

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO POTENCIAL
CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DA
ÁGUA E DO SEDIMENTO DO RIO CORUMBATAÍ –
SÃO PAULO, BRASIL**

LIVIA LOUREIRO DE SOUZA

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

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO POTENCIAL
CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DA
ÁGUA E DO SEDIMENTO DO RIO CORUMBATAÍ –
SÃO PAULO, BRASIL**

LIVIA LOUREIRO DE SOUZA

Orientação: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales

Coorientação: Dra. Paula Suares Rocha

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

**Rio Claro - SP
2014**

Dedico este trabalho a todos que me deram apoio e incentivo para fazer sempre o melhor, especialmente:

Meus pais, Neide e José Roberto, que tornam a minha vida extremamente feliz, em todos os sentidos, e que nunca medem esforços para que eu possa realizar meus objetivos.

Minha avó, Maria Aurora, pelo carinho e amor em todos os momentos da minha vida.

Meu namorado, Rafael, pela constante atenção, compreensão e dedicação para me ajudar a realizar essa conquista.

Minhas amigas verdadeiras, pois me fazem ver que não estou sozinha neste caminho.

“... I could have been a dreamer
I could have been a shooting star
I could have been a dreamer
Cause dreams are what we are...”

(Ronnie James Dio)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela amizade, dedicação, apoio e pela orientação.

À minha coorientadora, Dra. Paula Suares Rocha, pelo constante apoio, dedicação e pela amizade durante a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À Refinaria de Paulínia (REPLAN) por prestar suporte financeiro ao Laboratório de Mutagênese Ambiental, onde foi desenvolvida a maior parte do trabalho.

À Profa. Dejanira Francheschi de Angelis, pelo apoio e auxílio ao trabalho e por ser um verdadeiro exemplo de pessoa.

Às químicas Luciana Polese e Mirtis Ariza Malagutti, do Laboratório de Estudo de Bacias (LEBAC) e ao em convênio com o UFZ - Helmholtz Centre for Environmental Research GmbH, Leipzig, Alemanha, pelas análises químicas.

Ao Centro de Análise de Planejamento Ambiental (CEAPLA) do Instituto de Geociências da UNESP de Rio Claro por fornecerem os dados climáticos necessários para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, à Dra. Bibiana Souza e ao técnico Samuel do CEIS, pelo auxílio durante os processos de liofilização das amostras.

Aos Profs. Dr. Niel C. Bols e Dra. Lucy Lee da Universidade de Waterloo do Canadá; Prof. Dr. Thomas Braunkbeck da Universidade de Heidelberg da Alemanha, Prof. Dr. Henner Hollert e Dr. Steffen Keiter da Universidade de Aachen, por cultivarem e fornecerem as culturas de células RTL-W1 que foram utilizadas nas análises realizadas neste trabalho.

À Dra. Thais Fernandes e Profa. Dra. Grasiela Severi Aguiar por prontamente aceitarem o convite de compor a banca de defesa deste trabalho.

A todo o pessoal do Departamento de Bioquímica, especialmente Eduardo, Dilza, Zito, Márcio (os dois!), Beto, Fátima e Carmen por sempre prestarem auxílio quando precisei e pelo ótimo humor de todos.

Às secretárias do Departamento de Biologia, Lucila, Cris e Mônica por sempre me ajudarem e pelas risadas.

Ao técnico Gerson por sempre me ajudar quando precisei e por espalhar muita alegria e glamour pelo Departamento de Biologia.

Ao técnico Anderson por sempre prestar auxílio quando necessário.

À técnica Roberta por sempre me ajudar, e também pelo grande carinho e amizade.

À Profa. Dra. Carmen Christofolletti e à Dra. Márcia Hoshina por terem composto a banca de qualificação deste trabalho.

Aos Profs. Dr. do Departamento de Biologia, Maria Izabel Camargo, Sanae Kasahara, Patrícia Maltempi, Karen Moraes, Diogo Cavalcanti, Amilton Ferreira e Flávio Caetano, pelo apoio, suporte e companheirismo no ambiente de trabalho.

A todo o pessoal do Departamento de Biologia, Cintya, Júlia, Janaína, Cleiton, Luiz, Bairral, Cris, Matraca, Allison, Daniela, Diovani, Thiago, Mão, Keteryne, Yadira, Jorge, Diogo, Emygdio, Viviane e Tamaris, por terem um ótimo humor e transformarem o ambiente de trabalho em um lugar mais gostoso de trabalhar.

Aos mutagênicos, Verônica, Nádia, Laís, Bruna, Márcia, Michele, Raquel, Maria Tereza, Franco, Leonardo, Matheus, Cris, Jaque pira, Jaque Bianchi, Dânia, Paula, Thaís, Yali e Carol, pela amizade, ajuda constante, risadas, confraternizações e pela alegria de ter vocês como companheiros de laboratório.

Agradeço especialmente aos amigos de laboratório, Paula, Cris, Nádia, Verônica, Raquel, Maria Tereza e Leonardo, que me ajudaram muito durante a execução dos meus experimentos, mesmo que fosse aos feriados ou finais de semana, eu não sei o que teria sido sem a ajuda de vocês.

À Cris, Paula, Raquel, meu pai, José Roberto e meu tio, Dito, por me ajudarem muito durante as coletas das amostras usadas neste trabalho, pois não é nada fácil.

Aos meus pais, Neide e José Roberto, por serem lindos e maravilhosos, por me darem todo e qualquer tipo de ajuda, apoio e suporte em tudo na minha vida, por me ouvirem, pelos conselhos e pelo amor, carinho e pela amizade! Amo vocês!

Ao meu namorado, Rafael, pelo amor, carinho, atenção, dedicação, pela compreensão e por às vezes até ter “trabalhado” junto comigo! Você deu um novo sentido à minha vida, te amo!

À minha avó, Maria Aurora, à minha tia, Maria Aurea e à minha prima, Rafaela, por sempre se interessarem pelo meu trabalho, por me ajudarem quando preciso e por me aconselhar, serei eternamente grata!

Aos meus amigos, Lídia, Natalia, Telma, Débora, Mariana, Gustavo, Marcos, Lilian e Fabi pelo bom humor e momentos de descontração, por sempre me apoiarem e acreditaram em mim!

Aos amigos da Pró-Vida por inúmeras razões, mas acima de tudo, pela amizade verdadeira e por sempre ajudar os amigos no momento em que eles mais precisam!

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos são os ambientes mais comprometidos pela poluição derivada de emissões de substâncias tóxicas presentes em efluentes industriais e domésticos e em resíduos agrícolas. Essa contaminação pode atingir tanto a água quanto os sedimentos dos ambientes aquáticos e induzir diversos efeitos adversos aos organismos vivos expostos. A bacia do rio Corumbataí, localizada no interior do estado de São Paulo (Brasil), apresenta grande importância econômica e ambiental para o estado. As águas deste rio sofrem diversos impactos ambientais caracterizados pelo descarte de efluentes urbanos e industriais das cidades localizadas próximas à sua margem, bem como da ação de atividades agrícolas, principalmente da cultura de cana-de-açúcar. Sendo assim, este rio recebe uma quantidade considerável de substâncias potencialmente tóxicas, que vêm comprometendo a qualidade de suas águas e de seus sedimentos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de amostras de águas e de sedimentos do rio Corumbataí – SP, em pontos situados entre as cidades de Rio Claro e Piracicaba. Foram realizadas duas coletas, uma na estação chuvosa e quente e outra na estação seca e fria, em quatro pontos distintos do rio: P1) à montante da cidade de Rio Claro; P2) à jusante da cidade de Rio Claro; P3) à jusante de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4) à montante da cidade de Piracicaba. As avaliações foram realizadas por meio de bioensaios desenvolvidos com os organismos testes *Allium cepa* e com cultura de hepatócitos de truta arco-íris da linhagem RTL-W1. Para os bioensaios realizados com *A. cepa*, foram realizados testes de índice mitótico (IM), de aberrações cromossômicas (AC) e de indução de micronúcleos (MN), em células meristemáticas e testes de indução de MN em células F1. Para os bioensaios realizados com cultura de células RTL-W1, foi realizado o teste de citotoxicidade, pela incorporação do vermelho neutro, e o teste do MN. Os resultados obtidos neste trabalho, com os dois bioindicadores testados, sugerem que as águas e os sedimentos do rio Corumbataí apresentam características genotóxicas e mutagênicas. Os resultados mais expressivos de toxicidade foram registrados para os pontos P2 e P3, localizados próximos às cidades de Rio Claro e Santa Gertrudes, respectivamente. Nossos resultados indicaram, ainda, que as amostras coletadas em P3 apresentam um maior comprometimento, resultados estes, provavelmente, relacionados ao recebimento de efluentes industriais, da cidade de Santa Gertrudes, que é considerada o maior polo cerâmico da América.

Palavras-chave: aberrações cromossômicas, micronúcleos, biomonitoramento ambiental, rio Corumbataí, efluentes urbanos, efluentes industriais, *Allium cepa*, cultura de células.

ABSTRACT

Aquatic ecosystems are the most affected by pollution from toxic waste emissions of industrial, domestic and agricultural effluents. This contamination may occur in both water and sediments of aquatic environments and induce many adverse effects to the living organisms. The Corumbataí river basin, located within the state of São Paulo (Brazil), has great economic and environmental importance to the state. The waters of this river suffer from various environmental impacts characterized by the disposal of municipal and industrial effluents from cities located close to its border. Thus, this river receives a considerable amount of potentially toxic substances. Due to its importance for public water supply in the region this study aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of water and sediments samples from this water resource, by means of bioassays. For this study, two sampling campaigns were performed, one in the warm and rainy season and the other in the cold and dry season. Samples were collected in Corumbataí River, in four different sites: P1) upstream the municipality of Rio Claro, P2) downstream the municipality of Rio Claro; P3) downstream the confluence of Corumbataí River and Ribeirão Claro; P4) upstream the municipality of Piracicaba. The evaluations were performed through bioassay with the *Allium cepa* test organisms and culture of hepatocytes from rainbow trout RTL - W1. According to obtained results in this work, it was possible to observe that water and sediments Corumbataí have genotoxic and mutagenic characteristics. The most significant results were recorded for the points P2 and P3, located near the cities of Rio Claro and Santa Gertrudes. Our results also indicated that samples collected at P3 were more affected, probably due to influence of discharges of industrial and domestic effluents from the city of St. Gertrudes, which is considered the largest ceramic hub of America.

Keywords: chromosomal aberrations, micronuclei, biomonitoring, Corumbataí, effluents, industrial effluents, *Allium cepa*, cell culture

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	08
2. OBJETIVOS.....	09
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3.1. Poluição ambiental.....	10
3.2. Contaminação das águas e dos sedimentos aquáticos.....	11
3.3. Mutagênese ambiental.....	13
3.4. Bioensaios.....	15
3.4.1. <i>Allium cepa</i>	16
3.4.2. Testes in vitro e cultura de células RTL-W1.....	17
3.4.3. Ensaio de incorporação do vermelho neutro.....	20
3.4.4. Teste do micronúcleo.....	20
3.5. Classificação das águas.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1. Materiais biológicos.....	25
4.2. Área de estudo e pontos de coleta.....	25
4.3. Coleta das amostras.....	26
4.3.1. Dados térmicos e pluviométricos das coletas.....	26
4.4. Preparo das amostras.....	26
4.4.1. Extração de fase sólida e eluição dos extratos de água.....	27
4.4.2. Preparação dos extratos de sedimentos.....	27
4.5. Análises físico-químicas e químicas.....	28
4.6. Ensaios.....	28
4.6.1. Ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em <i>Allium cepa</i>	29
4.6.2. Ensaios com células RTL- W1.....	30
4.6.2.1. Manutenção das culturas de células.....	30
4.6.2.2. Ensaio de incorporação do vermelho neutro.....	31
4.6.2.3. Teste do micronúcleo.....	32
5. RESULTADOS.....	34
ARTIGO I: Avaliação citotóxica, genotóxica e mutagênica da água e do sedimento do rio Corumbataí (região entre Rio Claro e Piracicaba), por meio do sistema teste de <i>Allium cepa</i>	35
ARTIGO II: Avaliação da mutagenicidade da água e do sedimento do rio Corumbataí (região entre Rio Claro e Piracicaba), por meio de ensaios realizados com células RTL-W1.....	73
6. CONCLUSÃO GERAL.....	113
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

1. INTRODUÇÃO

O estilo de vida das populações humanas vem sofrendo grandes alterações ao longo da história, como resposta das crescentes necessidades humanas, do avanço tecnológico e do desenvolvimento socioeconômico. Essas transformações, contudo, não afetam só a população humana, mas também o ambiente como um todo.

Os eventos como a Revolução Agrícola e a Revolução Industrial foram determinantes para a modificação do modo de vida da humanidade, tanto pela prática e desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de alimentos, como pelos processos de manipulação de matéria prima.

Apesar do grande avanço econômico e social vivenciado nas últimas décadas, decorrentes do uso das novas tecnologias, houve um correspondente agravamento da poluição, que vem interferindo diretamente nos ecossistemas naturais e conseqüentemente na biota endêmica do local contaminado. Dentre os ecossistemas afetados pela poluição, os mais comprometidos são os ecossistemas aquáticos, tanto por receberem descartes diretos, como por ser o destino final de todo poluente despejado nos diversos ambientes físicos. Como a água é o constituinte básico de todos os organismos, os ambientes aquáticos acabam também sendo responsáveis pela manutenção da vida no planeta. A água, por sua vez, também é de extrema importância para o desenvolvimento das mais diversas atividades humanas.

A depreciação dos ambientes aquáticos como os de água doce, que vem ocorrendo em escala mundial, tem gerado uma grande preocupação ambiental. No Brasil, muitas cidades crescem e se desenvolvem próximas aos recursos hídricos, pela facilidade de abastecimento das cidades. Porém, estes recursos hídricos também recebem efluentes contendo contaminantes decorrentes da própria urbanização destes locais.

Desta forma, é de especial importância que sejam avaliados o grau de comprometimento dos ambientes aquáticos, para se estimar os reais prejuízos que a poluição possa causar sobre as comunidades biológica e humana da região impactada e servir de alerta para as instituições ambientais, quanto ao comprometimento que nossos recursos hídricos veem sofrendo, em decorrência das intensas atividades humanas não adequadas.

2. OBJETIVOS

Considerando que existe uma potencialidade de contaminação dos cursos d'água e dos sedimentos da bacia do Corumbataí, cuja água serve para o abastecimento de várias cidades do interior do estado de São Paulo, este estudo teve como objetivo:

- Avaliar os possíveis contaminantes químicos presentes nas amostras de água e de sedimentos do rio Corumbataí por meio de análises químicas;
- Avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de amostras de águas e de sedimentos coletadas em pontos de possíveis impactos do rio Corumbataí, por meio de bioensaios de índices mitóticos, de aberrações cromossômicas e de indução de micronúcleo, antes e após período de recuperação, por 48 horas em água ultra pura, em células meristemáticas e F₁ do organismo teste *Allium cepa*;
- Concentrar o conjunto de possíveis contaminantes presentes neste recurso hídrico, por meio de extrações específicas, tanto de amostras de água (Extração de Fase Sólida), como de amostras de sedimentos (Extração Cetônica), coletadas em pontos de possíveis impactos do rio Corumbataí;
- Avaliar os efeitos citotóxicos dos extratos de amostras de sedimentos, coletadas em pontos de possíveis impactos do rio Corumbataí, por meio do Ensaio de Incorporação do Vermelho Neutro em células RTL-W1;
- Avaliar os efeitos mutagênicos dos extratos de amostras de água e do sedimento, coletadas em pontos de possíveis impactos do rio Corumbataí, por meio de bioensaios de indução de micronúcleos em células RTL-W1;
- Correlacionar os dados obtidos nas análises químicas com os resultados das análises biológicas, para estabelecer uma possível relação de causa e efeito dos contaminantes presentes nas amostras com os efeitos biológicos observados;
- Avaliar o efeito da sazonalidade nas amostras, por meio de coletas realizadas em duas estações climáticas distintas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Poluição ambiental

Atualmente as atividades humanas promovem diversos impactos no meio ambiente. Tais atividades incluem as industriais, as agrícolas e o intenso processo de urbanização, que são caracterizados, principalmente, pelo lançamento de efluentes industriais e domésticos, que podem contaminar o ar, a água e o solo (CHASIN; PEDROZO, 2003).

A contaminação ambiental pode ocorrer tanto em áreas rurais como em áreas urbanas; por disposições contínuas ou eventuais; por fontes localizadas ou por transportes a longas distâncias. Desta forma, os impactos podem promover severas alterações nos ecossistemas e danos graves aos organismos vivos, como por exemplo: acúmulo de poluentes orgânicos nos tecidos dos organismos de locais muito distantes da fonte poluidora, contaminação de corpos d'água superficiais e subterrâneos ou ainda contaminação de solos florestais por poluentes lançados nas regiões industrializadas (EUGRIS, 2013).

É importante salientar que a poluição ambiental pode ter diversas origens, como químicas, físicas ou biológicas. Assim, é de extrema importância se investir no desenvolvimento de estudos que avaliem os efeitos que a poluição pode causar sobre os ecossistemas (PEREIRA, 2004).

Segundo Viana (2010), os efeitos adversos que a poluição pode causar nos ecossistemas estão relacionados à: (1) Contaminação química; onde se deve considerar os aspectos toxicológicos da substância em questão e as suas possíveis interações com os organismos vivos expostos; (2) Contaminação biológica; que se caracteriza, geralmente, pela ação de organismos patogênicos, pragas ou vetores; (3) Perda de patrimônio genético dado pelo desaparecimento de espécies, caracterizada, em sua maioria, por extinções resultantes das atividades humanas como predação excessiva e lançamento de poluentes ao meio; (4) Degradação dos solos, por meio de exploração agrícola ou por contaminações diversas; (5) Alterações das características físico-químicas do meio aquático, que pode gerar mortalidade maciça dos organismos, ocasionando desequilíbrios nos recursos hídricos; (6) Lançamentos de poluentes na atmosfera, causando problemas de ordem respiratória em seres vivos; (7) Deposição excessiva de lixo em diversas regiões, contaminando solos/corpos d'água da região, além de atrair vetores de

doenças; (8) Contaminação por elementos com propriedades radioativas, que gera grande preocupação pelos efeitos danosos e persistentes em longo prazo.

3.2. Contaminação das águas e dos sedimentos aquáticos

Os ecossistemas aquáticos são os que mais sofrem os impactos das ações humana, pois estes recebem grandes quantidades de poluentes que contaminam águas subterrâneas e corpos d'água.

Dentre os principais poluentes químicos lançados no meio aquático estão os agrotóxicos (TREPÓS et al., 2012), os fertilizantes (MIRLEAN et al. 2002), os químicos industriais (HENDRYX et al., 2012), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (CELINO et al. 2010), os metais (VENKATRAMREDDY et al., 2009) e os efluentes urbanos (CHEN et al 2013), sendo que muitos desses contaminantes atingem o ambiente aquático por meio de lançamento de efluentes que não recebem o tratamento adequado, antes de serem lançados nos corpos hídricos (KNIE; LOPES, 2004).

Quando os poluentes atingem os corpos d'água, eles estão sujeitos à ação de diversas variantes ambientais, tanto físicas quanto biológicas, como: fator diluição (que pode provocar um aumento ou uma diminuição dos poluentes no meio); ação hidrodinâmica (que pode promover o transporte desses poluentes); ação da gravidade (que pode auxiliar na sedimentação dos poluentes); e ação da luz, da temperatura e de microorganismos (que podem promover degradação das moléculas dos poluentes) (PEREIRA, 2004).

A contaminação dos ambientes aquáticos é difícil de controlar, pois, na maioria das vezes, ela ocorre a partir de fontes não pontuais, ou também chamadas de difusas, que são aquelas fontes que não permitem a identificação do ponto de lançamento dos contaminantes (MOZETO; ZAGATTO, 2006). As cargas poluidoras difusas se devem ao escoamento rural e urbano, distribuído ao longo das bacias hidrográficas. Essa poluição pode ainda ser de origem orgânica ou inorgânica, sendo que as orgânicas têm origem nos restos e dejetos humanos e animais e na matéria orgânica vegetal e as inorgânicas no uso de produtos químicos, nos efluentes industriais não pontuais e na lavagem pelo escoamento de superfícies contaminadas como as áreas urbanas (TUCCI, 2001).

O lançamento de poluentes no meio aquático pode depreciar a qualidade das águas, comprometendo a quantidade de água disponível para o consumo humano.

Este fato vem ocorrendo em escala mundial e, por isso, chama a atenção da comunidade científica, visto que o ser humano ainda não dispõe de ferramentas suficientes para a completa reversão destes poluentes. Segundo Lima (2001), mais de 97% da água do planeta está concentrada nos oceanos e mares e menos de 3% pertencem às reservas de água doce. A princípio, apenas a água doce é adequada para o consumo humano, embora apenas uma pequena parcela dessa porcentagem seja viável para este consumo.

Pela própria propriedade da água ser um solvente considerado universal, o ambiente aquático possui uma alta capacidade de solubilização de compostos orgânicos e inorgânicos, que ficam dispersos na coluna d'água, sujeitos a diversos tipos de reações químicas. Tais reações ocorrem a partir da formação de um gradiente vertical, entre as regiões mais superficiais e as regiões mais profundas do meio aquático, onde existe uma distribuição desigual na quantidade de luz, nutrientes, temperatura e dos gases do meio aquático (ESTEVES, 1998).

As regiões profundas do meio aquático são caracterizadas por acúmulo de sedimentos, originados a partir de processos de erosão, que podem ser transportados pelos rios, tendo, desta maneira, um papel importante na qualidade d'água destes ambientes (WALLING, 2009).

Os sedimentos aquáticos são formados por uma matriz complexa composta por uma mistura da argila, areia, sais minerais e matéria orgânica, depositada logo abaixo da coluna d'água dos recursos hídricos (ARAÚJO et al., 2006), sendo considerados os locais mais importantes para a acumulação e transformação da matéria orgânica presente no meio aquático (CANFIELD et al., 1993; WAINRIGHT et al., 1992; VILLAR et al., 1999). Os sedimentos desempenham um papel importante no meio aquático, pois mediam trocas químicas entre a fase particulada e a fase biológica do meio aquático (PELUSO et al., 2013).

A depreciação dos corpos d'água por poluentes pode levar também a contaminação dos sedimentos aquáticos. Uma vez que os poluentes atinjam os sedimentos, eles podem ficar retidos nestes compartimentos, que passam a servir, então, como reservatórios dos poluentes lançados na coluna da água (SANZ-LÁZARO; MARÍN, 2009; MIRELES et al., 2011; WETZEL et al., 2013). Os contaminantes presentes nos sedimentos podem permanecer ligados a estes, apresentando concentrações muitas vezes mais altas que as concentrações originalmente presentes na coluna d'água (CHAPMAN et al., 1989; YI et al., 2008).

Contudo, esses contaminantes podem retornar a coluna d'água, por meios de processos como bioturbação e/ou ressuspensão dos sedimentos (FILGUEIRAS et al., 2002; SPROVIERI et al., 2007), caracterizando-se, assim, em fontes secundárias de poluição (LEE et al., 2000; BURTON; LANDRUM, 2003).

As mudanças ambientais derivadas das ações humanas, que não incluem o lançamento direto de agentes químicos ao ambiente, também podem impactar o meio aquático. Algumas atividades humanas como, por exemplo, as navegações e as dragagens podem também promover a remobilização dos sedimentos nos rios, disponibilizando os poluentes para a coluna d'água (WETZEL et al., 2013). Outras condições, como as tempestades (KUUSISTO-HJORT; HJORT, 2013) e enchentes, também podem promover o retorno desses poluentes à fase dissolvida na coluna d'água (DENNIS et al., 2003; HOLLERT et al., 2003; SCHWARTZ et al., 2006; WALLING, 2009; BELLAS et al., 2011; WETZEL et al., 2013).

A maioria dos contaminantes adsorvidos nos sedimentos é persistente e pode induzir diversos efeitos adversos nos organismos expostos, mesmo quando os níveis de contaminantes da coluna da água são baixos (CHAPMAN, 1989, WETZEL et al., 2013). Desta maneira, os organismos aquáticos podem ser contaminados pela água, pelos sedimentos ou pela alimentação, dependendo do tipo contaminante considerado e da ecologia desses organismos (WANG et al., 2004). Deve-se levar em consideração que, mesmo que os contaminantes estejam restritos aos sedimentos e não disponibilizados na coluna d'água, a comunidade bentônica estará associada a esta contaminação. Uma vez que esta comunidade serve de base para a alimentação de outras comunidades, essa contaminação pode comprometer a qualidade de todo o ecossistema, tanto por via direta quanto por via trófica (YI et al., 2008). Desta maneira, a contaminação dos sedimentos pode levar a processos de bioacumulação e biomagnificação (BURTON, 2002), que se caracteriza em um perigo para os organismos aquáticos que tendem a bioacumular poluentes orgânicos persistentes em seus tecidos, quanto para os seres humanos que podem se alimentar desses organismos (BARÓN et al., 2013).

3.3. Mutagênese ambiental

Além do alto grau de toxicidade dos produtos químicos lançados nos ambientes, esses também podem apresentar características genotóxicas e mutagênicas e que podem induzir alterações nas sequências de bases do DNA,

aumentando o surgimento de mutações que, quando acumuladas, podem desencadear o aparecimento de doenças degenerativas e de processos neoplásicos nos organismos expostos (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

As alterações que ocorrem na molécula de DNA podem ser passíveis ou não de correção pelo sistema de reparo celular. Quando são passíveis de correção, o agente promotor é chamado de agente genotóxico, mas quando tais alterações não são corrigidas pelo sistema de reparo da célula, o agente promotor é chamado de mutagênico. Desta forma, as alterações no DNA resultantes de erros ocasionais, ocorridos durante a divisão celular, podem resultar no aparecimento de mutações (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

As mutações ocorrem ao longo da vida de todos os organismos vivos, sendo um evento fundamental para a evolução e, conseqüentemente, um processo importante para o aumento da diversidade biológica do planeta. Muitas mutações passam despercebidas, por não acarretarem danos aos organismos. Entretanto, embora a ocorrência de mutações seja um processo natural e necessário para a vida, em determinadas situações, elas podem resultar em alterações danosas ao organismo (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Um agente mutagênico tem a capacidade de promover uma alteração no material genético de uma célula, a partir de diversos modos de ação. Tal agente pode promover a adição, substituição ou deleção de bases no DNA nuclear, que podem alterar a sequência de codificação de aminoácidos, caracterizando, assim, uma mutação gênica; pode promover também alterações na estrutura ou no número de cromossomos de uma determinada célula, o que caracteriza as mutações conhecidas como cromossômicas. As mutações cromossômicas se dividem ainda em: estruturais, que podem promover duplicação, translocação, inversão e deleção de fragmentos cromossômicos; e numéricas, que, por sua vez, alteram o número de cromossomos presentes nas células, a partir da ocorrência de aneuploidias e poliploidias cromossômicas (BURNS; BOTTINO, 1991). A ocorrência de quaisquer destas mutações podem alterar os ciclos mitóticos e/ou meióticos das células, levando a uma divisão celular incorreta (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; MATSUMOTO et al., 2006), que podem levar a instabilidade celular e ao desenvolvimento de processos carcinogênicos (FERNANDES, 2005).

Assim, a certificação da potencialidade mutagênica de um dado agente ou de uma mistura complexa é baseada na observação da ocorrência de aberrações

cromossômicas estruturais ou numéricas; na formação de micronúcleos; na ocorrência de trocas entre cromátides-irmãs; e na avaliação da ocorrência de danos no DNA. Os danos relacionados ao DNA podem ser caracterizados como mutações de ponto; alterações no gene; danos clastogênicos (alterações na estrutura cromossômica, que podem resultar em quebras cromossômicas); danos aneugênicos (como por exemplo, os derivados de alterações nos microtúbulos) (FERNANDES, 2005) e aneuploidias (ganho ou perda de cromossomos) (HOUK, 1992).

Desta forma, as respostas apresentadas pelos organismos expostos, comparadas com as de um grupo controle, permitem avaliar, de maneira mais ampla, rápida e eficaz, o efeito que os contaminantes ambientais têm sobre os sistemas biológicos (RIZZO, 2011). É importante salientar que, se os agentes causam danos diretamente ao DNA de um organismo teste, o potencial genotóxico deste agente pode, em alguns casos, ser extrapolado para outros tipos celulares (RAMEL, 1983).

3.4. Bioensaios

A qualidade de um dado ambiente aquático é dada, de modo geral, a partir de duas formas de análises, consideradas complementares: as análises químicas, que identificam e quantificam as substâncias químicas presentes na água; e as análises biológicas, que qualificam os efeitos que podem ser induzidos nos organismos vivos por essas substâncias.

A prática de usar organismos vivos para testar comprometimento ambiental surgiu no século XIX, ainda com metodologias rudimentares, onde animais e plantas começaram a ser usados para avaliação dos efeitos negativos de ambientes contaminados, especialmente dos ambientes aquáticos. Essas avaliações são chamadas, atualmente, de bioensaios. Os ensaios biológicos podem ser desenvolvidos com vários grupos de organismos vivos, incluindo desde bactérias até mamíferos (KNIE; LOPES, 2004).

Os bioensaios são ferramentas importantes para avaliar as possíveis respostas dos organismos, quando estes estão expostos a contaminantes ambientais (RIZZO, 2011). Como há similaridade da estrutura do DNA e da síntese proteica entre os organismos, os resultados obtidos em uma espécie podem, muitas vezes, serem extrapolados para outra espécie. Entretanto, é necessário atentar para

as diferenças e peculiaridades dos organismos, que podem diferir entre si em aspectos como sensibilidade, mecanismos de reparo do DNA e atividade metabólica (RAMEL, 1983). Assim, os bioensaios são extremamente importantes, uma vez que análises químicas podem ser muito limitadas, pois apenas identificam e/ou quantificam as possíveis substâncias tóxicas, sem levar em consideração seus efeitos sobre os organismos expostos. Além disso, considerando a imensa quantidade de compostos químicos que podem chegar às águas, torna-se impossível a qualificação, com exatidão, de todos estes compostos (KNIE; LOPES, 2004). Ademais, as diferentes substâncias presentes no meio aquático, podem apresentar características e efeitos diferentes sobre os organismos, a partir do efeito combinados dessas substâncias (JAGER et al., 2007).

Nesse contexto, o monitoramento ambiental dos ecossistemas aquáticos representa uma ferramenta importante na análise da qualidade de água, tendo como principais objetivos estudar os tipos de contaminações (poluentes naturais ou sintéticos), resultantes das atividades humanas, além de identificar quais os mecanismos de ação desses poluentes e seus consequentes efeitos sobre o conjunto de seres vivos que habitam a biosfera (ZAGATTO, 2006).

3.4.1. *Allium cepa*

Os vegetais superiores vêm sendo amplamente recomendados pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS), para avaliar efeitos genotóxicos e mutagênicos de amostras ambientais e de substâncias químicas (BAGATINI et al., 2007; LAUGHINGHOUSE IV et al., 2012).

Dentre as plantas utilizadas para tais análises, destaca-se a espécie *Allium cepa*, pela sua eficiência de resposta a diversos agentes ambientais (GRANT, 1994; 1999), sendo, por isso, considerada um modelo eficiente para avaliação da contaminação ambiental terrestre e aquática (LEME; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

Os bioensaios realizados com *A. cepa*, quando comparados com bioensaios realizados com animais, são considerados mais sensíveis para avaliações ambientais e de mais fácil execução (LEME; MARIN-MORALES, 2008), uma vez que a espécie *A. cepa* possui uma alta taxa de germinação e um comportamento cromossômico bem conhecido, o que permite a obtenção de resultados seguros e

consistentes (ALVIM et al., 2011). Os bioensaios com a espécie *A. cepa* podem, ainda, ser realizados em um curto período, visto que o tempo, desde o processo de germinação até a coleta das raízes, é de cerca de cinco dias. A espécie possui determinadas características que auxiliam no desenvolvimento das análises, como por exemplo, cromossomos grandes e em pequeno número ($2n=16$), podendo ser facilmente visualizados em microscopia de luz, facilitando também a avaliação da presença de possíveis aberrações cromossômicas (GRANT, 1982).

Apesar dos organismos vegetais apresentarem diferenças metabólicas em relação aos animais, existem ainda muitas similaridades entre esses grupos, podendo haver uma correlação de até 82% entre os ensaios realizados com *A. cepa* e com animais (FISKESJO, 1993, 1994; RANK; NIELSEN 1994). Os ensaios com *A. cepa* foram também considerados mais sensíveis que o teste de Ames (RANK; NIELSEN, 1994) e com outros vegetais superiores como, por exemplo, a espécie *Vicia faba* (MA et al., 1995; MIGID et al., 2007). Essa espécie pode ser utilizada para analisar diferentes parâmetros de avaliação (endpoints), como: (1) avaliação de citotoxicidade - obtida a partir de parâmetros como índice mitótico (IM) e parâmetro de proliferação celular (GADANO et al., 2002); (2) genotoxicidade - obtida a partir da ocorrência de aberrações cromossômicas (AC) e de alterações nucleares; e (3) mutagenicidade – obtida a partir da ocorrência de micronúcleos celulares e fragmentos cromossômicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

3.4.2. Testes *in vitro* e cultura de células RTL-W1

O controle do uso de animais como organismos testes tem se tornado cada vez mais rigoroso, uma vez que os comitês de ética do mundo todo tentam minimizar (ou até mesmo exterminar) o sofrimento de animais utilizados em testes biológicos (ROGERO et al., 2003; UBELS; CLOUSING, 2005). Desta maneira, tem sido necessário o desenvolvimento e a padronização de ensaios *in vitro*, realizados com diferentes sistemas testes, que apresentem as características e as interações celulares dos tecidos originais, para poder, assim, simular as respostas biológicas obtidas em experimentos *in vivo* (ZUCCO et al., 2004). Os bioensaios realizados com cultura de células são uma ferramenta importante para a investigação de respostas biológicas, em diversas áreas, como a imunologia, a virologia, a genética e a toxicologia (LEWINSKA et al., 2007).

Muitos pesquisadores têm utilizado, como sistemas teste, células mantidas em cultura (ROCHA et al., 2009; BOETTCHER et al., 2010; BARON et al., 2012; KIENZLER et al., 2012; 2013; MALHÃO, 2013). Nos ensaios *in vitro*, essas culturas são expostas a um agente a ser testado, para se verificar possíveis alterações celulares que possam ocorrer nestas células. Tais ensaios apresentam algumas vantagens em relação aos testes *in vivo*, como, por exemplo: (1) a possibilidade de limitação do número de variáveis experimentais; (2) a maior facilidade de obtenção de dados significativos; (3) a alta reprodutibilidade; (4) a realização do experimento em um curto período de tempo; (5) a alta sensibilidade em relação a outros testes e (6) aos baixos custos, quando comparados com os testes *in vivo* (ROGERO et al., 2003).

As culturas de células que podem ser utilizadas nos bioensaios envolvem, basicamente, linhagens de cultivos primários e linhagens de cultivos permanentes. A obtenção das linhagens de cultivo primário pode ser dar a partir de células recentemente isoladas de tecidos, sendo que essas linhagens possuem um tempo de cultivo limitado (culturas finitas). A obtenção das linhagens de cultivo permanente, ou imortais, se dá pela transformação de células que tem capacidade de crescimento ilimitado em cultura (culturas infinitas). Alguns exemplos de culturas de células amplamente utilizadas em bioensaios são as Culturas de Fibroblastos 3T3, células HeLa e Células de Ovário de Hamster chinês (CHO) (SACHANA; HARGREAVES, 2007).

Existe um grande número de tipos celulares que podem ser empregados nos bioensaios *in vitro*, sendo que culturas celulares também são muito utilizadas para a avaliação dos efeitos da ação de xenobiontes presentes nos ambientes.

Os bioensaios *in vitro* realizados com cultura de células de peixes são muito importantes para o monitoramento ambiental, sendo eficientes para a avaliação do potencial tóxico tanto de substâncias isoladas quanto de misturas ambientais complexas, como as amostras de água e de sedimentos (CHEN; WHITE, 2004). Estudos indicam que as culturas de células de peixe podem substituir, ou complementar, os estudos *in vivo* realizados com animais (BABICH; BORENFREUND, 1986; 1987; CASTANO et al., 1994; JHA, 2004; ROCHA et al., 2009; BOLS et al., 1985).

As culturas de linhagens de hepatócitos de peixes são, ferramentas indispensáveis para a avaliação tanto da toxicidade de amostras aquáticas

(KNASMÜLLER et al., 2004), quanto da avaliação da ação de compostos xenobiontes (PESONEN; ANDERSSON, 1997; SEGNER, 1998), visto que as células do fígado possuem a capacidade de metabolização e biotransformação dos xenobiontes, sendo indicadas para a avaliação dos efeitos da ação direta dos contaminantes, bem como da ação dos seus metabólitos (LEE et al., 1993; KNASMÜLLER et al., 2004).

Dentre as linhagens de culturas de células de peixes, destaca-se a linhagem RTL-W1 (LEE et al., 1993), que tem sido utilizada em diversos bioensaios para a avaliação de diferentes endpoints. Essa linhagem celular foi obtida a partir do isolamento de células do fígado de um macho adulto de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). A partir da cultura primária inicial, algumas células continuaram a crescer lentamente até que, após 5 meses, foi atingida a confluência dessas células. Neste período, foram preparadas subculturas destas células, a partir de procedimentos de tripsinização (passagens). Após 14 meses de cultivo, Lee et al. (1993) desenvolveram testes com essas linhagens, onde os autores observaram que, após 100 passagens destas células (replicações celular), o tempo entre as passagens foi reduzido para um período de 7 a 10 dias. As células RTL-W1, provavelmente, adquiriram uma imortalidade espontânea, mesmo não sendo células neoplásicas. Essa linhagem celular é considerada uma linhagem celular normal de hepatócitos, pois mantém a sua característica celular, independente do número de passagens necessárias para os experimentos (MALHÃO et al., 2013).

Culturas de células RTL-W1 apresentam uma alta eficiência na detecção dos efeitos citotóxicos e genotóxicos dos poluentes presentes no meio aquático (NEHLS; SEGNER, 2001; ROCHA et al., 2009; BOETTCHER et al., 2010). No entanto, a maioria dos estudos realizados com esta linhagem celular se concentra em estudos que avaliam a atividade enzimática desta célula, tendo poucos estudos relacionados com a avaliação de amostras ambientais de ecossistemas aquáticos. Dentre os poucos estudos ambientais realizados com essas células, a maioria se concentra na avaliação da genotoxicidade (teste do cometa) e uma pequena parte para avaliar a mutagenicidade (indução de micronúcleos) de amostras aquáticas (MALHÃO et al., 2013).

Boettcher et al. (2010), notificaram que o teste de indução de micronúcleos em linhagens de células RTL-W1, se mostrou eficiente na detecção do potencial mutagênico (ensaio do MN) de extratos de amostras de sedimentos de água doce.

Esta linhagem celular também se mostrou adequada para a detecção do potencial genotóxicos (ensaio do cometa) de extratos de sedimento (BOETTCHER et al., 2010; ROCHA et al., 2009). Além disso, Kosmehl et al. (2004) comprovaram que as células RTL-W1 possuem uma alta capacidade de biotransformação de compostos químicos, quando comparadas com outras linhagens de células de peixe, como, por exemplo, as células RTG-2.

3.4.3. Ensaio de incorporação do vermelho neutro

Foram desenvolvidos muitos ensaios *in vitro*, realizados com cultura de células, para avaliar citotoxicidade. Esses testes consistem em verificar, por diferentes métodos, entre eles o de incorporação de corantes vitais ou pela inibição da formação de colônias celulares, a presença de alterações em células expostas a agentes tóxicos. (ROGERO et al., 2003).

O corante vermelho neutro tem sido muito utilizado como um dos indicadores de citotoxicidade de células mantidas em cultura, dentre elas as de hepatócitos, sendo também usado para avaliar viabilidade celular. O ensaio de citotoxicidade com o vermelho neutro caracteriza-se em um teste de incorporação do corante por células viáveis (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006), a partir da sua absorção pela membrana celular, por difusão passiva não iônica. O corante se concentra nos lisossomos das células, fixando-se nestas estruturas através de ligações eletrostáticas com grupos aniônicos e fosfatos hidrofóbicos da matriz lisossomal (MELO, 2000). Desta maneira, muitas substâncias tóxicas danificam as membranas celulares, resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro, tornando possível distinguir células vivas das danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (CIAPETTI et al., 1996).

Em testes realizados com extratos orgânicos de sedimentos para avaliações em culturas de células, o ensaio de incorporação do vermelho neutro é também uma ferramenta muito importante para que se possa estabelecer, com segurança, as concentrações mais altas destes extratos, que serão utilizadas em outros ensaios, onde a toxicidade aguda deve ser evitada (ROCHA et al., 2009), como por exemplo o teste do micronúcleo.

3.4.4. Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo é frequentemente utilizado na detecção da indução de danos nos cromossomos ou no aparato mitótico das células. Este teste se baseia na ocorrência de fragmentos de cromossomos ou de perdas de cromossomos inteiros, que não foram reincorporados ao núcleo principal da célula durante a divisão celular, sendo, então, transformados em pequenos núcleos (JENSSEN; RAMEL, 1980; GRISOLIA, 2002; NORPPA; FALCK, 2003). Desta forma, os micronúcleos são estruturas circulares envolvidas por membrana, semelhantes ao núcleo principal, mas de tamanho muito menor, equivalentes a 1/3 a 1/16 do tamanho do núcleo (RODRIGUES et al., 1997; FERETTI et al., 2008), que possuem mesma refração, sendo facilmente reconhecidos por microscopia de luz (AL SABTI; METCALFE, 1995).

Dentre as vantagens da realização deste teste, incluem-se a facilidade de análise e a possibilidade de sua aplicação em qualquer população celular em proliferação (HAYASHI et al., 1998).

A indução de micronúcleos pode prever efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos de diversos agentes. Sendo assim, a formação dos micronúcleos por fragmentos cromossômicos, derivados de quebras cromossômicas, caracteriza uma ação clastogênica, e a formação dos micronúcleos por perdas de cromossomos inteiros, durante a divisão celular, caracteriza uma ação aneugênica, dos agentes testados (LEME et al., 2008).

Este teste tem sido um dos métodos mais utilizados na avaliação de danos cromossômicos (FENECH, 2006; FENECH et al., 2003), sendo considerados eventos chave no desenvolvimento do câncer e do envelhecimento celular (FENECH, 2000). Desta forma, o teste do micronúcleo tem sido aplicado em diversas áreas biológicas e da saúde, na identificação do potencial genotóxico de novos produtos farmacêuticos, agrotóxicos, agentes físicos em geral e amostras ambientais (KIRSCH-VOLDERS, 1997). O teste do micronúcleo tem também sido muito utilizado, tanto para avaliações *in situ* (ROCHA et al., 2009), quanto para avaliações *in vitro* de contaminantes presentes em amostras ambientais (PANTALEÃO, 2006), fornecendo respostas biológicas relacionadas com o potencial de mutagenicidade de agentes presentes no ambiente (SOUZA; FONTANETTI, 2006).

3.5. Classificação das águas

O rio Corumbataí constitui uma sub-bacia da bacia do rio Piracicaba, que pertence a Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos das Bacias do Piracicaba, Capivari e Jundiaí – UGRHI PCJ. Este corpo hídrico nasce no município de Analândia, passando pelos municípios de Corumbataí, Itirapina, Ajapi, Rio Claro, Santa Gertrudes, Ipeúna, Charqueada e Piracicaba, todos localizados no interior do estado de São Paulo. Sua bacia compreende uma área de 1.679,19 Km², totalizando 13,4 % da área da sua bacia principal (IRRIGART, 2005) e recebe os afluentes: ribeirão Claro, o ribeirão Passa Cinco, o rio Cabeça e o córrego da Servidão.

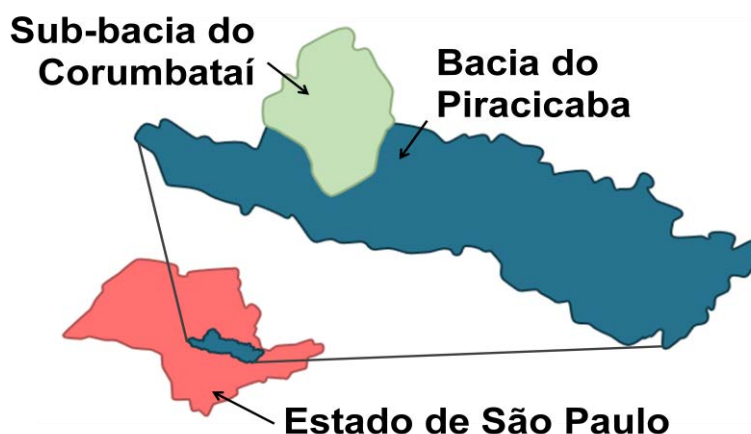


Figura 1: Esquema ilustrativo da localização geográfica da sub-bacia do rio Corumbataí (SP).

O uso das águas da bacia do Corumbataí é dividido, basicamente, em 54% para o abastecimento da população urbana, dentre elas as cidades de Rio Claro e Piracicaba, 22% para abastecimento industrial e 14% para irrigação agrícola, sendo uma sub-bacia de grande interesse econômico e ambiental (PALMA-SILVA, 1999; CARMONA et al., 2004).

Esta região possui diversos problemas ambientais, decorrentes da falta de planejamento de ocupação, com grandes áreas ocupadas por monocultura de cana-de-açúcar e por pastagens, além de ter um alto desenvolvimento industrial e uma concentração urbana intensa, atividades estas consideradas potencialmente poluidoras (FREDERICE et al., 2010).

A bacia do rio Corumbataí, ao longo de seu curso, recebe efluentes de origem doméstica e industrial das cidades de Analândia, Corumbataí, Rio Claro, Santa Gertrudes e Piracicaba, o que acaba levando a um aumento gradativo da sua carga

poluidora e um consequente aumento dos custos dos tratamentos de água das cidades que fazem uso deste recurso hídrico para abastecimento (CETESB, 2009).

As áreas da bacia do Corumbataí destinadas ao plantio de cana-de-açúcar estão próximas às margens do rio, fator este bastante preocupante, pois os agrotóxicos e outros produtos agrícolas podem ser facilmente carregados pelas águas da chuva para a calha do rio (CELLA, 2009).

Desta forma, de acordo com Palma-Silva (1999), os principais problemas ambientais que podem ser encontrados na região da Bacia do Rio Corumbataí podem ser resumidos em:

- Lançamento de esgotos domésticos e de efluentes industriais;
- Disposição inadequada de resíduos sólidos;
- Crescimento desordenado das áreas urbanas;
- Erosão e assoreamento do rio, devido ao desmatamento das matas ciliares;
- Degradação da paisagem para extração mineral;
- Realização de queimadas, aplicação de vinhaça, herbicidas e fertilizantes nas atividades agrícolas realizadas no entorno da bacia;
- Pilhas de rejeitos de lixo próximos aos rios.

O rio Corumbataí é classificado, de acordo com a resolução CONAMA, como de Classe 2 (MESSIAS et al., 2008). As águas de rios com esta classificação são destinadas: (1) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; (2) à proteção das comunidades aquáticas; (3) à recreação; (4) à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas, parques, jardins que possam vir a ter contato direto com o público e (5) à aquicultura e pesca.

As condições dos mananciais, de acordo com Tucci (2001) e definidas na Resolução CONAMA 357/05, dispõe que os requisitos mínimos para as águas de Classe 2 proíbe, nestas bacias, atividades como as relacionadas a: (1) Indústrias: incluindo as atividades de indústrias sucroalcooleiras, metalúrgicas, de galvanoplastia, químicas em geral, matadouros, de artefatos de amianto e processadoras de material radioativo; (2) Hospitais, sanatórios e leprosários; (3) Depósitos de lixo; (4) Parcelamento do solo de alta densidade: lotes, desmembramento e conjuntos habitacionais.

Os relatórios de qualidade dos recursos hídricos da bacia do rio Corumbataí, realizados pelo comitê PCJ, que considera determinados pontos deste rio, são baseados nos Índice de Qualidade da Água Bruta para fins de Abastecimento

Público (IAP), que reflete a contaminação dos corpos hídricos por atividades urbanas e industriais e Índice de Qualidade das Águas para a Proteção da Vida Aquática (IVA), que reflete a qualidade das águas para fins de proteção da fauna e flora em geral. Tais índices possuem classificações que variam de: ótima, boa, regular, ruim e péssima.

Os dados obtidos pelo comitê PCJ, em seu relatório mais recente, para os IAP e IVA de alguns pontos do Rio Corumbataí estão representados no quadro 1:

Quadro 1: Dados da avaliação da qualidade da água do Rio Corumbataí pelo comitê PCJ.

ÁREA DE AVALIAÇÃO	IAP	IVA
TRECHO À MONTANTE DE RIO CLARO	REGULAR	REGULAR
TRECHO À JUSANTE DE RIO CLARO	BOA	ÓTIMA
TRECHO À JUSANTE DE SANTA GERTRUDES	BOA	PÉSSIMA
TRECHO À MONTANTE DE PIRACICABA	RUIM	REGULAR

Estes dados mostram que o Rio Corumbataí não possui uma uniformidade, quanto à qualidade de suas águas, o que põe em discussão a classificação sugerida pelo CONAMA (resolução 357/2005), que enquadra esse rio em sua totalidade, como de Classe 2.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais biológicos

Neste estudo, foram utilizadas, para o desenvolvimento de bioensaios os, sistemas testes *A. cepa* (variedade Baia-Periforme), células RTL-W1 mantidas em cultura (LEE et al., 1993), derivadas do fígado de truta arco-íris (*Oreochromis mykiss*).

4.2. Área de estudo e pontos de coleta

As coletas das amostras de água e sedimentos do rio Corumbataí foram realizadas em quatro pontos distintos, localizados no Médio e no Baixo Corumbataí, próximos às cidades de Rio Claro, Santa Gertrudes e Piracicaba, como segue na figura 1 e tabela 1:

(P1) ponto à montante do município de Rio Claro;

(P2) ponto à jusante de município de Rio Claro;

(P3) ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o ribeirão Claro;

(P4) ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o rio Piracicaba.



Figura 1: Esquema ilustrativo dos quatro pontos de coleta. (1) P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; (2) P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; (3) P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; (4) P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 1: Coordenadas geográficas dos pontos de coleta.

PONTOS DE COLETA	LATITUDE (S)	LONGITUDE (W)
P1	22°23.205'	47°32.753'
P2	22°25.343'	47°35.614'
P3	22°29.076'	47°35.600'
P4	22°30.917'	47°37.467'

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

4.3. Coleta das amostras

Foram realizadas duas coletas durante o estudo, sendo uma durante a estação chuvosa e quente (fevereiro de 2013) e outra durante a estação seca e fria (julho de 2013). Estas coletas procuraram englobar as estações climáticas que melhor determinam o clima da região de estudo.

Para cada ponto amostrado do rio Corumbataí foram coletadas amostras de água e de sedimento. As amostras de água foram coletadas com o auxílio de baldes de aço inoxidável e frascos de vidro, enquanto que as amostras dos sedimentos foram realizadas com o auxílio de uma draga de Ekman-birge (coleta da camada de sedimento mais superficial).

Tanto as amostras de água quanto as de sedimentos foram homogeneizadas para a retirada de uma amostra composta, cujo volume final foi de 4 L para a água e de 2 Kg, para o sedimento. Os volumes finais de água e sedimento foram acondicionado em frasco escuro, mantido sob refrigeração, para serem, posteriormente, transportado para o laboratório, onde as amostras foram mantidas a 4°C, até serem utilizadas nos bioensaios.

4.3.1. Dados térmicos e pluviométricos dos meses das coletas

Os dados térmicos e pluviométricos da região em estudo, para os períodos considerados, foram obtidos junto Centro de Análise de Planejamento Ambiental (CEAPLA) do Instituto de Geociências da UNESP de Rio Claro.

4.4. Preparo das amostras

Os ensaios realizados com a espécie *A. cepa* não necessitaram de um preparo prévio das amostras (água e de sedimentos), sendo as mesmas utilizadas in

natura. No entanto, para a realização dos ensaios com culturas de células RTL-W1, as amostras de água e de sedimento dos pontos amostrados (P1, P2, P3 e P4), para as duas coletas realizadas, passaram por um processo de extração orgânica.

4.4.1. Extração de fase sólida e eluição dos extratos de água

O procedimento de extração de fase sólida foi realizado conforme o estudo desenvolvido por Silva (2013), e consistiu, basicamente, em passar as amostras de água por cartuchos poliméricos capazes de reter os contaminantes presentes nas amostras. Assim, para a realização da extração de fase sólida, neste estudo, primeiramente, as amostras de água foram filtradas, por duas vezes, em sistema de filtração a vácuo, com filtros de fibra de vidro de 47 mm (Sartorius Stedim Biotech®). Posteriormente, para o procedimento de extração, foram preparados cartuchos com resinas poliméricas Strata-X 200 mg/3 mL (Phenomenex®), adicionando-se 6 mL de metanol em cada cartucho, para a abertura de suas cadeias poliméricas. Em seguida foram adicionados 6 mL de água ultra pura para a retirada dos resíduos de metanol.

Após a preparação dos cartuchos, estes foram conectados a um sistema de filtração a hidrovácuo, por onde foi passado 1 L de amostra, em cada cartucho, no seguinte sentido: (1) colunas de vidro; (2) mangueiras de silicone; (3) manifold conectado a uma bomba de hidrovácuo. Desta maneira, os contaminantes presentes nas amostras ficaram todos retidos nos polímeros dos cartuchos e o restante de água, isenta de contaminantes, foi descartada no recipiente de descarte do manifold. Posteriormente, os cartuchos foram conectados diretamente ao manifold, para secagem, e depois armazenados em freezer a -20 °C, até a sua utilização nos ensaios.

Para a eluição dos cartuchos, foi adicionado 10 mL de metanol em cada cartucho. O extrato obtido (metanol + contaminantes que estavam retidos nos cartuchos) foi seco em nitrogênio gasoso, até obter um volume de 1 mL de extrato, ou extratos mil vezes concentrado (1 mL de extrato/1 L de amostra). Os extratos obtidos foram mantidos a 4°C, até a sua utilização nos ensaios.

4.4.2. Preparação dos extratos de sedimentos

Os extratos das amostras de sedimentos foram obtidos conforme o estudo realizado por Boettcher et al. (2010), a partir da extração cetônica, no aparelho

extrator Soxhlet. Primeiramente, as amostras de sedimentos (previamente congeladas a -80°C), foram liofilizadas, até a retirada total do conteúdo aquoso, por reação de sublimação da água. Posteriormente, foram colocados em filtros de celulose 20 g de cada amostra, sendo um filtro para cada amostra. Os filtros, contendo as amostras de sedimentos foram colocados em colunas de extração (Soxhlet), sendo uma para cada amostra. As colunas foram conectadas, em uma de suas extremidades, a um condensador de refluxo (contendo água gelada), e na outra extremidade, a um balão volumétrico (aquecido por uma fonte de calor), contendo 100 mL de acetona – P.A. (solvente orgânico).

Desta forma, formou-se um sistema fechado, onde o solvente foi aquecido até a sua evaporação. O vapor deste solvente foi condensado na coluna de extração, ao entrar em contato com o condensador de refluxo, gotejando, assim, na coluna de extração, até preencher toda a coluna. Ao encher a coluna de extração e entrar em contato com as amostras de sedimento, o solvente retornou ao balão volumétrico por sifonação e o processo de refluxo se repetiu automaticamente. Este processo foi realizado durante 16 horas, extraíndo os possíveis contaminantes do sedimento, transferindo-os para o solvente orgânico. Os extratos de sedimentos foram concentrados no próprio aparelho de Soxhlet, eliminando-se o solvente, antes do seu retorno ao balão volumétrico.

Posteriormente, os extratos foram secos em nitrogênio gasoso, e redissolvidos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se um extrato equivalente a 20 g de sedimento em 1 mL de DMSO (20 g SEQ/mL DMSO).

4.5. Análises físico-químicas e químicas

As análises físico-químicas foram realizadas com o auxílio do equipamento Horiba®, considerando os parâmetros: pH, temperatura, salinidade, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido.

Foram realizadas análises químicas das amostras de água, para avaliar a presença e a concentração de metais e de compostos inorgânicos, além da concentração de carbono. Tais análises foram realizadas no Laboratório de Estudo de Bacias (LEBAC), do Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas – UNESP – Rio Claro, em convênio com o UFZ - Helmholtz Centre for Environmental Research GmbH, Leipzig, Alemanha.

4.6. Ensaios

4.6.1. Ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em *Allium cepa*

As sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em dois tipos de ensaios: um em amostras de água e o outro em amostras de sedimento coletados no rio Corumbataí. O controle positivo foi realizado com sementes expostas à germinação em metil-metanosulfonato (MMS – 4×10^{-4} M) e o controle negativo em água ultra pura. Todos os ensaios foram realizados em estufa a 20 °C.

Para todos os ensaios realizados com *A. cepa*, foram feitos testes de recuperação, colocando as raízes previamente expostas nas amostras de água e de sedimento, em água ultra pura por 48 horas, para avaliar a persistência da ação dos contaminantes presentes nas amostras (água e sedimento) do rio Corumbataí.

Após a germinação das sementes, as raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético - v/v), por 6 a 18 horas, em duas situações: após 120 horas de exposição às amostras de água e de sedimento, e após o período de recuperação de 48 horas em água ultra pura.

Para a realização das análises de índice mitótico (IM), aberrações (AC) cromossômicas e de micronúcleo (MN), as raízes, previamente fixadas, foram submetidas a uma hidrólise ácida (HCl 1N a 60° C) por 8-9 minutos, seguido de tripla lavagem em água destilada. Após a hidrólise, as raízes foram submetidas à reação de Feulgen, utilizando o reativo de Schiff por 2 horas em local escuro. Após lavagem das raízes, até a total retirada do corante, foram confeccionadas lâminas pela técnica de esmagamento suave, utilizando tanto as regiões meristemáticas como as F₁ das raízes (1 mm acima da região meristemática). As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e, após secagem por 24 horas, as lâminas foram montadas em resina Enthellan®. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz, aumento de 400 vezes.

Para as análises de citotoxicidade, realizada para todos os ensaios, foi avaliado o índice de divisão celular, segundo a fórmula a seguir:

$$\text{Índice mitótico (IM)} = \frac{N^{\circ} \text{ de células em divisão} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de células observadas}}$$

Para as análises de genotoxicidade, foi avaliada a ocorrência de aberrações cromossômicas, por meio da contabilização das células que apresentaram anormalidades celulares do tipo aderências cromossômicas, C-metáfase, pontes cromossômicas, anáfases multipolares e perdas cromossômicas, segundo a fórmula a seguir:

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

Para as análises de mutagenicidade em células meristemáticas, foi avaliada a ocorrência de micronúcleos e de quebras cromossômicas, pela contabilização das células que apresentaram tais anormalidades celulares. Para as análises de mutagenicidade em células F_1 , foi avaliada a ocorrência de micronúcleos, pela contabilização das anormalidades nessas células, conforme as fórmulas a seguir:

$$\text{Índice de mutagenicidade (IMt)} = \frac{N^{\circ} \text{ de células alteradas} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de células observadas}}$$

$$\text{Índice de mutagenicidade } F_1 \text{ (IMt } F_1) = \frac{N^{\circ} \text{ de células } F_1 \text{ alteradas} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de células } F_1 \text{ observadas}}$$

Para todos os tratamentos, foram realizadas 3 réplicas, sendo analisadas 5 lâminas por réplica, contabilizando 2.500 células por réplica, totalizando 7.500 células por tratamento. As comparações estatísticas foram feitas entre os resultados dos testes e os resultados do controle negativo (CN) e entre as amostras de água e sedimento de um mesmo ponto. Foi aplicado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

4.6.2. Ensaio com células RTL-W1

4.6.2.1. Manutenção das culturas de células

As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² (TPP®), contendo 10 mL de meio Leibowitz (L15) (Cultilab®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®) e 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina) (Sigma®) a 21°C.

Para a realização das passagens, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline), depois tripsinizadas com 1 mL de tripsina 0,5%, durante 1 minuto. Posteriormente, a tripsina foi neutralizada com 5 mL de meio L15 suplementado e a suspensão celular foi resuspendida, para a obtenção de células isoladas. Foi adicionado mais meio aos frascos e a suspensão celular foi então aliquoteada em novos frascos, sendo 10 mL para cada frasco.

4.6.2.2. Ensaio de incorporação do vermelho neutro

O ensaio de incorporação do vermelho neutro foi utilizado para avaliar o potencial citotóxico dos extratos de sedimentos (toxicidade aguda), assim como para determinar os volumes de extratos de sedimentos que continham as concentrações mais elevadas e não tóxicas de sedimentos, que foram utilizadas nos experimentos *in vitro*, em *endpoints* específicos.

Para a realização deste ensaio, os extratos de sedimentos foram diluídos em meio L15, a uma concentração inicial de 200 mg de extrato por mL de meio. Foram adicionados 100 µL dos extratos em poços de placas de 96 poços (TPP®), onde foram realizadas as diluições em série a partir destes volumes (1:1 a 1:64), totalizando 6 réplicas por placa. Em seguida, foram adicionados 200 µL de suspensão celular em cada poço. O controle positivo foi realizado com 3,5-Diclorofenol, a uma concentração de 80mg/L de meio, e o controle negativo apenas com meio L15 suplementado. A exposição foi realizada por 48 horas, a 20 °C.

Após a exposição, os extratos foram descartados e as células foram incubadas com o corante vermelho neutro (2-metil-3-amino-7-dimetilaminofenazona) a 1% por 3 horas. Após esse período o corante foi descartado e as células foram expostas a uma solução de extração (490 mL de etanol 99%, 10 mL de ácido acético, 500 mL de água destilada), por 30 minutos, para serem posteriormente observadas em espectrofotômetro.

Para a determinação de citotoxicidade, a incorporação de vermelho neutro foi medida a 540 nm, com um comprimento de onda de referência de 690 nm. A viabilidade das células foi expressa em porcentagem e os dados foram avaliados com o software Prism 4.0 (GraphPad®).

O potencial citotóxico dos extratos foi calculado como NR₈₅ e, desta forma, os volumes de extrato que continham as concentrações mais elevadas de sedimentos,

utilizadas nos ensaios, foram aqueles que induziram 15% de mortalidade das células, após 48 horas de exposição.

4.6.2.3. Teste do micronúcleo

Para os testes realizados com os extratos das amostras de água, as células RTL-W1 foram expostas a 5 mL dos extratos diluídos (1:1000) em meio L15, em frascos de 25 cm² (TPP®), sendo um frasco para cada amostra, totalizando 2 réplicas por frasco.

Para os testes realizados com os extratos das amostras de sedimentos, primeiramente, as células foram incubadas em placas de 6 poços (TPP®) e depois expostas a 2 mL de diluições seriadas de extratos (1:1, 1:2, 1:4 e 1:8) em meio L 15, a partir dos volumes de extratos que continham as concentrações máximas de sedimentos, definidas pelos valores de NR₈₅, para os extratos de cada ponto, como segue:

Quadro 2: Volume dos extratos de sedimentos utilizadas nos ensaios do MN.

PONTOS	FEVEREIRO/2013	JULHO/2013
P1	5,5 µL DE EXTRATO	3,25 µL DE EXTRATO
P2	2,50 µL DE EXTRATO	2,50 µL DE EXTRATO
P3	1,25 µL DE EXTRATO	0,95 µL DE EXTRATO
P4	2,20 µL DE EXTRATO	6,70 µL DE EXTRATO

Para todos os tratamentos, o controle positivo foi realizado com metil-metanosulfonato (MMS – 2×10^{-4} M) e o controle negativo foi realizado com o meio L15 suplementado.

As exposições aos tratamentos foram realizadas por 48 horas (para todos os extratos) a 20 °C. Após esse período, o meio com os extratos foi descartado e substituído por um novo meio suplementado, por mais 72 horas, para permitir a proliferação celular. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas (tripsina 0,5%) e neutralizadas com meio L 15 suplementado.

As suspensões celulares foram transferidas para tubos falcon (TPP®) e centrifugadas por 10 minutos a 1500 RPM. Após a centrifugação, o meio foi descartado e as células resuspendidas. Foram adicionados aos tubos 2 mL de

fixador Carnoy 3:1 (metanol: ácido acético - v/v), diluído em PBS (1:1), para a primeira etapa de fixação. Após esse procedimento, as células foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 1500 RPM. O primeiro fixador foi descartado, as células foram resuspendidas, sendo adicionada uma nova solução de fixador Carnoy 3:1 (metanol: ácido acético - v/v) aos tubos (2 mL em cada tubo falcon). As células fixadas foram armazenadas a -20 °C, até sua posterior utilização.

Para a confecção das lâminas, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 RPM, formando um pellet celular. A solução de fixação foi descartada e 0,5 mL de uma nova solução de fixação foi adicionada em cada tubo. Em seguida, as células (pellet) foram ressuspendidas. Esta suspensão foi gotejada em lâminas previamente lavadas, cobertas com um filme de água ultra pura, e mantidas a 4 °C.

Posteriormente, as lâminas foram submetidas a uma hidrólise ácida (HCl 1N a 60° C) por 5 minutos, seguida de lavagem em água destilada. Após a hidrólise, as lâminas foram submetidas à reação de Feulgen, utilizando o reativo de Schiff por 2 horas em local escuro. Em seguida, as lâminas foram contracoradas com Giemsa a 0,2% por 5 minutos.

Para os testes realizados com extratos de água (CN), foram contabilizadas 2.000 células por frasco, com 2 réplicas, totalizando 4.000 células por tratamento.

Para os testes realizados com extratos de sedimentos foram contabilizadas 1.000 células por lâmina, onde foram analisadas 2 lâminas, totalizando 2.000 células por diluição.

As avaliações estatísticas foram realizadas comparando os resultados obtidos com as amostras testadas e os obtidos com o controle negativo (CN), por meio do teste do qui-quadrado, com modificações de Yates ($p < 0,001$).

5. RESULTADOS

ARTIGO I: Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da água e do sedimento do rio Corumbataí (São Paulo – Brasil), por meio do sistema teste de *Allium cepa*

Livia Loureiro de Souza; Paula Suares Rocha; Maria Aparecida Marin-Morales.

ARTIGO II: Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico da água e do sedimento do rio Corumbataí (São Paulo - Brasil), por meio de ensaios realizados com células RTL-W1

Livia Loureiro de Souza; Paula Suares Rocha; Maria Aparecida Marin-Morales.

ARTIGO I:

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DA ÁGUA E DO SEDIMENTO DO RIO CORUMBATAÍ (SÃO PAULO - BRASIL), POR MEIO DO SISTEMA TESTE DE *Allium cepa*

Livia Loureiro de Souza¹; Paula Soares Rocha¹;
Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24A, nº 1515, CEP 13.506-900, Bela Vista, Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

As substâncias potencialmente tóxicas que são lançadas no meio ambiente são o principal fator de contaminação dos corpos d'água. Tais substâncias podem interagir com a coluna d'água, acumular e contaminar também os sedimentos. Tal contaminação pode causar efeitos nocivos a organismos expostos e representar um perigo, não só para organismos aquáticos, mas para o ecossistema como um todo. A bacia do rio Corumbataí é de grande importância econômica para o interior do estado de São Paulo-Brasil, pois suas águas são utilizadas no abastecimento de várias cidades. Entretanto, este rio recebe uma quantidade significativa de descartes de efluentes urbanos, industriais e resíduos agrícolas, que vêm comprometendo a qualidade de suas águas. Dentre os vegetais superiores, a espécie *Allium cepa* tem sido muito utilizada em avaliações do potencial tóxico de amostras ambientais, principalmente de ambientes aquáticos. Devido a grande importância do rio Corumbataí para o abastecimento público da região, o presente estudo avaliou os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de amostras de água e de sedimentos deste recurso hídrico, por meio de bioensaios de índice mitótico, aberrações cromossômicas e micronúcleos, tanto em células meristemáticas como F_1 de *A. cepa*. Também foi avaliada a persistência dos efeitos dos contaminantes das águas e sedimentos sobre o organismo teste, após um período de recuperação de 48 horas em água ultra pura. Foram realizadas duas coletas, sendo uma na estação chuvosa e quente e outra na estação seca e fria. As amostras foram coletadas em quatro pontos distintos do rio Corumbataí: P1) à montante da cidade de Rio Claro; P2) à jusante da cidade de Rio Claro; P3) à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4) à montante da cidade de Piracicaba. Foi observado que as sementes expostas às amostras de água *in natura* tiveram a inibição quase completa de germinação e de crescimento das raízes, evidenciando a alta toxicidade das amostras. Todavia, as amostras de água diluídas na proporção 1:2 (v:v, amostra de água/água ultra pura, respectivamente) não apresentaram alterações para os testes de germinação. O mesmo ocorreu para as amostras de sedimento, onde as sementes somente germinaram quando essas amostras foram misturadas com areia de sílica na proporção 1:1. Para as análises com a água, foram observados resultados significativos de genotoxicidade para as amostras coletadas na estação seca, nos pontos P2, P3 e P4. Para as amostras de sedimentos, foram evidenciados resultados significativos de genotoxicidade e mutagenicidade para as amostras coletadas na estação chuvosa, nos pontos P2 e P3. Os resultados sugerem que existe um comprometimento da água do rio a partir das cidades de Rio Claro e Santa Gertrudes, provavelmente ao fato do P2 e P3 se localizarem próximos a lançamentos de efluentes industriais e domésticos destas cidades.

Palavras-chave: aberrações cromossômicas, micronúcleos, biomonitoramento ambiental, efluentes domésticos, efluentes industriais, agrotóxicos

ABSTRACT

Potentially toxic substances that are released into the environment are the main factor of contamination in water bodies. Those substances can interact with the water column, accumulate and also contaminate sediments. Such contamination can cause adverse effects to the exposed organisms and may represent a danger not only to the aquatic organisms, but also to the whole ecosystem. The Corumbataí River Basin plays an important role in the economy of São Paulo State (Brazil) since Corumbataí River serves as a source of water supply for many municipalities. However, this river receives a significant amount of urban, industrial and agricultural discharges, which has been compromising the quality of its waters. Among the higher plants, the species *Allium cepa* has been widely used to evaluate the toxic potential of environmental samples, mainly for aquatic environments. Due to its importance for public water supply in the region, this study aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of water and sediments samples from this water resource, by bioassays performed with the test organism *A. cepa*. This way, mitotic index, chromosomal aberrations and micronuclei, were investigated for both, meristematic and F1 cells. The persistence of effects induced by water and sediments contaminants were also evaluated on this test organism after a recovery period of 48 hours, in ultra pure water. Two sampling campaigns were performed, one in the warm and rainy season and the other in the cold and dry season. Samples were collected in Corumbataí River, in four different sites: P1) upstream the municipality of Rio Claro, P2) downstream the municipality of Rio Claro; P3) downstream the confluence of Corumbataí River and Ribeirão Claro; P4) upstream the municipality of Piracicaba. According to the obtained results, it was possible to observe that seeds exposed to raw water samples almost completely inhibited germination and growth of roots, demonstrating the high toxicity of the samples. However, water samples diluted in a ratio of 1:2 (v:v, water sample/ultra pure water, respectively) showed no changes for germination tests. The same was recorded for sediment samples, where seeds germinated only when these samples were mixed with silica sand, in a ratio of 1:1. Significant genotoxic effects for water samples collected in the dry season were observed in points P2, P3 and P4. For sediment samples collected in the rainy season, genotoxic and mutagenic effects were recorded for points P2 and P3. Results suggest that there is a major toxic potential of Corumbataí River waters, nearby Rio Claro and Santa Gertrudes, in points P2 and P3, probably due to the influence of discharges of industrial and domestic effluents from these municipalities.

Keywords: chromosomal aberrations, micronuclei, environmental biomonitoring, domestic sewage, industrial effluents, pesticides.

1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental, que pode ser de origem química, física ou biológica, pode promover severas alterações nos ecossistemas e danos graves aos organismos vivos. Uma das principais causas da poluição ambiental é a poluição por químicos que chegam ao ambiente acidentalmente, intencionalmente ou ainda de forma natural. Esses contaminantes podem ser transportados e/ou concentrados em diversos compartimentos do ambiente, como ar, águas superficiais e subterrâneas, sedimentos e solos (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB, 2013). Dentre todos os ecossistemas, os aquáticos são os que mais sofrem com os impactos das atividades humanas (MOZETO; ZAGATTO, 2006). Os poluentes químicos mais impactantes para esses ambientes são os agroquímicos (MIRLEAN et al., 2002; TREPÓS et al., 2012), os químicos industriais (HENDRYX et al., 2012), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (CELINO et al., 2010), os metais (VENKATRAMREDDY et al., 2009) e os efluentes urbanos (CHEN et al., 2013).

A água é a substância mais importante para a vida, e a água doce, particularmente, a mais importante para os organismos dos ecossistemas continentais (BARON et al., 2002; GLEICK et al., 2008). Este bem natural deve ser preservado ou, dependendo das suas condições, recuperado, para assim, assegurarmos a qualidade ambiental e, conseqüentemente, a vida do planeta.

O lançamento de poluentes no meio aquático pode comprometer tanto a qualidade como a disponibilidade das águas para os seres vivos. Por esse motivo, a contaminação dos recursos hídricos vem chamando a atenção da comunidade científica, pois ainda não dispomos de ferramentas eficientes para a completa remoção dos poluentes desses ambientes.

O sedimento aquático é uma matriz extremamente complexa, formada a partir de uma mistura da argila, areia, sais minerais e matéria orgânica depositada logo abaixo da coluna d'água dos recursos hídricos (ARAÚJO et al., 2006). A contaminação dos sedimentos dos ambientes aquáticos ocorre a partir do acúmulo de poluentes nestes compartimentos. Os sedimentos servem de reservatórios de poluentes que são lançados na coluna d'água (SANZ-LÁZARO; MARÍN, 2009; MIRELES et al., 2011, WETZEL et al., 2013), sendo considerados fontes secundárias de contaminação do meio aquático (LEE et al., 2000; BURTON; LANDRUM, 2003). Os contaminantes adsorvidos nos sedimentos podem retornar à

coluna d'água e desempenhar um papel muito importante na contaminação do ecossistema aquático (PELUSO et al., 2013). Além disso, contaminantes presentes nos sedimentos podem apresentar concentrações maiores do que as concentrações originalmente presentes na coluna d'água (CHAPMAN et al., 1989, YI et al., 2008). No entanto, pouca atenção tem sido dada aos poluentes associados aos sedimentos (BURTON, 2002), o que torna a maioria das avaliações dos recursos hídricos incompleta. Desta forma, para se obter resultados mais consistentes e seguros sobre as contaminações aquáticas, é necessário que sejam avaliadas ambas as fases dos sistemas hídricos (água e sedimentos).

Os contaminantes ambientais, além de induzirem efeitos deletérios gerais, podem interagir com a molécula de DNA, levando a efeitos adversos, como alteração das vias de reparo, alterações cromossômicas e mutações, que podem desencadear, dentre outros efeitos, processos neoplásicos (PRESTON; HOFFMANN, 2001; PEREIRA et al., 2007).

Os estudos de genética toxicológica têm como objetivo prever e monitorar os efeitos de agentes genotóxicos, mutagênicos e, até carcinogênicos, além de serem necessários para o entendimento do modo de ação desses agentes sob os organismos expostos (OHE et al., 2004). Já os bioensaios são ferramentas importantes para avaliar as possíveis respostas dos organismos, quando estes estão expostos a xenobiontes (RIZZO, 2011).

Muitos vegetais superiores são frequentemente utilizados para o monitoramento de contaminantes do meio ambiente (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; FERNANDES et al., 2009; LEME; MARIN-MORALES, 2009; 2010; MAZZEO et al, 2010; 2011). Dentre as plantas utilizadas em análise ambiental, a espécie *Allium cepa* se destaca pela sua eficiência de resposta a diversos agentes (GRANT, 1994; 1999), sendo, por isso, considerada um modelo eficiente para avaliação de contaminação terrestre e aquática (LEME; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

Apesar dos organismos vegetais apresentarem diferenças metabólicas, em relação aos animais, pode haver uma correlação de até 82% entre os ensaios realizados com *A. cepa* e com animais (FISKESJO, 1993, 1994; RANK; NIELSEN 1994). Os ensaios com *A. cepa*, realizados a partir de amostras ambientais, foram também considerados mais sensíveis que o teste de Ames (RANK; NIELSEN, 1994) e que *Vicia faba* (MA et al., 1995; MIGID et al., 2007), e podem ser utilizados para

avaliar diferentes *endpoints* como: (1) citotoxicidade - obtida a partir de parâmetros como índice mitótico (IM) e parâmetro de proliferação celular (GADANO et al., 2002); (2) genotoxicidade - obtida a partir da certificação da indução de aberrações cromossômicas (AC) e de alterações nucleares; e (3) mutagenicidade – obtida a partir da análise de indução de micronúcleos e de fragmentos cromossômicos. (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além disso, esses testes podem fornecer um rápido diagnóstico sobre os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos de amostras ambientais (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985, 1988, 1993; GRANT, 1994; NIELSEN; RANK, 1994; SMAKA-KINCL et al., 1996; LEME; MARIN-MORALES, 2008, LEME et al., 2008).

Pela aplicabilidade dos bioensaios de *A. cepa*, estes testes são utilizados, com sucesso, por muitos autores que realizam biomonitoramento de áreas impactadas (KOVALCHUCK et al., 1998; RANK; NIELSEN, 1998; MASOOD; MALIK, 2003; MATSUMOTO et al., 2005; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008, 2011; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; BLAGOJEVIC et al., 2009; LEME; MARIN-MORALES, 2008; 2009; SOUZA et al., 2009; ALVIM et al., 2011; BIANCHI et al., 2011; LEME et al., 2012; NETTO et al., 2013; POHREN et al., 2013; SOUZA et al., 2013; RADIC et al., 2014;).

A sub-bacia do rio Corumbataí representa uma área de grande interesse econômico e ambiental do estado de São Paulo e ocupa uma posição de destaque no abastecimento hídrico público da região, abastecendo várias cidades, dentre elas o município de Rio Claro e de Piracicaba (CARMONA et al., 2004). Contudo, essa região possui diversos problemas ambientais, decorrentes da falta de planejamento de ocupação humana. Nesta bacia, grandes áreas são ocupadas por monocultura de cana-de-açúcar e por pastagens, além de ter um alto desenvolvimento industrial e uma concentração urbana intensa, atividades estas consideradas potencialmente poluidoras (FREDERICE et al., 2010).

Levando em consideração a importância do rio Corumbataí para a região, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de amostras de água e de sedimentos deste rio, por meio de bioensaios de índice mitótico, aberrações cromossômicas e de micronúcleos tanto em células meristemáticas como na região F_1 de *A. cepa*. Neste trabalho também foi investigada a possibilidade de persistência dos efeitos dos contaminantes presentes nas amostras de água e sedimentos, após a normalização das condições

ambientais, por meio de ensaios de recuperação, expondo os organismos testes, por 48 horas, em água ultra pura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material biológico

O material biológico usado nos ensaios foram utilizadas sementes da espécie *A. cepa* (variedade Baia-Periforme), por apresentar homogeneidade fisiológica e genética (LEME; MARIN-MORALES, 2009) e por serem de fácil obtenção durante o ano todo.

2.2. Área de estudo e pontos de coleta

A bacia hidrográfica do rio Corumbataí é uma das sub-bacias do rio Piracicaba, localizada na região do Médio Tietê, nas latitudes 22°04'46"S e 22°41'28"S e longitudes 47°26'23"W e 47°56'15"W. Esta sub-bacia, que compreende, parcialmente ou totalmente, os municípios de Analândia, Itirapina, Corumbataí, Rio Claro, Ipeúna, Santa Gertrudes, Cordeirópolis, Charqueada e Piracicaba (VALENTE, 2001), é composta por cinco sub-bacias: (1) Passa Cinco; (2) Baixo Corumbataí; (3) ribeirão Claro; (4) Alto Corumbataí e (5) Médio Corumbataí (VALENTE, 2001).

Foram coletadas amostras de água e sedimentos em quatro pontos distintos do rio Corumbataí, pontos esses localizados no Médio e no Baixo Corumbataí, próximos às cidades de Rio Claro, Santa Gertrudes e Piracicaba (Figura 1 e Tabela 1), como segue:

(P1) ponto à montante do município de Rio Claro;

(P2) ponto à jusante de município de Rio Claro;

(P3) ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o ribeirão Claro;

(P4) ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o rio Piracicaba.



Figura 1: Esquema ilustrativo dos quatro pontos de coleta. (1) P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; (2) P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; (3) P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; (4) P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 1: Coordenadas geográficas dos pontos de coleta.

PONTOS DE COLETA	LATITUDE (S)	LONGITUDE (W)
P1	22°23.205'	47°32.753'
P2	22°25.343'	47°35.614'
P3	22°29.076'	47°35.600'
P4	22°30.917'	47°37.467'

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

2.3. Coleta e preparo das amostras

Foram realizadas duas coletas durante o estudo, sendo uma durante a estação chuvosa e quente (fevereiro de 2013) e outra durante a estação seca e fria (julho de 2013). As coletadas de água foram realizadas com o auxílio de baldes de aço inoxidável e frascos de vidro, enquanto que as amostras dos sedimentos foram feitas com o auxílio de uma draga de Ekman-birge (para coleta da camada superficial de sedimento). Tanto as amostras de água quanto as de sedimentos foram homogeneizadas para a retirada de uma amostra composta, cujo volume final

foi de 4 L para a água e de 2 Kg, para o sedimento. Este volume final, tanto para as amostras de água quanto para as amostras de sedimento, foi acondicionado em frasco escuro e mantido sob-refrigeração, para ser posteriormente transportado para o laboratório, onde as amostras foram mantidas a 4°C, até serem utilizadas nos bioensaios.

2.3.1 Dados térmicos e pluviométricos dos meses das coletas

Os dados térmicos e pluviométricos da região em estudo, para os períodos considerados, foram obtido junto Centro de Análise de Planejamento Ambiental (CEAPLA) do Instituto de Geociências da UNESP de Rio Claro.

2.4. Análises físico-químicas e químicas

As análises físico-químicas foram realizadas com o auxílio do equipamento Horiba®, considerando os parâmetros: pH, temperatura, salinidade, condutividade, turbidez, oxigênio dissolvido e sólidos totais dissolvidos.

Foram realizadas análises químicas das amostras de água, para avaliar a presença e a concentração de metais e de compostos inorgânicos, além da concentração de carbono, no Laboratório de Estudo de Bacias (LEBAC), Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas – UNESP – Rio Claro, em convênio com o UFZ - Helmholtz Centre for Environmental Research GmbH, Leipzig, Alemanha.

2.5. Ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em *Allium cepa*

As sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em dois tipos de ensaios: um em amostras de água e o outro em amostras do sedimento do rio Corumbataí. O controle positivo foi realizado com sementes expostas à germinação em metil-metanosulfonato (MMS – 4×10^{-4} M) e o controle negativo foi realizado com sementes submetidas à germinação em água ultra pura. Todos os ensaios foram realizados em estufa a 20 °C.

Para todos os ensaios com *A. cepa*, foram realizados ensaios de recuperação, colocando as raízes previamente expostas nas amostras de água e sedimento, em água ultra pura por 48 horas, para avaliar a persistência da ação dos contaminantes presentes nas amostras (água e sedimento) do rio Corumbataí.

Após a germinação das sementes, as raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético - v/v), por 6 a 18 horas, em duas situações: após 120 horas de exposição às amostras de água e de sedimento, e após o período de recuperação de 48 horas em água ultra pura.

Para a realização das análises de índice mitótico (IM), aberrações (AC) cromossômicas e de micronúcleo (MN), as raízes, previamente fixadas, foram submetidas a uma hidrólise ácida (HCl 1N a 60° C) por 8-9 minutos, seguido de tripla lavagem em água destilada. Após a hidrólise, as raízes foram submetidas à reação de Feulgen, utilizando o reativo de Schiff por 2 horas em local escuro. Após lavagem das raízes, até a total retirada do corante, foram confeccionadas lâminas pela técnica de esmagamento suave, utilizando tanto as regiões meristemáticas como as F₁ das raízes (1 mm acima da região meristemática). As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e, após secagem por 24 horas, as lâminas foram montadas em resina Enthellan®. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz, aumento de 400 vezes.

Para as análises de citotoxicidade, foi avaliado o número de células em divisão, para todos os ensaios realizados. Esses dados foram usados para calcular Índice Mitótico (IM), conforme segue:

$$IM = \frac{N^{\circ} \text{ de células em divisão} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de células observadas}}$$

Para as análises de genotoxicidade, foi avaliada a ocorrência de aberrações cromossômicas, por meio da contabilização das células que apresentaram anormalidades celulares do tipo aderências cromossômicas, C-metáfase, pontes cromossômicas, anáfases multipolares e perdas cromossômicas. Com esses resultados, foram calculados os índices de Alterações Cromossômicas (IAC), conforme segue:

$$IAC = \frac{N^{\circ} \text{ de células alteradas} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de células observadas}}$$

Para as análises de mutagenicidade, em células meristemáticas, foi avaliada a ocorrência de micronúcleos e de quebras cromossômicas, pela contabilização das

células que apresentaram tais anormalidades celulares. Com esses resultados, foram calculados os Índices de Mutagenicidade – células meristemáticas (IMt), conforme segue:

$$IMt = \frac{N^{\circ} \text{ de células alteradas} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de células observadas}}$$

Para as análises de mutagenicidade, em células F_1 , foi avaliada a ocorrência de micronúcleos, pela contabilização das células que apresentaram tais anormalidades celulares. Com esses resultados, foram calculados os Índices de Mutagenicidade – células F_1 (IMt F_1), conforme segue:

$$IMtF_1 = \frac{N^{\circ} \text{ de células } F_1 \text{ alteradas} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de células } F_1 \text{ observadas}}$$

Para todos os tratamentos foram realizadas 3 réplicas, onde foram analisadas 5 lâminas por réplica, contabilizando 2.500 células por réplica e totalizando 7.500 células por tratamento. As comparações estatísticas foram feitas entre os resultados dos testes com os do controle negativo (CN) e entre as amostras de água ou sedimento de um mesmo ponto. Foi aplicado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Dados térmicos e pluviométricos dos meses das coletas

Quadro 1: Média dos valores de temperatura e precipitação para os meses de coleta das amostras

PARÂMETROS	FEVEREIRO/2013	JULHO/2013
TEMPERATURA	23,5 °C	16,5 °C
PRECIPITAÇÃO	197,4 mm	49,7 mm

3.2. Análises físico-químicas e químicas

As tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 apresentam os resultados das análises químicas e físico-químicas, realizadas com as amostras de água coletadas no rio Corumbataí, nos pontos P1, P2, P3 e P4.

Durante a coleta de julho/2013 (estação seca e fria) foi possível observar que existe neste ponto a emissão de um efluente clandestino no P2 (Figura 2). Na coleta de fevereiro/2013 (estação chuvosa e quente), contudo, não foi observado este despejo, pois os níveis da água do rio nesta estação estavam altos, o que impossibilitou a visualização deste lançamento.

Durante ambas as coletas, foi evidenciado um forte odor de matéria em decomposição nas águas do P3, sendo que este odor foi ainda mais intenso na coleta realizada na estação seca (julho/2013). Ainda na estação seca, foi observada no P3 a presença de materiais flutuantes nas águas do rio como óleos, graxas e espumas (Figuras 3A e 3B). É importante salientar que, de acordo com a classificação estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA - resolução 357/05), este rio é classificado como de Classe 2, classe esta não compatível com os contaminantes encontrados nas suas águas. Neste ponto (P3), também foi evidenciada a presença de lixo nas margens do rio (Figuras 3C e 3D).

Os valores de turbidez foram maiores que os máximos permitidos (até 100 UNT), para todos os pontos da coleta de fevereiro/2013 (estação chuvosa e quente) e para P2 e P3 da coleta de julho/2013 (estação seca e fria) (Tabelas 2 e 5) (CETESB, 2009).

O oxigênio dissolvido apresentou valores inferiores ao mínimo essencial para a manutenção da vida aquática (5mg/L resolução CONAMA 357/05) em P3 e P4 da coleta de fevereiro/2013 (estação chuvosa e quente) e para todos os pontos da coleta de julho/2013 (estação seca e fria) (Tabelas 2 e 5).

Para os parâmetros químicos inorgânicos (Tabelas 3 e 6) e para a quantificação de metais (Tabelas 4 e 7), não foram evidenciados valores acima dos valores máximos estabelecidos pela legislação (resolução CONAMA 357/05), para nenhum ponto avaliado do rio Corumbataí.

Os valores de pH, registrados para as amostras de água coletadas nos pontos P1, P2 e P4, em julho/2013 (estação seca e fria), apresentaram-se fora dos limites estabelecidos para corpos hídricos de água doce (6,0 a 9,0 - resolução CONAMA 357/05) (Tabela 5).

Os valores de condutividade das amostras de P3, para as duas coletas realizadas, apresentaram-se acima do valor máximo permitido (100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ – CETESB 2009), sendo ainda mais elevado na estação seca (Tabelas 2 e 5).

Para as análises de Carbono Orgânico Total (COT), foram evidenciados valores muito altos para todos os pontos, em todas as coletas realizadas (acima de 500 ppm), embora a resolução CONAMA 357/05 não especifique um valor máximo permitido para este parâmetro para as águas doces. Assim, o valor foi considerado alto, pois a mesma legislação prevê um valor aceitável para águas salinas e salobras da ordem de 2 a 5 ppm de COT (Tabela 8).

3.3. Bioensaio com *Allium cepa*

A figura 4 ilustra células normais e as alterações cromossômicas e nucleares encontradas nos bioensaios realizados com a espécie *A. cepa*, fatores estes indicadores de ação genotóxica e mutagênica das amostras de água e de sedimentos avaliados neste trabalho.

3.3.1 Amostras de água

Os ensaios realizados com as amostras de água coletadas nos diversos pontos do rio Corumbataí, para os dois períodos avaliados (fevereiro de 2013 e julho de 2013), revelaram que essas amostras inibiram a germinação das sementes. Deste modo, para o desenvolvimento dos bioensaios de germinação, foi necessário diluir as amostras de água em água ultra pura, primeiramente na proporção de 1:1, que também não se mostrou adequada para a germinação das sementes, e depois na proporção de 1:2, diluição esta que se mostrou adequada para a realização dos testes de germinação.

Para as amostras de água coletadas em fevereiro/2013 (estação chuvosa e quente), não foram observados resultados significativos para os parâmetros avaliados (citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade), quando comparados com o controle negativo (Tabelas 9 e 10). Para as amostras de água coletadas em julho/2013 (estação seca e fria), foram observados resultados significativos para genotoxicidade em P2, P3 e P4 (Tabela 11), para os ensaios sem recuperação. Após o período de recuperação de 48 horas em água ultra pura, o potencial genotóxico das amostras de P2 e P3 foi reduzido, enquanto que o de P4 ainda se manteve alto (Tabela 12). As amostras em P1, que não apresentaram resultados

significativos nos ensaios de exposição direta nas amostras (Tabela 11), induziram genotoxicidade, após o período de recuperação em água ultra pura (Tabela 12).

3.3.2 Amostras de sedimentos

Para os ensaios de germinação realizados com as amostras de sedimento de todos os pontos avaliados, coletados nos dois períodos de análise (fevereiro de 2013 e julho de 2013), foi também observada uma inibição da germinação das sementes de cebola. Assim, para o desenvolvimento dos bioensaios, foi necessário realizar uma mistura das amostras dos sedimentos com areia de sílica, na proporção 1:1, que se mostrou adequada para a realização do teste com os sedimentos.

Para as amostras de sedimentos coletadas em fevereiro/2013 (estação chuvosa e quente), foram observados resultados significativos para genotoxicidade e mutagenicidade nos pontos P2 e P3, quando comparados com o controle negativo (Tabela 9). As sementes que germinaram em P3, após o período de recuperação de 48 horas em água ultra pura, apresentaram um aumento no seu potencial genotóxico e mutagênico. Contudo, em P2, após o mesmo período de recuperação, houve a manutenção do potencial genotóxico e uma diminuição do potencial mutagênico da amostra (Tabela 10).

Para as amostras de sedimentos coletadas em julho/2013 (estação seca e fria), não foram observados resultados significativos de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, quando comparados com os resultados do controle negativo (Tabelas 11 e 12).

3.3.3 Comparação dos resultados obtidos entre as amostras de água e sedimentos

Para a coleta realizada em fevereiro/2013 (estação chuvosa e quente), as amostras de sedimento em P3 apresentaram diferença significativa em relação a alguns dos parâmetros avaliados (genotoxicidade e mutagenicidade), para as amostras de água do mesmo ponto (P3), tanto nos ensaios de exposição direta nas amostras (sem recuperação) como nos ensaios de recuperação (Tabelas 9 e 10).

Para a coleta realizada em julho/2013 (estação seca e fria), quando foram comparados os resultados obtidos com as amostras de água e as dos sedimentos, foi observado que as amostras de água de P2, P3 e P4 apresentaram diferença significativa em relação às amostras de sedimento, para alguns dos parâmetros

avaliados (genotoxicidade e mutagenicidade), para os ensaios de exposição direta (sem recuperação) (Tabela 11). Após o período de recuperação, somente foram mantidas as diferenças significativas entre os valores de água e sedimento para P3 e P4 (Tabela 12).

3.3.4 Comparação da indução de MN em células F_1 entre as amostras de água e sedimento

Para a coleta realizada em fevereiro/2013 (estação chuvosa e quente), não foram encontrados valores significativos de mutagenicidade em células F_1 para as amostras de água. Entretanto, a amostra de sedimento do P3 apresentou, para as células F_1 , valores significativos de mutagenicidade (Tabela 2), tanto para os ensaios com recuperação como sem recuperação (Tabela 3).

Para a coleta realizada em julho/2013 (estação seca e fria), não foram registrados valores significativos de mutagenicidade em células F_1 para nenhuma amostra avaliada (Tabelas 4 e 5).

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos das amostras de água do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) (fevereiro de 2013).

AMOSTRAS	Temperatura °C	pH	Condutividade μS/cm	Turbidez NTU	Oxigênio Dissolvido (OD) mg/L	Sólidos Totais Dissolvidos (STD) mg/L
P1	22,74	6,44	67	142	5,41	43
P2	22,96	6,43	38	154	5,03	25
P3	24,07	7,51	108	135	4,92	70
P4	23,31	6,32	54	146	4,42	35

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 3: Parâmetros Inorgânicos das amostras de água do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) (fevereiro de 2013.)

AMOSTRAS	F ⁻ mg/L	Cl ⁻ mg/L	NO ₂ ⁻ mg/L	NO ₃ ⁻ mg/L	PO ₄ ³⁻ mg/L	SO ₄ ²⁻ mg/L	C ₂ O ₄ ²⁻ mg/L	Acetato mg/L	ClO ₂ ⁻ mg/L	Br ⁻ mg/L	Li mg/L	Na mg/L	NH ₄ mg/L	K mg/L
P1	< 0,010	2,27	<0,020	1,79	< 0,080	1,84	< 0,10	< 0,25	< 0,015	<0,020	< 0,10	3,75	0,50	2,33
P2	0,016	3,14	<0,020	1,96	< 0,080	2,51	< 0,10	< 0,25	< 0,015	<0,020	< 0,10	4,43	0,55	2,41
P3	0,017	5,08	<0,020	1,89	< 0,080	5,06	< 0,10	< 0,25	< 0,015	<0,020	< 0,10	5,27	1,08	2,74
P4	0,029	6,16	0,15	3,41	< 0,080	18,3	< 0,10	< 0,25	< 0,015	<0,020	< 0,10	8,78	0,86	2,46

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 4: Quantificação de metais das amostras de água do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) (fevereiro de 2013).

AMOSTRAS	Al mg/L	Ba mg/L	Ca mg/L	Cd mg/L	Co mg/L	Cr mg/L	Cu mg/L	Fe mg/L	Mg mg/L	Mn mg/L	Ni mg/L	P mg/L	Pb mg/L	Si mg/L	Sr mg/L	Zn mg/L
P1	0,11	0,52	6,56	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	0,36	2,15	0,16	< 0,003	0,058	< 0,005	5,39	0,060	0,26
P2	0,14	0,49	0,49	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	0,35	2,51	0,14	< 0,003	0,041	< 0,005	5,58	0,069	0,27
P3	0,16	0,30	0,30	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	0,36	2,81	0,23	< 0,003	0,033	< 0,005	5,42	0,076	0,16
P4	0,16	0,29	0,29	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	0,31	3,83	0,12	< 0,003	0,090	< 0,005	5,31	0,082	0,17

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 5: Parâmetros Físico-químicos das amostras de água do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) (julho de 2013).

AMOSTRAS	Temperatura °C	pH	Condutividade $\mu\text{S/cm}$	Turbidez NTU	Oxigênio Dissolvido (OD)mg/L	Sólidos Totais Dissolvidos (STD)mg/L
P1	17,58	5,72	53	7,3	4,61	34
P2	16,92	4,40	45	130	4,38	30
P3	17,34	6,13	154	112	4,69	100
P4	17,52	4,77	60	26,9	4,12	40

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 6: Parâmetros Inorgânicos das amostras de água do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) (julho de 2013).

AMOSTRAS	F ⁻ mg/L	Cl ⁻ mg/L	NO ₂ ⁻ mg/L	NO ₃ ⁻ mg/L	PO ₄ ³⁻ mg/L	SO ₄ ²⁻ mg/L	C ₂ O ₄ ²⁻ mg/L	Acetato mg/L	ClO ₂ ⁻ mg/L	Br ⁻ mg/L	Li mg/L	Na mg/L	NH ₄ mg/L	K mg/L
P1	< 0,010	2,31	< 0,020	4,08	1,99	1,24	< 0,10	1285	< 0,015	< 0,030	< 0,010	3,09	0,70	0,97
P2	0,087	6,48	0,15	5,06	2,02	3,02	0,33	1118	< 0,015	< 0,030	< 0,010	6,80	2,01	1,56
P3	0,12	11,1	< 0,020	2,44	2,31	6,90	0,87	1310	< 0,015	< 0,030	< 0,010	11,5	3,73	2,11
P4	0,15	14,1	0,30	5,36	2,64	24,7	0,95	1312	< 0,015	< 0,030	< 0,010	18,9	3,80	2,34

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 7: Quantificação de metais das amostras de água do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) (julho de 2013).

AMOSTRAS	Al mg/L	Ba mg/L	Ca mg/L	Cd mg/L	Co mg/L	Cr mg/L	Cu mg/L	Fe mg/L	Mg mg/L	Mn mg/L	Ni mg/L	P mg/L	Pb mg/L	Si mg/L	Sr mg/L	Zn mg/L
P1	0,051	0,095	4,17	< 0,005	< 0,003	< 0,003	0,006	0,20	1,53	0,033	< 0,003	0,021	< 0,005	6,23	0,042	0,075
P2	0,11	0,099	8,89	< 0,005	< 0,003	< 0,003	0,010	0,22	2,10	0,056	< 0,003	0,12	< 0,005	6,41	0,064	0,56
P3	0,075	0,094	8,55	< 0,005	< 0,003	< 0,003	0,005	0,30	2,33	0,078	< 0,003	0,11	< 0,005	6,53	0,067	0,53
P4	0,078	0,083	10,0	< 0,005	< 0,003	< 0,003	0,012	0,27	3,39	0,072	< 0,003	0,12	< 0,005	6,92	0,077	0,86

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 8: Quantificação de carbono orgânico total (COT) das amostras de água do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) (fevereiro e julho de 2013).

AMOSTRAS	COT ppm * FEV/2013	COT ppm * JUL/2013
P1	848	732
P2	578	744
P3	740	903
P4	783	830

* Limite de detecção = 0,60ppm e Limite de quantificação=2,00ppm



Figura 2: Ocorrência de despejo de efluente próximo ao P2



Figura 3: (A) Presença de óleos e graxas em P3; (B) Ocorrência de espuma em P3; (C) e (D) Presença de lixo nas margens do rio em P3.

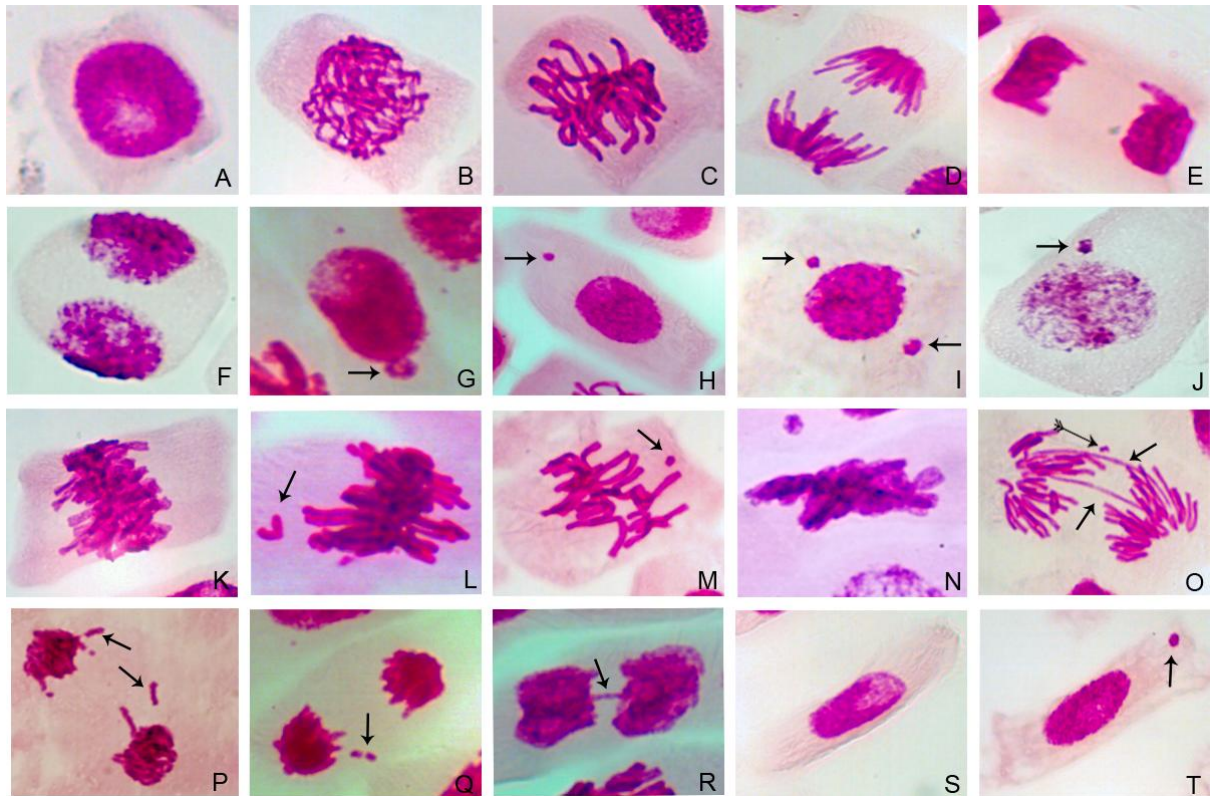


Figura 4: Células meristemáticas normais (A a E); Células meristemáticas portadoras de alterações (F a R); Células F_1 (S e T); Interfase; (A) Prófase (B); Metáfase (C); Anáfase (D); Telófase (E); Célula Binucleada (F); Célula com de broto nuclear, indicado pela ponta da seta (G); Interfase com micronúcleo, indicado pela ponta da seta (H); Interfase com dois micronúcleos, indicados pelas pontas das setas (I); Prófase com um micronúcleo, indicado pela ponta da seta (J); Metáfase poliploide (K); Metáfase com perda cromossômica (L); Metáfase com quebra cromossômica, indicada pela ponta da seta (M); Metáfase com aderência cromossômica (N); Anáfase com duas pontes, indicadas pelas pontas das setas e uma quebra cromossômica, indicada pela ponta da seta diferenciada (O); Telófase com duas perdas cromossômicas (P); Telófase com quebras cromossômicas (Q); Telófase com ponte cromossômica (R); Célula F_1 normal (S) e Células F_1 com micronúcleo (T).

Tabela 9: Média, Desvio Padrão ($\pm$ DP) e frequência (FRQ.) de índice mitótico (IM), aberrações cromossômicas (IAC), micronúcleos + quebras (IMt) e micronúcleos de células F_1 (IMt F_1), em células de *Allium cepa* expostas as amostras de água e de sedimento do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) sem período de recuperação (fevereiro de 2013).

AMOSTRAS		CITOTOXICIDADE			GENOTOXICIDADE			MUTAGENICIDADE			MUTAGENICIDADE F_1		
		MÉDIA	$\pm$ DP	IM	MÉDIA	$\pm$ DP	IAC	MÉDIA	$\pm$ DP	IMt	MÉDIA	$\pm$ DP	IMt F_1
CONTROLES	CN	155,13	$\pm$ 20,80	31,02	1,20	$\pm$ 0,41	0,24	1,33	$\pm$ 0,49	0,26	1,60	$\pm$ 0,63	0,32
	CP	115,67 a	$\pm$ 11,08	23,13 a	18,00 a	$\pm$ 0,93	3,6 a	17,13 a	$\pm$ 2,70	3,42 a	12,40 a	$\pm$ 2,41	2,48 a
ÁGUA	P1	155,47	$\pm$ 7,33	31,09	1,60	$\pm$ 0,51	0,32	1,73	$\pm$ 0,80	0,34	1,73	$\pm$ 0,80	0,34
	P2	141,27	$\pm$ 16,09	28,25	1,67	$\pm$ 0,62	0,33	1,93	$\pm$ 0,70	0,38	2,00	$\pm$ 0,85	0,40
	P3	151,20	$\pm$ 15,90	30,24	1,73	$\pm$ 0,46	0,34	2,13	$\pm$ 0,74	0,42	2,33	$\pm$ 0,49	0,46
	P4	152,67	$\pm$ 13,83	30,53	1,60	$\pm$ 0,63	0,32	1,73	$\pm$ 0,88	0,34	1,67	$\pm$ 0,82	0,33
SEDIMENTO	P1	145,07	$\pm$ 6,78	29,01	1,80	$\pm$ 0,56	0,36	2,33	$\pm$ 0,72	0,46	2,07	$\pm$ 0,80	0,41
	P2	147,60	$\pm$ 5,94	29,52	2,20 a	$\pm$ 0,41	0,44 a	2,87 a	$\pm$ 0,83	0,57 a	2,27	$\pm$ 0,59	0,45
	P3	141,40	$\pm$ 13,58	28,28	3,33 a b	$\pm$ 0,62	0,66 a b	3,07 a	$\pm$ 0,88	0,61 a	2,67 a	$\pm$ 0,49	0,53 a
	P4	143,60	$\pm$ 16,28	28,72	1,87	$\pm$ 0,64	0,37	2,00	$\pm$ 0,53	0,40	2,00	$\pm$ 1,20	0,40

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba. Foram realizadas 3 réplicas dos experimentos onde foram analisadas 5 lâminas por réplica, 2.500 células por réplica, totalizando 7.500 células por tratamento. CN: Controle negativo; CP: Controle Positivo; a: Estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$); b: Diferença significativa entre as amostras de água e sedimento de um mesmo ponto avaliado ($p < 0,05$).

Tabela 10: Média (M), Desvio Padrão ($\pm$ DP) e frequência (FRQ.) de índice mitótico (IM), aberrações cromossômicas (IAC), micronúcleos + quebras (IMt) e micronúcleos de células F_1 (IMt F_1), em células de *Allium cepa* expostas as amostras de água e de sedimento do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) com período de recuperação de 48 horas (fevereiro de 2013).

AMOSTRAS		CITOTOXICIDADE			GENOTOXICIDADE			MUTAGENICIDADE			MUTAGENICIDADE F_1		
		MÉDIA	$\pm$ DP	IM	MÉDIA	$\pm$ DP	IAC	MÉDIA	$\pm$ DP	IMt	MÉDIA	$\pm$ DP	IMt F_1
CONTROLES	CN	151.60	$\pm$ 21.25	30.32	1.60	$\pm$ 0.63	0.32	1.47	$\pm$ 0.52	0.29	1.60	$\pm$ 0.74	0.32
	CP	104.73 a	$\pm$ 16.75	20.94 a	19.33 a	$\pm$ 2.32	3.86 a	18.27 a	$\pm$ 3.08	3.65 a	13.53 a	$\pm$ 2.56	2.7 a
ÁGUA	P1	154.80	$\pm$ 13.20	30.96	1.53	$\pm$ 0.52	0.30	1.80	$\pm$ 0.68	0.36	1.60	$\pm$ 0.63	0.32
	P2	153.53	$\pm$ 17.18	30.70	2.07	$\pm$ 0.59	0.41	1.53	$\pm$ 0.52	0.30	1.87	$\pm$ 0.83	0.37
	P3	153.67	$\pm$ 14.64	30.73	2.00	$\pm$ 0.38	0.40	1.67	$\pm$ 0.62	0.33	1.87	$\pm$ 0.64	0.37
	P4	149.73	$\pm$ 14.34	29.94	1.80	$\pm$ 0.56	0.36	1.47	$\pm$ 0.52	0.29	1.73	$\pm$ 0.59	0.34
SEDIMENTO	P1	150.67	$\pm$ 13.56	30.13	1.87	$\pm$ 0.64	0.37	1.73	$\pm$ 0.70	0.34	1.93	$\pm$ 0.70	0.38
	P2	144.13	$\pm$ 13.54	28.82	2.40 a	$\pm$ 0.51	0.48 a	2.27	$\pm$ 0.70	0.45	2.53	$\pm$ 0.52	0.50
	P3	134.60	$\pm$ 17.68	26.92	3.47 a b	$\pm$ 0.52	0.69 a b	3.20 a b	$\pm$ 0.77	0.64 a b	2.60 a	$\pm$ 0.51	0.52 a
	P4	139.80	$\pm$ 15.45	27.96	2.00	$\pm$ 0.53	0.40	2.13	$\pm$ 0.83	0.42	2.33	$\pm$ 0.49	0.46

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba. Foram realizadas 3 réplicas dos experimentos onde foram analisadas 5 lâminas por réplica, 2.500 células por réplica, totalizando 7.500 células por tratamento. CN: Controle negativo; CP: Controle Positivo; a: Estatisticamente diferente do CN ($p < 0.05$); b: Diferença significativa entre as amostras de água e sedimento de um mesmo ponto avaliado ($p < 0,05$).

Tabela 11: Média, Desvio Padrão ($\pm$ DP) e frequência (FRQ.) de índice mitótico (IM), aberrações cromossômicas (IAC), micronúcleos + quebras (IMt) e micronúcleos de células F_1 (IMt F_1), em células de *Allium cepa* expostas as amostras de água e de sedimento do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) sem período de recuperação (julho de 2013).

AMOSTRAS		CITOTOXICIDADE			GENOTOXICIDADE			MUTAGENICIDADE			MUTAGENICIDADE F_1		
		MÉDIA	$\pm$ DP	IM	MÉDIA	$\pm$ DP	IAC	MÉDIA	$\pm$ DP	IMt	MÉDIA	$\pm$ DP	IMt F_1
CONTROLES	CN	164,00	$\pm$ 27,01	32,77	0,47	$\pm$ 0,52	0,09	0,47	$\pm$ 0,52	0,09	0,53	$\pm$ 0,52	0,10
	CP	124,33 a	$\pm$ 22,43	24,86 a	16,53 a	$\pm$ 4,84	3,3 a	15,07 a	$\pm$ 2,81	3,01 a	14,80 a	$\pm$ 2,14	2,96 a
ÁGUA	P1	157,87	$\pm$ 10,66	31,57	1,87	$\pm$ 0,74	0,37	0,67	$\pm$ 0,72	0,13	0,60	$\pm$ 0,51	0,12
	P2	139,47	$\pm$ 16,76	27,89	2,33 a b	$\pm$ 0,72	0,46 a b	0,87	$\pm$ 0,83	0,17	0,47	$\pm$ 0,52	0,94
	P3	139,00	$\pm$ 13,87	27,80	2,67 a b	$\pm$ 0,62	0,53 a b	0,87	$\pm$ 0,83	0,17	0,53	$\pm$ 0,52	0,10
	P4	128,73	$\pm$ 31,34	25,74	2,73 a b	$\pm$ 0,70	0,54 a b	0,67	$\pm$ 0,72	0,13	0,47	$\pm$ 0,52	0,94
SEDIMENTO	P1	130,67	$\pm$ 6,47	26,13	0,47	$\pm$ 0,52	0,09	0,67	$\pm$ 0,72	0,13	0,53	$\pm$ 0,52	0,10
	P2	142,93	$\pm$ 12,69	28,58	0,53	$\pm$ 0,64	0,10	0,40	$\pm$ 0,51	0,08	0,53	$\pm$ 0,52	0,10
	P3	134,93	$\pm$ 7,79	26,98	0,87	$\pm$ 0,74	0,17	0,33	$\pm$ 0,49	0,06	0,33	$\pm$ 0,49	0,06
	P4	142,67	$\pm$ 10,63	28,53	1,00	$\pm$ 0,52	0,20	0,40	$\pm$ 0,51	0,08	0,33	$\pm$ 0,49	0,06

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba. Foram realizadas 3 réplicas dos experimentos onde foram analisadas 5 lâminas por réplica, 2.500 células por réplica, totalizando 7.500 células por tratamento. CN: Controle negativo; CP: Controle Positivo; a: Estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$); b: Diferença significativa entre as amostras de água e sedimento de um mesmo ponto avaliado ($p < 0,05$).

Tabela 12: Média, Desvio Padrão ($\pm$ DP) e frequência (FRQ.) de índice mitótico (IM), aberrações cromossômicas (IAC), micronúcleos + quebras (IMt) e micronúcleos de células F_1 (IMt F_1), em células de *Allium cepa* expostas as amostras de água e de sedimento do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) com período de recuperação de 48 horas (julho de 2013).

AMOSTRAS		CITOTOXICIDADE			GENOTOXICIDADE			MUTAGENICIDADE			MUTAGENICIDADE F_1		
		MÉDIA	$\pm$ DP	IM	MÉDIA	$\pm$ DP	IAC	MÉDIA	$\pm$ DP	IMt	MÉDIA	$\pm$ DP	IMt F_1
CONTROLES	CN	141,20	$\pm$ 12,31	28,24	0,40	$\pm$ 0,51	0,08	0,67	$\pm$ 0,49	0,13	0,53	$\pm$ 0,52	0,10
	CP	107,33 a	$\pm$ 8,93	21,46 a	15,13 a	$\pm$ 3,31	3,02 a	17,73 a	$\pm$ 3,47	3,54 a	13,80 a	$\pm$ 1,57	2,76 a
ÁGUA	P1	135,47	$\pm$ 6,00	27,09	2,07 a	$\pm$ 0,96	0,41 a	1,20	$\pm$ 0,68	0,24	0,53	$\pm$ 0,52	0,10
	P2	140,33	$\pm$ 9,32	28,06	2,07 a	$\pm$ 0,96	0,41 a	1,33	$\pm$ 0,62	0,26	0,47	$\pm$ 0,52	0,09
	P3	141,80	$\pm$ 11,74	28,36	2,53 a b	$\pm$ 0,74	0,50 a b	1,47	$\pm$ 0,64	0,29	0,47	$\pm$ 0,52	0,09
	P4	141,73	$\pm$ 7,92	28,34	2,73 a b	$\pm$ 0,80	0,54 a b	1,40	$\pm$ 0,83	0,28	0,40	$\pm$ 0,51	0,08
SEDIMENTO	P1	132,20	$\pm$ 28,86	26,44	0,87	$\pm$ 0,74	0,17	0,80	$\pm$ 0,77	0,16	0,40	$\pm$ 0,51	0,08
	P2	134,20	$\pm$ 8,89	26,84	0,87	$\pm$ 0,83	0,17	0,73	$\pm$ 0,80	0,14	0,40	$\pm$ 0,51	0,08
	P3	145,00	$\pm$ 6,35	29,00	0,67	$\pm$ 0,72	0,13	0,93	$\pm$ 0,80	0,18	0,40	$\pm$ 0,51	0,08
	P4	141,67	$\pm$ 13,63	28,33	0,73	$\pm$ 0,70	0,14	0,93	$\pm$ 0,70	0,18	0,33	$\pm$ 0,49	0,06

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba. Foram realizadas 3 réplicas dos experimentos onde foram analisadas 5 lâminas por réplica, 2.500 células por réplica, totalizando 7.500 células por tratamento. CN: Controle negativo; CP: Controle Positivo; a: Estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$); b: Diferença significativa entre as amostras de água e sedimento de um mesmo ponto avaliado ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

As amostras de água coletadas em todos os pontos do rio Corumbataí, exibiram uma elevada toxicidade, para ambos os períodos avaliados, sugerindo a presença de contaminantes tóxicos nos locais de estudo, provavelmente decorrentes da emissão de efluentes lançados neste rio. Isto demonstra que efluentes comprometidos com poluentes tóxicos, podem afetar a qualidade da água e, conseqüentemente, a estrutura das comunidades aquáticas, comprometendo assim todos os níveis tróficos dos ecossistemas (HOSS et al., 2011).

Os ensaios, realizados com as amostras puras de água, sugeriram a presença de uma grande quantidade de matéria orgânica nestas águas em decorrência dos valores elevados de COT. De acordo com Wetzel et al. (2013), altas quantidades de matéria orgânica nas águas de um rio, são, muitas vezes, resultantes da contaminação por poluentes orgânicos, que, além de poderem ser muito tóxicos para os organismos vivos, podem também servir como fonte de energia para microorganismos.

Os resultados obtidos pela avaliação realizada com as células meristemáticas de *A. cepa*, expostas às amostras de sedimento de P2 e P3, coletadas na estação chuvosa, apresentaram resultados significativos para genotoxicidade e mutagenicidade. Estes resultados sugerem que, em P3, os contaminantes presentes nos sedimentos, provavelmente, tenham uma ação persistente, pois seus efeitos tóxicos persistiram após o período de recuperação de 48 horas em água ultra pura. Entretanto, em P2, após o período de recuperação, embora o potencial genotóxico da amostra tenha se mantido, o potencial mutagênico decresceu, indicando que as células foram capazes de se recuperar dos danos causados pelos agentes mutagênicos presentes nas amostras coletadas neste ponto do rio.

Neste estudo também foi observado efeitos mutagênicos em células F_1 . Foi possível observar que, em P3, houve a persistência dos danos mutagênicos, após o período de recuperação de 48 horas em água ultra pura, reforçando a persistência de ação dos contaminantes, mesmo após cessar a exposição aos contaminantes.

Os resultados obtidos, tanto para as amostras de água como para as de sedimento, estão de acordo com outros estudos realizados neste mesmo rio, onde outros pesquisadores também encontraram resultados positivos para os efeitos

adversos das amostras testadas (JARDIM, 2004; JARDIM et al.; 2008; MESSIAS, 2008, SANTOS, 2008).

No presente estudo, os danos mais evidentes foram registrados para as amostras de sedimento coletadas nas regiões de influência das cidades de Rio Claro e Santa Gertrudes (P2 e P3), fato este que está de acordo com o estudo de Jardim et al. (2008), onde os autores constataram que os sedimentos, de pontos próximos aos pontos P2 e P3 deste estudo, apresentam um maior efeito tóxico sobre os organismos expostos, do que os pontos de coletas situados mais próximo da montante deste rio.

O estudo de Santos (2008), também verificou um aumento de efeitos genotóxicos em *A. cepa*, para amostras de sedimento do rio Corumbataí. No entanto, esses autores não avaliaram os efeitos de amostras brutas, mas sim de extratos preparados a partir das amostras. De acordo com Leme (2007), os processos de produção dos extratos de amostras de sedimentos, podem acarretar em perdas de elementos durante a obtenção dos extratos, sugerindo que, para a obtenção de dados mais confiáveis, deve-se utilizar o sedimento bruto como substrato para germinação das sementes de *A. cepa*. Desta maneira, os ensaios realizados com as amostras de sedimentos brutos, no presente estudo, conferem resultados fiéis à realidade da qualidade do rio, por se caracterizarem em ensaios de evidência de resposta direta do organismo, frente à exposição aos contaminantes presentes nas amostras.

Os resultados positivos obtidos para o potencial genotóxico e mutagênico com as amostras de sedimentos, também podem representar um perigo para as comunidades bentônicas deste recurso hídrico, pois estas comunidades estão em contato direto com os sedimentos contaminados e podem estar sujeitas tanto a processos de bioacumulação desses contaminantes em seus tecidos (VAN DEN BERG et al., 1998; CHEN; WHITE, 2004), quanto a efeitos nocivos ao seu crescimento, à sua saúde e a reprodução (SKEI et al., 1996).

Os ensaios realizados com as amostras coletadas na estação seca, não apresentaram resultados significativos para os sedimentos. Por outro lado, foram observados resultados significativos de genotoxicidade para as amostras de água de todos os pontos testados, com exceção do ponto 1 (após o ensaio de recuperação). Entretanto, a diminuição deste potencial, observada nos ensaios de recuperação

com as amostras de água, sugere a não persistência da ação de agentes potencialmente genotóxicos, após 48 horas de recuperação. Isto significa que os compostos genotóxicos presentes nas águas não têm efeito acumulativo nas células.

Intrigantemente, para a mesma coleta, as amostras de P1 apresentaram alto potencial genotóxico, apenas após o período de recuperação. Esses resultados sugerem que alguns contaminantes presentes nestas amostras possam estar relacionados com uma ação de efeito posterior ao evento de divisão celular, ou ainda que os efeitos sejam decorrentes de compostos derivados de metabolização pelos organismos exposto (ação de metabólitos do agente poluidor original), o que levou a induzir danos mais posteriores nas células e, por isso, só observado após o período de recuperação por 48 horas. Este mesmo efeito foi também evidenciado nos estudos de Hara (2012), quando a autora avaliou amostras de água dos rios Atibaia e Jaguari. O efeito observado por Hara (2012) e aqui observado pode ser decorrente de uma maior concentração de poluentes nas águas desses rios, devido a grande estiagem do período, que levou a uma menor diluição dos poluentes presentes.

O potencial genotóxico das amostras avaliadas neste estudo comprova a presença de agentes tóxicos nas águas e sedimentos do rio Corumbataí, que apresentam capacidade de causar danos na molécula de DNA. Segundo Jha (2004) e Cheung et al. (2006), o uso de bioensaios com *A. cepa* são indicados para estudos de monitoramento de agentes genotóxicos lançados em ambientes aquáticos.

Embora os sedimentos não tenham apresentado resultados significativos, em relação ao CN, para a coleta da estação seca, eles apresentaram resultados significativos de genotoxicidade e mutagenicidade, quando comparados com as amostras de água, coletadas na estação chuvosa. Desta maneira, os resultados sugerem que os sedimentos induziram mais efeitos tóxicos ao organismo teste do que as águas, pois para as águas houve apenas indução de efeitos genotóxicos, que, possivelmente, foram passíveis de reparo celular, e que impediram o progresso dos danos para efeitos mutagênicos nas células F_1 . Nossos estudos corroboram os estudos de Jardim et al. (2008), que evidenciaram que os sedimentos do rio Corumbataí foram bem mais tóxicos que as águas deste rio.

Neste estudo foi observada também uma interferência da sazonalidade nos resultados obtidos. De maneira geral, as amostras de sedimento foram mais tóxicas para o período chuvoso, enquanto que as amostras de água tiveram seu potencial tóxico mais significativo para o período seco. Este padrão de alterações também foi observado por Hoshina e Marin-Morales (2009), onde os autores constataram, em testes de *A. cepa*, um maior efeito tóxico para as amostras de água dos rios Atibaia e Jaguari, durante a estação seca. Isto sugere que na estação chuvosa os contaminantes presentes nas águas possam sofrer diluição, o que não acontece com os sedimentos.

Alguns parâmetros físico-químicos, obtidos a partir da avaliação das amostras de água, em ambas as coletas, apresentaram resultados alterados em relação aos parâmetros vigentes determinados para qualidade de água. Tais alterações foram evidenciadas para os valores de pH, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido (OD), principalmente nos pontos P2 e P3, pontos estes próximos das cidades de Rio Claro e de Santa Gertrudes.

Os dados obtidos em P2 e P3, para os parâmetros físico-químicos da água, sugerem que a estes pontos possam estar impactados por lançamento de efluentes industriais. Dentre as atividades industriais da região, temos uma grande usina sucroalcooleira, além de diversas indústrias químicas, pequenas usinas e indústrias de produção de papéis e alimentos, próximas à cidade de Rio Claro (BORTELETTO, 1999), além de uma grande atividade ceramista na cidade de Santa Gertrudes, localizada antes do P3.

Os resultados significativos, observados para as respostas biológicas e para os padrões físico-químicos, foram, em maior parte, obtidos no P3 (à jusante da confluência do Rio Corumbataí com o Ribeirão Claro), próximo ao município de Santa Gertrudes. Esses dados sugerem uma contribuição evidente do Ribeirão Claro para a contaminação do Rio Corumbataí, provavelmente devido a uma junção de efluentes derivados das atividades dos municípios de Rio Claro e de Santa Gertrudes. Além disso, a região da confluência desses corpos hídricos é uma região caracterizada por uma grande atividade industrial, sendo conhecida como o maior pólo cerâmico das Américas (MOURA, 2006).

Em relação à concentração de Carbono Orgânico Total (COT), foram evidenciados valores muito altos para todos os pontos, em todas as coletas

realizadas (acima de 500 ppm). Apesar da resolução CONAMA 357/05 não especificar um valor máximo permitido de COT para as águas doces, o valor observado foi muito maior que os valores de referência para águas salinas e salobras (variação de 2 a 5 ppm), o que evidencia uma quantidade extremamente elevada de matéria orgânica presente neste rio, provavelmente relacionada com os lançamentos de efluentes urbanos e industriais da região (CETESB, 2009).

Deste modo, os resultados observados neste estudo, tanto para os potenciais de genotoxicidade como de mutagenicidade, assim como para os obtidos com as análises físico-químicas, validam a necessidade de um monitoramento constante do local, para garantia da qualidade da água destes rios, bem como, para alertar sobre o grau de comprometimento das águas e sedimentos desses corpos hídricos.

Os estudos associados entre água e sedimento são importantes para se avaliar, de maneira mais global, todas as possíveis alterações que um recurso hídrico possa sofrer ao longo do seu curso e a interferência das estações climáticas na qualidade de suas águas, pois estes estudos se caracterizam em avaliações complementares, capazes de avaliar os reais impactos que os ecossistemas aquáticos estão expostos, em decorrência das atividades humanas e naturais (MIRELES, et al., 2011; DÍAZ-DE-ALBA et al., 2011; BELLAS et al., 2011; CHEN et al., 2011; BALDWIN; MITCHELL, 2012; WETZEL et al., 2013; CANUTO et al., 2013; JACOB et al., 2013; KUUSISTO-HJORT; HJORT, 2013; PELUSO et al., 2013; CHEN et al., 2013). Nossos dados também confirmam a necessidade de realização de bioensaios e de quantificação dos elementos químicos presentes nas águas para uma melhor gestão dos recursos hídricos (BAO et al., 2012).

Outro fator que gera uma grande preocupação, quanto a qualidade das águas do rio Corumbataí, é o aumento populacional desordenado nesta sub-bacia do rio Piracicaba. A alta densidade demográfica de uma determinada região gera grande quantidade de resíduos que, de maneira geral, acaba atingindo os corpos d'água do local. Assim, o adensamento populacional dessa região acabou gerando uma grande quantidade, tanto de efluentes domésticos como industriais, que vêm comprometendo a qualidade da água deste rio. Isto acontece porque 80% da água usada para o abastecimento público das cidades do entorno do rio Corumbataí são devolvidas na forma de esgoto (CELLA, 2009). De acordo com Hendryx et al. (2012), os efluentes lançados nas águas superficiais podem conter componentes altamente

tóxicos, além de potenciais carcinogênicos, que podem resultar em mortalidade dos organismos expostos a essa contaminação. Ainda segundo estes autores, a mortalidade em ambientes aquáticos, é muito maior em áreas com intensa urbanização.

Levando em conta todas as análises realizadas, e que os efeitos tóxicos observados neste trabalho são maiores nas regiões de influência das cidades de Rio Claro e Santa Gertrudes, podemos sugerir que os contaminantes lançados ao longo destes rios podem estar promovendo um efeito combinado nesta água, ocasionando um efeito muito maior do que o efeito das substâncias isoladas, conforme descrito por Zagatto e Bertoletti (2006), denominado de efeito sinérgico. Além da poluição química gerada pelas atividades humanas, Norman et al. (2013), alertam para outro tipo de poluição, a poluição microbiológica ou por organismos patogênicos. Essa poluição é gerada por emissão de esgotos urbanos sem tratamento, que pode comprometer a qualidade da água e se caracterizar em um sério risco à saúde humana.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que as amostras de sedimentos do rio Corumbataí apresentam potenciais evidentes de genotoxicidade e mutagenicidade para o organismo *A. cepa*, enquanto que as amostras de água apresentaram apenas potencial genotóxico para este mesmo organismo testado.

Os resultados deste estudo apontam para um maior comprometimento dos pontos do rio localizados próximos às cidades de Rio Claro e Santa Gertrudes, provavelmente, devido ao grau de contaminação decorrente das atividades urbanas e industriais desenvolvidas nessas cidades.

O organismo teste *A. cepa* se mostrou eficiente para a avaliação da qualidade das águas e dos sedimentos do rio Corumbataí. Este estudo também relata, através das análises físico-químicas, que esta bacia está altamente contaminada por efluentes urbanos e por atividades industriais e que tais resultados servem como um alerta sobre o potencial de contaminação desse rio.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro - SP e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À Refinaria de Paulínia (REPLAN) por prestar suporte financeiro ao Laboratório de Mutagênese Ambiental do departamento de Biologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro - SP, onde foi desenvolvida a maior parte do trabalho.

À Profa. Dejanira Francheschi de Angelis, do departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro - SP, pelo apoio e auxílio ao trabalho.

Às químicas Luciana Polese e Mirtis Ariza Malagutti, do Laboratório de Estudo de Bacias (LEBAC) - Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas da UNESP de Rio Claro - SP, e ao em convênio com o UFZ - Helmholtz Centre for Environmental Research GmbH, Leipzig, Alemanha, pelas análises químicas do presente estudo.

Ao Centro de Análise de Planejamento Ambiental (CEAPLA) do Instituto de Geociências da UNESP de Rio Claro - SP por fornecerem os dados climáticos necessários para o desenvolvimento do trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, L. B.; KUMMROW, F.; BEIJO, L. A.; LIMA, C. A. A.; BARBOSA, S. Avaliação da genotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Revista Ambiente & Água**, v. 6, n. 2, p. 255-265, 2011.

ANJUM, R.; MALIK, A. Evaluation of mutagenicity of wastewater in the vicinity of pesticide industry. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, p. 284-291, 2013.

ARAÚJO, R. P. A., SHIMIZU, G. Y.; BOHRER, M. B. C.; JARDIM, W. Avaliação da Qualidade de Sedimentos In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Carlos: Editora Rima, 2006, p. 293-320.

BALDWIN, D. S.; MITCHELL, A. Impact of sulfate pollution on anaerobic biogeochemical cycles in a wetland sediment. **Water Research**, v. 46, p. 965-974, 2012.

BAO, L. J.; MARUYA, K. A.; SYNDER, S. A.; ZENG, E. Y. China's water pollution by persistent organic pollutants. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 100-108, 2012.

BARON, M. G.; PURCELL, W. M.; JACKSON, S. K.; OWEN, S. F.; JHA, A. N. Towards a more representative in vitro method for fish ecotoxicology: morphological and biochemical characterization of three-dimensional spheroidal hepatocytes. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 2419-2429, 2012.

BELLAS, J.; NIETO, O. BEIRAS, R. Integrative assessment of coastal pollution: Development and evaluation of sediment quality criteria from chemical contamination and ecotoxicological data. **Continental Shelf Research**, v. 31, p. 448-456, 2011.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 826-833, 2011.

BLAGOJEVIC, J.; STAMENKOVIC, G.; VUJOŠEVIC, M. Potential genotoxic effects of melted snow from an urban area revealed by the *Allium cepa* test. **Chemosphere**, v. 76, p. 1344-1347, 2009.

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

BORTOLETTO JUNIOR, M. J. B. **Balanço de alteração e erosão química na bacia hidrográfica do rio Corumbará, SP**. 1999. 95 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

BURTON, G. A. Sediment quality criteria in use around the world. **Limnology**, v. 3, p. 65-75, 2002.

BURTON, P. A.; LANDRUM, P. F. Encyclopedia of sediments and sedimentary rocks. In **Middleston, G. V.; Church, M. J.; Corigilo, M.; Hardie, L. A.; Longstaffe, F. J.** (Org.) Toxicity of sediments, p. 748–751. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of Soil From Farmland Irrigated With Wastewater Using Three Plant Bioassays. **Mutation Research**, v. 426, p. 211-214, 1999.

CANUTO, F. A. B.; GARCIA, C. A. B.; ALVES, J. P. H.; PASSOS, E. A. Mobility and ecological risk assessment of trace metals in polluted estuarine sediments using a sequential extraction scheme. **Environ. Monit. Assess.**, v. 185, p. 6173–6185, 2013.

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

CARMONA, E. C.; FAGUNDES, P.; GIMENEZ, D. D.; JORDÃO, M. W.; JORDÃO, S. E. R.; REIS, J. C.; RIBEIRO, M. A. H. W.; SANCHEZ, M. C.; SENEDA, R. M.; SOUZA, A. M. G. F. **Diagnóstico da Água no Município de Rio Claro**. Rio Claro, 110 p., 2004.

CELLA, A. L. **Ecotoxicologia do agotóxico fipronil em pacu (*Piractus mesopotamicus* Holmerg) e paulistinha (*Danio rerio*) e resíduos de agrotóxicos na bacia do rio Coraumbataí**. 2009. 92 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências: Área de concentração em química na agricultura e no ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

CELINO, J. J.; CORSEUIL, H. X.; FERNANDES, M.; GARCIA, K. S. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: a multivariate analysis. **REM: R. Esc. Minas**, v. 63, n. 2, p. 211-218, 2010.

CETESB (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO). **Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2009**. São Paulo: CETESB, 2009. 288p.

CETESB (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO). **Áreas Contaminadas**: O que são áreas contaminadas. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas>> Acesso em 04/06/2013

CHAPMAN, P. M. Current approaches to developing sediment quality criteria. **Environ Toxicol. Chem.**, v. 8, p. 589-599, 1989.

CHEN, Y.; NIU, Z.; ZHANG, H. Eutrophication assessment and management methodology of multiple pollution sources of a landscape lake in North China. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 20, p. 3877-3889, 2013.

CHEN, W.; JING, M.; BU, J.; BURNET, J. E.; QI, S.; SONG, Q.; KE, Y.; MIAO, J.; LIU, M.; YANG, C. Organochlorine pesticides in the surface water and sediments from the Peacock River Drainage Basin in Xinjiang, China: a study of an arid zone in Central Asia. **Environ Monit Assess**, v. 177, p. 1–21, 2011.

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

CHEUNG, V. V.; JHA, A.; OWEN, R.; DEPLEDGE, M. H.; GALLOWAY, T. S. Development of the in vivo chromosome aberration assay in oyster (*Crassostrea gigas*) embryo–larvae for genotoxicity assessment. **Marine Environmental Research**, v. 62, p. 278–282, 2006.

DIAZ-DE ALBA, M.; GALINDO RIAÑO, M. D.; CASANUEVA-MARENCO, M. J.; GARCIA-VARGAS, M.; KOSORE, C. M. Assessment of the metal pollution, potential toxicity and speciation of sediment from Algeciras Bay (South of Spain) using chemometric tools. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 177–187, 2011.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent-trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1680–1686, 2009.

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

FISKESJÖ, G. The *Allium* test- an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutat. Res.**, v. 197, p. 243–260, 1988.

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

FISKESJÖ, G. The *Allium* Test II: Assessments of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v. 9, p. 234–241, 1994.

FREDERICE, A. AMARAL, D. C.; MOREIRA, D. C.; SHITARA, J.; FUESS, L. T.; COSTA, N. R.; CURAN, R. M.; REIS, F. A. G. V.; GIORDANO, L. C. Diagnóstico ambiental do rio Corumbataí em trecho urbano do município de Rio Claro, SP. São Paulo, UNESP, **Geociências**, v. 29, n. 4, p. 643–657, 2010.

GADANO, A.; GURNI, A.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant. **Chenopodium ambrosioides**. **J Ethonopharmacol**, v. 81, p. 11–16, 2002.

GLEICK, P. H.; COOLEY, H.; COHEN, M. J.; MORIKAWA, M.; MORRISON, J.; PALANIAPPAN, M. **The world's water**, Island Press, p. 432, 2008.

GRANT, W. F. Chromosome Aberration Assays in *Allium*. **Mutat.Res.**, v. 99, p. 273–291, 1982.

GRANT, W. F. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutat. Res.**, v. 310, p. 175–185, 1994.

HARA, V. R. **Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade das águas dos rios jaguari, atibaia e piracicaba, na região de influência da refinaria de paulínia – SP**. 2012. 168 p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 20012.

HENDRYX, M.; CONLEY, P.; FEDORKO, E.; LUO, J.; ARMISTEAD, M. Permitted water pollution discharges and population cancer and non-cancer mortality: toxicity weights and upstream discharge effects in US rural-urban areas. **International Journal of Health Geographics**, v. 11, n. 9, p. 1-15, 2012.

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

HÖSS, S.; CLAUS, E.; VON DER OHE, P. C.; BRINKE, M.; GÜDE, H.; HEININGER, P.; et al. Nematode species at risk—ametric to assess pollution in soft sediments of freshwaters. **Environ. Int.**, v. 37, n. 940, 2011.

JACOB, D. L.; YELICK, A. H.; KISSOON, L. T. T.; ASGARY, A.; WIJEYARATNE, D.; SAINI-EIDUKAT, B.; OTTE, M. L. Cadmium and associated metals in soils and sediments of wetlands across the Northern Plains, USA. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 211-219, 2013.

JARDIM, G. M.; ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R. Ecotoxicological assessment of water and sediment of the Corumbataí River, SP, Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 68, n. 1, p. 51-59, 2008.

JARDIM, G. M. **Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento da água e do sedimento do rio Corumbataí – SP**. 2004. 127. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ecologia em Agroecossistemas) – Escola Superior Agricultura de “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

JHA, A. N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. **Mutation Research**, v. 552, n.2, p.1–1, 2004.

KOVALCHUK, O.; KOVALCHUK, I.; ARKHIPOV, A. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the ukraine contaminated by the chernobyl accident. **Mutation Research**, v. 415, p. 47–57, 1998.

KUUSISTO-HJORT, P.; HJORT, J. Land use impacts on trace metal concentrations of suburban stream sediments in the Helsinki region, Finland. **Science of the Total Environment**, v. 456, n. 457, p. 222–230, 2013.

LEE, I. S.; KIM, O. K.; CHANG, Y. Y.; KIM, B. H. H.; BAEK, K. H. Heavy Metal Concentrations and Enzyme Activities in Soil from a Contaminated Korean Shooting Range. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 406–411, 2002.

LEME, D. M. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de águas e sedimentos do rio Guaecá, São Sebastião – SP, após impacto de vazamento de oleoduto da região**. 2007. 156 p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2007.

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

LEME, D. M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; SKERSWETAT, M.; MARCHI, M. R. R.; MACHADO, M. C.; OLIVEIRA, D. P.; MARIN-MORALES, M. A. Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 2148–2155, 2011.

LEME, D. M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; RENZ, S.; REINEL, S.; OLIVEIRA, D. P.; FERRAZ, E. R. A.; MARCHI, M. R. R.; MACHADO, M. C.; ZOCCOLO, G. J.; MARIN-MORALES, M. A. An overview of biodiesel soil pollution: Data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 199–200, p. 343–349, 2012.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome Aberration and Micronucleus Frequencies in *Allium cepa* Cells Exposed to Petroleum Polluted Water: A Case Study **Mutation Research**, v. 650, p. 80–86, jul. 2008.

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

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

MASOOD, F. MALIK, A. Mutagenicity and genotoxicity assessment of industrial wastewaters. **Environ. Toxicol.**, v. 18, n. 2, p. 69–77, 2003.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX Biodegradation by Bacteria from Effluents of Petroleum Refinery. **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 20, p. 4334–4340, 2010.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular Damages in the *Allium cepa* Test System, Caused by BTEX Mixture Prior and After Biodegradation Process. **Chemosphere**, v. 85, n. 1, p. 13-18, 2011.

MESSIAS, T. G. **Influência da toxicidade da água e do sedimento dos rios São Joaquim e Ribeirão Claro na Bacia do Corumbataí**. 2008. 125p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

MIRELES, F.; PINEDO, J. L.; DACILA, J. I.; OLIVA, J. E.; SPEAKMAN, R. J.; GLASCOCK, M. D. Assessing sediment pollution from the Julian Adame-Alatorre dam by instrumental neutron activation analysis. **Microchemical Journal**, v. 99, p. 20-25, 2011.

MIRLEAN, N.; CASARTELLI, M. R.; GARCIA, M. R. D. Propagação da poluição atmosférica por flúor nas águas subterrâneas e solos de regiões próximas às indústrias de fertilizantes (Rio Grande, RS). **Quím. Nova**, v. 25, n. 2, p. 191-195, 2002.

MOURA, M. C. S.; LOPES, A. N. C.; MOITA, G. C.; MOITA NETO, J. M. Estudo multivariado de solos urbanos da cidade de Teresina, **Química Nova**, v. 29, n.3, p. 429-435, 2006.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Carlos: Editora Rima, 2006, p. 1-13.

NETTO, E.; MADEIRA, R. A.; SIVEIRA, F. Z.; FIORI, M. A.; ANGIOLETO, E. PICH, C. T. GEREMIAS, R. Evaluation of the toxic and genotoxic potential of acid mine drainage using physicochemical parameters and bioassays. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, p. 511-516, 2013.

NORMAN, S. A.; HOBBS, R. C.; WUERTZ, S. MELLI, A.; BECKETT, L. A.; CHOUICHA, N.; KUNDUC, A.; MILLER, W. A. Fecal pathogen pollution: sources and patterns in water and sediment samples from the upper Cook Inlet, Alaska ecosystem. **Environ. Sci.: Processes Impacts**, v.15, p. 1041-1051, 2013.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutat. Res.**, v. 567, n. 2-3, p. 109-49, 2004.

PELUSO, L.; ROSSINI, G. B.; SALIBIÁN, A.; RONCO, A. Physicochemical and ecotoxicological based assessment of bottom sediments from the Luján River basin, Buenos Aires, Argentina. **Environ. Monit. Assess.**, v. 185, p. 5993-6002, 2013.

PEREIRA, T. S.; ROCHA, J. A. V.; DUCCATTI, A.; SILVEIRA, G. A.; PASTORIZA, T. F.; BRINGUENTI, L.; VARGAS, V. M. F. Evaluation of mutagenic activity in supply water at three sites in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mutation Research**, v. 629, p. 71–80, 2007.

PRESTON, R. J., HOFFMANN, G. R. Genetic Toxicology. In: KLAASSEN, C.D. (Org.), **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 7 ed. McGraw-Hill: New York, **2001**, p. 381-413.

POHREN, R. S.; COSTA, T C; VARGAS, V. M. F. Investigation of sensitivity of the *Allium cepa* test as an alert system to evaluate the genotoxic potential of soil contaminated by heavy metals. **Water Air Soil Pollut.**, v. 224, n.1460, p. 1-10, 2013.

RADIĆ, S.; VUJČIĆ, V. CVETKOVIĆ, Z.; CVJETKO, P.; OREŠČANIN, V. The efficiency of combined CaO/electrochemical treatment in removal of acid mine drainage induced toxicity and genotoxicity. **Science of the Total Environment**, v. 466, n. 467, p. 84–89, 2014.

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

RIZZO, L. Bioassays as a Tool for Evaluating Advanced Oxidation Processes in Water and Wastewater Treatment. **Water Research**, v. 45, p. 4311-434, 2011.

SANTOS, M. A. P. F. **Avaliação da Qualidade da Água e do Sedimento da Sub-bacia do Rio Corumbataí (SP) por Meio de Testes Ecotoxicológicos**. 2008. 186 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências, Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SANZ-LÁZARO, C.; MARÍN, A. A manipulative field experiment to evaluate an integrative methodology for assessing sediment pollution in estuarine ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3510–3517, 2009.

SKEI, J.; HYLLAND, K.; SCHAANNING, M. T.; BERGE, J. A.; GUNNARSSON, J. S.; SKÖLD, M.; ERIKSEN, D. O. Interactions between eutrophication and contaminants. I. Principles, experimental design and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 33, p. 64–70, 1996.

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

SOUZA, T. S.; HENCKLEIN, F. A.; ANGELIS, D. F.; GONÇALVES, R. A.; FONTANETTI, C. S. The *Allium cepa* bioassay to evaluate land farming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1363–1368, 2009.

SOUZA, T. S.; HENCKLEIN, F. A.; ANGELIS, D. A.; FONTANETTI, C. S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environ. Monit. Assess.**, v.185, p. 1627–1636, 2013.

TRÉPOS, R., MASSON, V.; CORDIER, M. O.; GASCUEL-ODOUX, C.; SALMON-MONVIOLA, J. Mining simulation data by rule induction to determine critical source areas of stream water pollution by herbicides. **Comput. Electron. Agric.**, v.86, p. 75–88, 2012.

VALENTE, R. O. A. **Análise da Estrutura da Paisagem na Bacia do Rio Corumbataí, SP**. 2001. 162 p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

VAN DEN BERG, M.; BIRNBAUM, L.; BOSVELD, A.; BRUNSTRÖM, B.; COOK, P.; FEELEY, M.; GIESY, J. P.; HANBERG, A.; HASEGAWA, R.; KENNEDY, S. W. et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, p. 775–792, 1998.

VENKATRAMREDDY, V., VUTUKURU, S.S., TCHOUNWOU, P.B. Ecotoxicology of Hexavalent Chromium in Freshwater Fish: A Critical Review. **Rev Environ Health**, v. 24, n. 2, p. 129–145, 2009.

WETZEL, M. A.; WAHRENDORF, D. S.; VON DER OHE, P. C. Sediment pollution in the Elbe estuary and its potential toxicity at different trophic levels. **Science of the Total Environment**, v. 449, p. 199–207, 2013.

YI, Y.; WANG, Z.; ZHANG, K.; YU, G.; DUAN, X. Sediment pollution and its effect on fish through food chain in the Yangtze River. **International Journal of Sediment Research**, v. 23, p. 338–347, 2008.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Carlos: Editora Rima, 2006, Cap. 1, p. 1-13.

ARTIGO II:

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E MUTAGÊNICO DA ÁGUA E DO SEDIMENTO DO RIO CORUMBATAÍ (SÃO PAULO - BRASIL), POR MEIO DE ENSAIOS REALIZADOS COM CÉLULAS RTL-W1

Livia Loureiro de Souza¹; Paula Suares Rocha¹;
Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24A, nº 1515, CEP 13.506-900, Bela Vista, Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

As atividades humanas geram resíduos que podem contaminar a água e os sedimentos dos recursos hídricos e provocar efeitos adversos às comunidades biológicas endêmicas do ecossistema impactado, bem como aos seres humanos expostos a esta contaminação. O rio Corumbataí está localizado no interior do estado de São Paulo e pertence à sub-bacia do rio Piracicaba. As suas águas são destinadas, em sua maior parte, ao abastecimento hídrico das cidades da região, embora este corpo hídrico também receba uma grande quantidade de resíduos potencialmente tóxicos, decorrente do lançamento de efluentes urbanos, industriais e agrícolas. Esta poluição, contudo, vem comprometendo a qualidade das águas e dos sedimentos deste rio. Assim, o presente estudo avaliou os efeitos mutagênicos de amostras de água e de sedimentos do rio Corumbataí, por meio de bioensaios de indução de micronúcleos (MN) em hepatócitos de truta arco-íris da linhagem RTL-W1. Neste estudo, foram realizadas duas coletas: uma na estação chuvosa e quente e outra na estação seca e fria; em quatro pontos distintos do rio Corumbataí: P1) à montante da cidade de Rio Claro; P2) à jusante da cidade de Rio Claro; P3) à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4) à montante da cidade de Piracicaba. Para o desenvolvimento dos bioensaios, foram preparados extratos orgânicos de amostras de água e de sedimentos. As análises realizadas com os extratos de água mostraram resultados significativos de mutagenicidade para o ponto P3, para ambas as coletas realizadas, e para o ponto P2, para a coleta realizada na estação seca e fria. De maneira geral, as análises realizadas com os extratos de sedimentos exibiram resultados significativos de mutagenicidade para as diluições mais altas testadas do extrato (1:1 e 1:2), para todos os pontos avaliados, sendo que estes resultados foram mais significativos para as análises realizadas com amostras coletadas nos pontos P2 e P3. Assim, os resultados deste estudo sugerem que existe um comprometimento da água deste rio, que é conferido pela influência das cidades de Rio Claro e Santa Gertrudes, localizadas próximas aos pontos de coleta mais impactados (P2 e P3). Pelos dados mais evidentes de mutagenicidade (indução de MN), obtidos a partir dos ensaios de MN com células RTL-W1, observados para o período seco, foi possível inferir uma influência da sazonalidade na contaminação deste rio. Nossos estudos também sugerem que a avaliação de ambientes dulcícolas deve ser feita de maneira complementar, associando análises químicas e biológicas, estas últimas realizadas, ainda, com amostras de água e de sedimentos. Os extratos orgânicos, obtidos de amostras de água e de sedimentos, constituem uma eficiente estratégia para armazenamento, por longo período de tempo, de amostras ambientais, o que pode servir como uma interessante estratégia para acompanhamento de impactos ambientais de um determinado ecossistema.

Palavras-chave: mutagenicidade, micronúcleos, biomonitoramento ambiental, rio Corumbataí, efluentes urbanos, efluentes industriais.

ABSTRACT

Human activities generate toxic wastes that can contaminate the water and sediments of water resources and may induce many adverse effects on endemic biological communities and humans populations. The Corumbataí River is located within the state of São Paulo and belongs to the Piracicaba River Basin. Corumbataí River serves as a source of water supply for many municipalities. However, this river receives a significant amount of urban, industrial and agricultural discharges, which has been compromising the quality of its waters. The present study evaluated the mutagenic effects of organic extracts of water and sediment samples of Corumbataí River through micronuclei induction bioassay in hepatocytes of rainbow trout from the line RTL - W1. For this study two sampling campaigns were performed, one in the warm and rainy season and the other in the cold and dry season. Samples were collected in Corumbataí River, in four different sites: P1) upstream the municipality of Rio Claro, P2) downstream the municipality of Rio Claro; P3) downstream the confluence of Corumbataí River and Ribeirão Claro; P4) upstream the municipality of Piracicaba. According to obtained results, it was possible to observed significant mutagenicity results in points P2 and P3. Results also suggest that there is a major toxic potential of Corumbataí River waters, nearby Rio Claro and Santa Gertrudes, in points P2 and P3, probably due to influence of discharges of industrial and domestic effluents from these municipalities. Significant results were also obtained during the dry season and it was possible to infer an influence of seasonality. Our studies also suggest that assessment of freshwater environments must be made in a complementary manner, involving chemical and biological analyzes. The organic extracts obtained from water and sediments samples are an efficient strategy for storing environmental samples for a long period of time, which can serve as an attractive strategy for monitoring environmental impacts of a particular ecosystem.

Keywords: mutagenicity, micronuclei, biomonitoring, Corumbataí River, effluents, industrial effluents.

1. INTRODUÇÃO

As atividades humanas, decorrentes do avanço tecnológico e do desenvolvimento socioeconômico, promovem inúmeras alterações no meio ambiente, que podem provocar efeitos adversos, tanto aos organismos endêmicos dos ecossistemas impactados como aos seres humanos.

A poluição ambiental é caracterizada pelo lançamento de qualquer forma de matéria ou energia na atmosfera, no solo ou no meio aquático, que tornem os compartimentos ambientais impróprios ou nocivos para os seres vivos (IRITANI; EZAKI, 2012). O agravamento da poluição pelo lançamento de efluentes urbanos, industriais e rurais, interfere, diretamente, nos ecossistemas naturais (AKKOYUNLU; AKINER, 2012). Os ecossistemas aquáticos são os mais impactados, pois os efluentes que recebem, muitas vezes, não recebem tratamento adequado, antes de serem lançados nos corpos d'água (KNIE; LOPES, 2004).

As principais fontes de poluição do meio aquático são os contaminantes químicos, como: resíduos de esgotos urbanos, subprodutos de indústrias (HOUK, 1992), pesticidas, agrotóxicos e fertilizantes (KLEMZ, 2002), metais e compostos orgânicos persistentes (DE LEMOS; TERRA, 2003). Esses contaminantes podem desencadear efeitos adversos aos seres vivos desses ecossistemas, como contaminação biológica, perda de patrimônio genético, degradação dos solos e do meio aquático (VIANA, 2010), além de redução nas taxas de crescimento e de sobrevivência (LEE; STEINERT, 2003) e efeitos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998), derivados, muitas vezes, de alterações ocorridas nas sequências de bases do DNA dos organismos (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

A água é um elemento essencial para as atividades biológicas e constitui, portanto, um dos principais fatores para a manutenção da vida. Dependendo das circunstâncias em que ela for consumida, ela pode tanto oferecer ótimas condições de sobrevivência como atuar como agente causador de doenças (IRITANI; EZAKI, 2012). Por este motivo, os recursos hídricos devem ser constantemente monitorados, para se assegurar a sua qualidade e, conseqüentemente, a manutenção da vida no planeta.

A água, por ser um solvente universal, confere aos ambientes aquáticos uma alta capacidade de solubilização de compostos orgânicos e inorgânicos, tanto nos

estratos mais superficiais quanto nas regiões mais profundas do corpos hídricos (ESTEVES, 1998). O compartimento mais profundo do ambiente aquático é formado por um acúmulo de sedimentos, composto por uma mistura de argila, areia, sais minerais e matéria orgânica (ARAÚJO et al., 2006), originados de processos de erosão (WALLING, 2009) ou de decantação do material particulado da fase líquida. Portanto, os poluentes que são lançados na coluna d'água podem também contaminar os sedimentos, que passam a atuar como reservatórios de contaminantes ambientais (WALLING, 2009; PAPAETHYMIU et al., 2013; JACOB et al., 2013; CANUTO et al., 2013; KUUSISTO-HJORT; HJORT, 2013). Esses reservatórios acabam acumulando poluentes em concentrações muito mais elevadas que os presentes na coluna d'água (BERNER, 1980; IGNATIEVA, 1996; CHAPMAN et al., 1989; BARTLETT et al., 2004; YI et al., 2008).

Para avaliar, de maneira ampla, rápida e eficaz, o efeito dos contaminantes ambientais sobre os sistemas biológicos, são utilizados bioensaios, realizados com com diferentes grupos de organismos (RIZZO, 2011). Uma vez que os experimentos com animais vivos são cada vez menos aceitos pela comunidade científica, vem sendo desenvolvido e padronizado ensaios *in vitro*, com diferentes sistemas testes, na tentativa de substituir os experimentos *in vivo* (ZUCCO et al., 2004).

Atualmente, existe um grande número de tipos celulares que podem ser utilizados em diferentes ensaios. Este material também é amplamente usado para avaliar efeitos de xenobiontes presentes em amostras ambientais, principalmente dos ambientes aquáticos (DOWLING; MOTHERSILL, 2001). Dentre as células utilizadas em cultura de celular, destaca-se as de peixes (BABICH; BORENFREUND, 1986; 1987; CASTANO et al., 1994; JHA, 2004), como as da linhagem de hepatócitos de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* ou RTL-W1 (LEE et al., 1993), que apresenta uma alta eficiência na detecção dos efeitos citotóxicos e genotóxicos dos poluentes (NEHLS; SEGNER, 2001; ROCHA et al., 2009; BOETTCHER et al., 2010). De acordo com Boettcher et al. (2010), a linhagem RTL-W1 pode ser usada ainda em teste de indução de micronúcleos, para avaliar efeitos mutagênicos tanto de amostras de água *in natura*, como de extratos das amostras de água.

O corante vermelho neutro tem sido muito utilizado em testes de citotoxicidade *in vitro*, como para avaliar viabilidade celular. Por este teste, é

possível distinguir células vivas (vermelhas) das danificadas ou mortas (incolor), pela intensidade de cor da cultura celular (CIAPETTI et al., 1996). Isto se dá pelo fato das células viáveis incorporarem o corante, tornando-se coloridas (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006), enquanto que as não viáveis permanecem incolor.

O teste do micronúcleo, que detecta efeitos mutagênicos de compostos presentes no ambiente (SOUZA; FONTANETTI, 2006), se baseia na frequência de células portadoras de quebras cromossômicas (fragmentos acêntricos) ou de perdas de cromossomos inteiros, que não foram reincorporados ao núcleo principal, durante a divisão celular, formando, assim, pequenos núcleos (JENSSEN; RAMEL, 1980; GRISOLIA, 2002; NORPPA; FALCK, 2003). Este teste tem sido muito utilizado em avaliações *in situ* e *in vitro*, de contaminantes presentes nos ambientes aquáticos (PANTALEÃO, 2006).

O rio Corumbataí (sub-bacia do rio Piracicaba), inserido em uma região economicamente importante do Estado de São Paulo (CARMONA et al., 2004), tem suas águas destinadas, em sua maioria, ao abastecimento das cidades da região e, em proporções menor, mas não menos significativas, ao uso industrial e à irrigação agrícola (PALMA-SILVA, 1999). Este rio recebe, ao longo de seu curso, efluentes de origens domésticas e industriais das cidades de Analândia, Corumbataí, Rio Claro, Santa Gertrudes e Piracicaba (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB, 2008), destacando dentre elas a cidade de Santa Gertrudes, considerada o maior polo cerâmico da América (MOURA, 2006), e agroquímicos derivados da cultura de cana-de-açúcar (CELLA, 2009).

Levando em consideração a importância do rio Corumbataí para a região, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos e mutagênicos de extratos de amostras de água e de sedimentos deste rio, por meio de bioensaios de vermelho neutro e de micronúcleos (MN), respectivamente, em cultura de células RTL-W1.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Os bioensaios foram realizados com cultura de células permanentes RTL-W1 (LEE et al., 1993), derivadas do fígado de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

2.2. Área de estudo e pontos de coleta

O rio Corumbataí é uma sub-bacia do rio Piracicaba que está localizada no interior do estado de São Paulo, Brasil. Esta sub-bacia pertence à Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos das Bacias do Piracicaba, Capivari e Jundiá – UGRHI PCJ e atravessa, parcialmente ou totalmente, as cidades de Analândia, Itirapina, Corumbataí, Rio Claro, Ipeúna, Santa Gertrudes, Cordeirópolis, Charqueada e Piracicaba (VALENTE, 2001).

Para a realização deste estudo, foram coletadas amostras de água e de sedimentos em quatro pontos distintos do Médio e no Baixo Corumbataí, situados próximos às cidades de Rio Claro, Santa Gertrudes e Piracicaba, como segue: (P1) ponto à montante do município de Rio Claro; (P2) ponto à jusante de município de Rio Claro; (P3) ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; (P4) ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o rio Piracicaba, conforme representado pela figura 1 e tabela 1:



Figura 1: Esquema ilustrativo dos quatro pontos de coleta. (1) P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; (2) P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; (3) P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; (4) P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 1: Coordenadas geográficas dos pontos de coleta.

PONTOS DE COLETA	LATITUDE (S)	LONGITUDE (W)
P1	22°23.205'	47°32.753'
P2	22°25.343'	47°35.614'
P3	22°29.076'	47°35.600'
P4	22°30.917'	47°37.467'

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

2.3. Coleta das amostras

As amostras de água e de sedimentos foram coletadas em duas estações climáticas distintas que caracterizam o clima da região: estação chuvosa e quente (fevereiro de 2013) e a estação seca e fria (julho de 2013). As coletas de água foram realizadas com o auxílio de baldes de aço inoxidável e de frascos de vidro e as de sedimentos com o auxílio de uma draga de Ekman-birge (para coleta da camada mais superficial de sedimento). As amostras de água e sedimentos foram homogeneizadas para a retirada de uma amostra composta, cujo volume final foi de 4 L para a água e de 2 Kg, para o sedimento. Este volume final foi acondicionado em frasco escuro e mantido sob-refrigeração, para ser transportado para o laboratório, onde foram mantidos a 4°C, até serem utilizados nos bioensaios.

2.3.1. Dados térmicos e pluviométricos dos meses das coletas

Os dados térmicos e pluviométricos da região em estudo, para os períodos considerados, foram obtido junto Centro de Análise de Planejamento Ambiental (CEAPLA) do Instituto de Geociências da UNESP de Rio Claro.

2.4. Preparação das amostras

Os ensaios realizados com as culturas de células RTL-W1 foram desenvolvidos após um preparo prévio das amostras de água e de sedimentos, para a obtenção de extratos orgânicos, de todas as amostras (todos os pontos e nos dois períodos de coletas).

2.4.1. Extração de fase sólida e eluição dos extratos de água

Para a obtenção dos extratos, foi seguido o protocolo descrito conforme o estudo de Silva (2013). Primeiramente, as amostras de água foram filtradas duas vezes em sistema de filtração a vácuo, com filtros de fibra de vidro de 47 mm (Sartorius Stedim Biotech®). Em seguida, foram preparados os cartuchos com resinas poliméricas Strata-X 200 mg/3 mL (Phenomenex®), adicionando-se 6 mL de metanol em cada cartucho, para abertura de suas cadeias poliméricas. Após este procedimento, os cartuchos foram lavados com 6 mL de água ultra pura, para a retirada dos resíduos de metanol.

Depois de preparados, os cartuchos foram acoplados a um aparelho *Manifold* com sistema de filtração hidrovácuo, por onde foi passado 1 L de amostra em cada cartucho (3 cartuchos por amostra – totalizando 3 L de água amostrada), seguindo a sequência: (1) colunas de vidro; (2) mangueiras de silicone; (3) *manifold* conectado a uma bomba de hidrovácuo. Assim, os contaminantes presentes nas amostras de água ficaram retidos nos polímeros dos cartuchos e a água, isenta de contaminantes, dirigida para a cuba de descarte do *manifold*. Após este passo, os cartuchos foram conectados diretamente ao *manifold*, para serem secos e armazenados em freezer a -20°C, até a obtenção dos extratos das amostras, por eluição.

Para a obtenção das amostras concentradas dos extratos, os cartuchos com os contaminantes foram eluídos, adicionando-se 10 mL de metanol em cada cartucho. O extrato obtido (metanol + contaminantes que estavam retidos nos cartuchos) foi seco em nitrogênio gasoso, até obter um volume final de 1 mL de extrato, portanto, mil vezes mais concentrado (1 mL de extrato/1 L de amostra). Estes extratos concentrados foram armazenados a 4°C, até a sua posterior utilização nos ensaios.

2.4.2. Preparação dos extratos de sedimentos

A obtenção dos extratos das amostras de sedimentos foi feita por extração cetônica, conforme descrito no estudo de Boettcher et al. (2010), no aparelho de extração de Soxhlet. Esta extração se deu, basicamente, por refluxo do solvente orgânico, em sistema fechado e aquecido, que concentra os contaminantes presentes nas amostras.

As amostras de sedimentos foram previamente congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizadas, para a retirada total do conteúdo aquoso, por reação de sublimação da água. Após a liofilização, foram pesadas 20 g de cada amostra de sedimento, que foram colocadas em filtros de celulose, sendo um filtro para cada amostra. Na sequência, os filtros foram cobertos por uma camada de algodão e colocados em colunas de extração (Soxhlet), sendo uma coluna para cada amostra. Uma das extremidades das colunas foi conectada a um condensador de refluxo (contendo água gelada) e na outra extremidade a um balão volumétrico (aquecido por uma fonte de calor), contendo 100 mL de acetona – P.A. (solvente orgânico), formando assim um sistema fechado. O solvente foi aquecido, até evaporar, e o vapor condensado na coluna de extração, até que preenchesse toda a coluna. Ao encher a coluna de extração, e entrar em contato com as amostras de sedimento, o solvente retornava ao o balão volumétrico, por sifonação, e o processo de refluxo se repetia automaticamente. Este processo foi realizado durante 16 horas, extraindo todos os contaminantes do sedimento e transferindo-os para o solvente orgânico. Os extratos de sedimentos foram concentrados no próprio aparato de Soxhlet, eliminando-se o solvente, antes do seu retorno ao balão volumétrico. Após esses procedimentos, os extratos de sedimentos foram secos em nitrogênio gasoso e redissolvidos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), para a obtenção de um extrato de 20 g de sedimento em 1 mL de DMSO.

2.5. Análises químicas e físico-químicas

As análises químicas das amostras de água foram realizadas pelo Laboratório de Estudo de Bacias (LEBAC), Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas – UNESP – Rio Claro, em convênio com o UFZ - Helmholtz Centre for Environmental Research GmbH, Leipzig, Alemanha. Esta análises avaliaram três parâmetros básicos, nas amostras de águas: (1) detecção e quantificação de metais; (2) detecção e quantificação de compostos inorgânicos e (3) quantificação de Carbono Orgânico Total (COT).

As análises físico-químicas de pH, temperatura, salinidade, condutividade, turbidez, oxigênio dissolvido (OD) e sólidos totais dissolvidos (STD) das amostras de água foram realizadas em campo, com o auxílio do equipamento Horiba®, para as duas coletas realizadas.

2.6. Ensaios com cultura de células de peixes (RTL-W1)

2.6.1. Manutenção das culturas de células

A manutenção das culturas de células foi realizada em frascos de cultura de 25 cm² (TPP®), contendo 10 mL de meio Leibowitz (L15) (Cultilab®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®) e 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina) (Sigma®) a 21°C.

Os repiques foram realizados da seguinte maneira: primeiramente as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline), depois tripsinizadas com 1 mL de tripsina 0,5%, durante 1 minuto. A ação da tripsina foi neutralizada com 5 mL de meio L15 e a suspensão celular foi resuspendida para a obtenção de células isoladas. Foi adicionado mais meio L15 aos frascos e a suspensão celular foi aliquoteada em novos frascos, sendo 10 mL para cada frasco.

2.6.2. Ensaio de incorporação do vermelho neutro

O ensaio de incorporação do vermelho neutro foi utilizado para avaliar o potencial citotóxico dos extratos de sedimentos (toxicidade aguda), assim como para determinar os volumes de extratos que continham as concentrações mais elevadas e não tóxicas de sedimentos, que foram utilizadas nos experimentos *in vitro*, em *endpoints* específicos. Os extratos de água não necessitaram desta verificação, pois foram utilizados nas concentrações puras, encontradas na natureza.

Para a realização deste ensaio, os extratos de sedimentos foram diluídos em meio L15, a uma concentração inicial de 200 mg de extrato por mL de meio. Foram adicionados 100 µL dos extratos em poços de placas de 96 poços (TPP®), onde foram realizadas as diluições em série a partir destes volumes (1:1 a 1:64), totalizando 6 réplicas por placa. Em seguida, foram adicionados 200 µL de suspensão celular em cada poço. O controle positivo foi realizado com 3,5-Diclorofenol, a uma concentração de 80mg/L de meio, e o controle negativo apenas com meio L15 suplementado. A exposição foi de 48 horas a 20 °C. Após a exposição, os extratos foram descartados e as células incubadas com o corante vermelho neutro (2-metil-3-amino-7-dimetilaminofenazona) a 1% por 3 horas. Após esse período, o corante foi descartado e as células foram expostas a uma solução

de extrusão (490 mL de etanol 99%, 10 mL ácido acético, 500 mL água destilada) por 30 minutos, para serem posteriormente observadas em espectrofotômetro.

Para a determinação de citotoxicidade, foi medida, a 540 nm com um comprimento de onda de referência de 690 nm, a incorporação de vermelho neutro. A viabilidade das células foi expressa em porcentagem e os dados foram avaliados com o software Prism 4.0 (GraphPad®). O potencial citotóxico dos extratos foi calculado como NR_{85} e, desta forma, os volumes de extrato, contendo as concentrações mais elevadas de sedimentos, foram aquelas que induziram 15% de mortalidade das células, após 48 horas de exposição.

2.6.3. Teste do micronúcleo

Para os testes com amostras de água, as células RTL-W1 foram expostas a 5 mL dos extratos diluídos (1:1000) em meio L15, em frascos de 25 cm² (TPP®), sendo um frasco para cada amostra e 2 réplicas por frasco. Para os testes realizados com os extratos das amostras de sedimentos, primeiramente, as células foram incubadas em placas de 6 poços (TPP®) e depois expostas a 2 mL de diluições sequenciais de extratos (1:1, 1:2, 1:4 e 1:8) em meio L 15, a partir dos volumes de extratos que continham as concentrações máximas de sedimentos, definidas pelos valores de NR_{85} , para os extratos de cada ponto (Quadro 1).

Quadro 1: Volume dos extratos de sedimentos utilizadas nos ensaios do MN

PONTOS	FEVEREIRO/2013	JULHO/2013
P1	5,5 µL DE EXTRATO	3,25 µL DE EXTRATO
P2	2,50 µL DE EXTRATO	2,50 µL DE EXTRATO
P3	1,25 µL DE EXTRATO	0,95 µL DE EXTRATO
P4	2,20 µL DE EXTRATO	6,70 µL DE EXTRATO

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Para todos os tratamentos, o controle positivo foi realizado com metilmetanosulfonato (MMS – 2×10^{-4} M) e o controle negativo foi realizado com o meio L-15 suplementado.

As exposições aos tratamentos foram realizadas por 48 horas (para todos os extratos) a 20 °C, após esse período, o meio contendo os extratos foi descartado e substituído por um novo meio suplementado, por 72 horas adicionais, para permitir a proliferação celular. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas (tripsina 0,5%) e neutralizadas com meio L-15 suplementado. As suspensões celulares foram adicionadas a tubos falcon (TPP®) e centrifugadas por 10 minutos a 1500 RPM. Após a centrifugação, o meio foi descartado e as células (pellets) resuspendidas. Foram adicionados 2 mL de fixador Carnoy 3:1 (metanol: ácido acético - v/v) diluído em PBS (1:1), para a primeira etapa de fixação, seguida de uma nova centrifugação das células por 10 minutos a 1500 RPM. O primeiro fixador foi descartado, as células foram resuspendidas, sendo adicionados 2 mL de um novo fixador Carnoy 3:1 (metanol: ácido acético - v/v). As células fixadas foram armazenadas a -20 °C, até sua posterior utilização.

Para a confecção das lâminas, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 RPM e foi descartado o fixador antigo. Em seguida, as células foram resuspendidas em 0,5 mL de nova solução de fixação e esta suspensão foi gotejada em lâminas previamente lavadas, cobertas com um filme de água ultra pura, a 4°C. Posteriormente, as lâminas foram submetidas a uma hidrólise ácida (HCl 1N a 60° C) por 5 minutos, seguido lavagem em água destilada. Após a hidrólise, as lâminas foram submetidas à reação de Feulgen, utilizando o reativo de Schiff por 2 horas em local escuro. Em seguida as lâminas foram contracoradas com Giemsa a 0,2% por 5 minutos.

Para os testes realizados com extratos de água foram contabilizadas 2.000 células por frasco, com 2 réplicas, totalizando 4.000 células por tratamento. Para os testes realizados com extratos de sedimentos foram contabilizadas 1.000 células por lâmina, onde foram analisadas 2 lâminas, totalizando 2.000 lâminas por concentração. As comparações estatísticas foram feitas entre os resultados obtidos com as amostras testadas e os obtidos com o controle negativo (CN), por meio do teste do qui-quadrado, com modificações de Yates ($p < 0,001$).

3. RESULTADOS

Durante a realização das coletas, foram observadas as características macroscópicas do curso hídrico estudado (LOUREIRO et al. – em preparação). De

modo geral, não foram evidenciadas muitas alterações marcantes nestas características, que estivesse em desacordo com a resolução CONAMA (BRASIL 2005), para a coleta realizada na estação chuvosa e quente. No entanto, foram registradas mais alterações nestas características durante a coleta realizada na estação fria e seca. Tais alterações estão ilustradas nas figuras 2 e 3.

Primeiramente, foi observada, durante a coleta de julho/2013 (estação seca e fria), a existência de um efluente clandestino em P2 (Figura 2), não evidenciado na coleta da estação chuvosa e quente (fevereiro/2013). Foi evidenciado no P3 um forte odor de matéria em decomposição, em ambas as coletas realizadas. Este odor foi ainda mais intenso na coleta realizada durante a estação seca e fria (junho/2013). Ainda para o P3, foi observada, durante a coleta de junho de 2013, a presença de materiais flutuantes nas águas do rio, como óleos, graxas e espumas (figuras 3A e 3B). Além desses materiais flutuantes nas águas, havia um acúmulo de lixo nas margens do rio (figuras 3C e 3D).

De acordo com a resolução 357/05 – CONAMA, todas as características descritas acima, estão em desacordo com os padrões estabelecidos para a classificação deste rio (Classe 2) (BRASIL, 2005).

3.1. Dados térmicos e pluviométricos dos meses das coletas

Quadro 2: Média dos valores de temperatura e precipitação para os meses de coleta das amostras

PARÂMETROS	FEVEREIRO/2013	JULHO/2013
TEMPERATURA	23,5 °C	16,5 °C
PRECIPITAÇÃO	197,4 mm	49,7 mm

3.2. Análises químicas e físico-químicas

Os resultados obtidos nas análises químicas das amostras de água coletadas nos pontos P1, P2, P3 e P4 do Rio Corumbataí, também foram comparados com os padrões estabelecidos pela resolução 357/05 – CONAMA, para a classificação deste rio (Classe 2) (BRASIL, 2005), e podem ser visualizados nas tabelas 2, 3, 4, 6 e 7 (LOUREIRO et al. – em preparação).

Os resultados obtidos para a quantificação de COT (Tabela 2) mostraram valores muito altos para todos os pontos de coleta, em ambas as coletas realizadas. Estes valores variaram, resumidamente, de 578 ppm a 903 ppm, sendo que os valores mais elevados foram, de maneira geral, evidenciados na coleta de julho/2013.

Os resultados obtidos para as análises dos parâmetros químicos inorgânicos estão dispostos nas tabelas 3 e 6 e para a quantificação de metais nas tabelas 4 e 7.

Os resultados obtidos pelas análises físico-químicas das amostras de água coletadas nos pontos P1, P2, P3 e P4 do rio Corumbataí podem ser visualizados nas tabelas 5 e 8.

3.3. Ensaio de incorporação do vermelho neutro

A figura 4 ilustra os resultados obtidos em células RTL-W1 expostas os extratos de sedimentos, para o ensaio de incorporação do vermelho neutro, em valores de NR_{85} , que expressa o potencial citotóxico dos extratos das concentrações que induziram 15% de mortalidade das células, após 48 horas de exposição. Estes resultados foram baseados em uma média de três testes independentes.

A partir dos dados obtidos foi possível observar que os extratos das amostras da coleta realizada em fevereiro de 2013 apresentaram um maior efeito citotóxico nas células do que os da coleta realizada em julho de 2013.

Também é possível inferir que os extratos das amostras de sedimentos dos pontos de coleta P2 e P3 foram mais citotóxicos para ambas as coletas do que os dos pontos de coleta P1 e P4, sendo que os extratos das amostras de sedimentos do ponto de coleta P3 foi o mais citotóxico para ambas as coletas realizadas.

3.4. Teste do micronúcleo

A figura 5 demonstra células da linhagem RTL-W1 normais (figura 5A) e portadoras de micronúcleos (figura 5B) encontradas nos bioensaios realizados com extratos das amostras de água e de sedimentos. Os resultados obtidos para a avaliação de micronúcleos com os extratos das amostras estão ilustrados nas figuras: 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

3.4.1 Extratos das amostras de água

Para as análises de micronúcleos, realizadas com os extratos de água, foram obtidos resultados significativos, em relação ao CN, para o parâmetro de mutagenicidade, em P3 (Figura 6), em ambas as coletas realizadas (fevereiro/2013 e julho/2013), e em P2 na coleta realizada em julho/2013.

Os resultados de MN, obtidos com os extratos de água das coletas de julho/2013, foram, para todos os pontos amostrados (exceção do P4), os que apresentam valores médios maiores, quando comparados com os registrados para a coleta realizada em fevereiro/2013.

3.4.2 Extratos das amostras de sedimentos

Para o ponto de coleta P1 (Figura 7), os ensaios de MN, realizados com as diluições em série dos extratos de sedimento, apresentaram resultados significativos, em relação ao CN, para a diluição 1:1 (coleta de fevereiro/2013) e para as diluições 1:1 e 1:2 (coleta de julho/2013). Os valores médios registrados para indução de MN, para todas as diluições dos extratos deste ponto, coleta de Julho/2013, apresentaram-se maiores do que os valores observados para a coleta de fevereiro/2013.

Para o ponto de coleta P2 (Figura 8), ensaios do MN, realizados com as diluições em série dos extratos de sedimento, apresentaram resultados significativos, em relação ao controle negativo, nas diluições 1:1 e 1:2, para ambas as coletas realizadas. Os valores médios registrados para indução de MN, para as diluições 1:1 e 1:4 dos extratos deste ponto, para a coleta realizada em julho/2013, apresentaram-se maiores do que os valores observados para a coleta realizada em fevereiro. Já os valores observados para as diluições 1:2 e 1:8 apresentaram-se iguais para ambas as coletas.

Para o ponto P3 (Figura 9), os ensaios realizados com as diluições em série dos extratos dos sedimentos apresentaram resultados significativos, em relação ao CN, para a diluição 1:1, coleta de fevereiro/2013 e para as diluições 1:1 e 1:2, coleta de julho/2013. Os valores médios registrados para indução de micronúcleos, para todas as diluições dos extratos deste ponto, para a coleta realizada em julho/2013, apresentaram-se maiores que os valores observados para a coleta realizada em fevereiro/2013.

Para o ponto de coleta P4 (Figura 10), os ensaios realizados com as diluições em série dos extratos dos sedimentos apresentaram resultados significativos, em relação ao CN, para indução de MN, na diluição 1:2, para a coleta de fevereiro/2013. Porém, a diluição 1:1 desta mesma coleta apresentou valores altamente significativos no teste de qui-quadrado, tendo que ser corrigidos pelas modificações de Yates. Após correção, esses valores deixaram de ser significativos, embora o valor p obtido ($p=0.002$), após a correção, tenha sido muito próximo do valor de significância ($p<0.001$). Os valores médios registrados para indução de MN, para todas as diluições dos extratos deste ponto, coleta realizada em fevereiro/2013, apresentaram-se maiores do que os valores observados para a coleta realizada em julho/2013.

A partir da comparação dos resultados obtidos entre todos os pontos de coleta, para os extratos de sedimentos, o ponto P3 foi o que apresentou os maiores valores médios para indução de MN. No entanto, o ponto de coleta P2 apresentou um maior número de resultados significativos. Mesmo assim, os valores de significância obtidos nos resultados do ponto de coleta P3, foram maiores que os valores obtidos para o ponto de coleta P2.

Os pontos de coleta P1 e P4 foram os que apresentaram os menores valores, gerais para a indução de MN e um menor número de valores significativos. Para o ponto de coleta P4, foi evidenciado que apenas a diluição 1:2 apresentou resultados significativos. No entanto, a diluição 1:1 apresentou resultados muito próximos da significância.



Figura 2: Ocorrência de despejo de efluente próximo ao P2

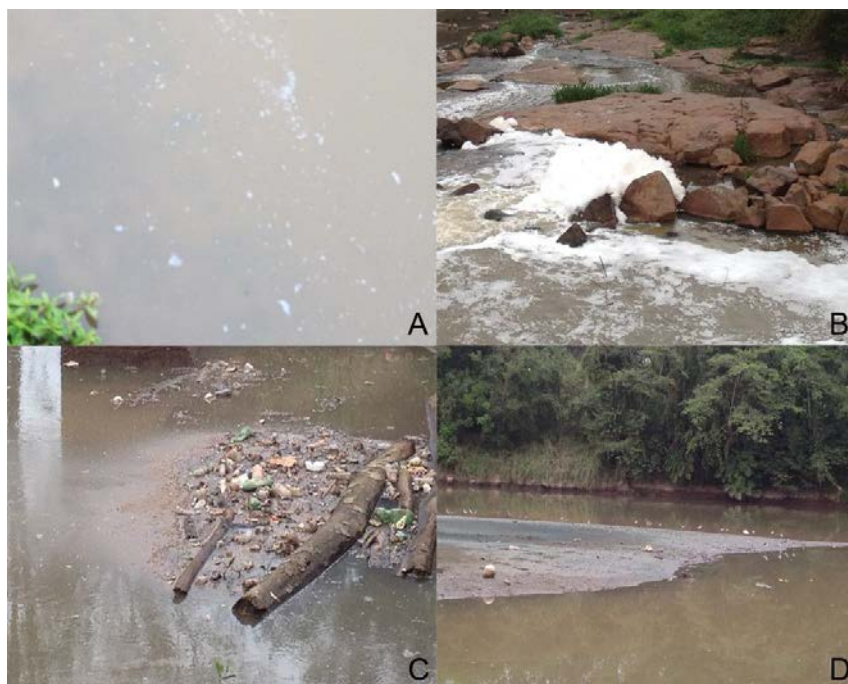


Figura 3: (A) Presença de óleos e graxas em P3; (B) Ocorrência de espuma em P3; (C) e (D) Presença de lixo nas margens do rio em P3.

Tabela 2: Quantificação de carbono orgânico total das amostras de água do rio Corumbataí (fevereiro e julho/ 2013).

AMOSTRAS	COT ppm FEV/2013	COT ppm JUL/2013
P1	848	732
P2	578	744
P3	740	903
P4	783	830

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba. COT (Carbono Orgânico Total).

Tabela 3: Parâmetros Inorgânicos das amostras de água do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) (fevereiro de 2013).

AMOSTRAS	F ⁻ mg/L	Cl ⁻ mg/L	NO ₂ ⁻ mg/L	NO ₃ ⁻ mg/L	PO ₄ ³⁻ mg/L	SO ₄ ²⁻ mg/L	C ₂ O ₄ ²⁻ mg/L	Acetato mg/L	ClO ₂ ⁻ mg/L	Br ⁻ mg/L	Li mg/L	Na mg/L	NH ₄ mg/L	K mg/L
P1	< 0,010	2,27	<0,020	1,79	< 0,080	1,84	< 0,10	< 0,25	< 0,015	<0,020	< 0,10	3,75	0,50	2,33
P2	0,016	3,14	<0,020	1,96	< 0,080	2,51	< 0,10	< 0,25	< 0,015	<0,020	< 0,10	4,43	0,55	2,41
P3	0,017	5,08	<0,020	1,89	< 0,080	5,06	< 0,10	< 0,25	< 0,015	<0,020	< 0,10	5,27	1,08	2,74
P4	0,029	6,16	0,15	3,41	< 0,080	18,3	< 0,10	< 0,25	< 0,015	<0,020	< 0,10	8,78	0,86	2,46

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 4: Quantificação de metais das amostras de água do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) (fevereiro de 2013).

AMOSTRAS	Al mg/L	Ba mg/L	Ca mg/L	Cd mg/L	Co mg/L	Cr mg/L	Cu mg/L	Fe mg/L	Mg mg/L	Mn mg/L	Ni mg/L	P mg/L	Pb mg/L	Si mg/L	Sr mg/L	Zn mg/L
P1	0,11	0,52	6,56	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	0,36	2,15	0,16	< 0,003	0,058	< 0,005	5,39	0,060	0,26
P2	0,14	0,49	0,49	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	0,35	2,51	0,14	< 0,003	0,041	< 0,005	5,58	0,069	0,27
P3	0,16	0,30	0,30	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	0,36	2,81	0,23	< 0,003	0,033	< 0,005	5,42	0,076	0,16
P4	0,16	0,29	0,29	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	0,31	3,83	0,12	< 0,003	0,090	< 0,005	5,31	0,082	0,17

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 5: Parâmetros Físico-químicos das amostras de água do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) (fevereiro de 2013).

AMOSTRAS	Temperatura °C	pH	Condutividade µS/cm	Turbidez NTU	Oxigênio Dissolvido (OD) mg/L	Sólidos Totais Dissolvidos (STD) mg/L
P1	22,74	6,44	67	142	5,41	43
P2	22,96	6,43	38	154	5,03	25
P3	24,07	7,51	108	135	4,92	70
P4	23,31	6,32	54	146	4,42	35

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 6: Parâmetros Inorgânicos das amostras de água do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) (julho de 2013).

AMOSTRAS	F ⁻ mg/L	Cl ⁻ mg/L	NO ₂ ⁻ mg/L	NO ₃ ⁻ mg/L	PO ₄ ³⁻ mg/L	SO ₄ ²⁻ mg/L	C ₂ O ₄ ²⁻ mg/L	Acetato mg/L	ClO ₂ ⁻ mg/L	Br ⁻ mg/L	Li mg/L	Na mg/L	NH ₄ mg/L	K mg/L
P1	< 0,010	2,31	< 0,020	4,08	1,99	1,24	< 0,10	1285	< 0,015	< 0,030	< 0,010	3,09	0,70	0,97
P2	0,087	6,48	0,15	5,06	2,02	3,02	0,33	1118	< 0,015	< 0,030	< 0,010	6,80	2,01	1,56
P3	0,12	11,1	< 0,020	2,44	2,31	6,90	0,87	1310	< 0,015	< 0,030	< 0,010	11,5	3,73	2,11
P4	0,15	14,1	0,30	5,36	2,64	24,7	0,95	1312	< 0,015	< 0,030	< 0,010	18,9	3,80	2,34

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 7: Quantificação de metais das amostras de água do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) (julho de 2013).

AMOSTRAS	Al mg/L	Ba mg/L	Ca mg/L	Cd mg/L	Co mg/L	Cr mg/L	Cu mg/L	Fe mg/L	Mg mg/L	Mn mg/L	Ni mg/L	P mg/L	Pb mg/L	Si mg/L	Sr mg/L	Zn mg/L
P1	0,051	0,095	4,17	< 0,005	< 0,003	< 0,003	0,006	0,20	1,53	0,033	< 0,003	0,021	< 0,005	6,23	0,042	0,075
P2	0,11	0,099	8,89	< 0,005	< 0,003	< 0,003	0,010	0,22	2,10	0,056	< 0,003	0,12	< 0,005	6,41	0,064	0,56
P3	0,075	0,094	8,55	< 0,005	< 0,003	< 0,003	0,005	0,30	2,33	0,078	< 0,003	0,11	< 0,005	6,53	0,067	0,53
P4	0,078	0,083	10,0	< 0,005	< 0,003	< 0,003	0,012	0,27	3,39	0,072	< 0,003	0,12	< 0,005	6,92	0,077	0,86

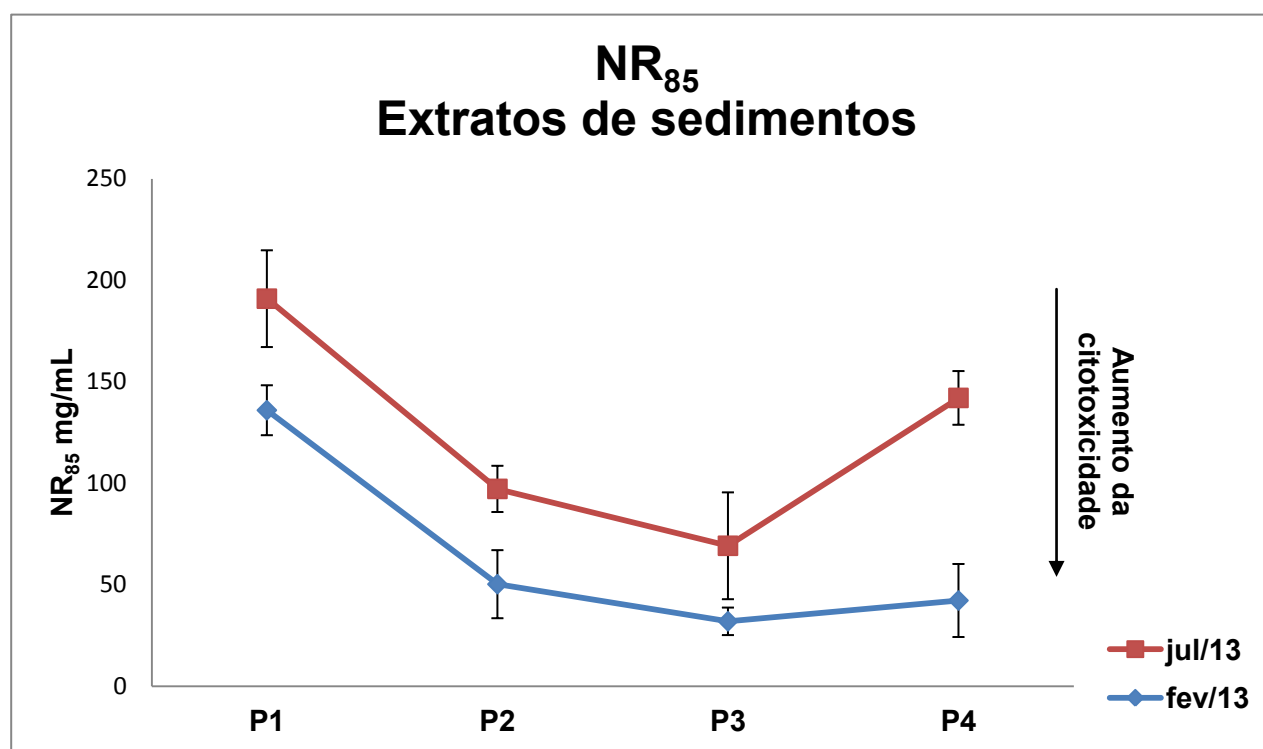
P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Tabela 8: Parâmetros Físico-químicos das amostras de água do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) (julho de 2013).

AMOSTRAS	Temperatura °C	pH	Condutividade µS/cm	Turbidez NTU	Oxigênio Dissolvido (OD)mg/L	Sólidos Totais Dissolvidos (STD)mg/L
P1	17,58	5,72	53	7,3	4,61	34
P2	16,92	4,40	45	130	4,38	30
P3	17,34	6,13	154	112	4,69	100
P4	17,52	4,77	60	26,9	4,12	40

P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

Figura 4: Valores médios e desvio padrão de NR85 em células RTL-W1 expostas, por um período de 48 horas, aos extratos de amostras de sedimentos do rio Corumbataí, coletadas nos pontos de coleta P1, P2, P3 e P4 para as coletas de Fevereiro e Julho de 2013.



P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba.

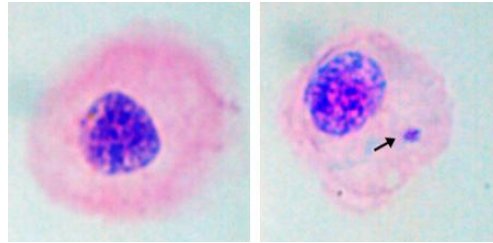
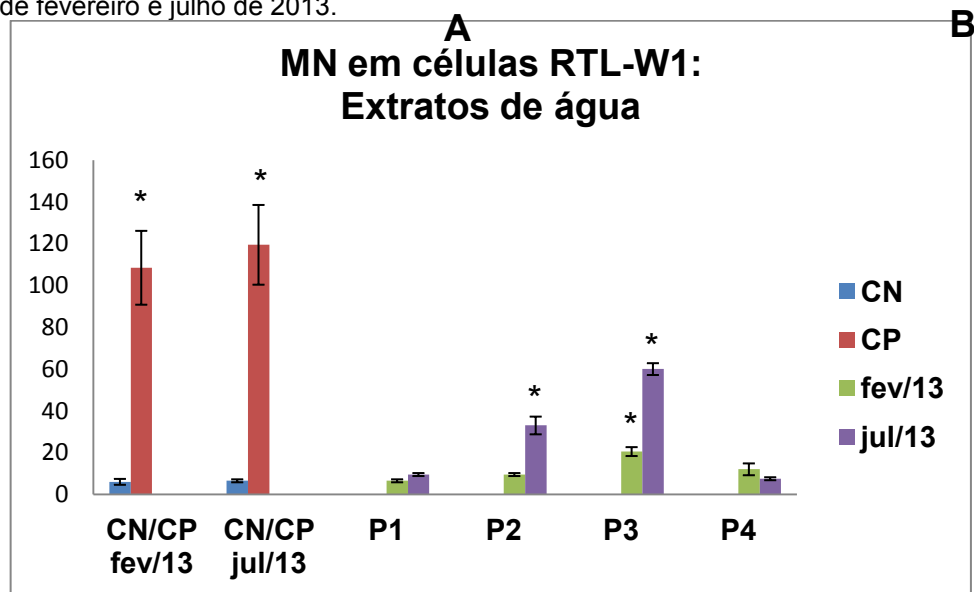


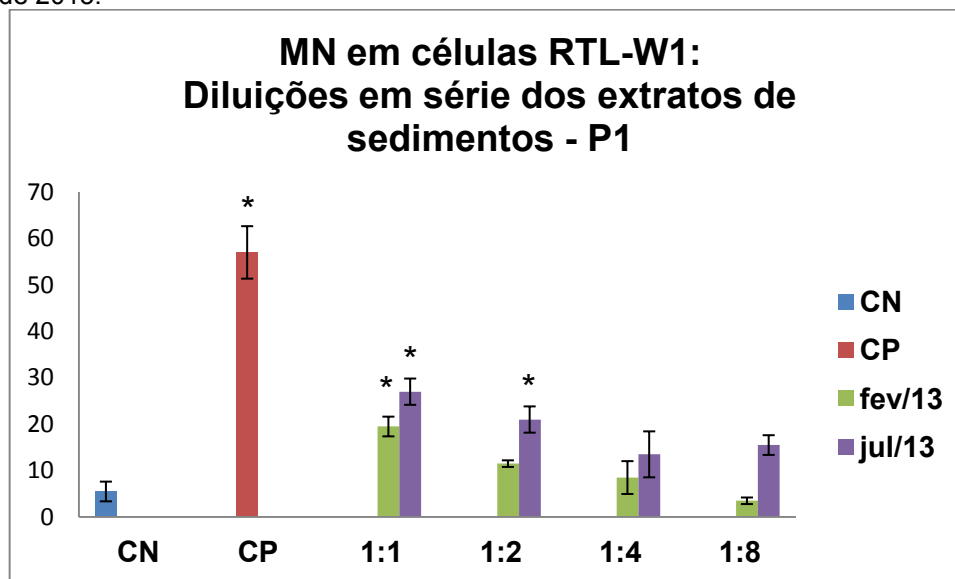
Figura 5: (A) Célula RTL-W1 normal; (B) Célula RTL-W1 portadora de micronúcleo (seta).

Figura 6: Valores médios e desvio padrão de micronúcleos em células RTL-W1, expostas aos extratos das amostras de água do rio Corumbataí, para as coletas de fevereiro e julho de 2013.



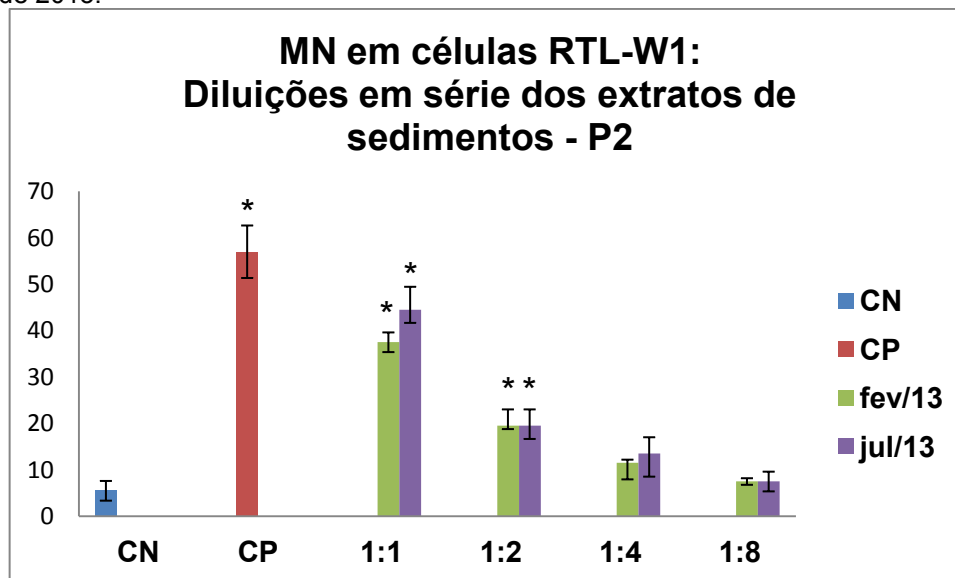
P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba. CN: Controle negativo; CP: Controle Positivo. *Estatisticamente diferente do CN ($p < 0.001$).

Figura 7: Valores médios e desvio padrão de micronúcleos em células RTL-W1, expostas às diluições em série dos extratos das amostras de sedimentos do rio Corumbataí, coletadas no ponto de coleta P1, para as coletas de fevereiro e julho de 2013.



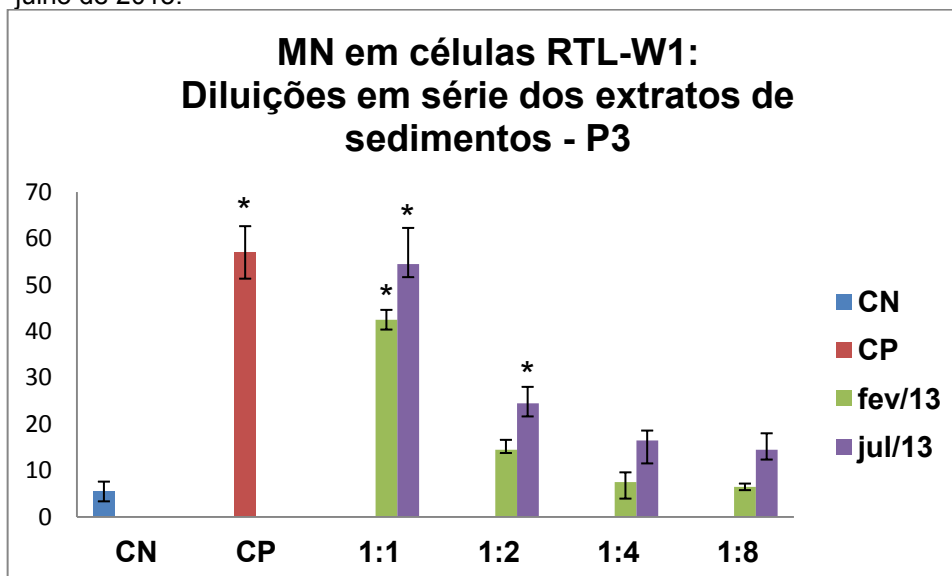
P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba. CN: Controle negativo; CP: Controle Positivo. *Estatisticamente diferente do CN ($p < 0.001$).

Figura 8: Valores médios e desvio padrão de micronúcleos em células RTL-W1, expostas às diluições em série dos extratos das amostras de sedimentos do rio Corumbataí, coletadas no ponto de coleta P2, para as coletas de fevereiro e julho de 2013.



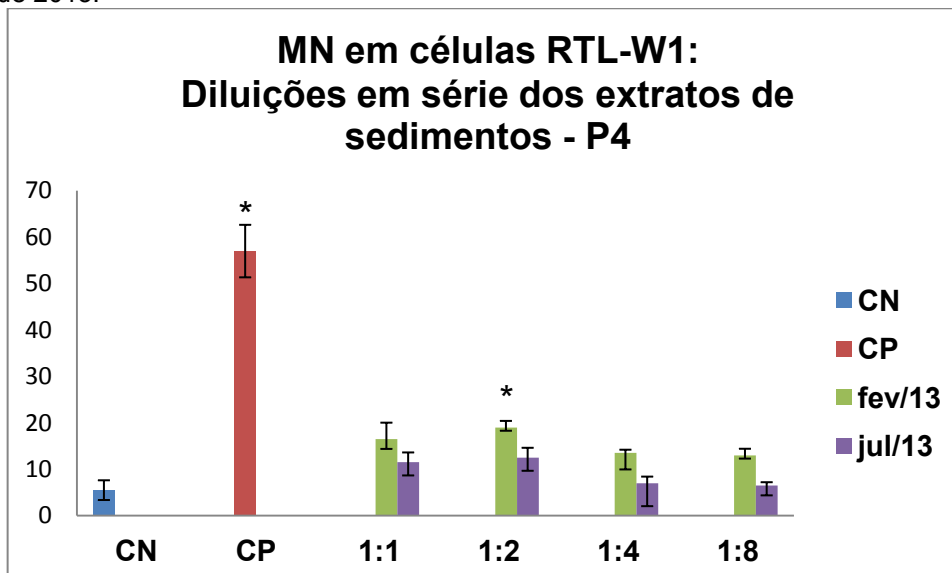
P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba. CN: Controle negativo; CP: Controle Positivo. *Estatisticamente diferente do CN ($p < 0.001$).

Figura 9: Valores médios e desvio padrão de micronúcleos em células RTL-W1, expostas às diluições em série dos extratos das amostras de sedimentos do rio Corumbataí, coletadas no ponto de coleta P3, para as coletas de fevereiro e julho de 2013.



P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da confluência do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba. CN: Controle negativo; CP: Controle Positivo. *Estatisticamente diferente do CN ($p < 0.001$).

Figura 10: Valores médios e desvio padrão de micronúcleos em células RTL-W1, expostas às diluições em série dos extratos das amostras de sedimentos do rio Corumbataí, coletadas no ponto de coleta P4, para as coletas de fevereiro e julho de 2013.



P1 - ponto à montante do município de Rio Claro; P2 - ponto à jusante de município de Rio Claro; P3 - ponto à jusante do município de Santa Gertrudes e da do rio Corumbataí com o Ribeirão Claro; P4 - ponto à montante da confluência do rio Corumbataí com o Rio Piracicaba. CN: Controle negativo; CP: Controle Positivo. *Estatisticamente diferente do CN ($p < 0.001$).

4. DISCUSSÃO

Determinadas características macroscópicas das águas do rio Corumbataí, avaliadas neste estudo durante a realização das coletas, como o lançamento de efluente clandestino no P2, a deposição de lixo nas margens do rio, o forte odor de matéria em decomposição e a presença de materiais flutuantes nas águas do Corumbataí, no ponto P3, apresentaram-se em desacordo com os parâmetros vigentes para os rios de Classe 2 (CONAMA – BRASIL, 2005). Estas alterações foram registradas apenas nas coletas da estação seca e fria (julho/2013), devido a baixa pluviosidade do período, típico da estiagem sazonal.

As agressões registradas acima, podem estar causando impactos severos na qualidade da água e uma consequente alteração nas comunidades biológicas endêmicas deste rio, que, segundo Caritá (2010), serve como um primeiro alerta sobre a qualidade deste ambiente aquático. Nossas observações reforçam os estudos realizados por Frederice et al. (2010), que postulam a ausência de planejamento de ocupação urbana nesta área, marcada, hoje, por um intenso processo de urbanização, bem como as citações de Palma-Silva (1999), onde o autor alerta para o fato de que os principais impactos ambientais evidenciados nesta sub-bacia são decorrentes das atividades humanas.

Foram evidenciadas elevadas concentrações de Carbono Orgânico Total (COT) em todos os pontos amostrados, para ambas as coletas realizadas. O COT é um parâmetro químico de grande importância ambiental, pois o carbono pode se complexar com alguns contaminantes lançados neste ambiente (como por exemplo, os metais) e conferir toxicidade ao meio, além de servir também como fonte de energia para diversos microorganismos e algas, levando a um processo de eutrofização deste sistema hídrico. O COT é originado da matéria orgânica e de efluentes e resíduos lançados ao ambiente de água doce. Como a análise e a quantificação de COT leva em consideração as porções biodegradáveis e não biodegradáveis da matéria orgânica aquática, essa avaliação se caracteriza por ser um indicador eficiente do grau de poluição dos rios. Segundo a CETESB (2009), as elevadas concentrações de COT estão relacionadas, provavelmente, a uma grande quantidade de matéria orgânica advinda do lançamento de efluentes nos recursos hídricos.

Também foram registradas nas águas do Corumbataí algumas alterações nos parâmetros físico-químicos. Foram registrados valores alterados de pH, fator este que pode interferir, de diferentes maneiras, no metabolismo das comunidades locais (ESTEVES, 1998). Estas alterações também podem contribuir para a precipitação e consequente deposição, nos sedimentos dos rios, de substâncias químicas, como, por exemplo, os metais, que são elementos que provocam efeitos danosos aos organismos (CETESB, 2009). Neste estudo, foram registrados valores de pH inferiores a 6,0 (pH ácido), que estão em desacordo com a legislação vigente. A acidez das águas de rios sugere a emissão de efluentes industriais (CETESB, 2009), fator este que pode alterar as características destes ecossistemas e gerar perda ou declínios da biodiversidade aquática local, principalmente de peixes e populações que se encontram em níveis tróficos mais basais (STOKES et al., 1986).

As análises de condutividade das águas coletadas neste rio foram extremamente relevantes para o estudo, visto que, a capacidade de uma amostra de água conduzir corrente elétrica é um parâmetro muito importante, pois está relacionado diretamente com a quantidade de sais existentes na coluna d'água e, portanto, representa uma medida indireta da concentração de poluentes. Assim, os valores registrados, superiores a 100 S/cm, além de estarem em desacordo com a legislação, indicam também características corrosivas da água (CETESB, 2009) e ambientes impactados por poluentes ambientais (MARINELLI et al., 2000).

Os valores de turbidez foram maiores que os máximos permitidos (até 100 UNT) para cursos d'água de classe 2, para todos os pontos amostrados na coleta de verão (fevereiro/2013). Este parâmetro determina o grau de atenuação da intensidade que um feixe de luz sofre ao atravessar a coluna d'água, devido à presença de sólidos em suspensão (CETESB, 2009). Os resultados obtidos para a coleta de verão, podem estar relacionados ao revolvimento dos sedimentos, decorrentes das intensas chuvas do período, que promoveu um subsequente aumento da turbidez. Essa diminuição da turbidez, contudo, pode levar a uma significativa redução da taxa de produtividade primária do ambiente aquático, em decorrência da redução da penetração de luz na coluna d'água (ESTEVES, 1998).

Os bons níveis de oxigênio dissolvido (OD) em um corpo hídrico indicam a capacidade desse ambiente manter a vida aquática (CETESB, 2009), tanto por assegurar os processos de biodegradação da matéria orgânica presente neste meio

como por suprir a demanda de oxigênio necessária para a respiração dos organismos aquáticos. Quando o OD encontra-se em concentrações insuficientes para degradar a matéria orgânica, esta pode se elevar (BELLANGER et al., 2004), decorrendo em processos de eutrofização do sistema. De maneira geral, a eutrofização está relacionada com despejo de efluentes domésticos e industriais (MATHEUS; TUNDISI, 1988). Os baixos valores encontrados para OD (5mg/L) neste estudo, inferiores ao mínimo essencial para a manutenção da vida aquática, são indicativos de um comprometimento da qualidade da água deste rio.

A partir dos dados de COT, turbidez e OD, descritos anteriormente, é possível afirmar que o rio Corumbataí vem sofrendo um grande comprometimento na qualidade de suas águas, derivado de atividades antrópicas de que lançam seus resíduos, de maneira indiscriminada e sem tratamento adequado, neste corpo hídrico.

O teste de citotoxicidade, pela incorporação do vermelho neutro, é usado para encontrar as maiores concentrações não tóxicas de um determinado agente. Esse teste foi aplicado aos extratos de sedimentos coletados no rio Corumbataí, para estimar quais as maiores concentrações deste compartimento aquático que poderiam ser usados nos testes de MN com células RTL-W1. Já os extratos de água não necessitaram desta avaliação, pois foram diluídos diretamente em água, na proporção que simulasse a concentração encontrada na natureza (1:1000), e, portanto, não citotóxica para as células.

Os valores de NR_{85} , obtidos no teste do vermelho neutro, indicam uma alta citotoxicidade para amostras dos extratos dos pontos P2 e P3, com destaque de maior citotoxicidade para o P3, em ambas as coletas. O teste do vermelho neutro se mostrou indicado para a avaliação do comprometimento ambiental do rio Corumbataí, reforçando as citações de Dailianis et al. (2003), que afirma que este teste é sensível para avaliar a poluição de meio aquático.

De maneira geral, a partir das avaliações com as células RTL-W1, realizadas no presente estudo, pode-se inferir que as culturas de células de peixes, destacando-se as de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), representam uma ferramenta importante para a avaliação de componentes tóxicos presentes no meio aquático, sendo ainda uma alternativa rápida e economicamente viável quando comparada com testes *in vivo* (BOLS et al., 1985).

Para as análises realizadas com os extratos das amostras de água do rio Corumbataí, o ponto de coleta P3 apresentou resultados significativos para mutagenicidade, para as células RTL-W1, para ambas as coletas realizadas, sendo que este ponto apresentou, ainda, resultados mais altos de significância que os P2. Isto, provavelmente, possa estar relacionado ao fato da região do P3 ser caracterizada pelo lançamento de efluentes industriais, decorrentes da intensa atividade do maior polo ceramista da América, localizado na cidade de Santa Gertrudes (MOURA, 2006).

As avaliações dos extratos de água do ponto de coleta P2 apresentaram resultados significativos para mutagenicidade, apenas para a coleta da estação seca e fria (julho/2013). Este resultado pode estar relacionado ao lançamento de um efluente clandestino, evidenciado durante esta coleta; ao lançamento de efluentes urbanos sem tratamento, pela maioria municípios localizados na sub-bacia do rio Corumbataí (SALATI, 1996); ou, ainda, pelo efeito sinérgico (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006) de ambos. Outro fator a ser considerado para essa alta mutagenicidade do P2 é o fato de que na estação seca e fria o nível de água estava muito baixo, o que provavelmente levou a uma maior concentração dos contaminantes lançados neste rio.

De maneira geral, para os extratos de água, foi evidenciado que as coletas julho/2013 apresentaram valores maiores para a indução de MN do que as coletas da fevereiro/2013, exceto para o ponto P4, ponto este que deve ter recebido uma contaminação pontual em fevereiro de 2013, provavelmente derivada do carreamento de agroquímicos por águas pluviais, decorrentes das intensas chuvas do período. Por esses resultados, nossos dados reforçam as citações de outros autores (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; SACCHI et al., 2013) que afirmam haver uma influência da sazonalidade na contaminação de recursos hídricos, pois as amostras coletas nas estações mais secas induziram mais danos que as de estação chuvosas (concentração de poluentes), com exceção dos locais mais próximos de área agrícolas (carreamento de substâncias por água pluvial).

Pelos nossos dados, é possível inferir que os extratos de água do rio Corumbataí, obtidos pela extração de fase sólida, conferiram uma boa ferramenta para a avaliação da mutagenicidade desses recursos hídricos, corroborando as

citações de Nakajima et al. (2008), sobre a aplicação de extratos de água em avaliações ambientais.

Para os testes realizados com as diluições dos extratos cetônicos dos sedimentos do rio Corumbataí, foi evidenciado um efeito dose-resposta gradual, onde a indução de micronúcleos foi aumentada, gradativamente, da menor para a maior concentração de extrato, fato este que corrobora com o estudo realizado por Boettcher et al. (2010). Assim, as diluições 1:1 e 1:2 dos extratos, em todos os pontos avaliados, apresentaram maiores valores para indução de MN nas células RTL-W1.

A partir da comparação dos resultados obtidos entre todos os pontos de coleta, para os extratos de sedimentos, o ponto P3 foi o que apresentou os maiores valores médios para indução de MN nas células, embora o ponto P2 tenha apresentado um maior número de resultados significativos. Mesmo assim, os valores de significância, obtidos nos resultados do ponto P3, foram maiores que os valores obtidos para o ponto P2. Para o ponto de coleta P4, foi evidenciado que apenas a diluição 1:2 apresentou resultados significativos, no entanto, a diluição 1:1 apresentou resultados muito próximos da significância.

Pelos testes realizados com os extratos de sedimentos, cujos resultados obtidos na coleta da estação seca e fria apresentaram mais valores significativos e maiores valores médios de indução de MN do que a estação chuvosa e quente pode-se inferir as amostras de sedimentos também podem, semelhantemente às amostras de água, avaliar efeitos de contaminação com característica sazonal. Assim, nossos estudos com sedimentos estão de acordo com os nossos dados obtidos com extratos de água e com os dados obtidos com amostras de água dos estudos de Hoshina e Marin-Morales (2009) e Sacchi et al. (2013). Os resultados obtidos neste estudo corroboram que os sedimentos de um rio podem ser usados para avaliar efeitos mutagênicos de recursos hídricos (CHEN; WHITE, 2004) e que as avaliações realizadas com extratos orgânicos dos sedimentos também podem fornecer resultados positivos nestas avaliações (CHEN; WHITE, 2004; TAGLIARI et al., 2004).

Em uma comparação geral, realizada entre os resultados obtidos com os extratos das amostras de água e com os extratos das amostras de sedimentos, foi possível observar que existe uma alta similaridade entre os dados obtidos neste

trabalho, corroborando outros dados de que a linhagem celular de hepatócitos de truta arco íris (RTL-W1) é sensível na determinação dos efeitos dos contaminantes presentes tanto em extratos de água (GAGNÉ et al., 2011), quanto em extratos de sedimentos (ROCHA et al., 2009; BOETTCHER et al., 2010).

Os pontos de coleta P2 e P3 apresentaram-se significativos para um número similar de exposições aos tratamentos, tanto para os extratos das amostras de água quanto para os extratos das amostras de sedimentos. No entanto, os resultados apresentaram maiores valores médios de significância para as amostras do P3, indicando que este ponto do rio Corumbataí, provavelmente, seja o mais impactado pela ação dos contaminantes ambientais.

Os pontos de coleta P1 e P4, tanto para os extratos de água, quanto para os extratos de sedimentos foram, de maneira geral, os que apresentaram menor número de resultados significativos e menores valores médios gerais para a indução de MN nas células RTL-W1, com menores valores de significância.

Foi observado que, de um modo geral, os valores medianos de indução de MN, para os extratos de água, foram ligeiramente maiores em P4 do que em P1, enquanto que, para as amostras de sedimentos, esses valores foram maiores em P1 do que em P4. Isto indica que, provavelmente, exista uma diferença de contaminantes presentes nesses dois locais de coleta. Como os sedimentos mostraram-se mais mutagênicos em P1, podemos inferir que a contaminação neste local foi por agentes hidrofóbicos, enquanto que em P4 foi por compostos hidrofílicos. Este mesmo fator pode ser também uma justificativa para a maior indução de MN das amostras de água da coleta da estação chuvosa e quente, observada no ponto P4, pois neste período, devido as fortes chuvas registradas, ocorreu uma maior remobilização dos sedimentos, o que pode ter ressuspensionado os contaminantes adsorvidos aos sedimentos (processos de bioturbação) para a coluna d'água (KUUSISTO-HJORT; JAN HJORT, 2013).

Assim, os valores de indução de MN, para o ponto P4, tanto para os extratos das amostras de água, quanto para os extratos das amostras de sedimentos, foram, no geral, maiores para a coleta da estação chuvosa e quente (Fevereiro/2013) do que os valores encontrados para a coleta da estação seca e fria (Julho/2013). Este fator pode indicar duas prováveis situações: (1) O rio Corumbataí pode estar sofrendo contaminação por agentes tóxicos pontuais, durante o período das chuvas

(ZAMBETTA, 2006) ou; (2) As chuvas deste período podem carregar materiais acumulados nas áreas agrícolas, urbanas e industriais, elevando a concentração de poluentes do rio (PROBST; SUCHET, 1992).

A partir da comparação dos pontos de coleta entre si, e de acordo com as citações de (ZAMBETTA, 2006) sobre comprometimento de recursos hídricos, é possível inferir que, ao longo dos pontos de coleta, os efeitos mutagênicos mais marcantes se concentram nas proximidades das cidades de Rio Claro e de Santa Gertrudes. Assim, os impactos observados em P2 e P3 podem estar relacionados, além de outros fatores, ao lançamento de esgotos urbanos destas cidades.

A partir de uma relação entre todas as avaliações realizadas neste estudo (químicas, físico-químicas e biológicas), é possível inferir que os pontos de coleta P2 e P3, são impactados por atividades antrópicas diversas como: lançamento de efluentes urbanos das cidades de Rio Claro e Santa Gertrudes; uso de agroquímicos nas culturas de cana-de-açúcar, localizadas nas proximidades das margens deste rio (ZAMBETTA, 2006); e pelo lançamento de efluentes de industriais da região. Dentre as atividades industriais da região, destacam-se uma grande usina sucroalcooleira, diversas indústrias químicas, pequenas usinas de produção de papéis e alimentos, próximas à cidade de Rio Claro (BORTELETTO, 1999), além de uma grande atividade ceramista, derivada de, aproximadamente, 22 indústrias na cidade de Santa Gertrudes, cidade esta caracterizada como o maior polo ceramista das Américas (MOURA, 2006).

Os dados obtidos neste estudo, a partir dos impactos registrados nos pontos de coleta P2 e P3, corroboram os estudos de Jardim et al. (2008), que registraram que tanto as águas quanto os sedimentos do rio Corumbataí, pode induzir diversos efeitos deletérios aos organismos aquáticos endêmicos deste sistema hídrico.

Os resultados obtidos neste trabalho com células RTL-W1, teste do MN, para os extratos cetônicos de sedimentos, conforme também evidenciado nos estudos de Boettcher et al. (2010), mostram que esta linhagem celular, apesar de ter sido muito pouco utilizada para este fim, também é um material biológico muito eficiente na detecção de mutagenicidade de amostras ambientais.

É importante salientar que os contaminantes retidos nos sedimentos, mesmo quando não disponibilizados para a coluna d'água, podem induzir sérios danos à comunidade bentônica e conferir comprometimentos extremamente preocupante

para o todo o ecossistema aquático, pois os organismos bentônicos estão situados na base da cadeia trófica desses sistemas. A contaminação dos sedimentos pode, então, comprometer a qualidade de todo o ecossistema, tanto pela contaminação direta quanto por via trófica (YI et al., 2008). Reforçamos ainda que os organismos bentônicos podem estar sujeitos a processos de bioacumulação e biomagnificação de poluentes (BURTON, 2002), o que caracteriza um perigo tanto para os organismos aquáticos que tendem a bioacumular poluentes orgânicos persistentes em seus tecidos, quanto para os seres humanos que podem se alimentar desses organismos (BARÓN et al., 2013).

5. CONCLUSÕES

A partir das avaliações realizadas no presente estudo é possível inferir que:

- Os procedimentos de extração das amostras ambientais consistem em ferramentas importantes para experimentos de biomonitoramento ambiental com culturas de células e que os extratos orgânicos de água e de sedimentos constituem um material eficiente para a avaliação dos potenciais mutagênicos de ambientes dulcícolas;

- A obtenção de extratos de amostras de água e de sedimentos constitui um método interessante para armazenamento de amostras ambientais, pois os extratos podem ser mantidos sob congelamento por muito tempo, sem que as características das amostras sejam perdidas;

- Os estudos realizados com extratos de amostras de águas e de sedimentos apresentaram resultados semelhantes entre si, indicando que esse processo de preparação de amostras pode ser aplicado, com segurança, tanto para amostras de água como para sedimentos do rio Corumbataí;

- As culturas de hepatócitos de truta arco-íris (RTL-W1) constituem um material biológico adequado para ser usado em avaliações de recursos hídricos, pois foram sensíveis tanto a contaminantes presentes na água como nos sedimentos do rio Corumbataí;

- A linhagem de cultura de hepatócitos de truta arco-íris (RTL-W1) se mostrou eficiente para a identificação de mutagenicidade (teste do MN) de extratos orgânicos de amostras ambientais do rio Corumbataí;

- Os resultados deste estudo (realizados com células RTL-W1) indicam que o rio Corumbataí esta sofrendo um grande comprometimento das suas águas, principalmente nos pontos localizados próximos às cidades de Rio Claro (P2) e Santa Gertrudes (P3), sendo o efeito mais marcante registrado para P3. Esses comprometimentos se devem, provavelmente, as contaminações ambientais decorrentes de atividades urbanas, industriais e agrícolas da região;

- Foi possível observar um efeito dose-resposta, a partir das diluições em série dos extratos das amostras de sedimento, onde foi verificado um aumento gradativo do potencial mutagênico das menores concentrações para as maiores concentrações dos extratos.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro - SP e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À Refinaria de Paulínia (REPLAN) por prestar suporte financeiro ao Laboratório de Mutagênese Ambiental do departamento de Biologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro - SP, onde foi desenvolvida a maior parte do trabalho.

À Profa. Dejanira Francheschi de Angelis, do departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro - SP, pelo apoio e auxílio ao trabalho.

Às químicas Luciana Polese e Mirtis Ariza Malagutti, do Laboratório de Estudo de Bacias (LEBAC) - Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas da UNESP de Rio Claro - SP, e ao em convênio com o UFZ - Helmholtz Centre for Environmental Research GmbH, Leipzig, Alemanha.

Ao Centro de Análise de Planejamento Ambiental (CEAPLA) do Instituto de Geociências da UNESP de Rio Claro - SP.

Aos Profs. Dr. Niel C. Bols e Dra. Lucy Lee da Universidade de Waterloo do Canadá; Prof. Dr. Thomas Braunkbeck da Universidade de Heidelberg da Alemanha, Prof. Dr. Henner Hollert e Dr. Steffen Keiter da Universidade de Aachen, por cultivarem e fornecerem as culturas de células RTL-W1 que foram utilizadas nas análises realizadas neste trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKOYUNLU, A.; AKINER, M. E. Pollution evaluation in streams using water quality indices: A case study from Turkey's Sapanca Lake Basin. **Ecological Indicators**, v. 18, p. 501–511, 2012.
- ARAÚJO, R. P. A.; SHIMIZU, G. Y.; BOHRER, M. B. C.; JARDIM, W. Avaliação da Qualidade de Sedimentos In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Carlos: Editora Rima, 2006, p. 293–320.
- BABICH, H.; BORENFREUND, H. In vitro cytotoxicity of metals to bluegill (BF-2) cells. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 15, p. 31–37, 1986.
- BABICH, H.; BORENFREUND, H. In vitro cytotoxicity of organic pollutants to bluegill sunfish (BF-2) cells. **Environ Res**, v. 42, p. 229–237, 1987.
- BARÓN, E.; GAGO-FERRERO, P.; GORGA, M.; RUDOLPH, I.; MENDOZA, G.; ZAPATA, A. M.; DÍAZ-CRUZ, S.; BARRA, R.; OCAMPO-DUQUE, W.; PÁEZ, M.; DARBRA, R. M.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Occurrence of hydrophobic organic pollutants (BFRs and UV-filters) in sediments from South America. **Chemosphere**, v. 92, p. 309–316, 2013.
- BARTLETT, A. J.; BORGMANN, U.; DIXON, D. G.; BATCHELOR, S. P.; MAGUIRE, R. J. Accumulation of tributyltin in *Hyaella azteca* as an indicator of chronic toxicity: survival, growth, and reproduction. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 2878–2888, 2004.
- BELLANGER, B.; HUON, S.; STEINMANN, P.; CHABAUX, F.; VELÁSQUEZ, F.; VALLES, V.; ARN, K.; CLAUER, N.; MARIOTTI, A. Oxic–anoxic conditions in the water column of a tropical freshwater reservoir (Peña-Larga dam, NW Venezuela). **Appl Geochem**, v. 19, p. 1295–1314, 2004.
- BERNER, R. A. Early diagenesis: a theoretical approach. **Princeton University Press**, Princeton, 1980.
- BOETTCHER, M.; GRUND, S.; KEITER, S.; KOSMEHL, T.; REIFFERSCHIED, G.; SEITZ, N.; ROCHA, P. S.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research**, v. 700, p. 11–17, 2010.
- BOLS, N. C.; BOLISKA, S. A.; DIXON, D. G.; HODSON, P. V.; KAISER, K. L. E. The use of fish cell cultures as an indication of contaminant toxicity to fish. **Aquatic Toxicology**, v. 6, p. 147–155, 1985.
- BURTON, G. A. Sediment quality criteria in use around the world. **Limnology**, v. 3, p. 65–75, 2002.

CANUTO, F. A. B.; GARCIA, C. A. B.; ALVES, J. P. H.; PASSOS, E. A. Mobility and ecological risk assessment of trace metals in polluted estuarine sediments using a sequential extraction scheme. **Environ Monit Assess**, v. 2013, n. 185, p. 6173–6185, 2013.

CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do polo ceramista da cidade de Santa Gertrudes – SP**. 2010. 190 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas – área: Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, 2010.

CARMONA, E. C.; FAGUNDES, P.; GIMENEZ, D. D.; JORDÃO, M. W.; JORDÃO, S. E. R.; REIS, J. C.; RIBEIRO, M. A. H. W.; SANCHEZ, M. C.; SENEDA, R. M.; SOUZA, A. M. G. F. **Diagnóstico da Água no Município de Rio Claro**. Rio Claro, 110 p., 2004.

CASTANO, A.; VEJA, M.; BLAZQUEZ, T.; TARAZONA, J. V. Biological alternatives to chemical identification for the ecotoxicological assessment of industrial effluents: the RTG-2 in vitro cytotoxicity test. **Environ Toxicol Chem**, v. 13, p. 1607–1611, 1994.

CELLA, A. L. **Ecotoxicologia do agotóxico fipronil em pacu (*Piractus mesopotamicus* Holmerg) e paulistinha (*Danio rerio*) e resíduos de agrotóxicos na bacia do rio Coraumbataí**. 2009. 92 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências: Área de concentração em química na agricultura e no ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

CETESB (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO). **Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2009**. São Paulo: CETESB, 2009. 288p.

CHAPMAN, P. M. Current approaches to developing sediment quality criteria. **Environ Toxicol Chem**, v. 8, p. 589-599, 1989.

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

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. **Biomaterials**, v. 17, p. 1259-1264, 1996.

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

DAILIANIS, S.; DOMOUHTSIDOU, G. P.; RAFTOPOULOU, E.; KALOYIANNI, M.; DIMITRIADIS, V. K. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 56, p. 443–470, 2003.

DE LEMOS, C. T.; TERRA, N. R. Poluição: Causas, efeitos e controle. **Genética Toxicológica**, p.119-137, 2003.

DOWLING, K.; MOTHERSILL, C. The further development of rainbow trout primary epithelial cell cultures as a diagnostic tool in ecotoxicology risk assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 53, p. 279-289, 2001.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro. Interciência, 1998. 569 p.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p.171-177, 2006.

FREDERICE, A. AMARAL, D. C.; MOREIRA, D. C.; SHITARA, J.; FUESS, L. T.; COSTA, N. R.; CURAN, R. M.; REIS, F. A. G. V.; GIORDANO, L. C. Diagnóstico ambiental do rio Corumbataí em trecho urbano do município de Rio Claro, SP. São Paulo, UNESP, **Geociências**, v. 29, n. 4, p. 643-657, 2010.

GAGNÉ, F.; ANDRÉ, C.; DOUVILLE, M.; TALBOT, A.; PARROTT, J.; MCMASTERB, M.; HEWITT, M. An examination of the toxic properties of water extracts in the vicinity of an oil sand extraction site. **J Environ Monit**, v. 13, p. 3075-3086, 2011.

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

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

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

IGNATIEVA, N. V. Distribution and release of sedimentary phosphorus in Lake Ladoga. **Hydrobiologia**, v. 322, n. 13, p. 129–136, 1996.

IRITANI, M. A.; EZAKI, S. **As águas subterrâneas do Estado de São Paulo** - São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente – SMA, 3a edição, 104 p., 2012.

JACOB, D. L.; YELICK, A. H.; KISSOON, L. T. T.; ASGARY, A.; WIJEYARATNE, D. N.; SAINI-EIDUKAT, B.; OTTE, M. L.; Cadmium and associated metals in soils and sediments of wetlands across the Northern Plains, USA. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 211-219, 2013.

JARDIM, G. M.; ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R. Ecotoxicological assessment of water and sediment of the Corumbataí River, SP, Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 68, n. 1, p. 51-59, 2008

JENSSEN, D.; RAMEL, C. The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested, **Mutat Res**, v. 75, p. 191–202, 1980.

JHA, A. N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. **Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen**, v. 552, p. 1–17, 2004.

KLEMZ, C. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes *Ancistrus* sp (cascudo)**. 2002. Dissertação de Mestrado: Departamento de Farmacologia – UFPR. 2002

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA / GTZ, p. 289, 2004.

KUUSISTO-HJORT, P.; HJORT, J. Land use impacts on trace metal concentrations of suburban stream sediments in the Helsinki region, Finland. **Science of the Total Environment**, v. 456, n. 457, p. 222–230, 2013.

LEE, L. E.; CLEMONS, J. H.; BECHTEL, D. G.; CALDWELL, S. J.; HAN, K. B.; PASITSCHNIAK-ARTS, M.; MOSSER, D. D.; BOLS, N. C. Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. **Cell Biology and Toxicology**, v. 9, p. 279–294, 1993.

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

MARINELLI, C. E.; MORETTO, E. M.; BRUCHA, G.; DE LUCCA, J. V. **Limnologia**. ESPÍNDOLA, E. L. G.; SILVA, J. S. V.; MARINELLI, C. E.; ABDON, M. M. (Eds.), A Bacia Hidrográfica do Rio do Monjolinho, Rima, São Carlos, p. 133–149, 2000.

MATHEUS, C. E.; TUNDISI, J. G. **Estudo físico-químico e ecológico dos rios da bacia hidrográfica do Ribeirão e Represa do Lobo (Broa) J.G. Tundisi (Ed.), Limnologia e Manejo de Represas**. Série Monografias em Limnologia, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 419–471, 1988.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. **Aquatic Toxicology**, v. 41, p.161–182, 1998.

MOURA, M. C. S.; LOPES, A. N. C.; MOITA, G. C.; MOITA NETO, J. M. Estudo multivariado de solos urbanos da cidade de Teresina, **Química Nova**, v. 29, n.3, p. 429–435, 2006.

NAKAJIMA, T.; HASEGAWA, H.; NAKAMATA, S.; TAKANASHI, H.; OHKI, A. Mutagenicity of eluent by hot water extraction of various coals: Effect of chlorination. **Fuel**, v. 87, p. 3132–3136, 2008.

NEHLS, S.; SEGNER, H. Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay, **Environ Toxicol**, v. 16, p. 321–329, 2001.

NORPPA, H.; FALCK, G. C. M. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, v. 18, p. 221-233, 2003.

PALMA-SILVA, G. M. **Diagnóstico ambiental, qualidade da água e índice de depuração do rio Corumbataí – SP**. 1999. 155p. Dissertação de Mestrado em Hidrologia – Centro de Estudos Ambientais, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1999.

PANTALEÃO, S. M. **Impacto genotóxico de poluentes químicos presentes na água e sedimento do rio Japarutuba (Sergipe)**. 2006. 107 p. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica – área de concentração: Genética) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

PAPAEFTHYMIU, H.; ATHANASOPOULOS, D.; PAPATHEODOROU, G.; IATROU, M.; GERAGA, M.; CHRISTODOULOU, D.; KORDELLA, S.; FAKIRIS, E.; TSIKOURAS, B. Uranium and other natural radionuclides in the sediments of a Mediterranean fjord-like embayment, Amvrakikos Gulf (Ionian Sea), Greece. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 122, p. 43-54, 2013.

PROBST, J. L. SUCHET, A. P. Fluvial suspended sediment transport and mechanical erosion the Maghreb, North Africa. **Journal des Sciences Hydrologiques**, v. 37, n. 6, p. 624-637, 1992.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

RIZZO, L. Bioassays as a Tool for Evaluating Advanced Oxidation Processes in Water and Wastewater Treatment. **Water Research**, v. 45, p. 4311-434, 2011.

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

SACCHI, A.; MOUNEYRAC, C.; BOLOGNESI, C.; SCIUTTO, A.; ROGGIERI, P.; FUSI, M. BEONE, G. M.; CAPRI, E. Biomonitoring study of an estuarine coastal ecosystem, the Sacca di Goro lagoon, using *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). **Environmental Pollution**, v. 177, p. 82-89, 2013.

SALATI, E. **Diagnóstico ambiental sintético e qualidade da água como subsídio para o planejamento regional integrado da bacia hidrográfica do rio Corumbataí – SP**. 1996. 199 p. Tese – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1996.

SILVA, M. T. P. **Avaliação da toxicidade e caracterização de Hidrocarbonetos presentes em águas de rios Impactados por efluente de indústria petroquímica.** 2013. 130 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas – área: Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, 2013.

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**, v.605, p.87-93, 2006.

STOKES, P. M. Ecological effects of acidification on primary producers in aquatic systems. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 30, p. 421-438, 1986.

TAGLIARI, K. C.; CECCHINI, R.; ROCHA, J. A. V.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. **Mutation Research**, v. 561, p. 101–117, 2004.

VALENTE, R. O. A. **Análise da Estrutura da Paisagem na Bacia do Rio Corumbataí, SP.** 2001. 162 p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

WALLING, D. E. **The impact of global change on erosion and sediment transport by rivers: current progress and future challenges.** Paris: UNESCO, 2009, 30 p.

YI, Y.; WANG, Z.; ZHANG, K.; YU, G.; DUAN, X. Sediment pollution and its effect on fish through food chain in the Yangtze River. **International Journal of Sediment Research**, v. 23, p. 338-347, 2008.

ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** São Carlos: Rima, 2006, 464 p.

ZAMBETTA, P. M. A. **Espécies químicas inorgânicas (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Se) no sedimento e nos sólidos em suspensão do rio Corumbataí – SP.** 2006. 73 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ZUCCO, F.; ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 153-163, 2004.

6. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste estudo, por meio dos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade realizados com os bioindicadores *Allium cepa* e células RTL-W1, com amostras das águas e dos sedimentos de quatro pontos distintos do rio Corumbataí-SP permitem inferir que:

- O rio Corumbataí recebe contaminantes a partir de diversas fontes de poluição e as análises químicas e físico-químicas foram eficientes na identificação e comparação dos parâmetros alterados neste recuso hídrico, em relação às legislações vigentes;

- Foram evidenciados efeitos da sazonalidade em ambas as amostras coletas onde as amostras coletas na estação seca e fria induziram mais alterações frente às análises realizadas;

- As análises realizadas em células meristemáticas e em células F1 de *A. cepa* mostraram-se sensíveis para avaliar os efeitos dos contaminantes presentes, tanto nas amostras de água quanto nas amostras de sedimento deste rio;

- Os ensaios de aberrações cromossômicas e MN em células meristemáticas e de MN em células F1, realizados com o organismo teste *A. cepa*, se mostraram ferramentas extremamente importantes para a avaliação de danos no DNA induzidos por contaminantes do meio aquático;

- As amostras de sedimentos do rio Corumbataí apresentam potenciais genotóxicos e mutagênicos mais evidentes, para o organismo *A. cepa*, do que os observados para amostras de água, visto que estas últimas apresentaram apenas potencial genotóxico para este mesmo organismo testado;

- Os procedimentos de extração das amostras ambientais consistem em ferramentas importantes para a realização de experimentos de biomonitoramento ambiental com culturas de células;

- As linhagens de cultura de hepatócitos de truta arco-íris (RTL-W1) são eficientes para a identificação de mutagenicidade de extratos orgânicos de amostras ambientais a partir da realização teste do micronúcleo;

- Os extratos orgânicos de água e dos sedimentos do rio Corumbataí apresentam potenciais mutagênicos para as culturas de hepatócitos de truta arco-íris (RTL-W1), apresentando resultados muito similares entre si;

- Os resultados deste estudo sugerem um grande comprometimento dos pontos localizados próximos às cidades de Rio Claro e Santa Gertrudes, sendo que para o ponto próximo ao município de Santa Gertrudes esse comprometimento foi ainda mais marcante. Tal comprometimento se deve provavelmente as contaminações ambientais decorrentes de atividades urbanas, industriais e agrícolas da região.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, L. B.; KUMMROW, F.; BEIJO, L. A.; LIMA, C. A. A.; BARBOSA, S. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Revista Ambiente & Água**, v. 6, n. 2, p. 255-265, 2011.

ARAÚJO, R. P. A.; SHIMIZU, G. Y.; BOHRER, M. B. C.; JARDIM, W. Avaliação da Qualidade de Sedimentos In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Carlos: Editora Rima, 2006, p. 293-320.

BABICH, H.; BORENFREUND, H. In vitro cytotoxicity of metals to bluegill (BF-2) cells. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 15, p. 31-37, 1986.

BABICH, H.; BORENFREUND, H. In vitro cytotoxicity of organic pollutants to bluegill sunfish (BF-2) cells. **Environ Res**, v. 42, p. 229-237, 1987.

BAGATINI, M. D.; DA SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do Sistema Teste de *Allium cepa* como Bioindicador de Genotoxicidade de Infusões de Plantas Medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Santa Maria, v. 17, n. 3, p. 444-447, jul/set 2007.

BARÓN, E.; GAGO-FERRERO, P.; GORGA, M.; RUDOLPH, I.; MENDOZA, G.; ZAPATA, A. M.; DÍAZ-CRUZ, S.; BARRA, R.; OCAMPO-DUQUE, W.; PÁEZ, M.; DARBRA, R. M.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Occurrence of hydrophobic organic pollutants (BFRs and UV-filters) in sediments from South America. **Chemosphere**, v. 92, p. 309-316, 2013.

BARON, M. G.; PURCELL, W. M.; JACKSON, S. K.; OWEN, S. F.; JHA, A. N. Towards a more representative in vitro method for fish ecotoxicology: morphological and biochemical characterization of three-dimensional spheroidal hepatocytes. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 2419-2429, 2012.

BELLAS, J.; NIETO, O.; BEIRAS, R. Integrative assessment of coastal pollution: Development and evaluation of sediment quality criteria from chemical contamination and ecotoxicological data. **Continental Shelf Research**, v. 31, p. 448-456, 2011.

BOETTCHER, M.; GRUND, S.; KEITER, S.; KOSMEHL, T.; REIFFERSCHIED, G.; SEITZ, N.; ROCHA, P. S.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research**, v. 700, p. 11-17, 2010.

BOLS, N. C.; BOLISKA, S. A.; DIXON, D. G.; HODSON, P. V.; KAISER, K. L. E. The use of fish cell cultures as an indication of contaminant toxicity to fish. **Aquatic Toxicology**, v. 6, p. 147-155, 1985.

BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J. **Genética**. 6a. edição, Editora Guanabara Koogan S.A. 1991.

BURTON, G. A. Sediment quality criteria in use around the world. **Limnology**, v. 3, p. 65-75, 2002.

BURTON, P. A.; LANDRUM, P. F. Encyclopedia of sediments and sedimentary rocks. In MIDDLESTON, G. V.; CHURCH, M. J.; CORIGILO, M.; HARDIE, L. A.; LONGSTAFFE, F. J. (Eds.), **Toxicity of sediments**, Dordrecht: Kluwer Academic, 2003, p. 748–751.

CANFIELD, D. E.; JOERGENSEN, B. B.; FOSSING, H.; GLUD, R.; GUNDERSEN, J.; RAMSING, N. B.; THAMDRUP, B.; HANSEN, J. W.; NIELSEN, L. P.; HALL, P. O. J. Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. **Marine Geology**, v. 113, n. 1-2, p. 27-40, 1993.

CARMONA, E. C.; FAGUNDES, P.; GIMENEZ, D. D.; JORDÃO, M. W.; JORDÃO, S. E. R.; REIS, J. C.; RIBEIRO, M. A. H. W.; SANCHEZ, M. C.; SENEDA, R. M.; SOUZA, A. M. G. F. **Diagnóstico da Água no Município de Rio Claro**. Rio Claro, 110 p., 2004.

CASTANO, A.; VEJA, M.; BLAZQUEZ, T.; TARAZONA, J. V. Biological alternatives to chemical identification for the ecotoxicological assessment of industrial effluents: the RTG-2 in vitro cytotoxicity test. **Environ Toxicol Chem**, v. 13, p. 1607–1611, 1994.

CELINO, J. J.; CORSEUIL, H. X.; FERNANDES, M.; GARCIA, K. S. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: a multivariate analysis. **REM: R Esc Minas**, v. 63, n. 2, p. 211-218, 2010.

CELLA, A. L. **Ecotoxicologia do agotóxico fipronil em pacu (*Piractus mesopotamicus* Holmerg) e paulistinha (*Danio rerio*) e resíduos de agrotóxicos na bacia do rio Coraumbataí**. 2009. 92 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências: Área de concentração em química na agricultura e no ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

CETESB (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO). **Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2009**. São Paulo: CETESB, 2009. 288p.

CHAPMAN, P. M. Current approaches to developing sediment quality criteria. **Environ Toxicol Chem**, v. 8, p. 589-599, 1989.

CHASIN, A. A. M.; PEDROSO, M. F. M. O estudo da toxicologia, In: CHASIN, A. A. M.; AZEVEDO, F. A. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2003. São Paulo: Intertox, 2003. 340 p.

CHEN, Y.; NIU, Z.; ZHANG, H. Eutrophication assessment and management methodology of multiple pollution sources of a landscape lake in North China. **Environ Sci Pollut Res**, v. 20, p. 3877-3889, 2013.

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

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. **Biomaterials**, v. 17, p. 1259–1264, 1996.

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

DENNIS, I. A.; MACKLIN, M. G.; COULTHARD, T. J.; BREWER, P. A. The impact of the October–November 2000 floods on contaminant metal dispersal in the River Swale catchment, North Yorkshire, UK. **Hydrological Processes**, v. 17, p. 1641–57, 2003.

ESTEVEES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro. Interciência, 1998. 569 p.

EUGRIS: Portal for soil and water management in Europe. **Contaminated land**. Reino Unido, 2013. Disponível em: <<http://www.eugris.info/eugris-soil-water-encyclopedia.asp>>. Acesso em: 04 jun. 2013.

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

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65–75, 2003.

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

FERETTI, D.; ZERBINI, I.; CERETTI, E.; VILLARINI, M.; ZANI, C.; MORETTI, M.; FATIGONI, C.; ORIZIO, G.; DONATO, F.; MONARCA, S.; Evaluation of chlorite and chlorate genotoxicity using plant bioassays and in vitro DNA damage tests. **Water Res**, v. 4, n. 2, p. 4075–4082, 2008.

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

FILGUEIRAS, A. V.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 4, p. 832–857, 2002.

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

FISKESJÖ, G. The *Allium* Test II: Assessments of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environ Toxicol Water Qual**, v. 9, p. 234-241, 1994.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p.171-177, 2006.

FREDERICE, A. AMARAL, D. C.; MOREIRA, D. C.; SHITARA, J.; FUESS, L. T.; COSTA, N. R.; CURAN, R. M.; REIS, F. A. G. V.; GIORDANO, L. C. Diagnóstico ambiental do rio Corumbataí em trecho urbano do município de Rio Claro, SP. São Paulo, UNESP, **Geociências**, v. 29, n. 4, p. 643-657, 2010.

GADANO, A.; GURNI, A.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*. **Ethonopharmacol**, v. 81, p. 11-16, 2002.

GRANT, W. F. Chromosome Aberration Assays in *Allium*. **Mutat Res**, v. 99, p. 273–291, 1982.

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

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

HENDRYX, M.; CONLEY, P., FEDORKO, E.; LUO, J.; ARMISTEAD, M. Permitted water pollution discharges and population cancer and non-cancer mortality: toxicity weights and upstream discharge effects in US rural-urban areas. **International Journal of Health Geographics**, v. 11, n. 9, p. 1-15, 2012.

HOLLERT, H.; HAAG, I.; DÜRR, M.; WETTERAUER, B.; HOLTEY-WEBER, R.; KERN, U.; WESTRICH, B.; FÄRBER, H.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. Investigations of the ecotoxicological hazard potential and risk of erosion of contaminated sediments in lock-regulated rivers. **Z Umweltchem Ökotox**, v.15, p. 5-12, 2003.

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

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

JAGER, T.; POSTHUMA, L.; ZWART, D.; MEENT, D. Novel view on predicting acute toxicity: Decomposing toxicity data in species vulnerability and chemical potency. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 3, p. 311-322, 2007.

JENSSEN, D.; RAMEL, C. The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested, **Mutat Res**, v. 75, p. 191–202, 1980.

JHA, A. N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. **Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen**, v. 552, p. 1–17, 2004.

KIENZLER, A.; TRONCHÈRE, X.; DEVAUX, A.; BONY, S. Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 500–510, 2012.

KIENZLER, A.; BONY, S.; TRONCHERE, X.; DEVAUX, A. Assessment of base excision repair activity in fish cell lines: Toward a new biomarker of exposure to environmental contaminants? **Mutation Research**, v. 753, p. 107– 113, 2013.

KIRSCH-VOLDERS, M. The CB in vitro micronucleus assay in human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 392, n. 1-2, 1997.

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

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA / GTZ, p. 289, 2004.

KOSMEHL, T.; KREBS, W. F. M.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, H.; HOLLERT, T. Comparative genotoxicity testing of Rhine river sediment extracts using the permanent cell lines RTG-2 and RTL-W1 in the comet assay and Ames assay. **Journal of Soils and Sediments**, v. 4, p. 84–94, 2004.

KUUSISTO-HJORT, P.; HJORT, J. Land use impacts on trace metal concentrations of suburban stream sediments in the Helsinki region, Finland. **Science of the Total Environment**, v. 456, n. 457, p. 222–230, 2013.

LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M. E.; RIEGER, A.; FRESCURA, V. D.; FIORE, M. F.; TEDESCO, S. B.; Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, v. 432, p. 180–188, 2012.

- LEE, L. E.; CLEMONS, J. H.; BECHTEL, D. G.; CALDWELL, S. J.; HAN, K. B.; PASITSCHNIAK-ARTS, M.; MOSSER, D. D.; BOLS, N. C. Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. **Cell Biology and Toxicology**, v. 9, p. 279-294, 1993.
- LEE, B. G.; LEE, J. S.; LUOMA, S. N.; CHOI, H. J.; KOH, C. H. Influence of acid volatile sulfide and metal concentrations on metal bioavailability to marine invertebrates in contaminated sediments. **Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 4517–4523, 2000.
- LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 214–219, 2008.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome Aberration and Micronucleus Frequencies in *Allium cepa* Cells Exposed to Petroleum Polluted Water: A Case Study **Mutation Research**, v. 650, p. 80–86, jul. 2008.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71–81, 2009.
- LEWINSKA, A.; LEWINSKA, A.; WNUK, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G.; Total anti-oxidant capacity of cell culture media. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.34, p.781-786, 2007.
- LIMA, J. E. F. W. **Recursos hídricos no Brasil e no mundo**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001, 46 p.
- MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutat Res**, v. 334, p. 185-195, 1995.
- MALHÃO, F.; URBATZKAB, R.; NAVASC, J. M.; CRUZEIROA, C.; MONTEIRO, R. A. F.; ROCHA, E. Cytological, immunocytochemical, ultrastructural and growth characterization of the rainbow trout liver cell line RTL-W1. **Tissue and Cell**, v. 45, n. 3, p. 159–174, 2013.
- 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**, v.29, p.148–158, 2006.
- MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluents using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, v.69, n.4, p.399-408, 2004.

MELO, P. S. **Derivados da desidrocrotonina: síntese, atividade antiulcerogênica e citotoxicidade**. 2000. 116 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MESSIAS, T. G. **Influência da toxicidade da água e do sedimento dos rios São Joaquim e Ribeirão Claro na Bacia do Corumbataí**. 2008. 125p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

MIRELES, F.; PINEDO, J. L.; DACILA, J. I.; OLIVA, J. E.; SPEAKMAN, R. J.; GLASCOCK, M. D. Assessing sediment pollution from the Julian Adame-Alatorre dam by instrumental neutron activation analysis. **Microchemical Journal**, v. 99, p. 20–25, 2011.

MIRLEAN, N.; CASARTELLI, M. R.; GARCIA, M. R. D. Propagação da poluição atmosférica por flúor nas águas subterrâneas e solos de regiões próximas às indústrias de fertilizantes (Rio Grande, RS). **Quim Nova**, v. 25, n. 2, p. 191-195, 2002.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Carlos: Editora Rima, 2006, p. 1-13.

NEHLS, S.; SEGNER, H. Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay, **Environ Toxicol**, v. 16, p. 321–329, 2001.

NORPPA, H.; FALCK, G. C. M. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, v. 18, p. 221-233, 2003.

PALMA-SILVA, G. M. **Diagnóstico ambiental, qualidade da água e índice de depuração do rio Corumbataí – SP**. 1999. 155p. Dissertação de Mestrado em Hidrologia – Centro de Estudos Ambientais, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1999.

PANTALEÃO, S. M. **Impacto genotóxico de poluentes químicos presentes na água e sedimento do rio Japarutuba (Sergipe)**. 2006. 107 p. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica – área de concentração: Genética) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

PELUSO, L.; ROSSINI, G. B.; SALIBIÁN, A.; RONCO, A. Physicochemical and ecotoxicological based assessment of bottom sediments from the Luján River basin, Buenos Aires, Argentina. **Environ Monit Assess**, v. 185, p. 5993–6002, 2013.

PEREIRA, R. S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. **Revista eletrônica de Recursos Hídricos. IPH-UFRGS**, v. 1, n. 1, p. 20-36, 2004.

PESONEN, M.; ANDERSSON, T. B. Fish primary hepatocyte culture; An important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies. **Aquatic Toxicology**, v. 37, p. 253-267, 1997.

RAMEL, C. Advantages of and problems with short-term mutagenicity tests for the assessment of mutagenic and carcinogenic risk. **Environ Health Perspect**, v. 47, p. 153-159, 1983.

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

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

RIZZO, L. Bioassays as a Tool for Evaluating Advanced Oxidation Processes in Water and Wastewater Treatment. **Water Research**, v. 45, p. 4311-434, 2011.

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

RODRIGUES, G. S.; MA, T. H.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L. H. Tradescantia bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. **Crit Rev Plant Sci**, v. 16, p. 325-359, 1997.

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

SACHANA, M.; HARGREAVES, A. J. **Toxicological testing: in vivo and in vitro models**. In: GUPTA, R. C. (Ed), Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles. Elsevier Inc, New York, pp. 51-66, 2007.

SANZ-LÁZARO, C.; MARÍN, A. A manipulative field experiment to evaluate an integrative methodology for assessing sediment pollution in estuarine ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3510-3517, 2009.

SCHWARTZ, R.; GERTH, J.; NEUMANN-HENSEL, H.; BLEY, S.; FÖRSTNER, U. Assessment of Highly Polluted Fluvisol in the Spittelwasser Floodplain Based on National Guideline Values and MNA-Criteria. **J Soils Sediments**, v. 6, n. 3, p. 145 - 155, 2006.

SEIGNER, H. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular & Integrative Physiology**, v. 120, p. 71-81, 1998.

SILVA, M. T. P. **Avaliação da toxicidade e caracterização de Hidrocarbonetos presentes em águas de rios Impactados por efluente de indústria petroquímica**. 2013. 130 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas – área: Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, 2013.

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**, v.605, p.87-93, 2006.

SPROVIERI, M.; FEO, M. L.; PREVEDELLO, L.; MANTA, D. S.; SAMMARTINO, S.; TAMBURRINO, S.; MARSELLA, E. Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in surface sediments of the Naples harbor (southern Italy). **Chemosphere**, v. 67, p. 998–1009, 2007.

TRÉPOS, R.; MASSON, V.; CORDIER, M. O.; GASCUEL-ODOUX, C.; SALMON-MONVIOLA, J. Mining simulation data by rule induction to determine critical source areas of stream water pollution by herbicides. **Comput Electron Agric**, v.86, p. 75-88, 2012.

TUCCI, C. E. M. **Gestão da água no Brasil**. Brasília: UNESCO, 2001. 156p.

UBELS, J. L.; CLOUSING, D. P. In vitro alternatives to the use of animals in ocular oxicology testing. **The Ocular Surface**, v. 3, n. 3, p. 126-142, 2005.

VENKATRAMREDDY, V.; VUTUKURU, S.S.; TCHOUNWOU, P.B. Ecotoxicology of Hexavalent Chromium in Freshwater Fish: A Critical Review. **Rev Environ Health**, v. 24, n. 2, p. 129–145, 2009.

VIANA, D. B. **Avaliação de riscos ambientais em áreas contaminadas: uma proposta metodológica**. 2010. 162 p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Planejamento Energético) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

VILLAR, C., CABO, L.; VAITHIYANATHAN, P.; BONETTO, C. Pour water N and P concentration in a floodplain marsh of the Lower Parana River. **Hydrobiologia**, v. 392, v. 1, p. 65–71, 1999.

WAINRIGHT, S. C.; COUCH, C. A.; MEYER, J. L. Fluxes of bacteria and organic matter into a Blackwater river from river sediments and floodplain soils. **Freshwater Biol**, v. 28, n. 1, p. 37–48, 1992.

WALLING, D. E. **The impact of global change on erosion and sediment transport by rivers: current progress and future challenges**. Paris: UNESCO, 2009, 30 p.

WANG, F.; GOULET, R. R.; CHAPMAN, P. M.; Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: the gap between laboratory and nature. **Chemosphere**, v. 57, p. 1713–1724, 2004.

WETZEL, M. A.; WAHRENDORF, D. S.; VON DER OHE, P. C. Sediment pollution in the Elbe estuary and its potential toxicity at different trophic levels. **Science of the Total Environment**, v. 449, p. 199–207, 2013.

YI, Y.; WANG, Z.; ZHANG, K.; YU, G.; DUAN, X. Sediment pollution and its effect on fish through food chain in the Yangtze River. **International Journal of Sediment Research**, v. 23, p. 338-347, 2008.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Carlos: Editora Rima, 2006, Cap. 1, p. 1-13.

ZUCCO, F.; ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 153-163, 2004.