, v.294, p.37-42, 2009.

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

KNASMÜLLER, S.; GOTTMANN, E.; STEINKELLNER, H.; FOMIN, A.; PICKL, C.; PASCHKE, A.; GÖD, R.; KUNDI, M. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. **Mutation Research**, Amsterdam, v.420, p.37-48, 1998.

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.

KÖNEN, S.; ÇAVAS, T. Genotoxicity testing of the herbicide Trifluralin and its commercial formulation Treflan® using the piscine micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.49, p.434-438, 2008.

KONUK, M.; LIMAN, R.; CIGERCI, I.H. Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells. **Pakistan Journal of Botany**, Multan, v.39, n.1, p.73-79, 2007.

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

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

KREWSKI, D.; YOKEL, R.A.; NIEBOER, E.; BORCHELT, D.; COHEN, J.; HARRY, J.; KACEW, S.; LINDSAY, J.; MAHFOUZ, A.M.; RONDEAU, V. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. **Journal of toxicology and environmental health**, Washington, v.10, p.1–269, 2007.

KÚRAS, 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.

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.

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**, New York, v.88, p.214-219, 2008.

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

LEMOS, N.G.; DIAS, A.L.; SILVA-SOUZA, A.T.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.19, p.197-201, 2005.

LERDA, D. The effect of lead on *Allium cepa* L. **Mutation Research**, Amsterdam, v.281, p.89-92, 1992.

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

LINDE, A.R.; SANCHEZ-GALAN, S.; IZQUIERDO, J.I.; ARRIBAS, P.; MARANON, E.; GARCYA-VAZQUEZ, E. Brown trout as biomonitor of heavy metal pollution: effect of age on the reliability of the assessment. **Ecotoxicological and Environmental Safety**, New York, v.40, p.120-125, 1998.

LIU, D.; JIANG, W.; WANG, W.; ZHAO, F.; LU, C. Effects of lead on root growth, cell division, and nucleolus of *Allium cepa*. **Environmental Pollution**, Barking, v.86, p.1-4, 1994.

LIU, D.; JIANG, W.; GAO, X. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic. **Biologia Plantarum**, Praha, v.47, p.79-83, 2003.

MA, T.H., XU, C., McCONNELL, H., RABAGO, E.V., ARREOLA, G.A., ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleous assay for clastogenicity of

environmental pollutants. **Mutation Research**, Amsterdam, v.334, n.2, p.185-195, 1995.

MANNA, G.K.; SADHUKHAN, A. Use of cells of gill and kidney of Tilapia fish in micronucleus test (MNT). **Current Science**, Bangalore, v.55, p.498–501, 1986.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: an ultrastructural study. **Environmental Research**, San Diego, Section A, v.88, p. 30-35, 2002.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; FÉRNANDEZ, Y.; MONTIEL, X.; TORREALBA, Z. Determination of vanadium accumulation in onion root cells (*Allium cepa* L.) and its correlation with toxicity. **Biocell**, Mendoza, v.30, p.259-267, 2006.

MARIA, V.L.; CORREIA, A.C.; SANTOS, M.A. Genotoxic and biochemical responses in caged eel (*Anguilla Anguilla* L.) after short-term exposure to harbour waters. **Environment International**, New York, v.29, p.923-929, 2003.

MARKERT, B. Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in environment. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.21, p.77-82, 2007.

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

MATHEUS, C.E.; MORAIS, A.J.; TUNDISI, T.M.; TUNDISI, J.G. **Manual de análises Limnológicas**. São Carlos: Centro de Recursos hídricos e ecologia aplicada, 1995. 62p.

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.; 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, p.148–158, 2006.

MAZON, A.F.; FERNANDES, M.N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Bulletin of environmental contamination and toxicology** New York, v.63, n.6, p.797-804, 1999.

MAZZEO, D.E.C. **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.**

2009. 144p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2009.

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

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

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

MINISSI, S.; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. **Mutation Research**, Amsterdam, v.393, p.17-21, 1997.

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

MONTE EGITO, L.M.; MEDEIROS, M.G.; MEDEIROS, S.R.B.; AGNEZ-LIMA, L.F. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, p.435-431, 2007.

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

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. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina. 2000.

MUMTAZ, M.M. Risk assessment of chemical mixtures from a public health perspective. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.82/83, p.527-532, 1995.

MUYSSSEN, B.T.A.; DE SCHAMPHELAERE, K.A.C.; JANSSEN, C.R. Mechanism of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, New York, v.77, p.393-401, 2006.

NADLA, S., PICKERING, T. **Tilapia fish farming in pacific island countries. Volume 1: Tilapia hatchery operations**. New Caledonia: SECRETARIAT OF THE PACIFIC COMMUNITY, 2004. 32p.

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

NGAN, P.V.; GOMES, V.; PASSOS, M.J.A.C.R.; USSAMI, K.A.; CAMPOS, D.Y.F.; ROCHA, A.J.S.; PEREIRA, B.A. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station "Comandante Ferraz," King George Island. **Polar Biology**, v.30, p.209-217, 2007.

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.

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

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

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-MARTINS, C.R.; GRISOLIA, C.K. Toxicity and genotoxicity of wastewater from gasoline stations. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.32, n.4, p.853-856, 2009.

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

PALACIO, S.M.; ESPINOZA-QUIÑONES, F.R.; GALANTE, R.M.; ZENATTI, D.C.; SEOLATTO, A.A.; LORENZ, E.K.; ZACARKIM, C.E.; ROSSI, N.; RIZZUTTO, M.A.; TABACNIKS, M.H. Correlation between heavy metal ions (Copper, Zinc, Lead) concentrations and root length of *Allium cepa* L. in polluted river water. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.48, p.191-196, 2005.

PAPAGIANNIS, I.; KAGALOU, I.; LEONARDOS, J.; PETRIDIS, D.; KALFAKAKOU, V. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). **Environment International**, New York, v.30, n.3, p.357-362, 2004.

PATRA, J.; BAISAKHI, B.; MOHAPATRO, M.K.; PANDA, B.B. Aluminium triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and theyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in plant cells in vivo. **Mutation Research**, Amsterdam, v.465, p.1-9, 2000.

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.

PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.52, p.199-223, 2004.

PEDROZO, M.F.M.; LIMA, I.V. Ecotoxicologia do cobre e seus compostos. **Série de Cadernos de Referência Ambiental**, Salvador, v.4, 128 p., 2001.

PEJCHAR, P.; PLESKOT, R.; SCHWARZEROVÁ, K.; MARTINEC, J.; VALENTOVÁ, O.; NOVOTNÁ, Z. Aluminum ions inhibit phospholipase D in a microtubule-dependent manner. **Cell Biology International**, London, v.32, p.554-556, 2008.

PORTO, J.I.R.; ARAÚJO, C.S.O.; FELBERG E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**, San Diego, v.97, p. 287-292, 2005.

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

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

RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUEZ, M.A.R.; MONTELEONE-NETO, R. Testes com organismos superiores. In: **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação.** Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, 1991, pp.59-75.

RADIĆ, S.; STIPANIČEV, D.; VUJČIĆ, V.; RAJČIĆ, M.M.; ŠIRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.408, p.1228-1233, 2010.

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.

RAJAGURU, P.; SUBA, S.; PALANIVEL, M.; KALAISELVI, K. Genotoxicity of a polluted river system measured using the Alkaline Comet Assay on fish and earthworm tissues. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.41, p.85-91, 2003.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. Introduction. In: Rand, G. M.; Petrocelli, S. R. (Eds.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**, Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 1985. p.1-28.

RANK, J.; NIELSEN, M. H.. A modified *A. cepa* test as as tool in the acreeing of the genotoxicity of complex mistures. **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 *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, Amsteden, v. 418, p.113-119, 1998.

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

RASHED, M.N.; Monotoring of environmental heavy metals in fisk from Nasser Lake. **Environment International**, New York, v.27, p.27-33, 2001.

RIBEIRO, I.A. Teste de raízes de cebola para avaliação de toxicidade de efluentes industriais. **Engenharia Sanitária e Ambiental: Nota técnica**, n.4, p.108-112, 1999.

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

ROBERTO, M.M. **Avaliação do potencial antimutagênico de extrato etanólico de própolis verde e de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), por meio de sistema-teste de *Allium cepa* e células de mamíferos (HTC)**. 2009. 129p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2009.

ROCHA, P.S.; LUVIZOTTO, G.L.; KOSMEHL, T.; BÖTTCHER, M.; STORCH, V.; BRAUNBECK, T.; HOLLERT, H. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.72, p.1842-1848, 2009.

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

ROMÉO, M.; BENNANI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFAURIE, M.; GIRARD, J.P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic toxicology**, New York, v.48, p.185-194, 2000.

ROMEOA, M.; SIAUB, Y.; SIDOUMOU, Z.; GNASSIA-BARELLI, M. Heavy metal distribution in different fish species from the Mauritania coast. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.232, p.169–175, 1999.

ROOS, P.H.; TSCHIRBS, S.; PFEIFER, F.; 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.; KASUBA, V.; BROZOVIC, G.; JAZBEC, A. Genotoxic effect 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: B. Cummings (Ed.), **Genetics**, San Francisco: Pearson Education, 2002. p 595-621.

RUSSO, I.L. **A bacia hidrográfica do córrego São Joaquim e o abastecimento urbano de água de Santa Gertrudes (SP)**. 1997. 121f. Dissertação (Mestrado em Geociências) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 1997.

SAMARDAKIEWICZ, S.; WOŹNY, A. Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v.83, p.289–295, 2005.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A.R.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.43, p.301-304, 1998.

SETH, C.S.; MISRA, V.; CHAUHAN, L.K.S.; SINGH, R.R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and comet assay approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.71, p.711-716, 2008.

SHANNON, M. C.; GRIEVE, C. M. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.78, p.5–38, 1999.

SHARMA, C.B.S.R.; PANNEER-SELVAN, N. Genetic toxicology of pesticides in higher plant systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v.9, p.409-442, 1990.

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

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.

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

SORENSEN, E.M.B. **Metal poisoning in fish**. Boca Ranton: CRC PRESS, 1991. p.235-283.

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

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. **4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás-PDPETRO**, Campinas, p. 1-10, 2007.

SOUZA, T.S.; HENCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F.; GONÇALVES, R.A.; FONTANETTI, C.S. The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.72, p.1363-1368, 2009.

STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T.H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.31, p.183-191, 1998.

SWASDEE, B.; KÖHLER, H. Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). **Chemosphere**, Oxford, v.75, p.1539-1547, 2009.

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.

TANAKA, P.R. **O papel das tilápias (*Oreochromis niloticus*) no ciclo do fósforo no Lago Azul (Rio Claro – SP)**. 2001. 40f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

TAVARES, D.C. **Estudos da possível ação genotóxica do alcalóide boldina em sistemas de células de mamífero "in vitro" e "in vivo"**. 1991. 205f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade 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.; MIAYMAE, 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.3, p.206-221, 2000.

UHL, M.; PLEWA, M.J.; MAJER, B.J.; KNASMÜLLER, S. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. In: MALUSZYNSKA, J.; PLEWA, M.

(Org.). **Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health**: a course manual. Katowice: 2003. p.11-30.

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

VARGAS, V.M.F.; MIGLIAVACCA, S.B.; MELO, A.C.; HORN, R.C.; GUIDOBONO, R.R.; FERREIRA, I.C.F.S.; PESTANA, M.H.D. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. **Mutation Research**, Amsterdam, v.490, p.141–158, 2001.

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

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPES, D. Cytogenetic damage in Shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “High-density brines”. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, New York, v.43, p.284-291, 2002.

VIGANÒ, L.; CAMOIRANO, A.; IZZOTTI, A.; D’AGOSTINI, F.; POLESELLO, S.; FRANCISCI, C.; DE FLORA, S. Mutagenicity of sediments along the Po River and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas. **Mutation Research**, Amsterdam, v.515, p.125-134, 2002.

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

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

VOUTSINAS, G. ZARANI, F.E.; KAPPAS, A. The effect of environmental aneuploidy inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. **Cell Biology International**, London, v.21, n.7, p.411-418, 1997.

VUJOŠEVIĆ, M.; ANDELKOVIĆ, S.; SAVIĆ, G.; BLAGOJEVIĆ, J. Genotoxicity screening of the river Rasina in Serbia using *Allium* anaphase-telophase test. **Environmental monitoring and assessment**, Dordrecht, v.147, p.75-81, 2008.

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

WHO. World Health Organization. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. **Environmental Health Criteria**. Geneva: WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2001. v.222, 238p.

WIERZBICKA, M. Mitotic disturbances induced by low doses of inorganic lead. **Caryologia**, Firenze, v.41, p.143-160, 1988.

WIERZBICKA, M. Disturbances in cytokinesis caused by inorganic lead. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.29, p.123–133, 1989.

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

YILMAZ, F.; ÖZDEMİR, N.; DEMIRAK, A.; LEVENT TUNA, A. Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. **Food Chemistry**, London, v.100, p.830-835, 2007.

ZHANG, Y., XIAO, H. Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. **Mutation Research**, Amsterdam, v.420, p.1-6, 1998.

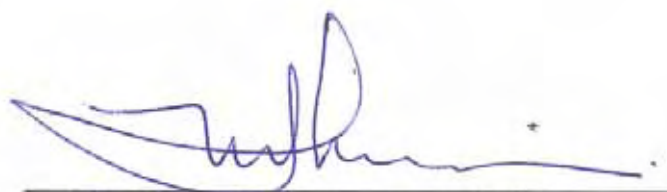
ZHANG, Y.X.; YANG, X.L. The toxic effect of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. **Mutation Research**, Amsterdam, v.312, p.121-126, 1994.

ŽEGURA, B.; HEATH, E.; ČERNOŠA, A.; FILIPIČ, M. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, Oxford, v.75, p.1453–1460, 2009.

Rio Claro, 10 de março de 2010.

A handwritten signature in blue ink, reading "Renata Caritá". The signature is fluid and cursive, with the first name "Renata" being more prominent than the last name "Caritá".

Renata Caritá

A handwritten signature in blue ink, reading "Maria Aparecida Marin Morales". The signature is more complex and stylized than the one above, with many loops and flourishes. It is written in a cursive style.

Maria Aparecida Marin Morales