
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CRISTIANE SUELI TALHIAFERRO DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E
MUTAGÊNICO DO EFLUENTE DE UMA REFINARIA
DE PETRÓLEO E DOS RIOS SOB SUA INFLUÊNCIA,
POR MEIO DE BIOENSAIOS COM *Oreochromis niloticus*
(PERCIFORMES, CICHLIDAE)**

CRISTIANE SUELI TALHIAFERRO DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DO
EFLUENTE DE UMA REFINARIA DE PETRÓLEO E DOS RIOS SOB SUA
INFLUÊNCIA, POR MEIO DE BIOENSAIOS COM *Oreochromis niloticus*
(PERCIFORMES, CICHLIDAE)**

Orientadora: Prof^ª Dr^a Maria Aparecida Marin-Morales

Co-orientadora: Dr^a Thaís Cristina Casimiro Fernandes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de
Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela e
Licenciada em Ciências Biológicas

Rio Claro
2013

575.1
A663a Araújo, Cristiane Sueli Talhiaferro

Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do efluente de uma refinaria de petróleo e dos rios sob sua influência, por meio de bioensaios com *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) / Cristiane Sueli Talhiaferro Araújo. - Rio Claro, 2013

64 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Maria Aparecida Marin-Morales
Coorientador: Thaís Cristina Casimiro Fernandes

1. Genética. 2. Mutagênese ambiental. 3. Micronúcleo. 4. Anormalidades nucleares. 5. Biomonitoramento. 6. Ecossistema aquático. 7. Peixe. I. Título.

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

*Dedico este trabalho ao meu pai, José, e à
minha mãe, Marilda.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por se esforçarem ao máximo para me dar tudo o que eles não tiveram e ainda mais.

Ao meu irmão, Sandro, pelo apoio e preocupação, por todas as sinucas, cervejas e conversas, por ter me dado a sobrinha mais linda e esperta que uma tia poderia querer. À Luciani e Jordana, pelos vários momentos em família. À Rafa, por ser tão sorridente, tão carinhosa, tão inteligente, por pedir pra vovó me ligar só para poder contar o seu dia, por me amar mesmo com a minha ausência.

A toda a minha família, perto ou longe, por fazerem parte da minha história de vida e pelas boas memórias.

Ao meu melhor amigo, Etho, por termos crescido e nos tornado a pessoa que somos hoje juntos, por partilhar comigo os mais diversos momentos, por sempre me ouvir, por me amar incondicionalmente, por me apoiar, por me aconselhar, por entender minha ausência, pelas ligações de horas, por sempre estar do meu lado, por ser meigo, por ser ogro, acima de tudo, por ser meu irmão. Te amo um tantão assim do tamanho do universo (considerando que ele está em contínua expansão!).

A todos os mutagênicos: Nádia, Laís, Matheus, Léo, Michele, Thaís, Paula, Yali, Dânia, Márcia, Jaque Pira, Raquel, Maria Tereza, Bruna, Jaque Bianchi, Verônica, Dani Leme, Rê Caritá e Lívia, por estarem sempre dispostos a ajudar, por todas as risadas e por tornarem esse laboratório tão alegre e acolhedor.

Ao que passaram pelo Laboratório de Mutagênese.

Aos agregados Du e Hélio.

À Marcinha, Léo, Matheus, Nádia, Mi, Maria, Rachelli, Princesa pelos fuscas azuis, cometas, “multirões”, happy hours, comidas, conselhos e pelo apoio. Acima de colegas de laboratório, vocês são grandes amigos.

Aos técnicos Sandra, Roberta e Gerson pelo apoio no laboratório.

À Marcinha, por sempre estar disponível para me ajudar em qualquer coisa, por se preocupar comigo e me dar conselhos, pela risada mais contagiante do mundo que sai tão facilmente, pelas arrumações de mala e vários outros momentos tão peculiares compartilhados. Por ser praticamente minha irmã mais velha.

À Thaís, amiga e co-orientadora, por estar comigo nos momentos bons e ruins, por sempre tentar me compreender, por acreditar em mim, pelos diversos ensinamentos, pelos momentos de diversão, pelos momentos sérios, pelas broncas dadas e não dadas, pelos elogios, por me motivar tanto. Enfim, é difícil colocar toda essa saga de tantos anos no papel, mas espero que você saiba o quanto é importante para mim. Sem você esse trabalho não teria saído.

À Profª Maria Aparecida Marin-Morales. Por ter me aceitado no seu “ninho”, por ser um exemplo de pessoa e profissional, pelo carinho, pela atenção, pela compreensão, pela paciência. Por nos inspirar. Por ser a melhor orientadora do mundo.

À Nádia, pelos momentos bons e ruins compartilhados, pela amizade, pelas caronas, pela ajuda no que eu precisasse, pelo apoio em diversas situações e até mesmo pelo excesso de convivência. Obrigada também ao Pé-de-pano!

À Nela Dopudj, pela experiência de conviver com uma sérvia, pelos risos e por ter sido tão paciente enquanto eu escrevia este trabalho.

À Izzy Carpenter, por ter me dado forças quando eu estava exausta, por me incentivar e pelos momentos únicos que eu guardarei para sempre na memória.

À Profª Dora, por ter sido um exemplo dentro e fora da sala de aula, por ter sempre sido tão amorosa e maternal com seus alunos recém-chegados ao mundo universitário e à vida longe

da família e amigos, por ter me ensinado mais do que qualquer outro professor. Por todas as madrugadas no laboratório trabalhando. Por todos os alpinos, bis, bolos e demais guloseimas. Você faz uma falta imensa por aqui, mas espero que esteja bem agora.

Ao pessoal da Moradia por ter me abrigado quando cheguei aqui pela primeira vez, e à Casa 7 por ser minha primeira família/república em Rio Claro e terem me ensinado até a fritar ovo!

Às meninas da Rep. Pensão pelos momentos compartilhados, especialmente à Marina, por tantas experiências e anos de amizade.

A todos os moradores e ex-moradores da Casa Rosada, especialmente Nani, Pedro, Ítalo, Milla, Lenon, Camila e Filipagem. Obrigada por tornar deste “um lugar de gente barata e cerveja bonita”!

Ao agregado Jé, pelas conversas afora enquanto bebíamos nossa sagrada cerveja, e Rê, por quase sempre estar disposta a embarcar nas minhas loucuras.

À República Itinerante Toca da Moréia, por momentos memoráveis, especialmente ao Charlie, que se tornou um grande amigo (seja na doação de sangue, seja no bar!).

Ao pessoal da Biologia, por fazerem desse o curso mais lyndo, pelos rolês na Casinha, festas, discussões, maratombas, gincanas, recepções, guache, lama...

Ao PET Biologia, pelas experiências e aprendizados proporcionados.

Ao Interbio, O Maior Espetáculo da Terra! “Onde você pode ser o que você realmente é”.

Ao AfterBio, o maior e mais lyndo After da Terra!

Ao pessoal do curso de verão do PRH, principalmente Xuxa, Gigolô, Nádia, Banana, Noemi, Raquel, Sacra, Hina, Patrick, Demorô, Vassoura, Ceará e claro ao Smurf, grande parceiro

nesses anos. Obrigada por todos os coffee-breaks, conversas, piadas e pelas cervejas na Mansão. Sinto saudades das quartas-feiras.

Ao pessoal do CBN 07, Nádia, Artur, Van, Isa, Xícara, Kenny, Ana, Surdo, Emo, Bia, Cobaia e os demais. Valeu pela convivência e pelo tempo que passamos juntos.

À Sandra de Santa Rosa, que sempre viu o que havia de melhor em mim e me incentivou a buscar isso, pelos abraços de urso mais acolhedores, por tanto afeto e inspiração. Por ser uma pessoa maravilhosa. Não sei se eu teria entrado na universidade sem você lá para me fazer caminhar.

Ao pessoal do Madalena, pelos cansaços compartilhados, bebidas e risadas, especialmente Marcela, Paulinha, Cutia, Chico, Fer, Bala, Carol, Curiosa, Margot, Milla, Ricardo, Ana Clara, Dênis, Vinícius, Luquinhas, Serginho.

Aos professores e funcionários do Instituto São Pio X, principalmente Rosângela Fontana que me ajudou e tanto incentivou na minha decisão de ser bióloga, Vera Lúcia Cardoso pelo apoio e carinho e Luiz, por me ensinar a amar a filosofia e a psicologia.

À Thaís e Rê Caritá, pela ajuda na coleta, especialmente ao Matheus, indispensável para a realização desse trabalho e por sempre se dispor a nos ajudar, obrigada por carregar tantos galões de água!

Ao Prof^o Dr. Dimas Dia Brito, José Maria Cazonatto, Adriana, Rodrigo Goya e Arthur Wieczorek do PRH 05 pelo auxílio.

Às técnicas Francisca do CEA e Mirtis e Luciana, do LEBAC, pelas análises físico-químicas.

À Prof^a Dejanira de Franceschi de Angelis e Dilza Nalin pelo apoio na realização deste trabalho.

À Refinaria de Paulínia (REPLAN) por permitir a realização das coletas e ao Zito por realizá-las.

Ao Ceapla, pela disponibilização dos dados climáticos.

Ao Departamento de Biologia, pela estrutura concedida.

Ao Programa de Formação de Recursos Humanos em Geociências e Ciências Ambientais Aplicadas ao Petróleo – PRH 05/UNESP, ao PFRH/Petrobrás e ao PRH/ANP – FINEP/MCT, pelo apoio acadêmico e financeiro, indispensáveis à realização deste trabalho de conclusão de curso.

Enfim, a todos que contribuíram de uma forma significativa na minha vida para que eu chegasse até aqui. Se eu esqueci alguém, desculpe, a memória é fraca e o nervosismo é forte.

With A Little Help From My Friends

Joe Cocker

(...) I get by with a little help from my friends
Going to try with a little help from my friends
I get high with a little help from my friends
Yes, I get by with a little help from my friends
With a little help from my friends.

Composição: John Lennon e Paul McCartney

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	14
2. OBJETIVOS	23
3. METODOLOGIA.....	24
3.1. Área de estudo	24
3.2. Material Biológico	25
3.3. Importância da área de estudo	26
3.4. Bioensaios.....	28
3.5. Ensaios Físicos e Químicos	29
3.6. Dados de temperatura, umidade relativa e pluviosidade	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Parâmetros físico-químicos	30
4.2. Parâmetros ecotoxicológicos	41
4.2.1. Análise das águas tratadas pela refinaria.....	41
4.2.2. Análise das águas do entorno da refinaria.....	42
5. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

RESUMO

A indústria petroquímica representa um setor de intensa atividade e grande importância no Brasil, que continua em plena expansão. Para sua utilização, o petróleo precisa sofrer um processo de refino que demanda a utilização de grandes quantidades de água gerando também grande quantidade de efluentes lançados nos rios. O petróleo é uma mistura complexa composta principalmente por hidrocarbonetos, muitos deles reconhecidamente tóxicos e, portanto, seu processamento pode promover a contaminação do meio ambiente. Sendo a água o receptor final da descarga dessa indústria e um recurso tão importante para o abrigo e manutenção dos ecossistemas é de vital importância que se realizem atividades de biomonitoramento para garantir e proteger a qualidade dos recursos hídricos que sofrem influência desse tipo de atividade industrial garantindo assim a saúde ambiental. Este trabalho teve como objetivo principal analisar a qualidade das águas provenientes do processo de refino de petróleo de uma das maiores refinarias de petróleo do Brasil (REPLAN) durante as etapas do tratamento das águas residuais da indústria e das águas de rios associados a essa refinaria. Com o intuito de observar os possíveis efeitos tóxicos, genotóxicos e mutagênicos das diferentes amostras de água, peixes da espécie *Oreochromis niloticus* foram avaliados por meio dos testes do micronúcleo e de anormalidades nucleares em eritrócitos circulantes periféricos deste organismo. Os resultados obtidos indicaram que o tratamento realizado pela refinaria, nos períodos avaliados, foi eficiente uma vez que as substâncias presentes nas águas analisadas não foram capazes de promover alterações no material genético dos eritrócitos do organismo teste de maneira significativa. Desta forma, os resultados mostraram que as águas não possuem atividade genotóxica e/ou mutagênica. Por outro lado, quando as substâncias presentes nas águas da descarga pela refinaria se misturam às substâncias provindas de outras atividades industriais a montante de onde está situada a empresa avaliada, estas passam a apresentar, em alguns períodos, potencial genotóxico, caracterizado pela grande quantidade de anormalidades nucleares presentes nos eritrócitos dos peixes expostos. Dentre essas anormalidades, as mais frequentes são as invaginações e evaginações, que são caracterizadas por alterações na forma do núcleo; as primeiras podem ser resultantes do efeito de substâncias que interferem na dinâmica do ciclo celular mitótico, estrutura da lâmina nuclear e/ou na expressão de genes relacionados às proteínas laminares enquanto que as evaginações podem ser originadas a partir de material genético amplificado excedente. As amostras de águas

provenientes dos rios no entorno da REPLAN não possuem potencial mutagênico, embora tenham se mostrado indutoras de genotoxicidade em alguns pontos, em determinados períodos, influenciadas pelo fator sazonalidade.

Palavras-chave: Micronúcleo, anormalidades nucleares, biomonitoramento, ecossistema aquático, peixe.

ABSTRACT

The petrochemical industry represents a sector of intense activity, in constant expansion and great economic importance for Brazil. In order to be used in various human activities petroleum needs to suffer a refinement process that, besides requiring large amounts of water, produces large amounts of wastes, which are discharged in hydric resources. Petroleum is a complex mixture mainly comprised by hydrocarbons, many of them are recognized as toxic chemicals, which are able to induce a considerable environmental pollution. Since water is an important resource for the maintenance of ecosystems and is also the final receiver of effluent discharges of the petroleum industry, there is an imminent need to monitor, constantly, the hydric resources that are influenced by this industrial activity, so that it can be ensured the environmental health. This study aimed, mainly, to analyze the quality of water samples derived from refinement process performed of the largest petroleum refinery in Brazil (REPLAN), in distinct steps of the industry treatment, and waters of rivers associated to its activity. Micronuclei and Nuclear Abnormalities tests were performed in erythrocytes of the fish species *Oreochromis niloticus* exposed to water samples derived from refinery use and to rivers under the influence of their effluents, in order to evaluate its possible toxic, genotoxic and mutagenic effects. The results obtained show that the treatment carried out by the refinery, during the evaluated periods, was effective, since the substances present in the water samples did not induce significant genotoxic and/or mutagenic alterations in the genetic material of the test organisms. On the other hand, when the substances present in the refinery effluent mix with the ones derived from other industrial activities developed upstream of this industry, the resultant compound, in some periods, presented genotoxic potential, characterized by a rise of erythrocytic nuclear abnormalities. Among these abnormalities, the most frequent are nuclear invaginations and evaginations; where the first ones can result from the effect of substances that interfere in the dynamics of the mitotic cell cycle, structure of the nuclear lamina and/or expression of genes related to lamina proteins, whereas the second ones can be originated from surplus genetic material derived from genome amplification. The water samples from rivers around REPLAN do not present mutagenic potential, although they induced genotoxicity at some collecting points, in certain periods, influenced by seasonality.

Key words: Micronuclei, nuclear abnormalities, biomonitoring, aquatic ecosystem, fish.

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

A água é um importante dispersor natural de substâncias que, com a intensificação das atividades antrópicas, se tornou um grande receptor de efluentes, acumulando substâncias tóxicas e promovendo a disseminação de contaminantes. Com o aumento da tecnologia industrial há, conseqüentemente, uma maior complexidade nas características físico-químicas das substâncias lançadas no meio ambiente, potencializando os riscos que podem ser originados a partir de tais descargas. Esses despejos, que podem ocorrer de forma proposital ou acidental, têm o potencial de causar disfunções tanto estruturais quanto funcionais nos ecossistemas. Determinados compostos, quando presentes em baixas concentrações no meio ambiente, podem não causar, em um curto período, efeitos severos aos organismos expostos, mas em longo prazo podem reduzir o tempo de vida desses seres. A persistência e o acúmulo de efluentes industriais proporcionam grandes riscos à biota associada ao local contaminado, inclusive para o homem (NEHLS; SEGNER, 2001; FLEEGER; CARMAN; NISBET, 2003; BENINCÁ et al., 2012).

A complexidade das misturas que vêm sendo descartadas no meio ambiente leva a uma necessidade de se avaliar os impactos ambientais que esses descartes proporcionam, sendo esta avaliação de suma importância para a garantia da qualidade dos ecossistemas e da saúde humana. Análises físico-químicas oferecem informações referentes às substâncias presentes na água, porém essas análises são apenas quantitativas, havendo, assim, a necessidade de aplicação de ensaios ecotoxicológicos que possam complementá-las e também avaliar se essas substâncias interagem e/ou interferem sobre as atividades biológicas dos organismos expostos (FLEEGER; CARMAN; NISBET, 2003; CHEN; WHITE, 2004; RANK; JENSEN; JESPERSEN, 2005).

Muitas dessas substâncias químicas descartadas no meio ambiente possuem a afinidade de se ligar ao material genético dos organismos, o que resulta em alterações ou danos na fita de DNA. Essas substâncias são chamadas de agentes genotóxicos e/ou mutagênicos (BOER; HOEIJMAKERS, 2000). O termo genotoxicidade se caracteriza por ser uma alteração na molécula de DNA, como, por exemplo, formação de adutos, lesões na fita, síntese de DNA não programada e trocas entre cromátides irmãs. Esses efeitos podem ser transitórios, pois são passíveis de serem neutralizados pelo sistema de reparo de DNA presente nos organismos. Já o termo mutagenicidade caracteriza-se pela indução de

mutações gênicas ou cromossômicas, sendo que estas causam uma alteração permanente no material genético dos organismos (DEARFIELD et al., 2002).

A importância de se realizar estudos de biomonitoramento se torna ainda maior se houver a possibilidade de alguma espécie nativa sofrer alterações ou danos biológicos, se houver a suspeita de que a população esteja consumindo organismos que ofereçam risco à sua saúde e/ou se houver o interesse em conhecer a qualidade do ambiente avaliado (SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

Com isso, há um aumento na demanda de estudos que contemplem a avaliação do potencial genotóxico das substâncias presentes em áreas afetadas por efluentes (KLIGERMAN, 1982). A exposição de organismos aquáticos a uma variedade de poluentes fornece subsídios para se inferir os possíveis efeitos que diversos compostos químicos possam induzir sobre a integridade dos organismos, tanto no presente quanto no futuro (KLIGERMAN, 1982; SOUZA; FONTANETTI, 2006).

Para uma análise mais acurada de um possível impacto ambiental, é interessante que haja a utilização de ferramentas diferentes de análise, a fim de que o estudo possa conter mais informações e assim auxiliar no diagnóstico e na tomada de decisões sobre o meio afetado. A utilização de biomarcadores em análise ambiental permite conhecer os potenciais danos da contaminação sobre as espécies utilizadas no estudo e sobre o próprio ecossistema. Biomarcadores são comumente definidos como organismos que respondem biologicamente a distúrbios ambientais, que possam ser mensurados e identificados quanto a presença, efeitos e até mesmo ao grau de distúrbio causado em um meio. Dessa forma, a utilização de biomarcadores deve ser considerada para um primeiro diagnóstico de contaminação (KLEMZ, 2002) e como uma ferramenta para avaliações multidisciplinares (BENINCÁ et al., 2012). Devido à dificuldade de se determinar individualmente os níveis exatos de contaminantes, bem como sua natureza em misturas complexas, a utilização de bioindicadores se torna um importante instrumento para medir os níveis de poluição dos ambientes aquáticos (RANK; JENSEN; JESPERSEN, 2005).

Nas últimas décadas, houve um grande progresso quanto à avaliação do impacto que compostos químicos e físicos, com potencial genotóxicos, possam induzir sobre os organismos aquáticos (JHA, 2004). O sucesso nas avaliações ambientais realizadas atualmente se deve às constantes investigações e aplicação de novas metodologias que utilizam organismos aquáticos cada vez mais sensíveis para a detecção da genotoxicidade de

diversos compostos (SHUGART, 2000; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Os benefícios da aplicação de espécies da biota aquática para estudos sobre danos genéticos causados por xenobiontes têm sido discutidos há várias décadas (BELFIORE; ANDERSON, 2001).

Peixes são capazes de responder à presença de xenobióticos da mesma forma que mamíferos, sendo a sua utilização útil para testar as possíveis propriedades genotóxicas de agentes químicos e físicos (AL-SABTI, 1986). Desta forma, a utilização de peixes como organismo-teste tem uma importância especial, pois estes organismos constituem uma relevante via de transferência de contaminantes entre a água e a população humana, bem como entre a água e outras espécies da cadeia trófica, que utilizam os peixes como recurso alimentar (AL-SABTI; METCALFE 1995).

Entre as diversas técnicas existentes para detectar efeitos genotóxicos em peixes, está o teste do micronúcleo (MN), que é largamente utilizado pela sua facilidade de aplicação sobre estes organismos (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005).

Inicialmente, essa técnica era aplicada somente em camundongos, mas Hooftman e De Raat (1982) modificaram esse protocolo para ser aplicado em peixe. Esse teste é de grande valia por ser rápido, confiável, sensível e não precisar de equipamentos caros e elaborados para sua realização. Dessa forma, o teste do MN tem sido largamente empregado para investigar danos causados por agentes físicos ou químicos, permitindo também avaliar a poluição da água por exposição direta ou indireta, em ensaios *in situ* e *ex situ*, em avaliações do potencial genotóxico dos compostos presentes no ambiente aquático, por meio de quebras cromossômicas e distúrbios no fuso mitótico (BARŠIENĖ; LOVEJOY, 2000; DOLCETTI; VENIER, 2002).

De acordo com Arkhipchuk e Garanko (2005), os MN são formados quando fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros, que sofreram atraso durante a migração para os pólos na anáfase, não são incorporados ao núcleo de nenhuma das células filhas durante a divisão celular. O primeiro caso ocorre devido ao potencial clastogênico do agente. Já o segundo, resulta da ação aneugênica, decorrente da interferência da substância com o fuso mitótico ou estruturas citoplasmáticas. Segundo Fernandes (2010), a ação aneugênica de algumas substâncias, como por exemplo, o biossurfactante ramnolipídio, está relacionada com a inativação da cálcio ATPase, aumentando a concentração de cálcio

presente no citoplasma e interferindo na formação do fuso mitótico, decorrente de sua ação direta sobre o material genético.

Os MNs podem ser encontrados tanto em células somáticas quanto germinativas (ARKHIPCHUK; GARANKO, 2005). A utilização de sangue periférico para a realização do teste do MN é bastante comum, visto que em peixes os eritrócitos são nucleados. A utilização do sangue obtido em órgãos hematopoéticos oferece resultados sobre danos relacionados ao ciclo celular desses eritrócitos, ao passo que a utilização de sangue periférico representa danos que acontecem durante todo o tempo de vida desses eritrócitos circulantes (SCHLEGEL; MacGREGOR, 1982). Para se realizar o teste do MN, deve-se levar em consideração o ciclo de vida e a cinética celular de cada um dos tipos de tecidos e organismos a serem avaliados. Primeiramente, a população celular escolhida precisa estar em divisão mitótica, de forma que o agente possa interferir nas fases da proliferação celular. A indução de MN varia muito entre os peixes, podendo ser encontrado um pico de indução dessa alteração entre 1-5 dias, após exposição. No entanto, para a maioria das espécies, a tendência geral de formação de MN se dá entre o segundo e terceiro dia de exposição. Assim, para que possa haver a formação de MN, é preciso populações celulares que estejam em constante processo de divisão e tenham sofrido, pelo menos, um ciclo celular (UDROIU, 2006). Contudo, ainda há pouca informação sobre o ciclo celular em teleósteos. Isto acontece devido à sua característica exotérmica que faz com o ciclo celular varie de acordo com a temperatura e a velocidade da eritropoiese, além de poder também variar de acordo com a própria espécie de peixe a ser considerada (AL-SABTI; METCALFE, 1995; JHA, 2008).

Vários autores têm observado que além dos MNs, a presença de outras anormalidades nucleares (ANs) pode estar relacionada com possíveis efeitos de contaminantes presentes no ambiente aquático (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; ANSARI et al., 2008; GUILHERME et al., 2008; HOSHINA; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008; JIRAUNGKOORSKUL et al., 2008; RIVERO et al., 2008; GALINDO; MOREIRA, 2009; BENINCÁ et al., 2012). No entanto, a compreensão sobre o mecanismo de formação dessas estruturas ainda é um desafio para os pesquisadores. Carrasco, Tilbury e Myers (1990) descreveram, além dos MNs, algumas outras anormalidades em eritrócitos de peixes, classificando-as em núcleo “notched”, “lobed”, “blebbed” e vacuolizado.

Diversos autores consideram essas ANs como danos genotóxicos e propõem que essa análise deve complementar as análises de MN (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001; FENECH; CROTT, 2002; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). De uma forma geral, as ANs aparecem como alterações na forma elíptica do núcleo (FERRARO et al., 2004).

Vários estudos demonstram que eritrócitos de peixe apresentam uma grande incidência de MN, após sua exposição a diversos xenobióticos, tanto em experimentos *in situ* quanto *ex situ* (BOMBAIL; GORDON; BATTY, 2001; MATSUMOTO et al., 2006). Assim, os marcadores genotóxicos, como indução de MNs e ANs têm sido largamente utilizados no biomonitoramento de áreas poluídas, demonstrando uma correlação positiva entre a poluição presente nesses ambientes e os danos genéticos encontrados (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; ERGENE et al., 2007; GUILHERME et al., 2008; JHA, 2008). Ayllon e Garcia-Vazquez (2000) demonstraram ainda que as ANs são induzidas por compostos genotóxicos, mesmo que estes não induzam a formação de MN.

Ansari et al. (2008) demonstraram, por meio de testes realizados com *Channa punctata*, que o inseticida do grupo dos piretróides deltametrin, uma alternativa menos tóxica e persistente aos organoclorados, induzia um aumento concentração-dependente na frequência de MN e AN em eritrócitos periféricos desses organismos. De acordo com Hill (1989), os peixes demonstraram ser mais sensíveis aos piretróides do que as células de mamíferos quando comparados a outros estudos desenvolvidos para avaliar a ação desse inseticida.

Ergene et al. (2007) utilizaram três espécies de peixes (*Clarias gariepinus*, *Alburnus orontis* e *Mugil cephalus*) para avaliar a contaminação por metais pesados em água e sedimento das lagoas Akgol e Paradeniz (Turquia), por meio do teste de AN e MN em sangue periférico das espécies dos peixes coletadas da própria área. Como resultado, observaram frequências mais altas de ANs e MN nos indivíduos que habitavam os lagos do que no grupo controle, o que indicou a contaminação desses ambientes.

No Brasil, poucos estudos são desenvolvidos com MN de peixes tropicais de água doce (GRISOLIA; CORDEIRO, 2000; GRISOLIA, 2002; GRISOLIA et al., 2005). As espécies de tilápia são comumente usadas para se avaliar o efeito das mais diversas substâncias tóxicas presentes no meio aquático e assim realizar estudos de biomonitoramento em diversas regiões do mundo (AL-SABTI; METCALFE, 1995;

GRISOLIA; CORDEIRO, 2000; BOMBAIL; GORDON; BATTY, 2001; GRISOLIA et al., 2005; MATSUMOTO et al., 2006). A espécie *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) é largamente aplicada para se avaliar os mais diversos tipos de componentes químicos no processo de biomonitoramento ambiental, como efluentes de refinaria, indústria têxtil, curtume (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003; GRISOLIA et al. 2005; SOUZA; FONTANETTI, 2006), e possui grande importância do ponto de vista comercial na região Sudeste do Brasil, particularmente no Estado de São Paulo. Essa espécie é comumente encontrada em estuários ao redor do mundo e possui comprovada sensibilidade em fornecer respostas rápidas a distúrbios ambientais (VIJAYAN et al., 1996).

No estudo desenvolvido por Rivero et al. (2008) para avaliar a genotoxicidade do composto etoxilato de nonifenol, utilizando como organismo teste a espécie *O. niloticus*, os autores concluíram que essa espécie apresentou maior sensibilidade ao teste do que outros organismos testados para o mesmo composto, como camundongo, *Drosophila melanogaster* e *Biomphalaria tenagophila* (GRISOLIA; BILICH; FORMIGLI, 2004; OLIVEIRA-FILHO et al., 2005).

Ventura, Angelis e Marin-Morales (2008), testando diferentes concentrações do herbicida atrazina sobre a espécie *O. niloticus*, encontrou uma correlação positiva entre a concentração do herbicida e o aumento na frequência de MN e AN, corroborando a sensibilidade e confiabilidade de tais testes.

Estudos realizados por Omar et al. (2012) com *O. niloticus* e *Mugil cephalus*, para avaliar o potencial genotóxico da poluição por metais no lago Qaroun (Egito), mostraram uma grande diferença na frequência de MN entre os locais comparados, em ambas as espécies, demonstrando os diferentes níveis de contaminação dessas áreas. Os autores afirmaram que essa diferença ocorre devido ao tipo e concentração de contaminantes presentes na área de estudo. Quando a sensibilidade das duas espécies utilizadas foi comparada, observou-se diferentes níveis de sensibilidade entre elas. *O. niloticus* se mostrou mais susceptível a danos clastogênicos, devido à uma maior incidência de eritrócitos micronucleados, derivados do efeito promovido pelos metais, do que a espécie *M. cephalus*. Palhares e Grisolia (2002) também concluíram que duas espécies de peixes podem responder de maneiras completamente diferentes a um mesmo agente genotóxico.

Outro parâmetro a ser considerado em ensaios de biomonitoramento ambiental é a sazonalidade. Segundo Buschini et al. (2003), as diferenças de sazonalidade podem interferir

significativamente nos resultados encontrados. Benincá et al. (2012) realizaram o biomonitoramento da água de dois estuários situados no Estado de Santa Catarina - Brasil, por meio dos testes de MN e ANs, utilizando a espécie *Geophagus brasiliensis* como organismo-teste, submetidos às amostras de água coletadas em três diferentes estações do ano. Os autores observaram potencial genotóxico para os componentes que impactam essas águas, sendo que o fator sazonalidade foi de grande importância na dinâmica da contaminação, principalmente no que concerne à diluição dos poluentes presentes na água.

Entre as indústrias que lançam seus descartes nos corpos hídricos, estão as refinarias. O processo de refino de petróleo requer grandes quantidades de água e o efluente gerado comumente contém poluentes orgânicos e metálicos, incluindo fenóis, óleo, graxa, sulfuretos, nitrogênio amoniacal e HPAs (BROWN; DONELLY, 1984; DASGUPTA; ZDUNEK, 1992).

A composição do petróleo consiste, essencialmente, em 97% de hidrocarbonetos, sendo o restante da composição de elementos como nitrogênio, oxigênio e enxofre (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2003). Esses hidrocarbonetos são classificados em dois grupos: alifáticos ou aromáticos, sendo que entre os últimos os mais conhecidos são Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) (XUE; WARSHAWSKY, 2005). Os HPAs são formados por dois ou mais anéis benzênicos, constituídos, exclusivamente, por átomos de carbono e hidrogênio, organizados sob forma linear, angular ou agrupada (NETTO et al., 2000). Eles fazem parte do grupo de poluentes orgânicos persistentes e são resistentes à processos de biodegradação, podendo permanecer no ambiente por longos períodos e causar distúrbios nos ecossistemas (WANIA; MACKAY, 1996). Estes compostos são bastante conhecidos pelo seu potencial mutagênico, carcinogênico e tóxico para os animais. A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) e a Comissão Européia classificam os HPAs como poluentes prioritários. A grande distribuição de HPAs no meio ambiente ocorre devido à sua formação e liberação, a partir de qualquer processo de combustão incompleta de materiais orgânicos. Dessa forma, o último século de desenvolvimento industrial gerou um significativo aumento das concentrações de HPAs no meio ambiente (WILD; JONES, 1995; WANIA; MACKAY, 1996).

De acordo com um estudo realizado por Kawamura et al. (1994), a análise do conteúdo de HPAs em geleiras da Groelândia mostraram que o nível atual desses componentes é cerca de 50 vezes maior do que no período pré-industrial.

As atividades do setor petroquímico, como o processo de refino na produção de petróleo e os acidentes, como o derramamento desses produtos e seus derivados em corpos hídricos, são fatores importantes a serem considerados quando se fala sobre o aumento dessas substâncias no meio ambiente (PAGE et al. 1999; YUNKER et al. 2002; SISINNO et al. 2003).

Os HPAs não são mutágenos diretos, pois precisam primeiramente ser ativados metabolicamente para se tornarem capazes de interagir com o DNA e outras macromoléculas (NETTO et al., 2000). O processo de biotransformação ocorre pela ação de enzimas específicas, muitas vezes presentes em grandes vertebrados, como no caso de mamíferos e aves (WARSHAWSKY, 1999). Quando absorvidos pelas células, os HPAs são metabolicamente ativados e tornam-se reativos a grupos nucleofílicos presentes nas macromoléculas celulares. Em relação ao DNA, a formação de adutos é o fator principal na carcinogenicidade química desses compostos. A biotransformação dos HPAs abrange uma série de reações de oxidação, redução, hidrólise e de conjugação que são realizadas principalmente no fígado, por enzimas do sistema de monooxigenases de função mista da superfamília dos Citocromos P450 (KLAASSEN DOULL; AMDUR, 1996). Essa transformação torna um metabólito mais hidrofílico que seu precursor e, no caso dos HPAs, esses derivados se tornam agentes carcinogênicos mais potentes que seus antecessores. A indução de monooxigenases por componentes químicos estranhos ao organismo já foi observada em vários organismos, como mamíferos, peixes, insetos, plantas, fungos e bactérias (CONNEY, 1982).

Embora a maior parte dos contaminantes de refinaria seja eliminada durante o processo de tratamento das águas residuais, o efluente final pode ainda conter quantidades significativas de componentes tóxicos. Análises químicas do efluente de refinaria evidenciaram a presença de grandes quantidades de substâncias com potencial genotóxico e carcinogênico, como o cromo hexavalente (CrVI) e hidrocarbonetos aromáticos. Nesse estudo, os efeitos genotóxicos dos efluentes de uma refinaria de petróleo foram mais severos do que quando comparados aos dos efluentes de uma indústria de processamento de cromo (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005).

Determinados contaminantes presentes nos ambientes aquáticos, como mercúrio orgânico, hidrocarbonetos clorados e HPAs, aumentam consideravelmente a quantidade de MNs e ANs em peixes (HOSE et al., 1987; PORTO; ARAUJO; FELDBERG, 2005). Outra

característica importante dos HPAs é seu potencial de serem bioacumulados (MARTINS et al. 2004).

Como já observado em peixes e outros organismos, a toxicidade desses compostos também sofre aumento quando expostos à luz solar, pois os HPAs absorvem a radiação ultravioleta, o que causa a excitação das moléculas que, ao perderem essa energia, podem gerar compostos mais tóxicos que os originais (ORIS et al., 1984; LANDRUM et al., 1986). Ankley et al. (1995) observaram o efeito da fototoxicidade de HPAs em invertebrados aquáticos e Oris e Giesy (1987) em vertebrados aquáticos. Em ambos os estudos, a interferência da luz aumentou a toxicidade de determinados HPAs sobre os organismos testados, levando até mesmo à morte de alguns indivíduos. Segundo Arfsten, Schaeffer e Mulveny (1996), esses efeitos podem variar desde reações cutâneas agudas até processos de carcinogênese e morte celular.

De acordo com Kohlpoth et al. (1999), é necessário desenvolver testes de genotoxicidade com os resíduos e efluentes industriais para a obtenção de dados de base científica que possam ser utilizados pelos governos, para auxiliar no processo de regulamentação do lançamento de substâncias potencialmente nocivas no meio ambiente.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar os possíveis efeitos mutagênico/genotóxico das águas servidas da Refinaria de Paulínia (Replan), sobre os recursos hídricos de seu entorno;
- Avaliar os impactos no rio Atibaia, em pontos situados antes e após o lançamento dos efluentes da refinaria, e no rio Piracicaba;
- Avaliar os efeitos conjuntos dos efluentes da refinaria, dos descartes agrícolas e de efluentes de outras atividades industriais da região sobre as águas dos recursos hídricos estudados;
- Avaliar a eficiência do tratamento das águas servidas da Refinaria de Paulínia, durante todo o processo de tratamento.

3. METODOLOGIA

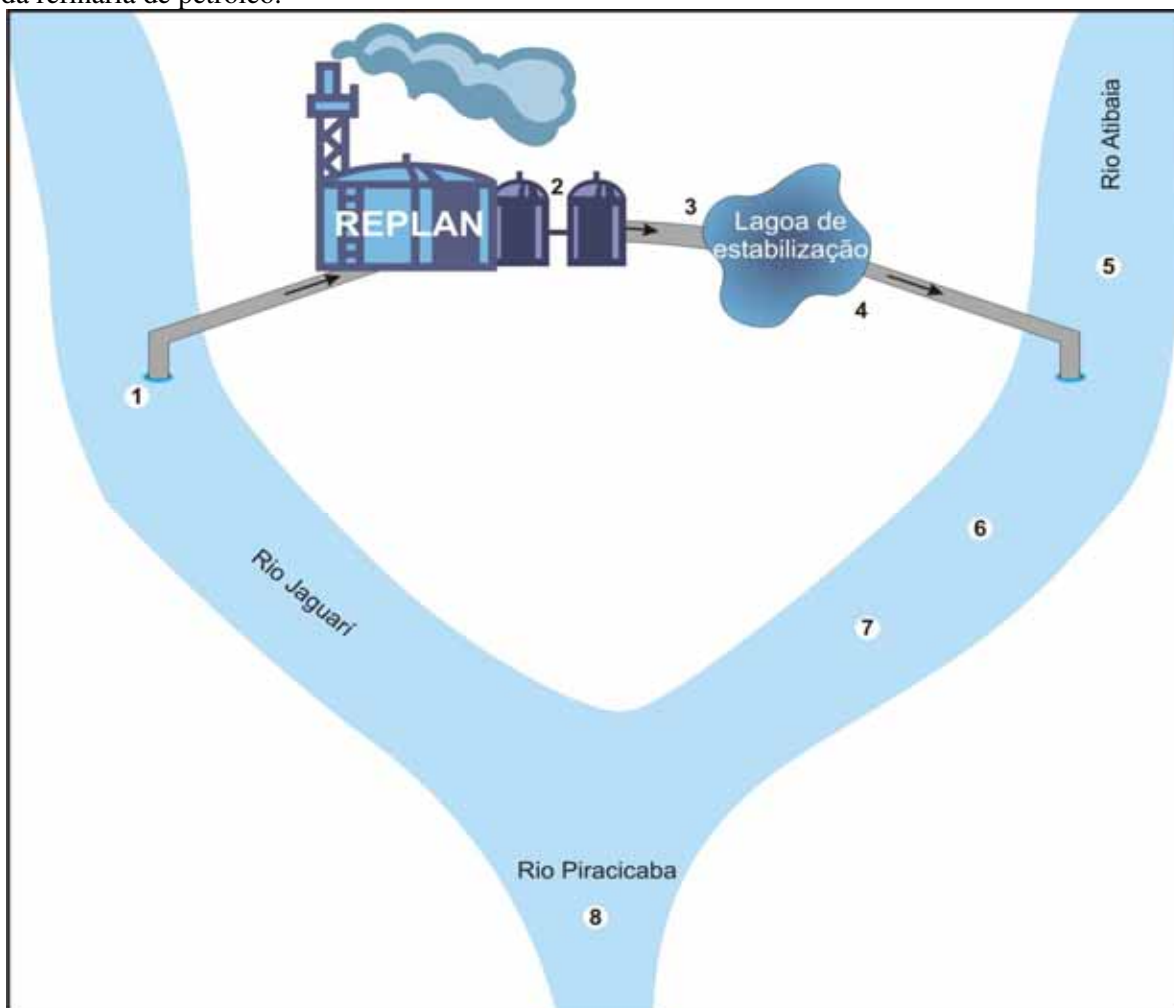
3.1. Área de estudo

Para investigar o impacto ambiental das águas residuárias da Refinaria de Petróleo de Paulínia (REPLAN) foram avaliados os potenciais genotóxicos e mutagênicos das águas do ponto de captação de água da refinaria, no rio Jaguari; de três amostras das águas tratadas pela refinaria, antes e após os diferentes processos de tratamento (físico-químico e da lagoa de estabilização); das águas a montante (500m) e a jusante da descarga das águas residuais da Refinaria (500 e 800m), no rio Atibaia e das águas do rio Piracicaba depois da confluência dos rios Atibaia e Jaguari. O monitoramento das águas foi realizado em diferentes períodos dos anos de 2010 e 2011. Os rios avaliados e a própria refinaria estão situados na cidade de Paulínia-SP, com exceção do rio Piracicaba, em que o ponto de coleta é situado na cidade de Americana-SP. Na figura 1 estão identificados e descritos os pontos investigados neste estudo. As amostras foram coletadas de acordo com o previsto pela NBR 9898 (Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, 1987).

3.2. Material biológico

Para a investigação de possíveis danos no material genético dos organismos expostos a essas águas foi utilizada, como organismo teste, a espécie de peixe *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo). Os espécimes foram expostos *in situ*, a montante e a jusante da descarga do efluente da refinaria e *ex situ*, em laboratório, após coleta das amostras de águas de todos os pontos de análise citados.

Figura 1 - Esquema demonstrando os pontos de coleta das amostras de água na área de influência da refinaria de petróleo.



Fonte: Modificado de Hoshina, Angelis e Marin-Morales (2008).

Ponto 1. Área de captação de água pela REPLAN – rio Jaguari; **Ponto 2.** Entrada do tratamento biológico do efluente; **Ponto 3.** Entrada da lagoa de estabilização da REPLAN; **Ponto 4.** Saída da lagoa de estabilização (água destinada aos despejos no rio Atibaia, município de Paulínia-SP – efluente da refinaria); **Ponto 5.** Água do rio Atibaia – 200m a montante do despejo da refinaria; **Ponto 6.** Água do rio Atibaia – 200m a jusante da descarga do efluente da refinaria; **Ponto 7.** Água do rio Atibaia – 500m a jusante da descarga do efluente da refinaria; **Ponto 8.** Água do rio Piracicaba – Cerca de 2,5 km após a confluência dos rios Jaguari e Atibaia.

Os dados referentes às coordenadas geográficas dos pontos de coletas estão identificados na Tabela 1.

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras de água da refinaria e dos rios avaliados.

Ponto de coleta	Latitude (S)	Longitude (W)
Ponto 1	22° 41' 48"	47° 08' 59"
Ponto 2	22° 44' 18"	47° 07' 17"
Ponto 3	22° 44' 26"	47° 07' 33"
Ponto 4	22° 44' 22"	47° 07' 03"
Ponto 5	22° 41' 28"	47° 07' 22"
Ponto 6	22 ° 44' 25"	47° 07' 33"
Ponto 7	22° 44' 22,3"	47° 07' 40,8"
Ponto 8	22° 45' 30"	47° 18' 54"

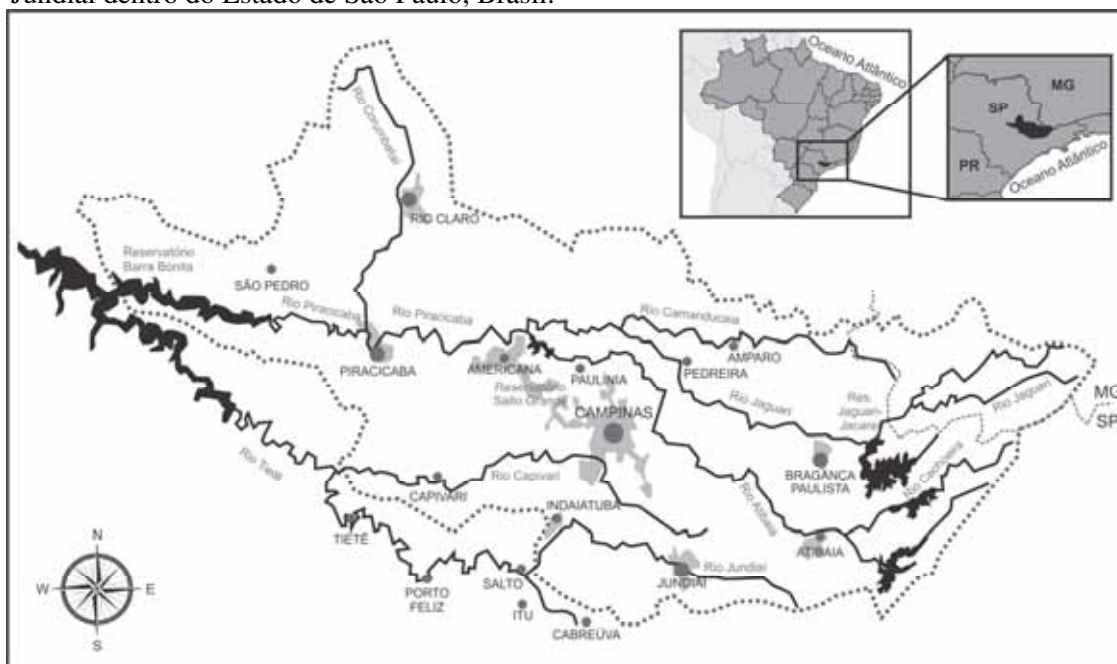
Fonte: Elaborado por Raquel Vaz Hara.

Dados obtidos no equipamento GPS – Garmin e Trex Summit.

3.3. Importância da área de estudo

Os rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba estão localizados na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 05 (UGRHI 05), dentro do Estado de São Paulo, que se constitui nas Bacias Hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí (Figura 2), possuindo 14.137,79 km² de extensão, sistema hídrico afluente do rio Tietê. A UGRHI 5 é a segunda unidade mais populosa do estado, com quase 5,1 milhões de habitantes. Sua área total é ocupada por 5,6% de cobertura vegetal natural; 3,2% de reflorestamentos; 28,2% de culturas agrícolas; 57,1% de pastagens e campos antrópicos e 4,9% de áreas urbanas e industriais. A bacia do rio Piracicaba possui 11.402,84 km², com cabeceiras correspondentes no estado de Minas Gerais (cabeceira do rio Jaguari) e no estado de São Paulo (cabeceiras dos rios Atibainha e Cachoeira, que originam o rio Atibaia) (CBH-PCJ, 2011).

Figura 2. Localização e delimitação das Bacias Hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá dentro do Estado de São Paulo, Brasil.



Fonte: Modificado de Agência Nacional de Águas – Núcleo de Gestão da Informação.

A bacia do rio Piracicaba é tida como um modelo de “bacia desenvolvida”, responsável por quase 10% do Produto Interno Bruto (PIB) e do Valor de Transformação Industrial do Brasil (VTIB). É o principal vetor da desconcentração industrial metropolitana de São Paulo, possui ocupação bastante heterogênea, com regiões de intensa atividade agrícola (cana-de-açúcar, citros, pastagens) e outras com atividade industrial. Os rios que compõe essa bacia abastecem 42 municípios (33 por captação em mananciais de superfície) e recebem efluentes de aproximadamente 194 indústrias, além de efluentes domésticos de 40 municípios, onde apenas 13 deles possuem sistema de tratamento de esgotos (MARTINELLI et al., 2002; CETESB, 2003; DEL GRANDE; REZENDE; ROCHA, 2003; CBH-PCJ, 2001).

A água dos rios nessa região é utilizada para abastecimento público e industrial, recepação de efluentes industriais e irrigação de plantações. As atividades industriais mais comuns são a de papel e celulose, alimentícia, sucroalcooleira, têxtil, curtumes, metalúrgicas, químicas e refinaria de petróleo (Paulínia) (CETESB, 1999).

3.4. Bioensaios

Para o ensaio *ex situ*, espécimes de *O. niloticus* foram transferidos do tanque de criação de peixes, localizado no Jardim Experimental do Instituto de Biociências da UNESP – Câmpus de Rio Claro, para o Laboratório de Toxicidade de Águas, do mesmo Instituto, onde foram aclimatados a 23°C em aquários com sistema de aeração constante e fotoperíodo de 12h claro/escuro. Posteriormente, os espécimes foram separados, aleatoriamente, em 9 grupos experimentais (9 aquários, com capacidade de 20L), sendo disponibilizados 4 peixes por aquário. Os aquários foram preenchidos com 15L das águas dos 8 diferentes pontos de coleta, sendo um aquário para cada amostra, além de um aquário contendo água de poço artesiano, para a realização do controle negativo (Figura 3). Para a viabilização dos ensaios com a amostra do efluente bruto, foi necessário diluí-la na proporção de 2:1 (água:efluente). Após 72 horas de exposição, foram coletadas amostras de sangue de todos os indivíduos, por meio de punção cardíaca, utilizando seringas descartáveis (1 mL), previamente heparinizadas. Para os testes de MN e ANs, as lâminas foram confeccionadas por meio da técnica de esfregaços (extensões sanguíneas). As lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e, após 24 horas, submetidas à reação de Feulgen. Foram analisados 1.500 eritrócitos por peixe, nos quais foram determinadas as frequências de células com MN e ANs (brotos nucleares, invaginações, evaginações, núcleo com descolamento de cromatina). A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Figura 3 - Aquários (20L cada) utilizados no bioensaio *ex situ* com *Oreochromis niloticus*, contendo as respectivas amostras de água coletadas nos pontos amostrados.



Fonte: Elaborado pela autora.

CN. Controle Negativo; **P1.** Área de captação de água pela REPLAN – rio Jaguari; **P2.** Entrada do tratamento biológico do efluente; **P3.** Entrada da lagoa de estabilização da REPLAN; **P4.** Saída da lagoa de estabilização (água destinada aos despejos no rio Atibaia, município de Paulínia-SP – efluente da refinaria); **P5.** Água do rio Atibaia – 200m a montante do despejo da refinaria; **P6.** Água do rio Atibaia – 200m a jusante da descarga do efluente da refinaria; **P7.** Água do rio Atibaia – 500m a jusante da descarga do efluente da refinaria; **P8.** Água do rio Piracicaba – Cerca de 2,5 km após a confluência dos rios Jaguari e Atibaia.

Para o bioensaio *in situ*, espécimes mantidos em tanques de criação no Jardim Experimental do IB/UNESP de Rio Claro foram transportados em caixas plásticas, devidamente aeradas, até o rio Atibaia, onde foram expostos em gaiolas nos pontos correspondentes à montante e jusante do despejo de efluentes da REPLAN, por 72h, sendo 4 peixes expostos por ponto. Após esse período, as gaiolas foram recolhidas e transferidas para o Laboratório de Toxicidade de Águas, para a retirada de amostras de sangue dos indivíduos e realização dos esfregaços sanguíneos, seguindo o mesmo processo descrito anteriormente. Foram analisados 1000 eritrócitos por peixe. Os dados obtidos nas análises foram submetidos ao teste estatístico Mann-Whitney ($p < 5\%$). O controle negativo utilizado foi o mesmo da exposição *ex situ*.

3.5. Ensaios Físicos e Químicos

Os ensaios físicos e químicos foram realizados com as amostras das águas de todos os pontos de coleta, como segue:

Análises físicas: pH; Condutividade; Temperatura; Transparência; Sólidos solúveis em suspensão; Material volátil; Matéria fixa residual.

Análises Químicas: Oxigênio Dissolvido; Demanda Química de Oxigênio; Demanda Bioquímica de Oxigênio; Cloretos; Acidez em CaCO_3 ; Alcalinidade; Amônia; Nitrito; Nitrato; Análise de íons; Sulfetos; Óleos e graxas; Cianetos; Fenóis.

As análises químicas de sulfeto, cianeto e análises de íons (selênio, mercúrio e arsênio) foram realizadas no Centro de Estudos Ambientais (CEA) pela química responsável Francisca de Assis Mattioli Gonçalves. Todas as análises foram baseadas no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995).

3.6. Dados de temperatura, umidade relativa e pluviosidade

Foram também obtidas as médias de temperatura, umidade relativa e pluviosidade de cada período avaliado, dados estes cedidos pelo Centro de Análise e Planejamento Ambiental (CEAPLA) do Instituto de Geociências e Ciências Exatas da UNESP, câmpus Rio Claro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Parâmetros físico-químicos

No Brasil, os recursos hídricos são classificados legalmente de acordo com a qualidade de suas águas. Esse enquadramento tem como objetivo estabelecer classes de uso para os corpos d'água a fim de que sua qualidade seja mantida ou melhorada. Segundo a classificação baseada nas diretrizes de enquadramento da Resolução CONAMA nº 357/2005, o rio Jaguari pertence à classe 2 e os rios Atibaia e Piracicaba à classe 4.

De acordo com a resolução CONAMA 357/2005, os efluentes lançados pelas indústrias devem obedecer as condições de pH entre 5-9 e os rios classes II e IV, pH 6-9. O pH pode interferir nos ecossistemas aquáticos de forma direta ou indireta. No primeiro caso (direta), quando age sobre a fisiologia das espécies presentes no ambiente e, no segundo caso (indireta), quando age sobre a precipitação de elementos químicos tóxicos e na solubilidade de nutrientes (CETESB, 2009). Alterações bruscas no pH de recursos hídricos podem levar ao desaparecimento de alguns organismos aquáticos (GERTEL; TAUKE-TORNISIELO; MALAGUTTI, 2003). Além disso, os pHs baixos podem promover a inibição do crescimento do fitoplâncton, zooplâncton e bactérias detritívoras, organismos fundamentais para o equilíbrio desses ambientes (BIRUNGI et al., 2007). Quando observamos os parâmetros físico-químicos das amostras de águas desse estudo (Tabelas 2 e 3), verificamos que os pHs de todas as amostras permaneceram dentro dos valores estabelecidos pela legislação. Os maiores valores de pH registrados foram para os pontos 3 (média de 8,05) e ponto 4 (média de 8,27) e os menores para o ponto 8 (média de 6,8).

A acidez, em CaCO_3 , atua como referência a possíveis desníveis de pH causados pela atividade da refinaria. De acordo com os valores obtidos, pode-se observar que essa indústria não afetou esse teor nos rios sob sua influência.

Outra referência ao pH são os índices de alcalinidade. Esse fator auxilia na estabilização do pH e o bicarbonato contribui com o desenvolvimento de diversos micro-organismos fotossintetizantes, bem como de microalgas de carapaças calcárias e microcrustáceos. O carbonato está associado à presença de gás carbônico, que interage com a água e origina ácido carbônico, que possui baixo poder acidificante. Quando comparados os valores de carbonatos da montante e da jusante do despejo de efluentes da REPLAN, é

possível verificar que essa indústria não está influenciando os níveis destes compostos no rio receptor de seus efluentes.

Os valores de condutividade indicam a capacidade da água conduzir corrente elétrica, parâmetro este que é dependente das concentrações de íons dissolvidos e da temperatura do meio. As atividades humanas modificam o ambiente, principalmente por inserirem diversos contaminantes nos corpos d'água. A condutividade é um parâmetro físico indireto, indicado pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) para avaliar a concentração de poluentes e, conseqüentemente, a qualidade das águas. Valores de condutividade superiores a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ indicam um ambiente impactado (CETESB, 2009).

Segundo os resultados obtidos em nossas análises, podemos observar um aumento nos valores de condutividade das águas servidas da refinaria (P2, P3 e P4), quando comparadas com os valores da água de captação (P1- rio Jaguari) (Tabelas 2 e 3). Como o aumento da condutividade está relacionado com uma maior presença de íons dissolvidos em uma amostra de água, podemos inferir que, segundo os dados das análises químicas (Tabelas 2 e 3), o aumento registrado em nossas avaliações pode estar relacionado com os altos valores de cloreto e sulfetos presentes nas águas desses rios. Este aumento nos valores do cloreto pode ser explicado pela presença de sais presentes no petróleo, em decorrência da sua origem marinha. Já o aumento de sulfetos é decorrente da própria composição do petróleo, que é um composto rico em compostos sulfurosos.

Os valores de condutividade observados para os pontos relativos aos tratamentos do efluente da indústria (P2, P3), até o efluente final (P4), foram maiores do que o permitido pela legislação. É importante ressaltar que a água de captação (rio Jaguari) já apresenta valores superiores a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para condutividade, o que nos indica uma possível atividade poluidora a montante do local de captação pela refinaria, exceto para os meses de maio de 2010 e março de 2011, onde os valores estão dentro do permitido pela CETESB (2009).

As análises da temperatura das águas de todos os pontos de coleta indicam que a atividade industrial não interfere, significativamente, neste parâmetro, pois a indústria promove um resfriamento do seu efluente, antes que ele seja descartado no rio Atibaia. A temperatura das águas do rio Atibaia é inferior à do efluente (por isso é feito o resfriamento do efluente antes de lançá-lo ao rio) devido à presença, em alguns pontos do rio, de matas ciliares, cuja cobertura vegetal mantém a água com temperaturas mais baixas e também uma atividade de decomposição microbiológica baixa. Já a Lagoa de Estabilização, além de

sofrer exposição direta à luz durante todo o período de insolação diária, também tem uma elevada carga microbiológica, que promove uma intensa atividade de biodegradação, levando a um aumento da temperatura da sua água.

A transparência da água está relacionada à quantidade de materiais em suspensão presentes nos corpos d'água e indica o nível de comprometimento da atividade fotossintética, pelo comprometimento dos níveis de penetração vertical da luz solar na coluna d'água (CETESB, 2009). Águas límpidas possuem maior taxa de oxigênio, devido ao aumento da atividade de organismos fotossintetizantes, o que promove um ambiente desfavorável à proliferação de microrganismos anaeróbios. Pelos resultados obtidos, podemos concluir que a refinaria não está interferindo na transparência da água, quando comparados os valores deste parâmetro a montante e a jusante do despejo. Já a sazonalidade parece interferir, de maneira efetiva, na transparência da água, visto que as estações quentes e chuvosas apresentam valores de transparência bem mais baixos que os outros períodos avaliados (Tabelas 2 e 3). Esta interferência se dá pelo carreamento de substâncias das margens à calha do rio, devido à ocorrência de chuvas intensas e torrenciais neste período do ano.

Os sólidos solúveis em suspensão (SSS) podem ser nocivos aos peixes e demais organismos aquáticos, por sedimentarem no leito dos rios e destruírem os organismos de importância primária da cadeia alimentar desses ecossistemas, ou ainda, por interferirem na desova dos peixes. Os sólidos têm a capacidade de reter bactérias e resíduos orgânicos no fundo dos rios, promovendo uma decomposição anaeróbia (CETESB, 2009). Estes sólidos podem ser parcialmente metabolizados ou assimilados pelos organismos presentes nos corpos d'água, constituindo fonte de matéria orgânica a ser degradada química ou biologicamente (Tabelas 2 e 3). Os resíduos gerados pela REPLAN elevam a quantidade de sólidos totais, mesmo após tratamento. Os maiores valores de SSS foram registrados para a estação fria e seca.

A matéria fixa residual (MFR) representa o teor total de matéria mineral, ou seja, quanto menor a MFR, menor os níveis de poluição inorgânica. As águas superficiais de rios de classe II não devem possuir além de 0,5% de sais dissolvidos. O efluente final da refinaria (P2) possui valores bastante elevados para esse parâmetro, quando comparado ao ponto 1 (Tabelas 2 e 3). Foi verificado que os pontos 2, 3 e 4 são ricos em MFR e que os valores voltam à normalidade (diminuição desses valores) para os pontos 5, 6 e 7,

evidenciando que os contaminantes presentes nas amostras sofreram uma dispersão, diluição ou sedimentação ao longo do rio Atibaia.

De acordo com a CETESB (2009), águas poluídas apresentam baixo teor de oxigênio dissolvido (OD), proveniente da decomposição de matéria orgânica, enquanto que águas limpas apresentam altas taxas de OD, pois o oxigênio é essencial para os processos de autodepuração em corpos hídricos. A partir deste parâmetro, é possível avaliar fatores bióticos e abióticos como a produção (fotossíntese) e consumo de oxigênio (respiração) dentro das comunidades aquáticas (MATHEUS et al., 1995). Segundo a resolução CONAMA 357 de 2005, o limite mínimo estabelecido para OD, para rios de Classe II é 5 mg/L O₂ e para rios classe IV, 2 mg/L O₂. Nossos resultados mostram que o ponto 2 apresenta valores muito baixos de OD (2010: média anual de 1,06 mg/L; 2011: média anual de 3,61 mg/L). No entanto, após os tratamentos realizados pela refinaria, esses valores aumentam (Tabelas 3 e 4), chegando até a valores mais elevados daqueles observados para as águas do ponto 1.

A demanda química de oxigênio (DQO) é a quantidade de oxigênio necessária para a oxidação de matéria orgânica, por meio de um agente químico, desconsiderando a biodegradabilidade. Despejos industriais são a principal fonte de aumento da DQO. Porém, a legislação federal e a estadual de São Paulo não incluem esse parâmetro de análise (CETESB, 2009). Os processos de refino realizados pela REPLAN promovem um grande aumento nos níveis de DQO da água captada no rio Jaguari (Tabelas 2 e 3). Após o tratamento do efluente bruto, as águas continuam com altas taxas de DQO, porém, esses valores se normalizam quando o efluente da indústria é despejado no corpo d'água no rio Atibaia, mostrando que o efluente não leva a qualquer alteração de DQO para as águas do corpo d'água receptor.

A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) é a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica, por meio de decomposição microbiana aeróbia, que leva à formação de um composto inorgânico estável (como água, gás carbônico, sulfatos, amônias, fosfatos, nitratos). Usualmente a DBO é tida como a quantidade de oxigênio consumida durante um determinado período de tempo numa temperatura de incubação específica, sendo que o padrão mais utilizado se refere a 5 dias numa temperatura de 20°C, conhecido como DBO_{5,20}. Aumentos na DBO dos rios indicam despejos de origem orgânica. Altos teores de matéria orgânica podem levar a um completo esgotamento de oxigênio na água, causando a

mortalidade de peixes e demais organismos aquáticos. Taxas elevadas de DBO podem ser indicadores de aumento da microflora, que resultam na interferência do equilíbrio da biota aquática e promovem sabor e odor desagradável para a água (CETESB, 2009). A resolução CONAMA (357/2005) estabelece limites de até 5 mg/L O₂ para águas superficiais de classe II e limites de até 10 mg/L O₂ para águas superficiais de classe IV. Já a resolução CONAMA 430/2011 designa para despejos de efluentes, remoção mínima de 60% de DBO.

Os resultados obtidos para a DBO mostram que a degradação dos compostos orgânicos presentes nas amostras estudadas é lenta, uma vez que os valores de degradação registrados foram baixos (Tabelas 2 e 3). O alto valor de DBO observado para o ponto 2 está relacionado com a grande quantidade de matéria orgânica do local, uma vez que essas águas são derivadas de coletas feitas no efluente bruto da refinaria. Contudo, nossos resultados mostraram que as taxas de DBO das águas dos efluentes da REPLAN (P2, P3 e P4) estão de acordo com a legislação vigente, uma vez que, quando são comparadas as taxas do efluente bruto com as do efluente lançado no corpo receptor, é possível observar que a indústria promoveu uma remoção de mais de 60% das taxas de DBO. Os altos índices observados para o ponto 4, durante a estação quente e chuvosa do ano de 2011, provavelmente, possa estar relacionado com o deslocamento de lodo do fundo da lagoa de estabilização ou devido a proliferação intensa de algas, ambos decorrentes das abundantes chuvas no período. No entanto, foi possível observar que as águas coletadas nos rios estudados (Jaguari, Atibaia e Piracicaba), também mostraram resultados de DBO acima dos valores estabelecidos pela legislação em diversos períodos.

De forma semelhante, Su et al. (2010), ao estudar o aporte de poluentes no rio Qiantang (China) e relacioná-los com suas possíveis fontes, avaliaram 41 pontos do rio mencionado no período de 2001 a 2004. Esses pontos foram classificados em três grupos distintos, denominados A, B e C. Tal agrupamento foi realizado de acordo com as características físico-químicas presentes na água, de forma a avaliar as quantidades e características do tipo de poluição encontrada para, posteriormente, relacioná-las à sua fonte poluidora. Em um dos grupos avaliados foi observada uma alta taxa de DBO, esse parâmetro quando aliado a outros, serviu como base para correlacionar essa alteração no ambiente com despejo de efluentes domésticos e contaminação agrícola.

Esses resultados corroboram nossas análises de impacto ambiental, que apresentam resultados significativos para a maior parte dos pontos avaliados em relação à DBO, sendo que a região estudada também é altamente influenciada pela atividade urbana e agrícola.

A DBO também é um parâmetro eficiente para indicar a eficiência do tratamento da refinaria. Augulyte et al. (2009) utilizaram a DBO como um dos parâmetros para determinar a eficiência da remoção de HPAs e carbonetos alifáticos de efluentes contaminados com produtos derivados do petróleo, por meio de um sistema de carbono ativado biologicamente, sendo que quanto menor o valor de DBO encontrado, maior a eficiência do tratamento, devido à degradação dos compostos oxidáveis presentes no efluente. No nosso estudo, foi possível observar, pelos valores de DBO, que houve uma remoção de mais de 60% dos contaminantes orgânicos do efluente bruto, durante o tratamento das águas servidas da refinaria.

Entre os efluentes industriais que mais contribuem para a adição de cloretos nos rios estão os de petróleo, produtos farmacêuticos e efluentes de curtumes. A legislação CONAMA 357/05 permite até 250 mg/L de cloreto total (Cl^-) para corpos d'água de classes II e IV, bem como para o efluente final. A água de captação da REPLAN (P1) apresentou valores de cloreto dentro da legislação vigente. Porém, os valores de cloreto aumentam nos efluentes da refinaria (P2, P3 e P4), mostrando que os tratamentos realizados pela empresa não estão sendo eficientes para a remoção do excesso de cloreto derivado do processo de refino do petróleo, para todos os períodos avaliados (exceto no período quente e chuvoso de 2010). Os valores observados nos efluentes são superiores ao estabelecidos pela resolução CONAMA. Contudo, pode-se observar que os pontos à montante e à jusante da descarga do efluente da refinaria não apresentaram valores significativamente diferentes entre si e nem acima do estabelecido pela legislação ambiental vigente (Tabelas 2 e 3), o que indica que o efluente lançado, apesar de apresentar valores acima do recomendado, não promoveu qualquer influência nos níveis de cloreto das águas dos pontos 6, 7 e 8.

Os recursos hídricos recebem nitrogênio de diversas fontes, sendo que as principais delas são derivadas de esgotos sanitários, seguido por indústrias químicas, petroquímicas, siderúrgicas, farmacêuticas, curtumes e também atividades agrícolas. O nitrogênio pode ser encontrado no ambiente sob a forma orgânica, amoniacal, nitrito e nitrato. As duas primeiras formas são reduzidas, e as demais, oxidadas. O tipo de nitrogênio encontrado está relacionado com a distância da fonte de poluição. Nos locais de autodepuração natural dos

rios, há a presença de nitrogênio orgânico na zona de degradação, amoniacal na zona de decomposição ativa, nitrito na zona de recuperação e nitrato na zona de águas limpas. Logo, a presença de formas reduzidas indica que a fonte de poluição está próxima, enquanto que a presença de formas oxidadas indica que essas fontes estão distantes. Pelo fato de ser um macronutriente importante para os processos biológicos, quando encontrados em grandes quantidades junto com demais nutrientes, acarreta no enriquecimento do meio, possibilitando a eutrofização (CETESB, 2009). De acordo com os padrões da Resolução CONAMA 430/11 sobre o despejo de efluentes, o limite para amônia é de 20 mg/L. Em relação aos rios de classe II, segundo a Resolução CONAMA 357/05, o limite para nitrogênio amoniacal total é de 3,7 mg/L para $\text{pH} \leq 7,5$ e 2,0 mg/L para $7,5 < \text{pH} \leq 8,0$, em rios classe IV é de 13,3 mg/L para $\text{pH} \leq 7,5$; 5,6 mg/L para $7,5 < \text{pH} \leq 8,0$; 2,2 mg/L para $8,0 < \text{pH} \leq 8,5$. Segundo a mesma Resolução, para todos os usos considerados, o valor limite para nitrito é de 1 mg/L e para nitrato é de até 10 mg/L. As análises realizadas nesse estudo mostraram que apenas o ponto 2 (efluente bruto) apresentou valores acima do recomendado, para alguns períodos dos anos de 2010 e 2011, para amônia e nitrato (Tabelas 2 e 3). Quanto aos resultados obtidos em relação ao nitrato, observamos que nenhum dos pontos apresentou valores acima do recomendado pelo CONAMA.

A Resolução CONAMA 357/05 estabelece valores de sulfeto para águas de Classe IV na ordem de 0,3 mg/L S e para a Classe II de 0,002 mg/L S, na Resolução CONAMA 430/11 esses valores estão na ordem de 1 mg/L S. Os sulfetos estão comumente associados à uma característica corrosiva e a um odor desagradável da água, podendo, em alto teor, ser tóxico para a macro e microbiota e também para os humanos. Verificamos que as águas do ponto 2 apresentaram valores elevados para esse parâmetro, para quase todas as análises realizadas (Tabelas 2 e 3), enquanto que as águas dos demais pontos estudados apresentaram valores dentro da normalidade, com exceção do ponto 1 durante o ano de 2011.

Os óleos e graxas são substâncias orgânicas oriundas de minerais, vegetais ou animais. Sua presença em águas naturais ocorre devido a despejos e resíduos industriais, esgotos domésticos, efluentes de oficinas mecânicas, postos de gasolina, estradas e vias públicas. Sua baixa solubilidade em água prejudica a sua degradação e a transferência de oxigênio entre a atmosfera e a água, pela diminuição da superfície de contato, o que leva a um prejuízo ao ecossistema aquático. Segundo a legislação, esses compostos devem estar virtualmente ausentes em águas de rios de classes II e em rios classe IV “toleram-se

iridescências”. A Resolução CONAMA 430/2011 estabelece um limite máximo de 20,0 mg/L de óleos minerais e de 50 mg/L de óleos vegetais e gorduras animais para a emissão de efluentes. Com relação ao efluente da REPLAN (P4), os índices de óleos e graxas estão dentro das normas para efluentes (Tabelas 2 e 3). As análises realizadas com as águas dos rios do entorno da REPLAN, antes e após a emissão do efluente da refinaria, mostraram a presença desses compostos em níveis superiores aos limites da legislação ambiental brasileira. Assim, como foi detectada a presença destes compostos a montante da emissão do efluente da refinaria, os índices observados para o ponto a jusante do descarte, provavelmente, não tem relação estrita com o efluente da refinaria.

Segundo a resolução CONAMA 357/05, o limite permitido de cianeto total para águas classe II é de 0,005 mg/L, para classe IV é de 0,022 mg/L e para efluentes é de 1 mg/L. Foi observado para o ponto 2 (efluente bruto sem tratamento) índices de cianeto acima do estabelecido pela legislação, para efluentes (Tabelas 2 e 3). No entanto, foi observado que após o tratamento do efluente, houve uma normalização dos valores de cianeto, pois o efluente apresentou índices dentro do padrão proposto pela legislação brasileira.

De acordo com Tarifeno-Silva et al. (1982), o cianeto está entre os elementos mais nocivos que podem se associar à biota. Além disso, tais elementos podem sofrer transformações químicas que os tornam ainda mais perigosos para os ecossistemas aquáticos (ESTEVES, 1998). O cianeto pode chegar a esses ambientes por meio de resíduos industriais, atividades de mineração, lixo urbano, emissão de gases combustíveis derivados de veículos automotores e por agroquímicos - como os compostos por piretróides, que contém cianeto em sua constituição (DUTRA et al., 2002; BRIX et al., 2000), além das fontes naturais. Esse composto inibe a respiração celular, sendo letal na faixa de 0,5 a 3,5 mg.Kg⁻¹ de massa corporal (IKEBUKURO; NAKAMURA; KARUBE, 2000). Além de exercer efeitos diretos nas células, promovendo a morte das mesmas, o cianeto também pode exercer um efeito indireto, por meio de alterações na dinâmica da respiração celular inibindo o aceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial (VOET; VOET; PRATT, 2001). Essa alteração pode originar espécies químicas capazes de reagir com biomoléculas e causar danos no DNA, exercendo importante influência em processos de mutagênese e carcinogênese (POULSEN; PRIEME; LOFT, 1998).

Apesar da potencialidade tóxica do cianeto, não foi observado resultados estatisticamente significativos em relação à genotoxicidade e mutagenicidade.

Os fenóis são substâncias tóxicas para humanos, organismos aquáticos e microorganismos. Sua presença em águas superficiais ocorre devido à emissão de efluentes industriais nos rios. De acordo com a resolução CONAMA, para águas de classe II, a concentração de fenóis totais (substâncias que reagem com 4-aminoantipirina) não deve exceder a 3 µg/L, para águas de classe IV, até 1,0 mg/L e para efluentes industriais, 0,5 mg/L. Verificamos em nossas análises que todas as amostras avaliadas estavam dentro das normas, com exceção dos pontos 4 e 5 (Tabelas 2 e 3).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC), o arsênio é considerado um agente carcinogênico para humano. A legislação ambiental brasileira estabeleceu valores de até 500 µg/L (CONAMA, resolução 430/11) para efluentes, 10 µg/L para rios classe II e 33 µg/L para classe IV (CONAMA 357/05). Como pode ser observado nas tabelas 2 e 3, os valores encontrados para esta substância estão dentro do permitido pela legislação.

O valor previsto na legislação CONAMA para o selênio é de 300 µg/L em efluentes, 10 µg/L em rios classe II e 50 µg/L em classe IV. Em nosso trabalho, foram registrados valores de selênio abaixo dos índices propostos pela legislação.

O mercúrio é altamente tóxico para o homem, sendo que doses a partir de 3g são letais (CETESB, 2009). As formas inorgânicas de mercúrio podem sofrer reações, quando em contato com a água, resultando em compostos orgânicos mais tóxicos que a forma inorgânica. Essas formas orgânicas do mercúrio são facilmente absorvidas por peixes e demais animais aquáticos, resultando em sua bioacumulação nos tecidos dos organismos vivos. A principal via de acesso do mercúrio aos humanos se dá pela ingestão de organismos contaminados (LOPES-POLEZA, 2004). A legislação CONAMA preconiza para águas de rios, um limite de 2 µg/L para esse metal em rios classe IV, 0,2 µg/L em classe II e 10 µg/L em efluentes industriais. Os resultados obtidos para as amostras coletadas nos rios Piracicaba e Atibaia e para o efluente da refinaria mostram que a concentração de mercúrio presente em suas águas está de acordo com o limite estabelecido na legislação, no entanto, não é possível afirmar se as concentrações observadas de mercúrio nas amostras coletas no rio Jaguari estão ou não em acordo com a legislação, uma vez que o equipamento utilizado para a análise não possui uma acurácia suficiente para identificar valores abaixo de 1 µg/L.

Tabela 2 - Análises físico-químicas das amostras coletadas nos pontos analisados neste estudo nos períodos referentes ao ano de 2010.

Parâmetro	P1			P2			P3			P4			P5			P6			P7			P8		
	Fev	Mai	Ago	Fev	Mai	Ago	Fev	Mai	Ago	Fev	Mai	Ago	Fev	Mai	Ago	Fev	Mai	Ago	Fev	Mai	Ago	Fev	Mai	Ago
pH	7,39	7,58	7,60	7,43	7,31	7,91	7,89	7,93	8,20	8,84	8,23	8,39	7,48	7,52	7,84	7,86	7,47	7,69	7,74	7,56	7,84	7,18	7,22	6,56
Cond. (uS/cm)	181,0*	81,3	107,7*	1750,0**	1529,0**	2740,0**	1350,0**	1394,0**	2780,0**	1200,0*	1486,0*	2800,0*	98,5	199,1*	295,0*	101,5*	209,0*	365,0*	100,1*	216,0*	347,0*	92,0	158,6*	278,3*
Temp. (°C)	25,0	21,0	20,0	37,0	31,0	30,0	35,0	28,0	30,0	30,0	25,0	24,0	25,0	21,0	20,0	25,0	21,0	20,0	25,0	21,0	20,0	25,4	20,4	20,1
Transp. (cm)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	10,0	55,0	60,0	10,0	55,0	60,0	...	...	...
S.S.S (g/L)	0,031	0,05	0,111	0,4100	0,541	2,023	0,237	0,419	1,837	0,258	0,452	2,056	0,036	0,086	0,227	0,062	0,087	0,305	0,062	0,100	0,208	...	...	...
M.V (mg/L)	0,171	0,100	0,111	0,060	0,086	2,023	0,055	0,080	1,837	0,037	0,058	2,056	0,026	0,040	0,227	0,215	0,153	0,305	0,171	0,100	0,208	...	...	...
M.F.R (g/L)	0,002	0,018	0,095	0,194	0,388	1,752	0,066	0,319	1,794	0,202	0,372	1,924	0,002	0,028	0,121	0,037	0,047	0,214	0,002	0,014	0,137	...	...	...
OD (mg/L)	4,75*	5,97	6,27	2,59	0,00**	0,60**	4,12	6,00	5,82	8,98	5,36	5,79	4,74	5,83	6,33	4,83	6,03	6,03	5,28	6,00	6,07	6,95	8,37	3,04
DQO (mg/L)	17,0	12,5	7,68	2040,0	800,0	1920,0	163,2	80,0	128,0	163,2	80,0	160,0	13,0	14,6	12,48	18,0	13,5	19,2	16,0	17,7	14,4	...	...	...
DBO5,20 (mg/O2/L)	14,9*	9,3*	7,0*	2024,0**	952,0**	1792,0**	71,2	11,4	30,7	72,3	20,3	30,3	11,2*	13,8*	11,4*	15,0*	13,3*	17,3*	13,9*	12,3*	12,5*	...	...	...
Cloretos (mg/L)	1,96	3,93	7,86	331,90**	270,44**	712,97**	282,73**	295,02**	762,14**	208,97*	307,32*	774,43*	2,95	13,77	20,65	2,95	13,77	38,35	5,90	13,77	33,43	...	...	...
Acidez CaCO ₃ (mg/L)	3,88	3,88	3,88	9,70	19,42	7,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,88	3,88	3,88	3,88	3,88	3,88	3,88	3,88	3,88	...	...	...
Alcalinidade (CO ₃)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	28,57	14,28	21,42	60,71	32,14	35,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	...	...	...
Alcalinidade (HCO ₃ ⁻)	25,00	32,14	33,92	205,35	232,14	314,28	189,28	189,28	226,78	141,07	183,92	207,14	28,57	32,14	48,21	30,35	32,14	48,21	32,14	35,71	44,64	...	...	...
Amônia (mg NH ₄ /L)	1,47	2,91	...	33,36**	23,18**	...	17,24	2,54	...	14,56	2,86	...	0,89	4,27	...	0,67	4,44	...	0,85	5,33	...	...	...	...
Nitrito (mg NO ₂ /L)	0,006	0,112	0,192	ND	ND	ND	0,100	0,035	ND	0,092	0,108	0,081	0,045	0,148	0,256	0,037	0,150	0,273	0,037	0,033	0,243	...	...	...
Nitrato (mg NO ₃ /L)	0,065	1,451	2,055	12,74**	8,338	9,443	1,317	2,718	6,221	1,258	2,108	5,279	0,065	1,922	2,201	ND	0,513	2,293	ND	1,972	2,226	...	...	...
Sulfetos (µg/L ⁻¹ S ²⁻)	2,0	2,0	1,0	230,0	420,0	750,0	2,0	5,0	9,0	...	3,00	7,00	1,0	1,0	1,0	2,0	5,0	1,0	4,0	7,0	4,0	...	...	...
Óleos e graxas (mg/L)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	3,4	1,2	1,2	0,1	0,7	1,0	...	...	...	0,2	0,2	0,8	...	...	...
Cianetos (mg/L)	0,002	0,001	<0,001	2,300*	4,200*	0,061	0,002	0,005	<0,001	ND	0,003	0,003	0,001	0,001	<0,001	0,002	0,005	0,009	0,004	0,007	<0,001	...	...	...
Fenóis (mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	...	...	...
Arsênio (µg/L)	<2	<2	<2	3	4	<2	<2	2	5	<2	2	3	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Selênio (µg/L)	<5	<5	<5	<5	39,0	45,0	<5	39,0	40,0	...	35,0	40,0	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Mercurio (µg/L)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	...	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota:

... (reticências) Dado desconhecido.

*Valor acima do previsto pela legislação.

**Valor acima do previsto pela legislação, no entanto o ponto não representa o efluente final.

ND: Valor não detectado pelo aparelho.

Tabela 3 - Análises físico-químicas das amostras coletadas nos pontos analisados neste estudo nos períodos referentes ao ano de 2011.

Parâmetro	P1			P2			P3			P4			P5			P6			P7			P8		
	Mar	Mai	Jul	Mar	Mai	Jul	Mar	Mai	Jul	Mar	Mai	Jul	Mar	Mai	Jul	Mar	Mai	Jul	Mar	Mai	Jul	Mar	Mai	Jul
pH	7,17	7,60	7,99	7,33	7,46	7,77	8,06	7,90	8,32	7,84	7,90	8,47	7,40	7,56	8,10	7,44	7,53	7,93	7,51	7,68	7,89	6,80	6,72	6,3
Cond. (uS/cm)	56,7	100,9*	110,6*	2380,0**	2400,0**	2430,0**	1740,0**	1960,0**	2440,0**	1930,0*	1770,0*	2630,0*	174,0*	256,5*	340,3*	181,0*	258,6*	348,7*	173,0*	257,5*	358,1*	76,7	179,3*	215,5*
Temp. (°C)	25	20	18	31	30	25	29	29	25	29	26	21	25	20	18	25	20	18	25	20	18	24,88	22,21	18,53
Transp. (cm)	...	...	...	...	...	75	...	...	...	...	...	...	10	75	...	10	75	75	10	75	75	...	...	...
S.S.S (g/L)	0,283	0,134	0,392	1,625	1,966	2,154	1,372	1,440	1,772	1,380	1,272	1,812	0,241	0,180	0,410	0,288	0,232	0,480	0,744	0,120	0,396	...	...	...
M.V (mg/L)	0,267	0,074	0,316	0,345	0,674	0,494	0,327	0,454	0,426	0,286	0,388	0,250	0,137	0,076	0,084	0,051	0,162	0,272	0,679	0,116	0,130	...	...	...
M.F.R (g/L)	0,016	0,06	0,08	1,28	1,292	1,66	1,045	0,986	1,346	1,094	0,884	1,562	0,104	0,104	0,326	0,237	0,07	0,208	0,065	0,004	0,266	...	...	...
OD (mg/L)	5,35	10,14	3,47*	2,83	5,34	2,68	1,50**	9,36	2,92	5,79	7,96	2,72	7,48	9,16	3,54	8,37	8,68	3,40	7,63	8,53	3,28	7,94	7,70	6,6
DQO (mg/L)	14,56	8,32	17,92	600,0	552,0	1408,0	120,0	110,4	140,8	120,0	128,8	105,0	12,48	9,36	22,4	16,64	11,44	29,12	24,96	11,44	29,12	...	...	...
DBO5,20 (mg/O2/L)	7,8*	6,5*	12,2*	200,0**	484,0**	1300,0**	52,7	31,2	33,3	53,4	32,3	28,0	11,6*	8,5	14,7*	10,7*	9,8	25,1*	8,7	10,0*	20,4*	...	...	...
Cloretos (mg/L)	2,95	5,9	7,87	700,68**	565,46**	540,87**	442,53**	467,12**	540,87**	516,29*	381,07*	614,63*	8,85	14,75	17,7	11,8	17,7	21,6	12,78	17,7	21,64	...	...	...
Acidez CaCO ₃ (mg/L)	1,94	3,88	3,88	0,00	9,70	5,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,88	3,88	3,88	1,94	3,88	3,88	3,88	3,88	3,88	...	...	...
Alcalinidade (CO ₃)	0,00	0,00	0,00	10,71	0,00	0,00	28,57	39,28	14,28	10,71	25,00	14,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	...	...	...
Alcalinidade (HCO ₃ ⁻)	21,43	26,78	30,35	305,36	310,71	253,57	158,93	166,07	275,0	189,29	171,42	257,14	39,29	33,92	42,85	39,29	35,71	44,64	35,71	35,71	39,28	...	...	...
Amônia (mg NH ₃ /L)	0,58	1,26	0,77	41,70**	37,15**	22,60**	0,59	0,69	2,88	0,90	1,50	3,22	1,17	2,24	1,95	1,05	2,51	2,12	1,06	2,53	2,21	...	...	...
Nitrito (mg NO ₂ /L)	0,010	0,129	0,164	ND	ND	0,0487	0,203	0,013	0,074	0,453	0,162	0,037	0,160	0,180	0,203	0,164	0,187	0,227	0,163	0,185	0,204	...	...	...
Nitrato (mg NO ₃ /L)	0,341	1,375	1,965	13,176*	13,384*	11,766*	2,443	3,51	3,711	2,476	2,584	3,504	1,088	1,467	2,173	1,088	1,505	2,187	1,092	1,517	2,201	...	...	...
Sulfetos (µg/L ⁻¹ S ²⁻)	9,0*	6,0*	10,0*	157,0**	370,0	290,0	9,0	8,0	15,00	7,0	10,0	28,00	4,0	5,0	25,00	4,0	15,0	22,00	9,0	8,0	21,00	...	...	...
Óleos e graxas (mg/L)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	0,20	1,80	2,30	0,40	2,20	3,70	...	...	...	0,70	1,00	1,10	...	...	...
Cianetos (mg/L)	0,001	0,002	<0,001	2,900**	4,750**	2,00**	0,004	0,001	0,001	0,002	0,004	0,001	0,004	0,003	<0,001	0,003	0,007	<0,001	0,004	0,005	<0,001	...	...	...
Fenóis (mg/L)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	2,490	ND	ND	3,960*	ND	ND	...	...	...	0,000	ND	ND	...	...	...
Arsênio (µg/L)	6,5	<2	3,3	17,4	11,3	9,6	7,1	6,1	14,5	8,9	5,5	9,1	7,3	<2	3,9	8,4	<2	2,5	6,5	<2	3,5	<2	<2	<2
Selênio (µg/L)	<5	<5	<5	42,8	50,7	11,4	9,3	17,6	16	11,1	12,4	11,8	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Mercurio (µg/L)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota:

... (reticências) Dado desconhecido.

*Valor acima do previsto pela legislação.

**Valor acima do previsto pela legislação, no entanto o ponto não representa o efluente final.

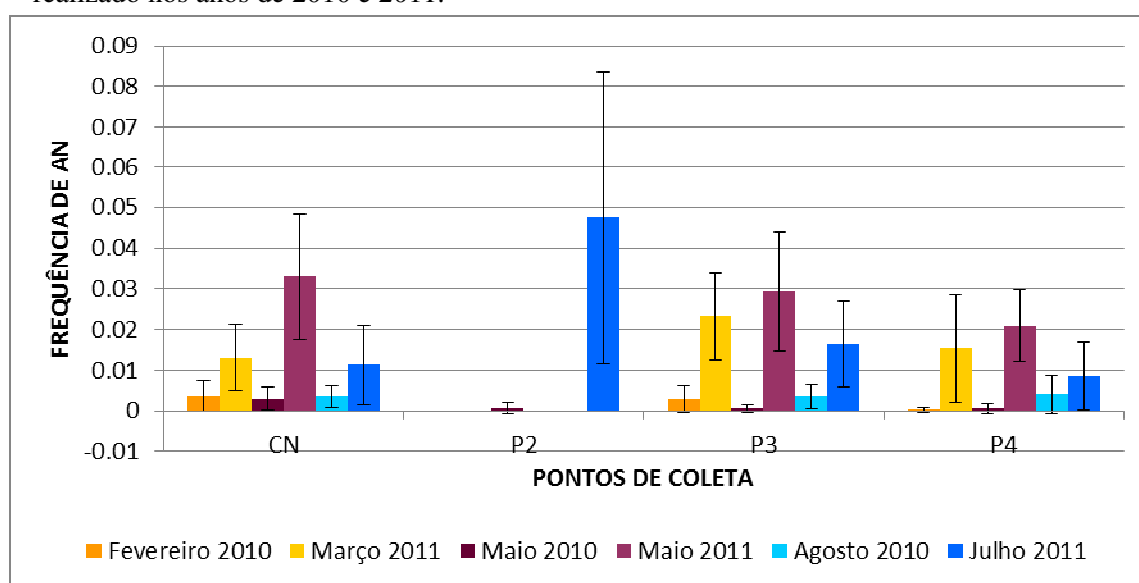
ND: Valor não detectado pelo aparelho.

4.2. Parâmetros ecotoxicológicos

4.2.1. Análise das águas tratadas pela refinaria

Verificamos, após a análise de genotoxicidade das águas dos pontos relacionados com o tratamento do efluente pela refinaria (2, 3 e 4), que os compostos presentes nessas amostras, em todos os períodos estudados dos anos de 2010 e 2011, não foram capazes de promover anormalidades nucleares (AN) nos eritrócitos de sangue periférico de *O. niloticus* (Figura 4).

Figura 4 - Frequência da média de AN em relação ao tratamento do efluente industrial realizado nos anos de 2010 e 2011.



Fonte: Elaborado pela autora.

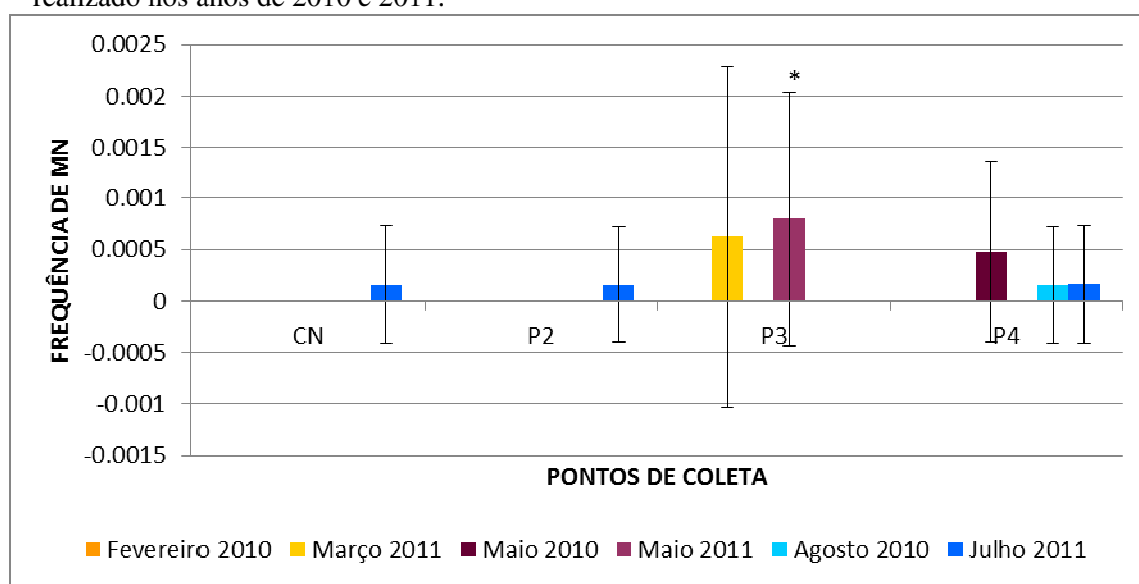
*estatisticamente significativo $p < 0,05$ (Mann-Whitney).

Apesar de não ter sido observado um índice de genotoxicidade significativo para todos os pontos relacionados ao tratamento do efluente pela refinaria, é possível verificar que a indução de alterações nucleares diminui ao longo dos tratamentos (Figura 4). Esses resultados mostram que as águas residuárias do processo de refino melhoram a sua qualidade ao passar pelos tratamentos da REPLAN, uma vez que as águas lançadas pela refinaria no rio Atibaia apresentam características bastante semelhantes, em vários aspectos, com as águas de captação no rio Jaguari.

Quando observada a atividade mutagênica das amostras coletadas nos períodos de 2011, para os pontos relacionados à utilização e tratamento das águas pela refinaria, apenas a amostra do P3, em maio de 2011, apresentou resultados estatisticamente

significativos (Figura 5). Esse ponto está relacionado com as águas do efluente bruto que passaram apenas pelo tratamento físico-químico, o que parece ter minimizado os efeitos dos compostos, uma vez que os organismos sobreviveram à exposição, diferentemente do P2 (efluente bruto), onde a taxa de mortalidade foi de 100%. No entanto, verificamos que após o processo completo de tratamento do efluente pela refinaria não foi verificada qualquer potencialidade mutagênica das águas para esse ponto ou para qualquer período estudado (Figura 5).

Figura 5 - Frequência da média de MN em relação ao tratamento do efluente industrial realizado nos anos de 2010 e 2011.



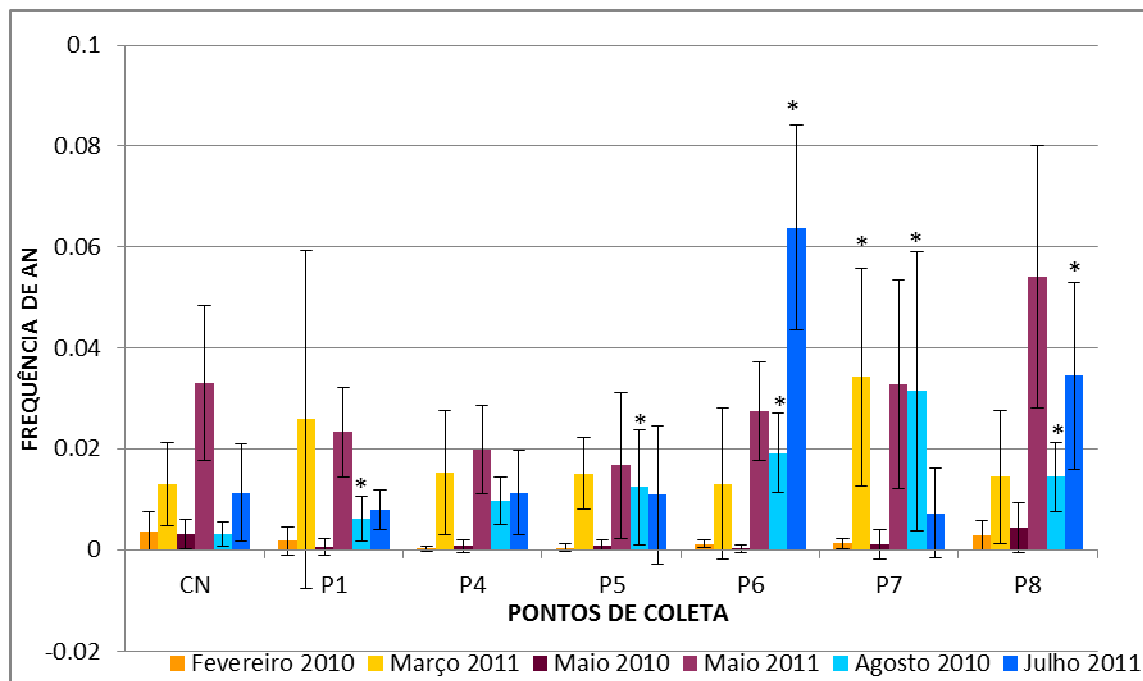
Fonte: Elaborado pela autora.

*estatisticamente significativo $p < 0,05$ (Mann-Whitney).

4.2.2. Análise das águas do entorno da refinaria

Quando avaliado o impacto ambiental das águas no entorno da refinaria (P1, P5, P6, P7 e P8), por meio do possível potencial genotóxico das amostras coletadas, verificou-se que as águas do ponto 1, 5, 6, 7 e 8, no período de agosto de 2010, induziram a formação significativa de anormalidades nucleares (Figura 6).

Figura 6 - Frequência da média de AN em relação ao impacto ambiental realizado nos anos de 2010 e 2011.



Fonte: Elaborado pela autora.

*estatisticamente significativo $p < 0,05$ (Mann-Whitney).

Esse resultado indica que as águas do rio Jaguari (captação da empresa) e do rio Atibaia (montante e jusante do despejo do efluente da empresa) possuem contaminantes. Uma explicação plausível para esse resultado pode estar relacionada à taxa de pluviosidade nesta época do ano. Como pode ser visto na tabela 4, durante todo o mês de agosto de 2010 não houve precipitação, o que provavelmente acarretou em uma baixa diluição dos contaminantes presentes nos corpos hídricos e, portanto, alta concentração de poluentes. No entanto, é importante salientar que as águas do efluente da refinaria descartadas no rio Atibaia (P4) não apresentaram potencial genotóxico. Todos os resultados de genotoxicidade estão, provavelmente, relacionados com outras fontes emissoras de poluentes do que a refinaria.

Tabela 4 - Média de temperatura, umidade relativa e pluviosidade dos períodos avaliados nos anos de 2010 e 2011.

Período	Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)	Pluviosidade (mm)
Fevereiro/2010	26,03	80,21	6,55
Maio/2010	19,54	79,00	0,56
Agosto/2010	19,07	62,56	0,00
Março/2011	22,48	81,97	6,56
Maio/2011	17,54	76,00	0,35
Julho/2011	17,76	70,00	0,05

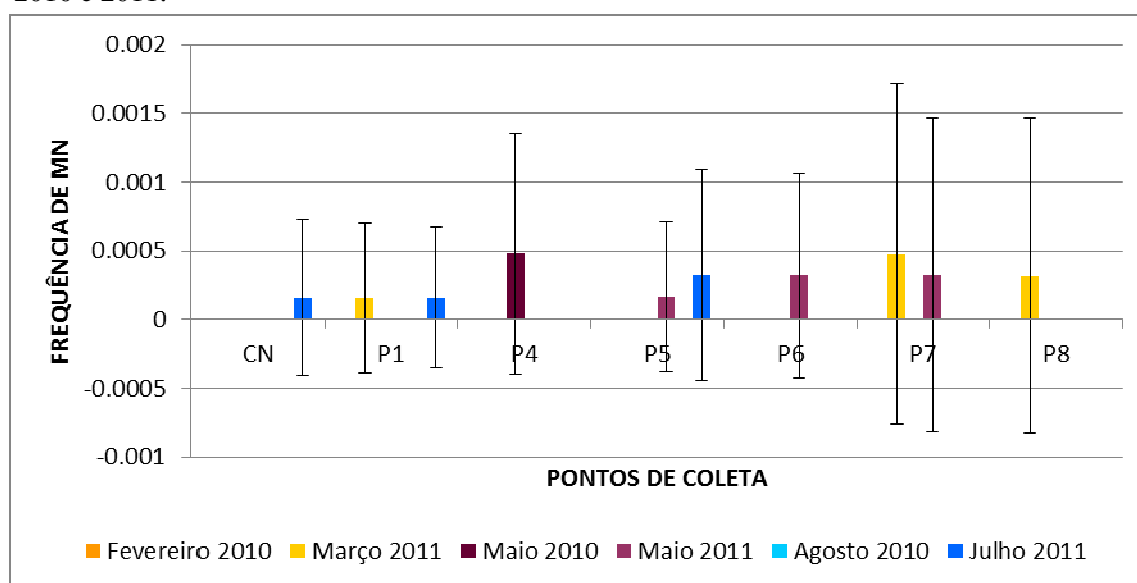
Fonte: Elaborado pela autora.

Dados fornecidos pelo Centro de Análise e Planejamento Ambiental (CEAPLA) localizado no Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE) da UNESP - Câmpus de Rio Claro.

No ano de 2011, conforme observamos na figura 7, o descarte do efluente (P4), as águas a montante (P5) e as águas a jusante (800m do descarte) da REPLAN (P7) apresentaram, para o mês de julho, valores baixos de indução de AN. No entanto, P6 demonstra um alto índice de anormalidades nucleares estatisticamente significativo, o que pode ser relacionado a possíveis descartes de efluentes clandestinos entre os pontos de coleta a montante (P5) e de despejo do efluente (P6).

Em relação à mutagenicidade, nenhum dos resultados foi estatisticamente significativo, indicando que as alterações mencionadas anteriormente não estão se perpetuando nas células (Figura 7).

Figura 7 - Frequência da média de MN em relação ao impacto ambiental realizado nos anos de 2010 e 2011.

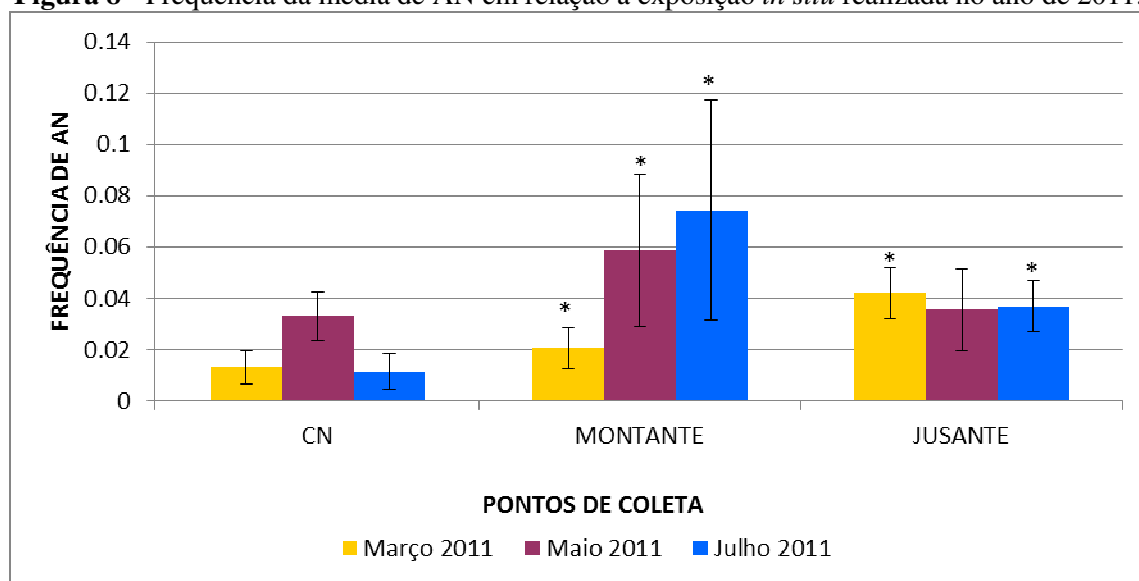


Fonte: Elaborado pela autora.

*estatisticamente significativo $p < 0,05$ (Mann-Whitney).

A avaliação de genotoxicidade *in situ* foi realizada apenas para o ano de 2011. Neste período foram observados resultados estatisticamente significativos quanto a indução de anormalidade nucleares (AN) a montante do descarte da refinaria, para todos os períodos avaliados (Figura 8). Ao observar a figura 8, verificamos que as águas já apresentam potencial genotóxico antes do despejo da refinaria e que, apesar desse potencial persistir após o descarte do efluente, as frequências de anormalidades nucleares observadas diminuem em dois dos três períodos estudados.

Figura 8 - Frequência da média de AN em relação à exposição *in situ* realizada no ano de 2011.

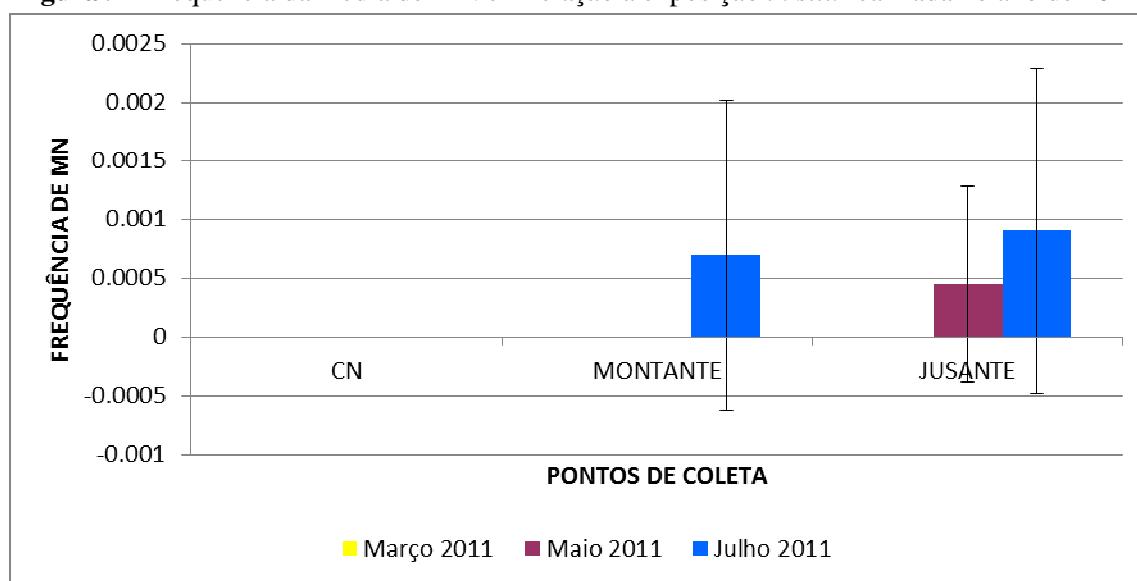


Fonte: Elaborado pela autora.

*estatisticamente significativo $p < 0,05$ (Mann-Whitney).

Quando avaliado o potencial mutagênico das amostras de águas coletadas no ano de 2011, para o ensaio *in situ*, observou-se que nenhum dos pontos apresentou indução significativa para a formação de micronúcleos nas células dos peixes expostos (Figura 9).

Figura 9 - Frequência da média de MN em relação à exposição *in situ* realizada no ano de 2011.



Fonte: Elaborado pela autora.

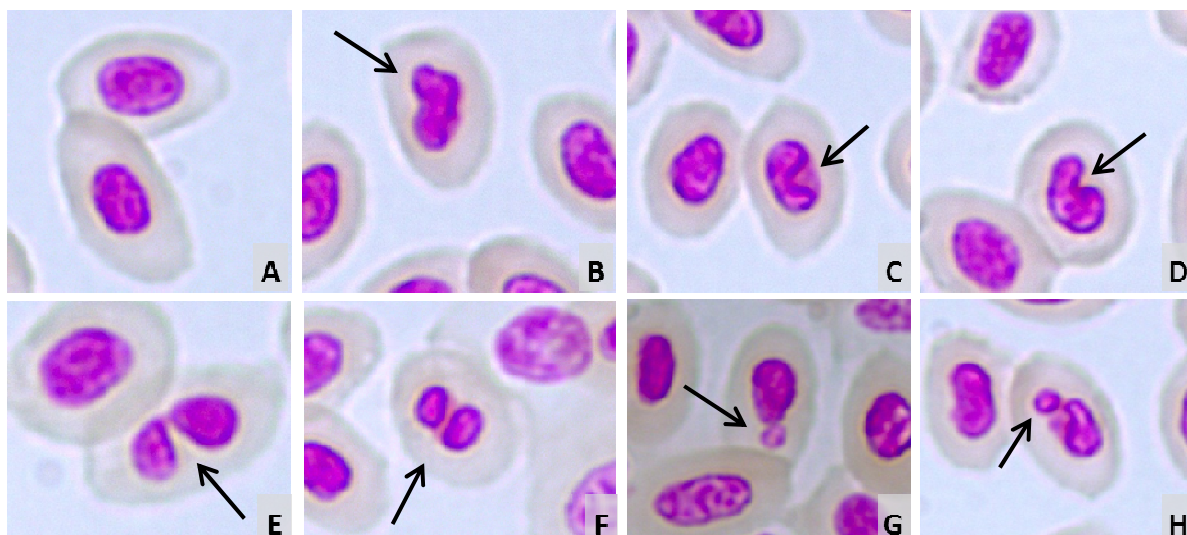
*estatisticamente significativo $p < 0,05$ (Mann-Whitney).

De maneira geral, podemos sugerir que as águas sob influência da refinaria não promovem danos permanentes no DNA, ou seja, não possuem potencial mutagênico. No entanto, em muitos casos foi observada a indução de anormalidades nucleares nas células eritrocitárias do organismo teste. Estudos recentes têm levado em consideração esse tipo de alteração como um parâmetro importante para avaliação de impacto ambiental promovido por atividade antrópica, principalmente relacionado a despejos industriais (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; DANELLAKIS et al., 2011). No entanto, alguns autores afirmam que esse parâmetro é pouco sensível (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990; CAVALCANTE; MARTINEZ; SOFIA, 2008; OMAR et al, 2012) e que os processos que envolvem a formação dessas anormalidade não são completamente compreendidos (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001; FENECH; CROTT, 2002; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). Portanto, ainda é muito discutido se essas alterações estão, realmente, relacionadas com a presença ou atividade de poluentes em corpos d'água (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

As anormalidades observadas em nosso estudo estão relacionadas com modificações morfológicas no núcleo das células de eritrócitos de sangue periférico de peixes da espécie *O. niloticus*. Os núcleos dos eritrócitos desses vertebrados aquáticos possuem uma forma elíptica característica (TAVARES et al., 1999), que aparece alterada, pela presença de núcleos deformados que exibem, principalmente, brotos, evaginações,

invaginações, descolamento da cromatina periféricamente disposta na membrana nuclear e células binucleadas (Figura 10).

Figura 10. Fotos de alterações nucleares em *O. niloticus*.



A. Células normais; **B.** Evaginação; **C.** Núcleo com descolamento periférico de cromatina; **D e E.** Invaginação; **F.** Célula binucleada; **G.** Broto nuclear; **H.** Micronúcleo

Segundo Tolbert, Shy e Allen (1992), Shimizu et al. (1998) e Shimizu, Shimura e Tanaka (2000), brotos e evaginações são anormalidades que podem estar relacionadas com problemas de segregação de cromossomos aderidos entre si ou com amplificações gênicas decorrentes de um ciclo de pontes derivadas de quebra-fusão, que leva a eliminação do material excedente do núcleo. Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007) sugerem que amplificações do material genético derivado de poliploidização também podem levar a formação de brotos nucleares, que acabam por eliminar o material genético excedente, restabelecendo o conteúdo genético normal do núcleo.

De acordo com Ventura, Angelis e Marin-Morales (2008), células binucleadas são originadas a partir de problemas na polimerização das tubulinas que participam do processo de citocinese. Dessa forma, embora os cromossomos sejam segregados para as periferias da célula, não ocorre a separação desse material em duas células filhas.

Embora existam algumas explicações para os eventos relacionados com a formação de brotos, evaginações e células binucleadas, o mecanismo de formação de alterações morfológicas do tipo invaginações ainda não foi descrito.

Após análise de diversos estudos sobre a estrutura, cinética e modificações morfológicas da membrana nuclear, acreditamos que exista a possibilidade de que agentes químicos possam interferir na estrutura protéica da lâmina nuclear e promover a formação tanto de evaginações como invaginações. A estrutura da lâmina nuclear é caracterizada como uma camada protéica situada entre a cromatina e a parte interna da membrana nuclear e composta principalmente por laminas (ALBERTS et al., 2004). Devido à sua posição na periferia nuclear, as laminas dão suporte ao envelope nuclear e fornecem sítios de ancoragem para a cromatina. Além disso, evidências sugerem que a lâmina nuclear está envolvida em processos como montagem do envoltório nuclear, síntese de DNA, transcrição e apoptose (GOLDMAN et al., 2002).

Em mamíferos, a formação das laminas se dá a partir de três genes: LMNA, LMNB1 e LMNB2, que dão origem a sete isoformas alternativamente arranjadas dessa estrutura, sendo que o gene LMNA codifica as laminas do tipo A (A, AΔ10, C e C2) (FISHER; CHAUDHARY; BLOBEL, 1986; McKEON; KIRSCHNER; CAPUT, 1986; FURUKAWA; INAGAKI; HOTTA, 1994; MACHIELS et al. 1996) e as do tipo B são codificadas pelos genes LMNB1 (B1) e LMNB2 (B2 e B3) (POLLARD et al. 1990; BIAMONTI et al., 1992; FURUKAWA; HOTTA, 1993; STUURMAN; SASSE; FISHER, 1996). Todas as células de vertebrados expressam ao menos um tipo de lamina B, enquanto que as laminas A, AΔ10, e C são reguladas conforme o desenvolvimento da célula e expressas essencialmente por células diferenciadas (ROBER; WEBER; OSBORN, 1989; MACHIELS et al. (1996); as laminas C2 e B3 são expressas somente em linhagens de células germinativas (FURUKAWA; HOTTA, 1993; FURUKAWA; INAGAKI; HOTTA, 1994; ALSHEIMER et al.1999), sugerindo uma função específica para essas estruturas de acordo com o tipo celular e do tecido envolvido (GOLDMAN et al., 2002).

Diversos estudos *in vitro* foram realizados com sistemas de montagem do núcleo, extraídos a partir de variados tipos celulares com o intuito de determinar a função das laminas na montagem do envoltório nuclear, incluindo as membranas e o complexo de poros nucleares. Em alguns experimentos, as laminas foram removidas de extratos livres de células que estavam prestes a iniciar a montagem nuclear *in vitro*. A partir de então, foi feito o constante monitoramento dos efeitos utilizando-se diversos marcadores de poro e de membrana. Algumas vezes, a imunoadsorção das laminas impediu a descondensação de cromossomos, reorganização do envoltório nuclear e a formação do poro nuclear (BURKE;

GERACE, 1986; ULITZUR; GRUENBAUM, 1989; DABAUVALLE et al., 1991; ULITZUR et al., 1992, 1997). Em outras pesquisas realizadas, essa remoção não impediu a estruturação do envoltório nuclear (NEWPORT; WILSON; DUNPHY, 1990; MEIER et al., 1991), mas este núcleo resultante era pequeno, frágil e com lâmina ausente. Esses resultados, embora conflitantes, podem ser explicados pelos diferentes protocolos de extração das proteínas utilizados em cada laboratório, que resulta em quantidades distintas de lamina residuais. Mesmo em pequena quantidade, esse material residual pode ser adequado para iniciar o processo de montagem do envoltório nuclear (JENKINS et al., 1993).

Em *Drosophila*, mutações na lamina Dm₀ causam severos danos na morfologia nuclear e no desenvolvimento desse inseto (GUILLEMIN; WILLIAMS; KRASNOW, 2001). De forma semelhante, o bloqueio na expressão de lamina a partir de RNAi em *C. elegans* resultou em diversas alterações no formato do núcleo, agrupamento dos poros nucleares e segregação incorreta dos cromossomos durante a mitose (LIU et al., 2000).

Durante o processo de divisão celular as membranas do núcleo são rapidamente desmontadas durante a transição prófase/metáfase em células de vertebrados, sendo remontadas após a mitose, processo regulado, respectivamente, pela fosforilação/desfosforilação das lamina (HEALD; McKEON, 1990).

A regulação das diversas estruturas de lamina que se formam durante o correto desenvolvimento do envoltório nuclear pode ser determinada pela associação das lamina a outras proteínas (COHEN et al., 2001). Na maioria dos casos, o papel dessas proteínas na estruturação do núcleo, bem como em outras funções dentro do mesmo, não é bem conhecida. Contudo, em experimentos com *Xenopus* pôde-se concluir que a adição de domínios ininterruptos de isoformas da proteína LAP2 a extratos celulares dessa espécie, antes do início da estruturação nuclear, deriva em anormalidades nucleares assinaladas por ondulações descontínuas na membrana que circunda a cromatina (GANT; HARRIS; WILSON, 1999). Além disso, a imunodepressão da proteína LBR na estruturação do núcleo de ouriço-do-mar impede a membrana interna do núcleo de se ligar à cromatina (COLLAS; COURVALIN; POCCIA, 1996). Dessa forma, se torna claro que, embora o papel dessas proteínas ainda não seja bem compreendido, sua interação com as lamina exercem importantes funções na montagem nuclear (GOLDMAN et al., 2002).

A observação de regiões de cromatina que se ligam à lâmina nuclear sugere que essas regiões de ancoragem organizam a cromatina na intérfase e, portanto, regulam as atividades de transcrição (MOIR; SPANN; GOLDMAN, 1995). O papel das laminas nos processos de replicação e transcrição também podem ser relacionadas à interação das laminas e das proteínas associadas à cromatina. Como exemplo, pode-se citar a associação de heterocromatina periférica à lâmina nuclear de diversas espécies, tanto de vertebrados quanto de invertebrados (FAWCETT, 1966; DESSEV; GOLDMAN, 1988; PADDY et al., 1990). Estudos *in vitro* também demonstram que as laminas podem se ligar diretamente à cromatina (TANIURA; GLASS; GERACE, 1995).

Diante do exposto, sugerimos que alterações como as invaginações/evaginações, que são caracterizadas por alterações no formato nuclear possam ser decorrentes de, entre outros processos já conhecidos, interferência de agentes químicos em processos como:

- Estrutura dos genes que codificam as laminas e as proteínas associadas, resultando em mutações que impedem a sua correta expressão ou por causarem a inativação desses genes.
- Montagem das laminas, após o processo de divisão celular, podendo perturbar tanto a estrutura laminar em si quanto os processos de fosforilação/desfosforilação.
- Ancoragem de proteínas, por meio de ligação a sítios específicos de conexão tanto com a cromatina quanto com demais proteínas que compõem a lâmina nuclear.
- Além disso, no presente trabalho, também foram observadas alterações caracterizadas por um correto formato oval do envoltório nuclear, porém com descontinuidades na ligação da cromatina com o limite da membrana interna, onde estão ancoradas as laminas. É possível que estas alterações sejam causadas por distúrbios semelhantes aos descritos acima, porém sem interferir no envoltório nuclear, resultando em interferências apenas no processo de ligação da cromatina com a lâmina nuclear.

É importante ressaltar que essas são suposições sobre possíveis mecanismos de formação das anormalidades nucleares, uma vez que não há trabalhos experimentais que comprovem a origem desses eventos. São ainda necessários estudos sobre avaliação de interferência na expressão destes genes relacionados com a integridade da ligação lamina/cromatina, para se esclarecer os efeitos reais que os poluentes possam induzir nas células, especificamente neste caso, no envoltório nuclear das células dos organismos expostos.

5. CONCLUSÃO

- A partir dos resultados obtidos por meio das análises físico-químicas, genotóxicas e mutagênicas, foi possível avaliar que as águas dos rios do entorno da refinaria de Paulínia são pouco afetadas pelos descartes da indústria, de forma direta. No entanto, por vezes, o efeito sinérgico entre as substâncias presentes nos efluentes da refinaria e as derivadas de outras atividades antrópicas da região resulta em anormalidades nucleares que ainda são passíveis de reparo;
- as águas do entorno da refinaria não possuem potencial mutagênico, mas podem ser consideradas potencialmente genotóxicas em alguns pontos e em determinada época do ano;
- as anormalidades nucleares que caracterizam genotoxicidade nas águas do entorno da refinaria de Paulínia são decorrentes, provavelmente, de substâncias que atuam na dinâmica do ciclo celular mitótico, na estrutura da lâmina nuclear e/ou na expressão dos genes envolvidos com as proteínas laminares;
- em relação ao tratamento dos efluentes realizado pela refinaria, parece que este tem sido eficiente, principalmente porque quando se compara os resultados do efluente bruto com os do efluente final, pode-se observar uma remoção de mais de 60% dos poluentes, além de efeitos biológicos minimizados no efluente tratado, em relação ao efluente bruto. As águas, após tratamento pela refinaria, não apresentaram qualquer potencialidade mutagênica ou genotóxica nos períodos estudados;
- para um maior esclarecimento sob os efeitos genéticos de possíveis poluentes presentes nos rios avaliados, seria indicada a realização de ensaios para avaliar se estes poluentes estão interferindo na expressão de alguns genes, principalmente os envolvidos com a integridade do envoltório nuclear.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. NBR 9898: **Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores**. Rio de Janeiro, 1987.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**, 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- AL-SABTI, K. Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio L.*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 85C, p.5-9, 1986.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 343, p. 121-135, 1995.
- ALSHEIMER, M.; von GLASENAPP, E.; HOCK, R.; BENAVENTE, R. Architecture of the nuclear periphery of rat pachytene spermatocytes: distribution of nuclear envelope proteins in relation to synaptonemal complex attachment sites. **Molecular biology of the cell**, Bethesda, v. 10, n. 4, p. 1235-1245, 1999.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19 ed. Washington, 1995, p. 9–125.
- ANKLEY, G.T.; ERICKSON, R.J.; PHIPPS, G.L.; MATTSON, V.R.; KOSIAN, P.A.; SHEEDY, B.R.; COX, J.S. Effects of light intensity on the phototoxicity of fluoranthene to a benthic macroinvertebrate. **Environmental science & technology**, v. 29, p. 2828–2833, 1995.
- ANSARI, R.A.; KAUR, M.; AHMAD, F.; RAHMAN, S.; RASHID, H.; ISLAM, F.; RAISUDDIN, S. Genotoxic and Oxidative Stress-inducing Effects of Deltamethrin in the Erythrocytes of a Freshwater Biomarker Fish Species, *Channa punctata* Bloch. **Environmental Toxicology**, New York, v. 24, p. 429–436, 2008.
- ARFSTEN, D.P.; SCHAEFFER, D.J.; MULVENY, D.C. The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 33, p. 1–24, 1996.
- ARKHIPCHUK, V.V.; 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.
- AUGULYTE, L.; KLIAUGAITE, D.; RACYS, V.; JANKUNAITE, D.; ZALIAUSKIENE, D.; BERGQVIST, P.A.; ANDERSSON, P.L. Multivariate analysis of a biologically activated carbon (BAC) system and its efficiency for removing PAHs and aliphatic hydrocarbons from wastewater polluted with petroleum products. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 170, n. 1, p. 103-110, out. 2009.

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, n. 2, p. 177-86, maio. 2000.

BARŠIENĖ, J.; LOVEJOY, D.B. Environmental genotoxicity in Klaipėda port area. **International Review of Hydrobiology**, Berlin, v. 85, p. 663–672, nov. 2000.

BELFIORE, N.M.; ANDERSON, S.L. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: A review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 489, p. 97-122, 2001.

BENINCÁ, C.; RAMSDORF, W.; VICARI, T.; RIBEIRO, C.A.O., ALMEIDA, M.I.; ASSIS, H.C.S.; CESTARI, M.M. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in estuarine lakes at Santa Catarina coast-southern of Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, Dordrecht, v. 184, n. 4, p. 2045-56, abr. 2012.

BIAMONTI, G.; GIACCA, M.; PERINI, G.; CONTREAS, G.; ZENTILIN, L.; WEIGHARDT, F.; RIVA, S. The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. **Molecular and cellular biology**, Washington, v. 12, n. 8, p. 3499-3506, 1992.

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 Nakiubo wetland along Lake Victoria. **Physics and Chemistry of the Earth**, Oxford, v. 32, p. 1350-1358, 2007.

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

BOMBAIL, V.; 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. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA); **Resolução nº 357**, Brasília, DF, 15 mar. 2005.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA); **Resolução nº 357**, Brasília, DF, 13 mai. 2011.

BROWN, K. W.; DONNELLY, K. C. Mutagenic activity of runoff and leachate water from hazardous waste land treatment. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological**, London, v. 35, n. 3, p. 229-246, jan. 1984.

BRIX, K.V.; CARDWELL, R.D.; HENDERSON, D.G.; MARSDEN, A.R. Site-specific marine water-quality criterion for cyanide. **Environmental toxicology and chemistry**, New York, Pensacola, v. 19, n. 9, p. 2323-2327, 2000.

BURKE, B.; GERACE, L. A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. **Cell**, v. 44, p. 639–652, 1986.

BUSCHINI, A.; CARBONI, P.; MARTINO, A.; POLI, P.; ROSSI, C. Effects of temperature on baseline and genotoxicant induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 537, p. 81–92, 2003.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronuclei test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian journal of fisheries and aquatic sciences**, Ottawa, v. 47, p. 2123–2136, 1990.

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation research**, Amsterdam, v. 655, n. 1-2, p. 41-6, 2008.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nuclear organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 538, p. 87-91, 2003.

CAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic toxicology**, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 264-71, set. 2005.

CBH-PCJ. Plano de bacia hidrográfica 2000-2003: relatório final - fase 3. Piracicaba: Coplaenge/FEHIDRO. 2001. 240p.

CBH-PCJ (COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS PIRACICABA, CAPIVARI E JUNDIAÍ). **Bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí: Relatório da situação dos recursos hídricos – Ano Base 2010**, FEHIDRO/PCJ/CBJ-PCJ, 2011.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente. 1999. Série relatórios.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**. 2003. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente. Série relatórios.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**: significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem. 2009. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente. Série relatórios.

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

COHEN, M.; LEE, K.K.; WILSON, K.L.; GRUENBAUM, Y. Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 26, p. 41–47, 2001.

COLLAS, P.; COURVALIN, J.C.; POCCIA, D. Targeting of membranes to sea urchin sperm chromatin is mediated by a lamin B receptor-like integral membrane protein. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 135, p. 1715–1725, 1996.

CONNEY, A.H. Introduction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. **Cancer Research**, Baltimore, v. 42, p. 4875–4917, 1982.

DABAUVALLE, M.C.; LOOS, K.; MERKERT, H.; SCHEER, U. Spontaneous assembly of pore complex-containing membranes (“annulate lamellae”) in *Xenopus* egg extract in the absence of chromatin. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 112, p. 1073–1082, 1991.

DANELAKIS, D.; NTAIKOU, I.; KORNAROS, M.; DAILIANIS, S. Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic toxicology**, Amsterdam, v. 101, p. 358–366, 2011.

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

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.

DEL GRANDE, M.; REZENDE, M.O.O.; ROCHA, O. Distribuição de compostos organoclorados nas águas e sedimentos da bacia do rio Piracicaba – Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 678–686, 2003.

DESSEV, G.; GOLDMAN, R. Meiotic breakdown of nuclear envelope in oocytes of *Spisula solidissima* involves phosphorylation and release of nuclear lamin. **Developmental Biology**, San Diego, v. 130, p. 543–550, 1988.

DOLCETTI, L.; VENIER, P. Susceptibility to genetic damage and cell types in Mediterranean mussels. **Marine environmental research**, Barking, v. 54, p. 487–491, 2002.

DUTRA, A.J.B.; SOBRAL, L.G.S.; LEMOS, F.A.; SANTOS, F.H.S. O processo eletroquímico como alternativa para o tratamento de efluentes cianídricos. *Revista Escola de Minas*, Ouro Preto, v.55, n.4, p.267–272, out.-dez. 2002.

ERGENE, S.; ÇAVAŞ, T.; ÇELİK, A.; KÖLELİ, 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**, London, v. 16, n. 4, p. 385-91, maio. 2007.

ESTEVEES, F. A. 1998. **Fundamentos de limnologia**. 2ed. Interciência, Finep: Rio de Janeiro. 602p.

FAWCETT, D.W. On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. **American journal of anatomy**, Philadelphia, v. 119, p. 129–145, 1966.

FENECH, M., CROTT, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes- evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis- block micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 504, n. 1–2, p. 131–136, 2002.

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

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos do biossurfactante ramnolipídio e suas implicações quando usado na biorremediação de águas contaminadas por petróleo**. 2010. Tese (Doutorado Biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2010.

FERRARO, M.V.M.; FENOCCHIO, A.S.; MANTOVANI, M.; RIBEIRO, C.O.; CESTARI, M.M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirao Preto, v. 27, p. 103–107, 2004.

FISHER, D. Z.; CHAUDHARY, N.; BLOBEL, G. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 83, n. 17, p. 6450-6454, 1986.

FLEEGER, J.W.; CARMAN, K.R.; NISBET, R.M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **Science of the total environment**, Amsterdam, v. 317, n. 1–3, p. 207–233, 2003.

FURUKAWA, K.; HOTTA, Y. cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. **The EMBO journal**, v. 12, n. 1, p. 97–106. 1993.

FURUKAWA, K.; INAGAKI, H.; HOTTA, Y. Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. **Experimental cell research**, New York, v. 212, n. 2, p. 426–430, 1994.

GALINDO, T. P.; MOREIRA, L. M. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirao Preto, v. 32, 2, p. 394-398, 2009.

GANT, T.M.; HARRIS, C.A.; WILSON, K.L. Roles of LAP2 proteins in nuclear assembly and DNA replication: Truncated LAP2 beta proteins alter lamina assembly, envelope formation, nuclear size, and DNA replication efficiency in *Xenopus laevis* extracts. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 144, p. 1083–1096, 1999.

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 Environmental**, Rio Claro, v. 3, n. 2, p. 103-350, 2003.

GOLDMAN, R.D.; GRUENBAUM, Y., MOIR, R.D.; SHUMAKER, D.K.; SPANN, T.P. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. **Genes & development**, Cold Spring Harbor, v. 16, n. 5, p. 533-547, 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, n. 1, p. 235-239, mar. 2000.

GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 518, p. 145–150, 2002.

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

GRISOLIA, C.K.; BILICH, M.R.; FORMIGLI, L.M. A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 59, p. 123–126, 2004.

GUILHERME, S.; VÁLEGA, M.; PEREIRA, M.E.; SANTOS, M.A.; PACHECO, M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 70, p. 411–421, 2008.

GUILLEMIN, K.; WILLIAMS, T.; KRASNOW, M.A. A nuclear lamin is required for cytoplasmic organization and egg polarity in *Drosophila*. **Nature cell biology**, London, v. 3, p. 848–851, 2001.

HEALD, R.; McKEON, F. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. **Cell**, v. 61, p. 579–589, 1990.

HILL, I.R. Aquatic organisms and pyrethroids. **Pesticide science**, v. 27, p. 429–465, 1989.

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

HOSE, J. E.; CROSS, J.; SMITH, S. G.; DICHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off 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.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. **Arsenic and arsenic compounds**. Monographs on the Evaluations of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 23: Some Metals and Metallic Compounds. Lyon, p. 39–141, 1980.

IKEBUKURO, K; NAKAMURA, H; KARUBE, I. **Handbook of Water Analysis: Cyanides**. Cap. 19, p.367-385, New York: Marcel Dekker, 2000.

JENKINS, H.; HOLMAN, T.; LYON, C.; LANE, B.; STICK, R.; HUTCHISON, C. Nuclei that lack a lamina accumulate karyophilic proteins and assemble a nuclear matrix. **Journal of cell science**, London, v. 106, p. 275–285, 1993.

JHA, A.N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: An overview. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 552, p. 1–17, 2004.

JHA, A.N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, p. 207–221, 2008.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; SAHAPHONG, S.; KANGWANRANGSAN, N.; ZAKARIA, S. The protective influence of ascorbic acid against the genotoxicity of waterborne lead exposure in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of fish biology**, London, v. 73, p. 355–366, 2008.

KAWAMURA K.; SUZUKI I.; FUJII Y.; WANATABE O. Ice core record of polycyclic aromatic hydrocarbons over past 400 years. **Naturwissenschaften**, v. 81, p. 502-505, 1994.

KLAASSEN, C.D.; DOULL, J.; AMDUR, M.O. **Casarett and Doull's Toxicology – the basic science of poisons**. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 1996.

KLEMMZ, C. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes *Ancistrus sp.* (Cascudo)**. 2002. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

KLIGERMAN, A.D. Fishes as a biological detector of the effects of genotoxic agents. **Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology**. Academic Press, New York, p. 435–453, 1982.

KOHLPOTH, M.; RUSCHE, B.; NÜSSE, M. Flow cytometric measurement of micronuclei induced in a permanent fish cell line as a possible screening test for the genotoxicity of industrial waste waters. **Mutagenesis**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 397–402, 1999.

LANDRUM, P.F.; GIESY, J.P.; ORIS, J.T.; ALLRED, P.M. The photo-induced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to aquatic organisms. **Oil in fresh water: chemistry, biology, technology**, New York, p. 304–318, 1986.

LIU, J.; BEN-SHAHAR, T.R.; RIEMER, D.; TREININ, M.; SPANN, P.; WEBER, K.; FIRE, A.; GRUENBAUM, Y. Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. **Molecular biology of the cell**, Bethesda, v. 11, p. 3937–3947, 2000.

LOPES-POLEZA, S. C. G.; CESTARI, M. M.; FENOCCHIO, A. S. **Avaliação do efeito do metilmercúrio (CH₃Hg⁺) em *Hoplias malabaricus* através da frequência de Aberrações Cromossômicas e dos ensaios Cometa e Micronúcleo**. Dissertação. Universidade do Paraná, Curitiba, 2004.

MACHIELS, B. M., ZORENC, A. H., ENDERT, J. M., KUIJPERS, H. J., van EYS, G. J., RAMAEKERS, F. C., & BROERS, J. L. An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, n. 16, p. 9249–9253, 1996.

MARTINELLI, L.A.; VICTORIA, R.L.; FERRAZ, E.S.; CAMARGO, P.B.; MOREIRA, M.Z.; KRUSCHE, A.V.; MORAES, J.M.; BALLESTER, M.V.; LARA, L.L.S.; BERNARDES, M.C.; OMETTO, J.P.H.B.; CERRI, C.E. **Hydrology and water quality in the Piracicaba River basin, São Paulo State, Brazil**: Ecohydrology of South American Rivers and Wetlands. United Kingdom: McClain, M.E., 2002, p.159- 177.

MARTINS, C.C.; BÍCEGO, M.C.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R.C. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Antarctic Science**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 117–122, 2004.

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, p. 62, 1995.

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**, Ribeirao Preto, v. 29, p. 148–158, 2006.

McKEON, F.D.; KIRSCHNER, M.W.; CAPUT, D. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. **Nature**, v. 319, p. 463–468, 1986.

MEIER, J.; CAMPBELL, K.H.; FORD, C.C.; STICK, R.; HUTCHISON, C.J. The role of lamin LIII in nuclear assembly and DNA replication, in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. **Journal of cell science**, London, v. 98, p. 271–279, 1991.

MOIR, R.D.; SPANN, T.P.; GOLDMAN, R.D. The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. **International Review of Cytology**, New York, v. 162B, p. 141–182, 1995.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects**. Academies Press, Washington, 2003.

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

NETTO, A.D.P.; DIAS, J.C.M.; ARBILLA, G.; OLIVEIRA, L.F.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 765–773, 2000.

NEWPORT, J.W.; WILSON, K.L.; DUNPHY, W.G. A lamin- independent pathway for nuclear envelope assembly **Journal of Cell Biology**, New York, v. 111, p. 2247–2259, 1990.

OLIVERIA-FILHO, E.C.; GERALDINO, B.R.; GRISOLIA, C.K.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, New York, v. 75, p. 1185–1190, 2005.

OMAR, W.A.; ZAGHLOUL, K.H.; ABDEL-KHALEK, A.A.; ABO-HEGAB, S. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 746, n. 1, p. 7–14, jul. 2012.

ORIS, J.T.; GIESY, J.P.; ALLRED, P.M.; GRANT, D.F.; LANDRUM, P.F. Photoinduced toxicity of anthracene in aquatic organisms: an environmental perspective. **The biosphere: problems and solutions**, Amsterdam, v.25, p. 639–658, 1984.

ORIS, J.T.; GIESY, J.P. The photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to larvae of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Chemosphere**, Oxford, v. 16, p. 1395–1404, 1987.

PADDY, M.R.; BELMONT, A.S.; SAUMWEBER, H.; AGARD, D.A.; SEDAT, J.W. Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery. **Cell**, v. 62, p. 89–106, 1990.

PAGE, D.S.; BOEHM, P.D.; DOUGLAS, G.S.; BENCE, A.E.; BURNS, W.A.; MANKIEWICZ, P.J. Pyrogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in sediments record past human activity: A case study in Prince William Sound, Alaska. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 38, p. 247-266, 1999.

PALHARES, D.; GRISOLIA, C. K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 3, p. 281-284, 2002.

POLLARD, K. M.; CHAN, E. K.; GRANT, B. J.; SULLIVAN, K. F.; TAN, E. M.; GLASS, C. A. *In vitro* posttranslational modification of lamin B cloned from a human T-cell line. **Molecular and cellular biology**, Washington, v. 10, n. 5, p. 2164-2175, 1990.

PORTO, J.I.; ARAUJO, C.S.; FELDBERG, 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.

PORTO, L.C.S.; ETHUR, E.M. Elementos traço na água e em vísceras de peixes da Bacia Hidrográfica Butuí-Icamaquã, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 39, n. 9, dez. 2009.

POULSEN, H.E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 9-16, 1998.

RANK, J.; JENSEN, K.; JESPERSEN, P.H. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled in costal sites from Denmark. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 585, p. 33–42, 2005.

RIVERO, C.L.G.; BARBOSA, A.C.; FERREIRA, M.F.N.; GRISOLIA, J.C.K.; DOREA, G. Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). **Ecotoxicology**, v. 17, p. 732–737, 2008.

ROBER, R. A.; WEBER, K.; OSBORN, M. Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. **Development**, v. 105, n. 2, p. 365-378, 1989.

SCHLEGEL, R., MacGREGOR, J.T. The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 104, p. 367–369, 1982.

SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v. 38, n. 1, p. 38–45, 2001.

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

SHIMIZU, N.; SHIMURA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 448, n. 1, p. 81-90, 2000.

SHUGART, L.R. DNA damage as a biomarker of the exposure. **Ecotoxicology**, v. 9, p. 329–340, 2000.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. **Genética Toxicológica**, Porto Alegre, p. 167–178, 2003.

SISINNO, C.L.S.; NETTO, A.D.P.; REGO, E.C.P.; LIMA, G.S. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 671-676. 2003.

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.

STUURMAN, N.; SASSE, B.; FISHER, P A. Intermediate Filament Protein Polymerization: Molecular Analysis of *Drosophila* Nuclear Lamin Head-to-Tail Binding. **Journal of structural biology**, San Diego, v. 117, n. 1, p. 1-15, 1996.

SU, S.; ZHI A.J.; LOUB, L.; HUANGA, F.; CHENA, X.; WU, J. Spatio-temporal patterns and source apportionment of pollution in Qiantang River (China) using neural-based modeling and multivariate statistical techniques. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, Oxford, v. 36, n. 9-11, p. 379-386, jan. 2011.

TANIURA, H., GLASS, C., AND GERACE, L. A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 131, p. 33–44, 1995.

TARIFENO-SILVA, E.; KAWASAKI, L.; YU, D.P.; GORDON, M.S.; CHAPMAN, D.J. Aquacultural approaches to recycling dissolved nutrients in secondarily treated domestic waste waters: uptake of dissolved heavy metals by artificial food chains. **Water Research**, New York, v. 16, p. 59-65. 1982.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R. A.; GIOLI, L. D.; FAUSTINO, C. D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 423-431, 1999.

TOLBERT, P.E.; SHY, A.C.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear abnormalities in buccal smears: Methods development. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 271, n. 1, p. 69–77, 1992.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic toxicology**, Amsterdam, v. 79, n. 2, p. 201–4, ago. 2006.

ULITZUR, N.; GRUENBAUM, Y. Nuclear envelope assembly around sperm chromatin in cell-free preparations from *Drosophila* embryos. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 259, p. 113–116, 1989.

ULITZUR, N.; HAREL, A.; FEINSTEIN, N.; GRUENBAUM, Y. Lamin activity is essential for nuclear envelope assembly in a *Drosophila* embryo cell-free extract. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 119, p. 17–25, 1992.

ULITZUR, N.; HAREL, A.; GOLDBERG, M.; FEINSTEIN, N.; GRUEN-BAUM, Y. Nuclear membrane vesicle targeting to chromatin in a *Drosophila* embryo cell-free system. **Molecular biology of the cell**, Bethesda, v. 8, p. 1439–1448, 1997.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants, Proposed regulations, Federal Register, vol. 49, no. 209, USEPA, Washington, DC.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology**, New York, 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, n. 1, p. 42–51, jan. 2008.

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

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of Biochemistry**. 1 ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

WANIA F.; MACKAY D. Tracking the distribution of persistent organic pollutants. **Environmental science & technology**, v. 30, p. 390–396, 1996.

WARSHAWSKY, D. Polycyclic aromatic hydrocarbons in carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 107, p. 317–319, 1999.

WILD, S. R.; JONES, K. C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: A preliminary source inventory and budget. **Environmental Pollution**, Barking, v. 88, p. 91–108, 1995.

XUE, W.; WARSHAWSKY, D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. **Toxicology and applied pharmacology**, San Diego, v. 206, n. 1, p. 73-93, ago. 2005.

YUNKER, M.; BACKUS, S.; PANNATIER, E.; JEFFRIES, D.; MacDONALD, R. Sources and significance of alkane and PAH hydrocarbons in Canadian Arctic rivers. *Estuarine, Coastal and Shelf. Science*, v. 55, 1 – 31, 2002.