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

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E
MUTAGENICIDADE DAS ÁGUAS DOS RIOS JAGUARI,
ATIBAIA E PIRACICABA, NA REGIÃO DE INFLUÊNCIA
DA REFINARIA DE PAULÍNIA - SP**

RAQUEL VAZ HARA

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

Rio Claro - SP
2012

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E
MUTAGENICIDADE DAS ÁGUAS DOS RIOS JAGUARI,
ATIBAIA E PIRACICABA, NA REGIÃO DE INFLUÊNCIA
DA REFINARIA DE PAULÍNIA - SP**

RAQUEL VAZ HARA

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

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

Rio Claro - SP
2012

*Dedico esse trabalho a Deus,
Meus pais Antônio e Tereza
Meu irmão Ricardo*

*“Aqueles que passam por nós,
não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam
um pouco de nós.”*

(O pequeno príncipe - Antoine Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por ter abençoado a minha vida acadêmica, me encorajado a vencer os obstáculos, me incentivado a querer sempre o melhor que posso fazer e, principalmente, por ter colocado em meu caminho pessoas iluminadas que fizeram parte dessa trajetória. Por ser a minha coragem e força nos momentos de medo - “Tudo posso Naquele que me fortalece...”

Aos meus queridos pais, Tereza e Antônio, pelo apoio, confiança, amor, carinho, companheirismo e, principalmente, por entenderem a minha ausência. Vocês são os grandes responsáveis por essa conquista e me fazem ser a pessoa mais feliz do mundo pelo simples fato de estarem sempre ao meu lado. Amor infinito e incondicional.

Ao meu “brother” Ricardo, meu melhor amigo, que me escuta em todos os momentos, que me apoia na minha decisão e esteve sempre ao meu lado. Obrigada por sua amizade, bondade, conversas, brincadeiras e por ser essa pessoa maravilhosa.

Aos meus avós, Chyoko Hara, Keizo Hara, Rosa Vaz e Pedro Vaz, pelo exemplo de vida.

A toda a minha família, tios e tias, primos e primas, que não citarei os nomes porque Deus, com toda a sua bondade, me presenteou com uma família grande e que mesmo com alguns distantes estão guardados no meu coração com belas lembranças.

A minha segunda família Bruno, Lilian, Danilo, Roselaine e Júnior, por sempre estarem do meu lado e por toda preocupação. Distância nenhuma acabará com o amor que sinto por vocês.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Aparecida Marin Morales, por permitir que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa. Sou eternamente grata pela oportunidade. Obrigada pela paciência, dedicação, amizade, apoio, pela orientação e, principalmente, por ser um exemplo de profissional e pessoa.

A todos os meus amigos mutagênicos, Bruna, Cinthya, Cris, Dânia, Jaque Bianch, Jana, Jaque pira, Laís, Leonardo, Livia, Márcia, Maria Tereza, Matheus, Michele, Nádia, Nahanna, Paula, Thaís, Yali, por me acolherem e se tornarem grandes amigos. Muito obrigada pelas risadas que fizeram dos meus dias mais felizes. Especialmente, quero agradecer a Bruna, Dânia, Jaque Bianch, Márcia, Matheus e Maria Tereza pela ajuda nos experimentos de cultura celular, principalmente, na realização do ensaio do cometa.

Às amigas de toda vida, Carol, Gabi, Luana e Thaís, sempre presentes em minha vida. Simplesmente uma amizade eterna!

Às amigas biomédicas (Máfia), Dé, Jú, Lê, Mary, May, Rebeca e Talita, pela amizade, conversas, encontros, offs, risadas... que a nossa amizade continue a crescer.

À amiga, Maria Tereza, minha companheira desde a época de faculdade, amizade para todas as horas, diversão garantida... obrigada por ser a minha família Rioclarense e me ajudar em todos os momentos.

À amiga, Márcia Hoshina, pela companhia, risadas, conversas, conselhos, mão de obra (hihi), tradução de resumos (hehe)... obrigada por se tornar uma grande amiga que posso contar sempre.

À amiga Bruna Ventura, por ser a minha dupla na elaboração do artigo de revisão. Pela paciência, amizade, risadas e companheirismo.

À amiga Tânia e sua família, uma amizade essencial que quero levar por toda a minha vida. Obrigada por me acolherem nos momentos difíceis, pela amizade, carinho, conversas, preocupações, risadas, bafões, pelos foras, e muitas outras coisas que tornaram essa amizade sólida e sincera.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa concedida.

Ao PRH-05 pelos quatro meses de bolsa concedida e pelos dois meses de cursos de verão, que contribuíram para a minha formação.

Ao Profº Dr. Dimas Dia Brito e ao secretário José Maria Cazonatto pelo auxílio.

À Refinaria de Paulínia (REPLAN) por permitir a realização das coletas.

À Profª Dejanira de Franceschi de Angelis, Dilza Nalim e ao Zito por toda ajuda e incentivo para a realização desse trabalho, todos sempre dispostos a ajudar.

À Profª Drª Sílvia Tamie Matsumoto pelo envio da linhagem celular.

A todos os professores do departamento de biologia, área biologia celular e molecular, pela transmissão de conhecimento durante o mestrado.

Ao Profº Drº Rodrigo Juliano Oliveira, grande incentivador, obrigada por acreditar em mim, pelos conselhos, e por aceitar fazer parte da minha banca.

À Profª Drª Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, por aceitar fazer parte da minha banca.

À técnica Sandra Veloso, pela ajuda nesse trabalho e que faz muita falta no laboratório.

A todos os colegas do departamento de biologia pelo convívio agradável de todos os dias.

Enfim... A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho! MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Os avanços tecnológicos trazem muitos benefícios, no entanto vêm acompanhados de um aumento dos efluentes provenientes de diferentes tipos de indústrias, os quais geram subprodutos indesejáveis que carregam consigo muitos contaminantes químicos que são lançados todo ano no solo, ar e água. Em especial, as indústrias de refino de petróleo produzem efluentes ricos em metais pesados, químicos inorgânicos e orgânicos. Dentre os contaminantes orgânicos mais importantes do petróleo, encontram-se os Hidrocarbonetos, em especial os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA). De maneira geral, tanto os HPA quanto seus derivados estão associados ao aumento da incidência de diversos tipos de cânceres no homem. Neste contexto, faz-se necessário o desenvolvimento e aplicação de ferramentas para avaliação de amostras ambientais possivelmente impactadas por dejetos químicos. Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a genotoxicidade e a mutagenicidade das águas dos rios Jaquari-SP, Atibaia-SP e Piracicaba-SP, numa região influenciada pelos efluentes gerados pela refinaria de petróleo da cidade de Paulínia – SP. As avaliações foram feitas por meio de dois organismos-testes distintos: raízes de *Allium cepa* e cultura de Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO-K1). Para os ensaios com *A. cepa*, foram aplicados os testes de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN) em células de meristemas de raízes e micronúcleos em células F₁ deste mesmo órgão. Para os ensaios com células CHO-K1, foram aplicadas as técnicas do ensaio do cometa e do teste do Micronúcleo. Os resultados obtidos nessa pesquisa mostraram que as substâncias químicas geradas pelo processo de refino do petróleo apresentam características genotóxicas e/ou mutagênicas. Os resultados também permitiram o esclarecimento dos modos de ação destes compostos sobre o material genético dos organismos expostos. Sobretudo, foi observado, pelos testes realizados, que o efluente lançado pela refinaria apresenta-se menos tóxico que o efluente bruto produzido, mostrando que o sistema de tratamento da indústria tem sido eficiente para a descontaminação dos subprodutos gerados pelo processo industrial.

Palavras-chaves: efluente industrial, HPA, *Allium cepa*, cultura de células, CHO-K1, aberrações cromossômicas, micronúcleos.

ABSTRACT

Technological advances bring many advances; however they are accompanied by an increase in the effluents derived from different types of industries, which generate undesirable by-products that carry several chemical contaminants that are discharged every year in the soil, air and water. Industries of petroleum refinery, in particular, produce effluents rich in heavy metals, inorganic and organic chemicals. Among the most important organic contaminants of the petroleum, we can highlight the Hydrocarbons, in special the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). In general, both PAHs and their derivatives are associated with the increase in the incidence of several types of cancer in humans. In this context, it is necessary to develop and apply tools to assess environmental samples possibly impacted by chemical waste. Thus, this study aims to evaluate the genotoxicity and mutagenicity of waters of the Jaquari-SP, Atibaia-SP and Piracicaba-SP rivers, in a region influenced by effluents generated by a petroleum refinery of the city of Paulínia – SP. The evaluations were carried out with two distinct test organisms: roots of *Allium cepa* and culture of cells of Chinese Hamster Ovary (CHO-K1). For the assays with *A. cepa*, the tests of chromosome aberrations (CA) and micronuclei (MN) in meristematic cells of roots and micronuclei in F₁ cells of the same organ were applied. For the assays with CHO-K1 cells, the techniques of comet assay and the micronucleus test were used. The results obtained in this study showed that the chemical substances generated by the petroleum refining process present genotoxic and/or mutagenic characteristics. The results also allowed the elucidation of the modes of action of these compounds on the genetic material of the organisms exposed. Particularly, it was observed, by the tests performed, that the effluent discharged by the refinery are less toxic than the crude effluent produced, showing that the treatment system of the industry has been effective in decontaminating the by-products generated by the industrial process.

Key-words: industrial effluent, PAHs, *Allium cepa*, cell culture, CHO-K1, chromosome aberrations, micronuclei.

LISTA DE ABREVIATURAS

8-OHdG	8-hidroxi-20-deoxiguanosina
AC	Aberrações Cromossômicas
Ag-NPs	nanopartículas de prata
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	Análise de Variância
As	Arsênio
Asc^{•-}	Radical Semidesidroascorbato
AsCH⁻	Ascorbato
AsCH₂	Vitamina C
ATP	Adenosina Trifosfato
AZM	Azinfosmetil
B[a]P	Benzo[a]pireno
Beas-2B	Células Epiteliais de Brônquio Humano
BEAS-2B	Células Epiteliais de Brônquio Humano
BPCs	Bifenilas Policloradas
BSO	D,L-butionina-(S,R)-sulfoximina
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
CAT	Catalase
CBMN	Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
Chang	Células Normais de Fígado Humano
CHO	<i>Células de Ovário de Hamster Chinês</i>
Cit-B	Citocalasina B
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cu	Cobre
CV-1	Células Renais de Macaco Verde Africano
DB[a,l]P	Dibenzo[a,l]pireno
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DBPs	Produtos de Desinfecção
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DMEM/F12	<i>Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DON	Desoxinivalenol
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DSF	Dissulfiram
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EPA US	<i>E.U> Environmental Protection Agencia</i>
ERK	Quinase Reguladora de Sinal Extracelular
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROD	Etoxiresofurina O-desetilase

ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe	Ferro
GC-PFPD	Detector Fotométrico de Chama Pulsante
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione Dissulfeto
GST	Glutathione S-transferase
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
H-4-II-E	Hepatoma de Rato
HCl	Ácido Clorídrico
HEL	Fibroblasto Diploide de Pulmão Humano
HepG2	Célula de Carcinoma Hepatocelular Humano
Hg	Mercúrio
HK-2	Células Renais Humanas
HL-60	Linhagem Celular Oriunda de Leucemia Humana
HO[•]	Radical Hidroxila
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
Hsp70	Proteína de Choque Térmico de 70 kDa
HT	Hidrotirosol
HTC	Células de Fígado de Rato
HTPs	Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
I-407	Células Epiteliais de Intestino Humano
IARC	Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer
II	Índice Interfásico
IM	Índice Mitótico
L-02	Células de Fígado Humano
LDH	Lactato Desidrogenase
LE	Lagoa de Estabilização
LLC-PK₁	Linhagem Celular de Túbulo Renal Proximal de Porcos
MAPEG	<i>Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid e Glutathione Metabolism</i>
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MDA	Malondialdeído
MMS	Metilmetano Sulfonato
MN	Micronúcleo
Mn	Manganês
MOE	Matéria Orgânica Extraível
MPO/SEPURB,SRHSO	Ministério do Planejamento e Orçamento/Secretaria de Política Urbana, Secretaria de Recursos Hídricos
MTT	<i>3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide</i>

NAC	<i>N</i> -acetil- <i>L</i> -cisteína
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
Ni	Níquel
<i>o,p'</i>-DDT	orto,para' –diclorodifeniltricloroetano
OCS	Octacloroestireno
OD	Oxigênio Dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	Polimerase poli(ADP-ribose)
Pb	Chumbo
PBS	Solução Salina tamponada com Fosfato
PCJ	Bacia do Piracicaba, Capivari e Jundiaí
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLHC-1	Carcinoma Hepatocelular de Peixe
PROD	Pentoxiresofurina O-desetilase
q-PCR	PCR em Tempo Real
q-RT-PCR	PCR de transcriptase reversa em Tempo Real
REPLAN	Refinaria do Planalto Paulista
RNA	Ácido Ribonucléico
S	Latitude
SH	Grupo Sulfidril
SiO₂	Dióxido de Silício
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCE	Tricloroetileno
TK6	Células Humanas Linfoblastóide
TRL1215	Células de Fígado de Rato
TUNEL	<i>Terminal Deoxynucleotidil Transferase Uracil Nick End Labeling</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas
UV-Vis	Ultravioleta Visível
V79	Células de Fibroblasto de Pulmão de Hamster Chinês
Vero	Células de Rim de Macaco Verde Africano
W	Longitude
Zn	Zinco
γ-CE	γ -glutamilcisteína
γ-H2AX	histona H2A fosforilada

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	11
2. Objetivos Gerais.....	14
3. Revisão da literatura.....	15
3.1. Poluição Ambiental.....	15
3.2. HPA.....	16
3.3. Ensaio	17
3.3.1. <i>Allium cepa</i>	17
3.3.2. Cultura de células de mamíferos	19
3.3.3. Ensaio do Cometa	20
3.3.4. Teste do Micronúcleo	21
3.3.5. Estresse Oxidativo	22
3.4. Classificação das águas	22
4. Materiais e Métodos	24
4.1. Material Biológico	24
4.2. Localização da área de estudo e coleta das amostras de água.....	24
4.3. Bioensaios	26
4.3.1. Bioensaio com <i>Allium cepa</i>	26
4.3.1.1. Testes de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em Células Meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	26
4.3.1.2. Testes de Micronúcleos em Células F1 de <i>Allium cepa</i>	27
4.3.2. Bioensaios com células CHO-K1 (<i>cells Chinese hamster ovary</i>)	27
4.3.2.1. Tratamentos	28
4.3.2.2. Ensaio do Cometa em células CHO-K1	28
4.3.2.3. Teste do micronúcleo em células CHO-K1	29
5. Resultados.....	31
ARTIGO 1: O uso de ensaios de estresse oxidativo na toxicologia ambiental – uma revisão	32
ARTIGO 2: Avaliação dos possíveis impactos da indústria de petróleo, sob os aspectos de genotoxicidade e mutagenicidade	95
ARTIGO 3: Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de águas servidas e receptoras de efluentes de refinaria de petróleo.	127
6. Conclusão Geral	159
7. Bibliografia	161

1. Introdução Geral

A crescente urbanização e industrialização têm intensificado a contaminação dos corpos d'água e se tornou uma preocupação no mundo todo, devido aos danos ambientais ocasionados pelo despejo dos resíduos gerados por essas atividades. Assim, vem sendo cada vez mais discutida e exigida a aplicação de tratamento eficiente de descontaminação das águas residuais, a fim de se minimizar os impactos que esta poluição possa, eventualmente, causar nos ecossistemas aquáticos e terrestres.

As principais atividades geradoras de resíduos que contaminam o meio ambiente envolvem os esgotos domésticos, as atividades industriais e a agricultura. Dentre as diversas atividades industriais poluidoras do meio ambiente, destacam-se as refinarias de petróleo. O petróleo é um composto constituído por uma mistura complexa de substâncias químicas, onde predomina a presença de hidrocarbonetos, que podem chegar a mais de 90% da sua composição. Em menor quantidade, podem-se encontrar os derivados orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organo-metálicos (ZILIO; PINTO, 2002). A poluição de recursos hídricos por este tipo de atividade industrial pode atingir grandes proporções, pois, segundo Byers et al. (1995), as refinarias utilizam grandes volumes para o desenvolvimento dos seus processos produtivos, valores estes que podem chegar, em média, a 65-90 litros de água utilizada por barril de petróleo bruto processado.

Os HPA e seus derivados representam uma ameaça eminente para a saúde humana. Segundo Netto et al. (2000), o que determina a composição e a complexidade da mistura de HPA é sua fonte emissora. A constituição e concentração de HPA em uma mistura pode interferir nas funções da membrana celular, por se ligarem aos sítios hidrofóbicos presentes nessa estrutura e, assim, induzirem a deformações e perturbações moleculares, além de também alterarem o próprio sistema enzimático celular (TUVIKENE, 1995).

Devido a todas essas características descritas a cima, muitos pesquisadores vêm desenvolvendo pesquisas, em diferentes organismos testes, a fim de avaliar a toxicidade dos HPA. Segundo Leme e Marin-Morales (2009), é necessário identificar os compostos que possam interagir com o DNA, para garantir que o meio ambiente esteja o mais livre possível de poluentes que possam comprometer os ecossistemas. Muitas técnicas e metodologias, desenvolvidas com diversos organismos teste, vem sendo aplicadas em estudos que avaliam as potencialidades genotóxicas e mutagênicas de agentes químicos. Assim, existe na literatura uma gama de estudos que utilizam plantas superiores (ODEIGAH et al., 1997; MONARCA et al., 2002; LEME; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; CABARAVIDIC, 2010; FENG et al., 2011), peixes (ÇAVAS;

ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; BOLOGNESI et al., 2006; VANZELLA et al., 2007; HOSHINA et al., 2008), bactérias (BÉKAERT et al., 1999; MONARCA et al., 2002; PEREIRA et al., 2010), linhagem de cultura celulares (DIAMOND et al., 1984; PARK et al., 2006; KRISHNAMURTHI et al., 2007; TARANTINI et al., 2009; LAGERQVIST et al., 2011), entre outros organismos.

O presente estudo utilizou como bioindicador dois organismos distintos: *Allium cepa* e a células de ovário de Hamster Chinês (CHO-K1). Foram realizados com estes organismos os testes de aberrações cromossômicas, micronúcleo e ensaio do cometa, a fim de se avaliar o potencial genotóxico e/ou mutagênico do efluente gerado por uma refinaria de petróleo, bem como a qualidade das águas dos rios sobre a influência desta atividade industrial.

A espécie *Allium cepa* tem se mostrado uma eficiente ferramenta para identificação de danos cromossômicos e distúrbios no ciclo celular, pois os cromossomos desta espécie apresentam condições favoráveis para esse tipo de estudo (FRISKESJÖ, 1985). Segundo Leme e Marin-Morales (2008), as análises de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN) em células meristemáticas e MN em células F₁ de *A. cepa* tem sido descrita como bons indicadores de ação celular de agentes químicos presentes no ambiente.

O teste do MN deve envolver células que tenham completado somente um ciclo de divisão celular, pois não se conhece o destino dos MN após mais de ciclo de divisão (FENECH, 2000). Assim, o método considerado mais seguro de análise de mutagenicidade para testes com culturas celulares, tanto pela simplicidade como pela segurança na interpretação dos resultados, é o ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (FENECH; MORLEY, 1985). A citocaliasina B (Cit-B) é uma droga que induz o bloqueio da citocinese, por ter uma ação sobre células que estão completando o ciclo da divisão celular. A identificação de seu efeito é feita pela visualização de uma célula binucleada (FENECH, 2000).

O ensaio do cometa possui diversas aplicações, sempre se baseando em avaliações de danos e reparo do DNA. O ensaio atrai adeptos por sua sensibilidade, versatilidade, rapidez e economia, além da sua facilidade de divulgação nos meios científicos e pela eficiência de interpretação dos resultados. O ensaio envolve a lise celular, por meio de ação de detergentes que, quando incorporados nas lâminas cobertas por agarose, tornam as células imobilizadas para serem submetidas à corrida eletroforética. Sua aplicação mais comum é em células animais, principalmente em cultura celular ou isolamento de células de um determinado tecido. Porém, embora existam métodos que estão sendo desenvolvidos também

para células vegetais. Além disso, tem a capacidade de detectar baixos níveis de danos e faz uso de um pequeno número de células por amostra (COLLINS, 2004).

2. Objetivos Gerais

Considerando que o Rio Jaguari é fonte de captação de água destinada às atividades da maior Refinaria de Petróleo do Estado de São Paulo e que esta gera, após tratamento, efluentes que são lançados no Rio Atibaia, e que mais adiante ocorre a confluência destes dois rios para formar o Rio Piracicaba, este projeto tem por objetivo geral investigar a possível presença de agentes contaminantes com potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico, decorrentes da emissão de efluente da refinaria de petróleo, bem como avaliar os efeitos sinérgicos derivado das várias emissões que ocorrem ao longo dos rios Jaguari e Atibaia, como também avaliar a qualidade das águas do Rio Piracicaba, logo na sua origem, por meio de:

- Análise físico-química (pH, temperatura, salinidade, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido) e de químicos inorgânicos das águas dos rios Jaguari, Atibaia e início do Piracicaba;
- Análise dos possíveis efeitos genotóxicos (teste de aberrações cromossômicas) e mutagênicos (teste do micronúcleo) das águas dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba, por meio do sistema-teste *Allium cepa*;
- Análise dos possíveis efeitos genotóxicos (ensaio do cometa) e mutagênicos (teste do Micronúcleo) das águas dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba por meio do sistema-teste *in vitro* CHO-K1;
- Avaliar os mecanismos de ação dos contaminantes presentes nas águas dos rios estudados, bem como avaliar a eficiência dos sistemas-teste propostos para a detecção deste tipo de contaminação.

3. Revisão da literatura

3.1. *Poluição Ambiental*

Muitos produtos químicos apresentam potencial tóxico que podem, quando atingem o ambiente, contaminar os lagos, a atmosfera, os alimentos e até a água destinada ao consumo humano (DEGUCHI et al., 2007). Dentre as atividades humanas que mais comprometem a qualidade ambiental estão os descartes industriais, as atividades urbanas e as atividades agrícolas (VANZELLA et al., 2007). Porém, convém ressaltar que esses contaminantes de origem antropogênica acumulam-se no meio, caracterizando-se em uma ameaça para os organismos vivos eventualmente expostos (CAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2005).

Os poluentes tóxicos que apresentam potencial mutagênico podem causar efeitos diretos à saúde humana, como cânceres, arteriosclerose, doenças cardiovasculares e envelhecimento precoce (RADIC et al., 2010).

Segundo Krishnamurthi et al. (2007), poucos são os estudos que avaliam os riscos ocasionados por amostras ambientais, o que leva a uma falta de informações sobre a sua toxicidade, pois em muitos casos falta compreender o comportamento das substâncias genotóxicas presentes em misturas complexas, bem com as suas interações sinérgicas e antagonistas. Para se entender melhor os efeitos gerados por essas interações, são aplicados ensaios biológicos que possibilitem caracterizar os efeitos de exposição crônica e/ou aguda sobre os organismos, mesmo sem a quantificação e identificação prévia dos compostos químicos presentes na amostra (OHE et al., 2004).

O potencial genotóxico de poluentes ambientais pode estar relacionado com processos carcinogênicos, teratogênicos e a uma série de outros distúrbios. Em decorrência disto, há cada vez mais a necessidade de desenvolvimento de ensaios com organismos vivos sensíveis, que sejam capazes de responder às potencialidades tóxicas dos químicos ambientais (KLOBUCAR et al., 2003) e de avaliar a ação destes químicos sobre o material genético dos organismos, mesmo quando estes estiverem presentes em baixas concentrações (FRENZILLI et al., 2009). Também, é de extrema importância para a saúde ambiental a realização de testes de toxicidade e genotoxicidade, combinados com análises físico-químicas, a fim de avaliar a qualidade dos ambientes (EGITO et al., 2007).

As análises físico-químicas permitem detectar a presença de agentes químicos que podem oferecer um perigo para o ambiente aquático e para os seres humanos (VAN DER OOST et al., 2003). No entanto, segundo Oberholster et al. (2008), a realização apenas de

análises químicas e físicas da água não fornece uma avaliação detalhada da saúde de um ecossistema. Os autores acrescentam que o monitoramento químico não leva em conta a variedade de perturbações induzidas pelo homem, que incluem as alterações decorrentes de degradação e destruições de *habitats*, capazes de prejudicar a saúde biológica. Portanto, o biomonitoramento oferece algumas vantagens adicionais importantes, que as análises químicas convencionais, sozinhas, são incapazes de oferecer (ZHOU et al., 2008).

De acordo com Hoshina et al. (2008), entre os diversos setores que contribuem para a contaminação dos corpos hídricos, as refinarias de petróleo são consideradas relevantes, pois os processos de refino do petróleo exigem uma grande quantidade de água, além de seus efluentes serem portadores de diversos poluentes, como metais, fenóis, óleos e gorduras, amônia e HPA. Embora haja a reutilização das águas servidas pela própria refinaria, uma grande quantidade de compostos tóxicos pode permanecer até o efluente final da indústria (AVCI et al., 2005).

Em um estudo realizado por Krishnamurthi et al. (2007), os autores avaliaram lodos gerados por uma refinaria de petróleo da Índia e concluíram que essas amostras apresentam compostos genotóxicos, por meio de ensaios realizados com células de mamíferos, e um contato com este lodo podia representar um risco genotóxico também para os seres humanos.

3.2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)

Entres os hidrocarbonetos, os policíclicos aromáticos, encontrados na combustão incompleta de combustíveis fósseis, na matéria orgânica e no petróleo bruto (BIHARI et al., 2006), são considerados contaminantes altamente tóxicos por apresentarem efeitos mutagênicos e cancerígenos, enquanto outros hidrocarbonetos são conhecidos pelo seu potencial oxidante (PAGLIA; VALENTINE, 1967; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

De acordo com o IARC (2005) os HPA são classificados como cancerígenos (grupo 1), provavelmente cancerígenos (grupo 2A) ou possivelmente cancerígenos (grupo 2B) para humanos. Estes compostos são de característica lipofílica, por apresentarem baixa solubilidade em água e alta solubilidade em lípidios, e são acumulados nos sedimentos dos ambientes aquáticos (BIHARI et al., 2006; MARIN-MORALES et al., 2010). Segundo Tuvikene (1995), a característica lipofílica dos HPA permite uma rápida absorção destes compostos pelas membranas biológicas, facilitando a sua acumulação nos tecidos. Além disso, os HPA são compostos persistentes e podem se bioacumular através da cadeia

alimentar, representando um problema para a saúde humana, quando estes sofrem exposição em longo prazo (LV et al., 2010).

Os HPA podem ser gerados por duas fontes principais: naturais, provenientes de erupções vulcânicas, exudatos de árvores, incêndios florestais e de pastagens; e antropogênicas, que são gerados durante a combustão de materiais carbonosos como o carvão, gasolina e diesel e derramamentos de petróleo (LV et al., 2010; HARITASH; HAUSHIK, 2009). As fontes emissoras podem influenciar na composição e na complexidade das misturas de HPA e gerar uma grande variedade desses compostos, em diferentes níveis de concentração (NETTO et al., 2000). A persistência dos hidrocarbonetos no ambiente também está relacionada com o seu ponto de ebulição, ou seja, quanto maior a temperatura de ebulição, maior é sua permanência no ambiente (WHO, 1982).

De acordo com Mas et al. (2010), o interesse em conhecer as vias de entrada dos HPA no meio ambiente estimula a investigação de suas propriedades e suas atividades biológicas, principalmente, porque muito deles apresentam um potencial tóxico e cancerígeno. No entanto, estes compostos requerem ativação de metabólitos eletrofilicos para exercer seus efeitos mutagênicos e carcinogênicos (NETTO et al., 2000; XUE; WARHAWSKY, 2005). O primeiro passo no processo de ativação do HPA é a sua oxidação pela enzima P450, onde o seu metabolito final carcinogênico é capaz de interagir com as macromoléculas celulares, principalmente os ácidos nucleicos e proteínas (XUE; WARHAWSKY, 2005). Assim, os HPA podem causar, indiretamente, danos oxidativos no DNA, devido à liberação de espécies reativas de oxigênio durante a sua metabolização (BAULIG et al., 2005; BRIEDE et al., 2005).

3.3. Ensaios

3.3.1. *Allium cepa*

Muitas plantas servem como bioindicadores para avaliação de efeitos mutagênicos e para o monitoramento ambiental, pela alta sensibilidade que apresentam na detecção dos fatores da poluição e para a toxicidade dos compostos químicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). A comprovação da eficiência dos ensaios genotóxicos realizados nos vegetais, para o monitoramento ambiental, deu-se pelos estudos internacionais colaborativos que receberam o apoio do Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), da Organização Mundial de Saúde (OMS) e também da *E.U. Environmental Protection Agencia* (EPA dos Estados Unidos) (MA et al., 1995). Estes testes permitem a observação de diferentes

parâmetros genéticos, como as aberrações cromossômicas, que ocorrem a partir de mutações pontuais, tanto em células individuais como em órgãos (GRANT, 1994).

Segundo Vidakovic-Cifrek et al. (2002), as alterações cromossômicas estruturais ou numéricas, que podem acontecer em qualquer fase do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), são consideradas evidências de efeitos mutagênicos, induzidos por agente clastogênicos e/ou aneugênicos. Segundo Houk (1992), as três grandes classes de danos podem ser descritas como: mutações gênicas, referentes às mutações no gene, que são alterações do DNA dentro de seqüências gênicas; ações clastogênicas, referentes às alterações na estrutura cromossômica, usualmente resultando em ganho, perda, ou rearranjo de peças cromossômicas; e ações aneugênicas, referentes ao ganho ou perda de cromossomos inteiros no complemento cromossômico.

A espécie *Allium cepa* contém células meristemáticas homogêneas com grandes e poucos cromossomos ($2n = 16$), bem visíveis e facilmente corados, o que permite uma melhor avaliação dos danos cromossômicos e/ou distúrbios na divisão celular (GRANT, 1982; FRISKESJÖ, 1985; KURAS et al., 2006). Esta espécie, que é freqüentemente utilizada na avaliação de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de várias substâncias (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; FERNANDES et al., 2007), também apresenta uma alta correlação com os outros sistemas biológicos usados em ensaio para o mesmo fim, como, por exemplo, os testes com mamíferos (GRANT, 1982; CHAUHAN et al., 1999; KURAS et al., 2006).

Muitos estudos têm considerado o teste *Allium cepa*, como uma técnica muito eficaz para determinar a toxicidade e os níveis de poluição no meio ambiente (GROVER; KAUR, 1999; CHADRA et al., 2005; FATIMA; AHAMAD, 2006; EGITO et al., 2007; LEME et al., 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009; BIANCHI et al., 2011; MAZZEO et al., 2011; VENTURA-CAMARGO et al., 2011). O teste faz uso do índice mitótico (IM) como indicador do nível de proliferação celular (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Valores reduzidos ou aumentados deste parâmetro podem indicar a presença de agentes citotóxicos (FERNANDES et al., 2007). Outros parâmetros podem ser monitorados na divisão celular, tais como aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e micronúcleos (MIGID et al., 2007). A presença de micronúcleos pode ser resultado de fragmentos cromossômicos por ação clastogênica ou pela perda de cromossomos inteiros em decorrência de ação aneugênica de um determinado agente (FENECH, 2000). Já a formação de brotos nucleares é indicativa do

processo inicial de expulsão do material genético e, conseqüentemente, podem estar relacionados com a formação de micronúcleos (FERNANDES et al., 2007).

3.3.2. Cultura de células de mamíferos

Com o controle cada vez mais rigoroso do uso de animais de laboratório em experimentos biológicos, torna-se necessário o desenvolvimento e padronização de testes *in vitro*, que possam detectar a toxicidade de dispositivos e de substâncias para seres humanos (ROGERO et al., 2003). Ensaio com cultura de células constitui uma importante ferramenta de investigação básica, na atualidade, servindo a diversas áreas de investigação, como a imunologia, a virologia, a genética e a toxicologia (LEWINSKA et al., 2007). Um dos principais objetivos de sistemas *in vitro* é reproduzir as características dos tecidos originais bem como as interações entre as células para simular o ambiente *in vivo* (ZUCCO et al., 2004).

Segundo Cardozo et al. (2006), o uso de testes *in vitro* aplicados em culturas de células de mamíferos são eficazes na avaliação de agentes genotóxicos e, aplicá-los em áreas contaminadas por atividades antrópicas, junto a outros ensaios, possibilita uma maior obtenção dos níveis genotóxicos.

As vantagens desta técnica *in vitro* sobre os métodos *in vivo* são: a possibilidade de se limitar o número de variáveis experimentais; se obter dados significativos mais facilmente; e realizar ensaios em períodos mais curtos (ROGERO et al., 2003). Pequenas amostras de células são suficientes para as avaliações, não havendo a necessidade de submeter à eutanásia grandes quantidades de animais (CARVALHO, 1996). Ainda, é possível manter linhagens celulares derivadas de tecidos humanos, cujos dados são considerados mais completos e mais confiáveis na avaliação de riscos toxicológicos (ZUCCO et al., 2004). Segundo DiPaolo et al. (1981), o uso de ensaios *in vitro*, como a cultura de célula, tem sido considerado uma ferramenta eficaz e sensível para avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de contaminantes químicos. Além disso, o uso de ensaios *in vitro* possibilita também um direcionamento dos efeitos tóxicos específicos para um órgão alvo (ZUCCO et al., 2004).

As células mantidas em cultura são relativamente fáceis de serem manipuladas e podem ser observadas do ponto de vista microscópico, bioquímico e molecular, após a adição de substâncias no meio em que estão sendo cultivadas. No entanto, o estudo dos efeitos de uma determinada substância, aplicada em uma linhagem celular pré-determinada, deve ter seu comportamento estudado também *in vivo*, uma vez que o próprio organismo pode apresentar diversos fatores que irão interferir nos resultados (MORALES, 2008).

A linhagem celular CHO-K1, proveniente de ovário de *hamster* chinês, tem sido utilizada em estudos que envolvem efluentes industriais (MATSUMOTO et al., 2003; 2005), e em estudos que avaliam a toxicidade dos HPA (KRISHNANURTHI et al., 2007; CHENG et al., 2008; AOUDADENE et al., 2008).

3.3.3. Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa, também conhecido como ensaio de eletroforese em gel de célula única, é uma técnica rápida e quantitativa que possibilita a visualização de danos no DNA em células eucarióticas (LIAO et al., 2009). Esse ensaio é baseado na quantificação de fragmentos de DNA que migram para fora do nucleóide da célula durante a eletroforese e permite avaliar danos que podem ser reparados (FRENZILLI et al., 2009; LIAO et al., 2009). Assim, esse método tem sido muito empregado para detectar danos no DNA na área de ecotoxicologia (FRENZILLI et al., 2009).

Os primeiros pesquisadores a quantificar os níveis de danos no DNA em células individuais foram Rydberg e Johanson (1978), que utilizaram lâminas de agarose, solução de lise e neutralização, coloração com laranja de acridina, analisados por um fotômetro. Mais tarde, Ostling e Johanson (1984) desenvolveram o ensaio do cometa, onde as células são introduzidas sobre lâminas cobertas com agarose, lisadas e tratadas com sal. Após esses processos, o DNA é submetido a uma corrida eletroforética em condições neutras e corados com brometo de etídio. No entanto, Singh e colaboradores (1988) introduziram uma versão do ensaio do cometa, usada atualmente, que submete a lâmina com o material celular a uma corrente eletroforética alcalina para detectar os danos causados no DNA, tanto por agentes físicos como químicos.

Biomarcadores genotóxicos são empregados para avaliar os efeitos de contaminantes sobre os organismos expostos, sobretudo aqueles potencialmente indutores de danos celulares (FRENZILLI et al., 2009).

O ensaio do cometa é considerado um teste genotóxico rápido, simples e sensível, capaz de detectar danos no DNA de células individuais induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (ANDRADE et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2006; PAVLICA et al., 2001). Para Speit et al. (2009), o ensaio do cometa ganhou popularidade por ser um teste capaz de detectar baixos níveis de danos e reparos no DNA e por ser aplicável em diversos tecidos e/ou tipo celulares. Outras vantagens que o diferencia dos métodos citogenéticos convencionais é que esta técnica requer um pequeno número de células e não necessita que estas estejam em divisão, podendo, então, ser aplicada em qualquer fase do ciclo celular

(PAVLICA et al., 2001). Segundo He et al. (2000), ainda, uma parte dos danos que ocorrem nas células pode ser reparada, dependendo do estágio do ciclo celular e/ou do tipo de agente mutagênico testado. Somente uma pequena quantidade de danos não são reparados, se tornam uma mutação fixa.

3.3.4. Teste do Micronúcleo

Micronúcleos (MN) são massas de cromatina com aparência de um pequeno núcleo, resultante da condensação de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que atrasaram a sua migração para os pólos na anáfase. Portanto, são porções cromossômicas que não foram incorporadas ao núcleo principal da célula-filha, durante a divisão celular (SCHMIDT, 1976, AL-SABTI; METCALFE, 1995), devido à ausência de centrômero, danos no aparelho mitótico ou por defeito na citocinese (BOLOGNESI et al., 2006; ERGENE et al., 2007). São considerados MN clássicos as estruturas circulares de mesma refringência que o núcleo, não ligadas a este e com um tamanho correspondente de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

O teste do MN *in vitro*, também conhecido como ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN), faz uso da citocalasina B que é um inibidor da polimerização da actina, proteína envolvida na formação do anel de microfilamentos relacionado com a contração do citoplasma que separa os núcleos das células filhas durante a citocinese (CARTER, 1967). No entanto, essa substância não evita a divisão nuclear, resultando em um acúmulo de células binucleadas, formadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão, independentemente do grau de sincronia e da proporção de células em divisão (FENECH, 1997; KIRSCH-VOLDERS et al., 1997; FENECH, 2000). Assim, essa metodologia tem sido frequentemente utilizada para detectar danos no DNA resultante da presença de agentes clastogênicos e aneugênicos (AARDEMA et al., 1998; FENECH, 2000).

O teste do MN é uma importante técnica usada no monitoramento ambiental, pois avalia a potencialidade mutagênica de agentes presentes no ambiente, sendo considerado um bioindicador que consegue avaliar a mutagenicidade do ecossistema (SOUZA e FONTANETTI, 2006). Ayllon e Garcia-Vazquez (2000) complementam a aplicação do teste, relatando a capacidade de sua utilização para avaliar a poluição aquática e testar a genotoxicidade de determinados compostos químicos, por meio de exposições *in vivo* diretas e indiretas.

É possível observar, também, pontes nucleoplasmáticas entre os núcleos da célula binucleada. Provavelmente essas pontes ocorram devido à formação de cromossomos

dicêntricos, onde os dois centrômeros são puxados para os polos diferentes da célula e acabam por resultar em numa ponte de DNA envolto por uma membrana nuclear. Assim, a presença dessas pontes nucleoplasmáticas encontradas nas células binucleadas são endpoints que devem ser considerados na contagem do teste de MN (FENECH, 2000).

3.3.5. Estresse Oxidativo

Os dados referentes à revisão de literatura sobre estresse oxidativo estão apresentados no artigo de revisão (artigo 1), que faz parte dos resultados desta dissertação.

3.4. Classificação das águas

Os rios Atibaia e Jaguarí, pertencentes à bacia do Piracicaba, Capivari e Jundiaí (PCJ), passam pelo município de Paulínia-SP, região esta que abriga 51.242 habitantes, 107 indústrias, dentre elas a Refinaria de Petróleo de Paulínia, a maior refinaria de petróleo do sistema PETROBRÁS, responsável pelo refino de cerca de 20% do petróleo do Brasil. Esta Refinaria, que possui uma área de 9.125 milhões de m², capta água para o desenvolvimento de suas atividades no rio Jaguarí e despeja os seus efluentes, após passagem por tratamentos físico-químicos, biológicos e por lagoa de estabilização, no rio Atibaia.

Segundo o comitê do PCJ e a MPO/SEPURB,SRHSO [Consórcio Figueiredo Ferraz / COPLASA S.A. (1999)], o rio Jaguarí tem suas águas classificadas como de Classe 2 e o rio Atibaia de classe 4. Esses dois rios se unem para formar o rio Piracicaba que, segundo a mesma classificação, tem suas águas classificadas como pior que classe 4 (Figura 1).



Figura 1: Mapa hidrográfico da Bacia do PCJ (Fonte:CONSÓRCIO PCJ, 2005).

4. Materiais e Métodos

4.1. Material Biológico

Foram utilizados como organismo-teste sementes de *Allium cepa* (variedade Baia piriforme) e células de mamíferos (células de ovário de *hamster* chinês – CHO-K1) fornecidas pela Profa. Dra. Sílvia Tamie Matsumoto da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e mantidas em cultura no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro.

4.2. Localização da área de estudo e coleta das amostras de água

As amostras de água foram coletadas em 7 (sete) pontos distintos de três rios que sofrem influência das atividades da Refinaria de Petróleo de Paulínia-SP (Figura 2), como segue:

P1: Água de capacitação pela refinaria – Rio Jaguari;

P2: Efluente bruto- entrada do tratamento biológico do efluente;

P3: Entrada da lagoa de estabilização (LE) da refinaria;

P4: Saída da lagoa de estabilização (água destinada aos despejos no Rio Atibaia, município de Paulínia-SP), efluente propriamente dito;

P5: Água do Rio Atibaia – montante, 200 metros acima do descarte do efluente industrial tratado, proveniente da LE;

P6: Água do Rio Atibaia – jusante, cerca de 500 metros abaixo da descarga do efluente industrial tratado, proveniente da LE;

P7: Rio Piracicaba – cerca de 500m após a confluência dos rios Jaguari e Atibaia.

A distribuição geográfica está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1. Coordenadas geográficas dos pontos de coleta.

Ponto	Latitude (S)	Longitude (W)
Ponto 1	22° 41' 48"	47° 08' 59"
Ponto 2	22° 44' 18"	47° 07' 17"
Ponto 3	22° 44' 26"	47° 07' 33"
Ponto 4	22° 44' 22"	47° 07' 03"
Ponto 5	22° 41' 28"	47° 07' 12"
Ponto 6	22° 44' 22,3"	47° 07' 40,8"
Ponto 7	22° 45' 30"	47° 18' 54"

As coletas foram realizadas em três períodos do ano, para contemplar as diferentes condições climáticas típicas da nossa região: estação seca e fria; estação seca e quente; e estação quente e chuvosa.

As análises físico-químicas das amostras de água, coletadas em todos os pontos acima descritos, foram realizadas no local da coleta (pH, OD, DBO e DQO); as químicas no Departamento de Bioquímica da UNESP/IB Rio Claro e no Centro de Estudos Ambientais da UNESP – CEA (parâmetros químicos e bioquímicos, como fosfatos, nitratos, metais e outros).

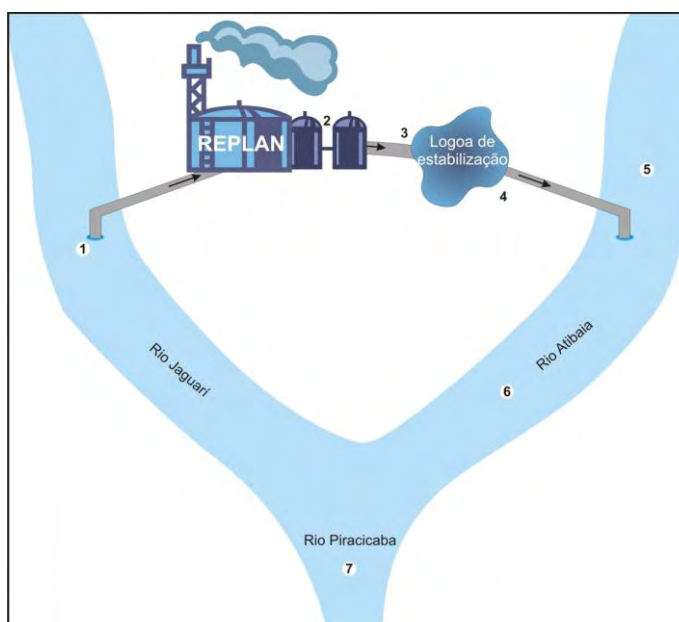


Figura 2. Esquema dos sete pontos de coletas na área de influência da refinaria de petróleo de Paulínia-SP.

4.3. Bioensaios

4.3.1. Bioensaio com *Allium cepa*

Sementes de *Allium cepa* foram colocadas para germinar em placas de Petri forradas com papel filtro contendo amostras das águas coletadas nos pontos de 1 a 7. Os controles foram realizados com água Mili-Q, para o controle negativo e solução aquosa de metilmetano sulfonato (MMS - 4×10^{-4} M), para o controle positivo.

Após germinação, quando as radículas atingiram cerca de 1,5 centímetros, parte delas foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 de ácido acético – v:v). A outra parte foi transferida para placas de Petri contendo água Mili-Q, por um período de 48 horas, para se estimar a potencialidade de recuperação do organismo exposto, quando as condições retornam à normalidade. Posteriormente, estas raízes também foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1.

As raízes fixadas foram mantidas em geladeira até sua utilização na confecção das lâminas.

4.3.1.1. Testes de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em Células Meristemáticas de *Allium cepa*

Para os testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de raiz de cebola foi adotado o protocolo descrito por Grant (1982), com algumas modificações, como segue: as raízes fixadas em Carnoy 3:1 passaram por três banhos em água destilada. Posteriormente, foram submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N a 60° C por 10 minutos e, novamente, lavadas em água destilada (3 banhos). Após essa etapa, as raízes foram ligeiramente secas em papel filtro e transferidas para frascos escuros contendo reativo de Schiff por, aproximadamente, 2 horas. Realizada a reação, as raízes passaram por banhos em água destilada, até a total retirada do excesso de corante.

Para a confecção das lâminas, foi colocado um meristema sobre a lâmina e seccionanda, com o auxílio de um estilete, a sua região meristemática. O material foi recoberto com lamínula e suavemente esmagados em uma gota de Carmim Acético (2%). As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas, permanentemente, com resina sintética.

Para a análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos foram confeccionadas 10 lâminas para cada amostra de água coletada. Foram contadas, no mínimo, 500 células de cada lâmina analisada.

Para a análise dos efeitos genotóxicos e mutagênicos, foram considerados os diferentes tipos de aberrações cromossômicas, em diferentes fases do ciclo celular. As perdas, aderências cromossômicas, pontes, atrasos e broto nuclear foram usadas na avaliação da genotoxicidade e a presença de quebras cromossômicas e micronúcleos para registrar a presença de mutagenicidade.

Após a obtenção dos resultados de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade foi realizada a análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$, o qual possibilita a comparação dos tratamentos entre si e com o controle negativo. As lâminas que portaram as alterações mais representativas para cada anormalidade foram fotodocumentadas, para ilustrar os resultados.

4.3.1.2. Testes de Micronúcleos em Células F1 de *Allium cepa*

O procedimento para confecção das lâminas para análise das alterações em células F₁ foi realizado como descrito anteriormente, porém o material utilizado foi a região localizada a 1 milímetro acima da região meristemática.

A contagem de micronúcleos e a análise estatística também foi realizada de acordo com o descrito acima para as células meristemáticas.

4.3.2. Bioensaios com células CHO-K1 (cells Chinese hamster ovary)

As Células de Ovário de Hamster Chinês – CHO-K1 foram gentilmente cedidas pela Prof^a Dr^a Silvia Tamie Matsumoto (Universidade Federal do Espírito Santo – UFES) e estocadas em nitrogênio líquido no laboratório de Mutagênese do Departamento de Biologia da UNESP-IB/Rio Claro. Para o cultivo das células, foi utilizado o meio DMEM/F12, com solução antibiótica/antimicótica, suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os frascos de cultura de 25 cm² foram mantidos em temperatura controlada (37°C).

Inicialmente, as ampolas com a linhagem celular foram descongeladas em 10 mL de meio de cultura com soro. Após o crescimento celular, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS, tripsinizadas por alguns minutos, com Tripsina-EDTA 0,025% e, logo em seguida, a tripsina foi inativada com 1,5 mL de meio de cultura suplementado. Normalmente, os frascos de cultura de 25 cm² contêm em média 3×10^6 células e, para cada pré-frasco, foram necessários 1×10^6 . Assim, as células foram semeadas obedecendo a regra (1:3), cujo conteúdo foi distribuído gota a gota, para que todos os frascos contivessem a mesma quantidade de células, em 5 mL de meio suplementado.

O repique foi realizado para obter 54 pré-frascos. Após 24h, período corresponde a 2 ciclo de divisão celular e o tempo necessário para a aderência das células no frasco, as células foram expostas aos diferentes tratamentos (amostras de água e controles).

4.3.2.1. Tratamentos

Todas as amostras de água foram matidas à 37°C e o pH foi corrigido para 7,3. Em seguida, foi feita a esterilização das amostras, utilizando filtro de seringa com membrana de poliestersulfona com 33 mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade. Para o controle negativo, foi utilizado PBS e para o controle positivo um solução aquosa de metilmetanosulfonato (MMS - 4×10^{-4} M).

O volume das amostras (água e controles) foi o equivalente a 20% do volume total do frasco. Assim, foram adicionados, em cada frasco, 2 mL de amostra e 8 mL de meio de cultura, totalizando 10 mL de volume final. O período de exposição aos tratamentos foi de 3 horas, sendo o material exposto posteriormente submetido aos ensaios do cometa do micronúcleo.

4.3.2.2. Ensaio do Cometa em células CHO-K1

Após o tempo de exposição aos tratamentos, foi realizada a coleta da suspensão celular. O meio de cultura foi descartado e os frascos lavados 2x com 5 mL de PBS. Após a retirada do excesso de PBS, as células foram tripsinizadas por alguns minutos e inativadas com 5 mL de uma mistura de meio novo e soro. A suspensão celular foi então transferida para tubos Falcon® e centrifugados, por 5 minutos, a 1000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e a suspensão homogeneizada.

Para a realização do ensaio de viabilidade celular, foram separados em criotubos, 20 µL da suspensão celular. Em seguida, foi adicionado, em cada amostra, 20 µL de Azul de Trypan. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, onde se quantificou os percentuais das células vivas (brancas) e células mortas (azuis) encontrada em cada um dos quatro quadrantes da câmara.

Para o ensaio do cometa, foram montadas lâminas previamente cobertas com agarose comum, com 20 µL da suspensão celular + 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão, a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram submetidas a solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8g de NaOH sólido para 1 L), pH 10, no escuro, em geladeira a 6° C, por 1 hora. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma

cuba de eletroforese, contendo o tampão de corrida eletroforética (NaOH 300mM + EDTA 1mM, com pH>13), por 20 minutos, para a denaturação do DNA. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 25 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas, com 3 banhos de 5 minutos, em tampão de neutralização (pH 7,2). Após neutralização, as lâminas foram fixadas, por 10 min, em etanol absoluto.

As lâminas foram coradas com 50 µL de solução de GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada) e analisadas imediatamente após a sua coloração. Foram analisados em microscopia de epifluorescência Leica, objetiva de 40x, filtro B - 3⁴ (excitação: i=420 n - 490 nM, barreira: I=520 nM) 100 nucleóides por lâmina, totalizando 300 nucleóides por tratamento. Os nucleóides foram classificados, visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos: classe 0 – nucleóide sem danos e que não apresenta cauda; classe 1: nucleóide com cauda menor que o seu diâmetro; classe 2: nucleóide com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes do seu diâmetro; classe 3: nucleóide com cauda 2 vezes maior que o seu diâmetro (SPEIT et al., 1996). Os escores de cada tratamento foram submetidos ao teste estatístico ANOVA: um critério/Dunnett (p<0,05), para comparação dos resultados entre os tratamentos e o controle negativo.

4.3.2.3. Teste do micronúcleo em células CHO-K1

Após a exposição das células aos tratamentos, o meio de cultura foi trocado por um novo meio e adicionado neste 3 µg/mL de citocalasina B por frasco, onde as culturas permaneceram, por 18 horas, para obtenção de células binucleadas. Passado este tempo de exposição à citocalasina, foi realizada a coleta das células. O meio de cultura foi reservado em tubos Falcon® e os frascos foram lavados 2x com 5 mL de PBS e tripsinizados. Para inativar a tripsina, foi utilizado o mesmos meio de cultura anteriormente reservado. Após o desprendimento das células, todo o conteúdo do frasco foi transferido, novamente, para os tubos Falcon®, onde foi adicionada 1 gota de formal 40%. Os tubos foram homogeneizado suavemente e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. Em seguida, foi retirado 1,5 mL do sobrenadante, adicionado 1,5 mL de solução hipotônica de citrato de sódio 1%, seguido de homogeneização. Novamente, os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Por fim, o material foi fixado com solução fixadora Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético) e armazenado em geladeira.

Para a confecção das lâminas, o material foi centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante descartado e foi adicionado 0,5 mL de fixador novo ao tubo. Em seguida, essa suspensão celular foi gotejada em uma lâmina pré-lavada e coberta por um filme de água

destilada a 4°C. Em seguida, as lâminas foram coradas com *Giemsa* 5% por, aproximadamente, 10 minutos.

Foram contadas 1.000 células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração, por réplica, totalizando 3.000 células por tratamento. Foram contabilizadas células binucleadas normais e células binucleadas portadoras de micronúcleos, ponte e/ou brotos nucleares (FENECH et al., 2003).

A análise de significância dos resultados foi feita pelo teste estatístico ANOVA: um critério/*Dunnett* ($p < 0,001$).

5. Resultados

ARTIGO 1: O uso de ensaios de estresse oxidativo na toxicologia ambiental – uma revisão

Raquel Vaz Hara, Bruna de Campos Ventura Camargo, Maria Aparecida Marin-Morales

ARTIGO 2: Avaliação dos possíveis impactos da indústria de petróleo, sob os aspectos de genotoxicidade e mutagenicidade

Raquel Vaz Hara, Maria Aparecida Marin-Morales

ARTIGO 3: Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de águas servidas e receptoras de efluentes de refinaria de petróleo.

Raquel Vaz Hara, Maria Aparecida Marin-Morales

O uso de ensaios de estresse oxidativo na toxicologia ambiental – uma revisão

Raquel Vaz Hara¹, Bruna de Campos Ventura Camargo¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, 13.506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

As ERO (espécies reativas de oxigênio) podem ser produzidas por várias fontes endógenas ou exógenas. Quando estes agentes oxidativos não são eliminados pela atuação eficiente do sistema de defesa antioxidante, a célula pode sofrer danos que, uma vez não reparados, resultam no estresse oxidativo. Primeiramente, essa revisão buscou reunir informações sobre a origem das ERO e os mecanismos de estresse oxidativo decorrentes dos possíveis danos aos ácidos nucleicos, lipídios e proteínas. Além disso, foi descrita a ação dos sistemas de defesa antioxidante enzimático (CAT, SOD, GR, GPx e GST) e não-enzimático (GSH, vitaminas C e E, e carotenóides). A toxicidade de diferentes contaminantes ambientais tem sido avaliada pelo uso de biomarcadores de estresse oxidativo em linhagens celulares de mamíferos mantidas em cultura. Assim, o presente estudo relata algumas pesquisas que vêm sendo desenvolvidas para avaliar a influência de agrotóxicos, efluentes industriais e urbanos e de nanopartículas nos sistemas de defesa antioxidante, na produção de ERO e nos possíveis danos oxidativos induzidos por estes compostos sobre as biomacromoléculas. Também foi discutida a origem de doenças humanas, com ênfase às doenças neurodegenerativas e câncer, derivadas das lesões oxidativas ocasionadas pela presença de ERO nas células.

Palavras-chaves: cultura de células de mamíferos, espécies reativas de oxigênio, contaminantes ambientais, danos oxidativos, defesas antioxidantes.

ABSTRACT

ROS (Reactive Oxygen Species) are induced by a variety of endogenous and exogenous sources. When these oxidant agents are not eliminated by the efficient action of the antioxidant defense system, the cell may be damaged and if not repaired it may result in oxidative stress. Firstly, this review aimed to gather information about the source of the ROS and the oxidative stress mechanisms resulting from the possible damage to nucleic acids, lipids and proteins. Additionally, the action of enzymatic (CAT, SOD, GR, GPx, and GST) and non-enzymatic (GSH, vitamins C and E, and carotenoids) antioxidant defense systems has been described. The toxicity of many environmental contaminants has been evaluated by the use of oxidative stress biomarkers in mammalian cell lines maintained in culture. Therefore, this article reports some researches that are being carried out in order to evaluate how the pesticides, industrial and urban effluents, and nanoparticles could affect the antioxidant defense systems, the ROS generation and what are the possible oxidative damage induced by such compounds to the cellular macromolecules. It was also discussed the origin of human diseases, emphasizing neurodegenerative diseases and cancer derived from the oxidative lesions caused by the presence of ROS in the cells.

Keywords: mammalian cells line; ROS (Reactive Oxygen Species); environmental contaminants; oxidative damage; antioxidant defense

1. INTRODUÇÃO

As atividades humanas têm provocado, ao longo dos anos, grandes impactos ambientais. O crescente desenvolvimento industrial, urbano e agrícola tem levado a um aumento considerável na produção de resíduos que, quando lançados no ambiente, podem causar sérios comprometimentos à qualidade ambiental e à saúde da biota.

Os poluentes inseridos no ambiente, bem como os subprodutos de sua degradação, podem se associar e formar misturas complexas de constituição e ação desconhecidas e causar efeitos deletérios aos organismos expostos (WHITE; RASMUSSEN, 1998). A ação destes compostos pode induzir efeitos fisiológicos, bioquímicos, patológicos e genéticos (ARNAIZ, 1995; CLAXTON et al., 1998), que interferem nos aspectos reprodutivos, de sobrevivência e, conseqüentemente, na estrutura das populações (FRACÁCIO et al., 2000). As substâncias provenientes de efluentes domésticos e industriais (MATSUMOTO et al., 2005; 2006; HOSHINA et al., 2008), os agrotóxicos (VENTURA et al., 2008; FERNANDES et al., 2009; MOORE et al., 2009; BIANCHI et al., 2011; MARAN et al., 2010; FARINA et al., 2011), as drogas farmacêuticas, os corantes (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; ZHANG et al., 2009a; VENTURA-CAMARGO et al., 2011), os metais pesados (MATSUMOTO et al., 2005; 2006; LU et al., 2011), os hidrocarbonetos derivados do petróleo e outros compostos orgânicos (LEME et al., 2008; MAZZEO et al., 2010; HANZALOVA et al., 2010) podem induzir alterações à biota, tanto pela exposição direta como indireta.

Pela grande exposição dos seres vivos a diferentes agentes químicos, torna-se cada vez mais necessário conhecer os processos biológicos que possam ser alterados pela ação dos contaminantes, bem como identificar as substâncias capazes de interagir com as diferentes organelas e/ou biomoléculas celulares, e, assim, melhor combater os efeitos biológicos da poluição, para minimizar os seus riscos (SILVA; FONSECA, 2003).

Segundo Finkel e Holbrook (2000), Regoli et al. (2002), Sohal et al. (2002) e Valavanidis et al. (2006), o interesse de se fazer uma avaliação sobre estresse oxidativo em estudos ecotoxicológicos deve-se ao fato de que vários poluentes ambientais induzem um desbalanço entre as ERO (espécies reativas de oxigênio) endógenas e exógenas, por meio de diferentes mecanismos bioquímicos (reações redox, metabolismo oxidativo dependente do citocromo P450, reação de Fenton), levando a uma diminuição das defesas antioxidantes de um organismo. Segundo Klaunig et al. (1997), os agentes tóxicos podem causar estresse oxidativo celular, por meio de metabolização direta de radicais intermediários primários ou pela ativação de fontes endógenas das ERO, que levam a danos tissulares, inflamações, doenças degenerativas e envelhecimento (Figura 1).

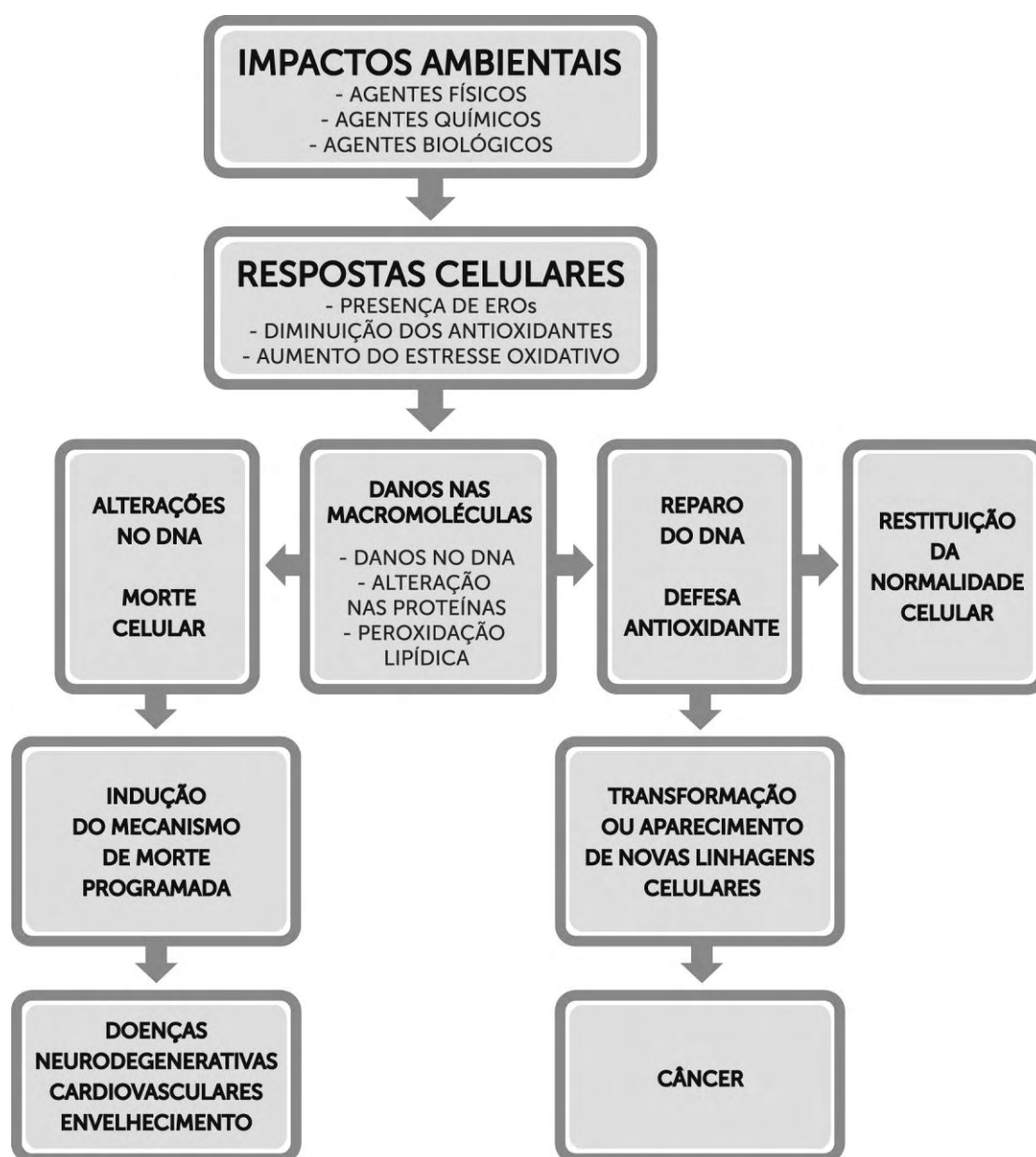


Figura 1. Efeitos tóxicos mediados por mecanismos de sinalização redox resultante da ação de diferentes contaminantes ambientais.

De acordo com Ames et al. (1993) e Valavanidis et al. (2006), o estresse oxidativo tem se tornado um assunto importante em estudos ambientais. Para Livingstone (2001), o dano oxidativo pode ser o principal mecanismo da toxicidade de poluentes. As células respondem e adaptam-se a sinais ambientais, como agentes tóxicos ou estressores, por meio de mecanismos múltiplos que envolvem vias de comunicação ou processos de transdução de sinal. Segundo Franco et al. (2009), embora exista uma enorme quantidade de estudos toxicológicos para entender a base biológica da resposta celular aos contaminantes ambientais, ainda há poucas evidências sobre os mecanismos moleculares desta ação. Os

xenobiontes, como os metais de transição, as quinonas, os corantes, os herbicidas e os compostos nitroaromáticos, são capazes de realizar o ciclo redox e causar estresse oxidativo (KAPPUS; SIES, 1981).

De acordo com Ziech et al. (2010), vários estudos *in vivo* e *in vitro* têm descrito a relação dos danos oxidativos ocasionados pela toxicidade do ERO com a presença de químicos ambientais. O estresse oxidativo pode ser derivado do aumento de ERO nas amostras de água contaminadas com metais pesados e compostos orgânicos (compostos cíclicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, hidrocarbonetos halogenados e dioxinas). Segundo Tsangaris et al. (2011), biomarcadores de estresse oxidativos são sensíveis a contaminantes ambientais e são ferramentas úteis para avaliar a ação de misturas complexas e substâncias químicas presentes na água. Estudos realizados por Ryter et al. (2007) demonstraram que os contaminantes ambientais, como os metais, material particulado, monóxido de carbono, asbestos, pesticidas, dioxinas, BPC (bifenilas policloradas), HPA (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), radiação ultravioleta, induzem efeitos tóxicos, via regulação/indução de apoptose e sinalização redox, que podem estar associados à etiologia de diversas doenças ambientais. Muitos estudos epidemiológicos *in vitro* e *in vivo* mostram evidências de que a patogênese de diferentes doenças humanas, como aterosclerose, artrite, doenças neurodegenerativas e, em particular, o câncer, pode estar relacionada ao estresse oxidativo e a ocorrência de danos celulares distintos mediados pelas ERO (GALARIS et al., 2008; ZIECH et al., 2010).

De acordo com Fang et al. (2009), a exposição prolongada ao estresse oxidativo pode conduzir à morte celular, enquanto que exposições baixas ou transitórias levam a mutações somáticas e transformações neoplásicas. Rahman (2007) e Klaunig et al. (2011) afirmaram que o estresse oxidativo, causado tanto por fontes de ERO exógenas (poluentes ambientais, radiação e agentes terapêuticos) como endógenas (atividade mitocondriais, dos peroxissomos e ativação da resposta celular à inflamação), podem interferir em macromoléculas críticas para as células, causando instabilidade cromossômica, mutações e/ou modulação do crescimento celular. Pesquisas com biomarcadores de oxidação lipídica, protéica e do DNA têm-se revelado essenciais para avaliar como o estresse oxidativo pode ser um componente-chave na ligação entre a toxicidade ambiental e o processo de múltiplos estágios carcinogênicos (ZIECH et al., 2010).

A presente revisão teve como objetivo buscar informações relevantes sobre o estresse oxidativo induzidos pela ação tóxica de diferentes contaminantes ambientais, incluindo sistemas de defesa antioxidante e danos oxidativos, e as suas correlações com a

indução de patologias humanas. Por isso, serão apresentados nesta revisão os estudos de estresse realizados com células de mamíferos mantidas em cultura.

2. ESTRESSE OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Os organismos vivos sofrem ataques constantes por agentes oxidantes, cuja ação pode levar a um aumento do aparecimento de espécies reativas e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo da célula (BURTON; JAUNIAUX, 2011).

Geralmente, as moléculas ou fragmentos moleculares que podem causar o estresse oxidativo possuem um número ímpar de elétrons na sua órbita externa (elétrons desemparelhados) e, por isso se caracterizam como estruturas instáveis e altamente reativas, recebendo ou doando elétrons para restituir sua estabilidade estrutural (ABUJA; ALBERTINI, 2001; VALKO et al., 2006; BURTON; JAUNIAUX, 2011).

Dentre os agentes oxidantes, podemos destacar dois principais tipos: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN), ambas normalmente geradas pela ação de estímulos como a radiação ionizante, reações químicas, além de muitos outros fatores exógenos e/ou endógenos celulares (ABUJA; ALBERTINI, 2001). Estas espécies reativas também podem ser geradas durante processos inflamatórios, derivados da presença aumentada dos níveis de neutrófilos e macrófagos (MEDZHITOY, 2008; PETER; GRANGER, 2011). As ERO podem, ainda, ser geradas pela redução incompleta do oxigênio na cadeia respiratória das mitocôndrias (ABUJA; ALBERTINI, 2001).

O oxigênio tem uma profunda influência sobre o comportamento celular, auxiliando no seu metabolismo e atuando junto ao sistema imune, para a obtenção de uma resposta eficiente (SITKOVSKY; LUKASHEV, 2005). Os efeitos do oxigênio são geralmente mediados pela geração de radicais livres, que agem como moléculas de sinalização (BURTON et al., 2006). Quando a concentração de ERO for considerada fisiológica (basal), ela pode atuar como molécula sinalizadora e desempenhar papéis importantes como segundo mensageiro em muitas cascatas de sinalização intracelular. Esta sua ação mantém a homeostase da célula com o seu ambiente imediato, participa do crescimento, migração e diferenciação celular.

Por outro lado, o oxigênio pode reagir com os componentes celulares (DNA, proteínas, lipídios, carboidratos e outras macromoléculas), causando sérios problemas para o organismo (KRYSTON et al., 2011). Desta forma, dentre os radicais livres presentes nos seres vivos, os derivados de oxigênio representam a classe mais importante.

Dentro das células, ocorre a formação das ERO por processos celulares básicos, como a respiração celular, ação de enzimas antioxidantes ou pela presença de compostos químicos que aumentam a produção de oxirradicais (KELLY et al., 1998). As principais fontes endógenas de ERO incluem as mitocôndrias, embora estas estruturas também produzam uma variedade de antioxidantes que ajudam a minimizar a indução do estresse oxidativo. As ERO também são geradas pelo próprio metabolismo do citocromo P450, peroxissomos e ativação das células inflamatórias (CADENAS; DAVIES, 2000).

Quando as ERO atingem níveis celulares elevados, elas tornam-se citotóxicas e podem induzir danos indiscriminados nas moléculas biológicas, levando à perda de funções celulares, que podem promover a senescência e decorrer em morte da célula, principalmente pela via apoptótica. Pela alta reatividade do oxigênio com uma ampla gama de biomoléculas (BURTON et al., 2006; BURTON; JAUNIAUX, 2011), as alterações nas concentrações de ERO podem induzir diferentes respostas fisiológicas e quadros patológicos. Por esta razão, é muito importante que se conheçam todos os mecanismos envolvidos com o estresse oxidativo (BURTON et al., 2006).

Segundo Halliwell e Whiteman (2004), as ERO podem se apresentar na forma de radicais livres (superóxido, hidroxila, hidroperoxila, peroxila, alcoxila, carbonato e dióxido de carbono) e na forma de não radicais (peróxido de hidrogênio, ácido hipobromo, ácido hipocloro, ozônio, oxigênio singlete, peróxidos orgânicos, peroxinitrito e ácido peroxinitroso).

As ERO são capazes de estimular a formação de adutos de DNA e proteínas, que leva à indução de aberrações cromossômicas e modificações epigenéticas (BENSAAD; VOUSDEN, 2005). Segundo D'Autréaux e Toledano (2007), as ERO apresentam algumas propriedades biológicas distintas, como o tempo de meia-vida, a solubilidade lipídica e a reatividade química. A sua interação com as moléculas biológicas levam ao bloqueio da síntese e da capacidade de reparo do DNA (KRYSTON et al., 2011).

3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DANOS OXIDATIVOS

As ERO, como citado acima, embora possam desempenhar uma ação benéfica nas células, também agem como agentes prejudiciais aos seres vivos (VALKO et al., 2004). Entre os efeitos positivos, podemos citar a defesa contra agentes infecciosos e a indução, quando necessária, de respostas mitogênicas. Dentre os efeitos prejudiciais, estão os danos aos constituintes celulares, como danos às membranas, aos ácidos nucleicos, aos lipídios, às proteínas e a outras estruturas celulares (POLI et al., 2004). Além de prejudicar diretamente as macromoléculas celulares, as ERO podem influenciar diversos processos bioquímicos e

interromper a função das proteínas de reparo do DNA (MARTIGNONI et al., 1999; SHIMURA-MIURA et al., 1999; MUNIZ et al., 2008). Em contraste a este potencial de indução de danos nas macromoléculas, as ERO, em muitas condições patológicas, também podem induzir uma resposta celular adaptativa ao estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento nas taxas de proteínas de reparo do DNA (DEGANUTO et al., 2007; MUNIZ et al., 2008).

3.1. Dano oxidativo aos ácidos nucleicos (DNA e RNA)

As moléculas de DNA são importantes alvos de ataque das espécies reativas (VALKO et al., 2006). Esta facilidade de reação com o DNA se deve, principalmente, à presença dos radicais hidroxilas dos radicais livres, que promovem danos ao DNA, por quebras de fita simples ou dupla, modificações das bases nitrogenadas púricas e/ou pirimídicas, alterações na cadeia desoxirribose-fosfato, oxidação da molécula de açúcar e ligações cruzadas proteína-DNA (IMLAY; LIN, 1988; MARNETT, 2000; DIZDAROGLU et al., 2002; COOKE et al., 2003; IMLAY, 2003; VALKO et al., 2006). Todos estes danos ao DNA podem resultar em mutação gênica, instabilidade gênica e cromossômica, atraso ou indução do processo de transcrição, indução das vias de transdução de sinais, erros de replicação e morte celular, efeitos esses associados aos processos de mutagênese e carcinogênese (DIZDAROGLU et al., 2002; VALKO et al., 2006; KLAUNIG et al., 2011). De acordo com Klaunig et al. (2011), o DNA mitocondrial é o mais susceptível à ação das ERO e alterações nesta molécula estão diretamente associadas a diferentes tipos de câncer em humanos, que podem comprometer o cólon, fígado, mama, pulmão, bexiga, próstata, ovário, entre outros.

Segundo Valko et al. (2006), vários métodos estão sendo utilizados para medir os danos oxidativos causados no DNA. Uma das técnicas mais empregadas utiliza a digestão enzimática do DNA, que libera o DNA oxidado para análise em HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), com detecção eletroquímica. Outro método faz uso da HPLC para detectar as bases nitrogenadas que são liberadas, após a clivagem ácida do DNA.

Segundo Kasai (1997), após o ataque das ERO, ocorrem modificações em várias bases do DNA, sendo a 8-hidroxi-20-deoxiguanosina (8-OHdG) a lesão mais importante, formada pela oxidação do carbono 8 (C8) da guanina, ou ainda seu produto de oxidação, a 8-oxo-20-deoxiguanosina (8-oxodG), ambas muito utilizadas como biomarcadores para estresse oxidativo celular e genotoxicidade em organismos vivos. Ensaio realizados com diferentes organismos, mostram um aumento nas taxas de 8-OHdG decorrente da exposição a agentes

ambientais, como a radiação ionizante, o cigarro, metais e compostos químicos orgânicos. Além disso, as taxas elevadas de 8-OHdG também estão associadas a doenças como diabetes, *Parkinson*, *Alzheimer* e infecção hepática crônica (KLAUNIG et al., 2011).

Segundo Klaunig et al. (2011), apesar da extensão e da distribuição dos danos oxidativos no RNA ainda não serem tão bem compreendidas como no DNA, alguns estudos demonstram que os danos no RNA podem ser resultantes de modificações nas riboses, de excisão de bases e de quebras da fita (LI et al., 2006). Os danos oxidativos podem ocorrer nos RNAs codificante e não codificante, causando erros na síntese de proteínas ou desregulação da expressão gênica. Além disso, têm sido descritos danos oxidativos na molécula de RNA, para muitas doenças neurodegenerativas (LI et al., 2006; NUNOMURA et al., 2007).

3.2. Dano oxidativo aos lipídios e peroxidação lipídica

A geração de radicais de oxigênio, induzida por compostos químicos diversos, pode comprometer os componentes celulares que envolvem resíduos de ácidos graxos poli-insaturados de fosfolipídios, os quais, devido às suas ligações duplas, são extremamente sensíveis à oxidação pelas ERO (MARNETT, 1999). A partir das reações em cadeia que envolvem os lipídios, ocorre o processo de peroxidação lipídica (VALAVANIDIS et al., 2006).

A peroxidação lipídica é considerada o mecanismo que mais causa danos celulares, pois gera grandes quantidades de ERO, com a interferência de fontes endógenas e/ou exógenas, e provocam vários efeitos biológicos (SHAD; IQBAL, 2010). Para Green e Reed (1998), esse mecanismo pode ser citotóxico, quando ocorrer na membrana das mitocôndrias, pois ele altera a atividade enzimática e a produção de ATP, além de iniciar o processo de apoptose. Segundo Gutteridge e Halliwell (1990) e Kohen e Nyska (2002), a peroxidação lipídica é um processo autocatalítico que envolve três eventos distintos: iniciação, propagação e terminação, cujo produto final é a formação de aldeídos e hidrocarbonetos.

A reação química de Fenton, que envolve a formação de um Fe(II):Fe(III), é um dos principais mecanismos de iniciação da peroxidação lipídica (VALKO et al., 2006). A finalização dessa reação é o resultado de interações entre radicais lipídicos e/ou a formação de espécies não radicais por radicais peroxil-lipídio (VALAVANIDIS et al., 2006).

A quebra dos produtos de peroxidação lipídica resulta na formação de muitos aldeídos reativos, como o malondialdeído (MDA), os quais podem reagir com proteínas celulares e também formar adutos de DNA, provocando mutações e alterações nos padrões de

expressão gênica (MARNETT, 1999). Segundo Iqbal et al. (1999), além do MDA, a peroxidação lipídica pode formar um outro aldeído, o hidroxinonenal (HNE), que é altamente reativo e muito citotóxico. Quando há peroxidação lipídica nas membranas celulares, elas se tornam rígidas, perdem a permeabilidade e a integridade. Além disso, os efeitos cumulativos da peroxidação podem estar associados com diferentes mecanismos patológicos (aterosclerose, anemia hemolítica e isquemia) em humanos e outros organismos (STEINBERG, 1997; VALAVANIDIS et al., 2006).

Um dos métodos mais conhecidos para detecção de ERO intracelulares é o ensaio fluorométrico DCFH-DA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato). O princípio do método baseia-se no uso dessa molécula que possui capacidade de atravessar a membrana plasmática e ser convertida, enzimaticamente, em DCFH não fluorescente. Na presença de ERO, os derivados da DCFH são oxidados para DCF (diclorofluoresceína), que apresentam alta fluorescência. Além disso, é importante considerar que a intensidade dessa fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de espécies reativas presentes nas células (BASS et al., 1982; LEBEL et al., 1992; WANG; JOSEPH, 1999).

Segundo Kasprzak (1995) e Valavanidis et al. (2006), os metais e seus complexos quelados, como o cádmio, o cobre, o níquel e o cromo, estão associados à peroxidação lipídica e à subsequente promoção de carcinogênese nos organismos expostos a estes compostos.

3.3. Dano oxidativo às proteínas

As ERO podem reagir diretamente com as proteínas ou reagir com açúcares e lipídios, gerando produtos que reagem com as proteínas (FREEMAN et al, 2009). A oxidação de proteínas por ERO está associada à clivagem peptídica, às modificações oxidativas de cadeias laterais de aminoácidos, à formação de vários tipos de ligações cruzadas inter e intra-proteicas, às reações de peptídeos com lipídios, aos produtos da oxidação de carboidratos e à formação de derivados carbonílicos das proteínas, à interação de 2 radicais de carbono centrais, obtidos pela remoção dirigida de hidrogênios pelo radical hidroxila da cadeia polipeptídica, à oxidação dos grupos sulfidril dos resíduos de cisteína e de tirosina, formando ligações cruzadas –S–S– e –tyr–tyr–, respectivamente (LESSER, 2006; VALAVANIDIS et al., 2006; VALKO et al., 2006).

Os danos oxidativos às proteínas podem resultar na modificação de atividades enzimáticas celulares, em alterações nas concentrações de cálcio e potássio intracelular e na modificação da transferência de sinal nas células (KLAUNIG et al., 2011). É importante

destacar, ainda, que a oxidação de proteínas está diretamente associada a algumas doenças relacionadas à idade e ao envelhecimento (STADTMAN, 2001). O acúmulo de proteínas oxidadas pode ser decorrente do aumento do nível de ERO ou da diminuição da atividade antioxidante de um organismo. Também, pode ser derivado da capacidade reduzida de degradação de proteínas oxidadas, devido a um decréscimo nas concentrações de proteases e/ou a um aumento dos níveis de inibidores de proteases (VALKO et al., 2006). Esta perda na capacidade de degradação de proteínas oxidadas, durante o envelhecimento, implica em efeitos negativos sobre os mecanismos de transcrição e tradução proteica (DUIKAN et al., 2000).

4. DEFESAS ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são moléculas que protegem o organismo da ação danosa dos radicais livres. O sistema celular de defesa antioxidante pode envolver tanto as enzimas catalase como a glutathione peroxidase dependente de selênio, a glutathione peroxidase total, a glutathione S-transferase e outras moléculas não enzimáticas (vitaminas e carotenóides), que têm a função de equilibrar a concentração de ERO a fim de minimizar as lesões ocasionadas pela sua ação. Este sistema mantém o equilíbrio redox celular pela eliminação do acúmulo e pela supressão da ação das ERO no interior das células (BONT et al., 2004). O aumento da produção de ERO está relacionado com o aumento da atividade dos antioxidantes, que protege o organismo contra os danos oxidativos (WINSTON; GIULIO, 1991). Esse sistema de defesa impede que ocorram danos às macromoléculas que resultariam em modificações irreversíveis na viabilidade e função celular (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

A maioria dos antioxidantes apresenta uma estrutura química com anel aromático e são capazes de neutralizar e deslocar o elétron desemparelhado dos radicais livres, causando a destruição ou modificação das características originais destes radicais, tornando-os inativados, com meia vida mais longa e atividade menos tóxica (LU et al., 2010).

Os efeitos nocivos das ERO são equilibrados pela ação de antioxidantes, que podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Estas defesas antioxidantes podem agir em ambientes hidrofílicos e/ou hidrofóbicos da célula, para promoverem a remoção direta de radicais livres, fornecendo, assim, proteção aos organismos (VALKO et al., 2006). Entre os antioxidantes não enzimáticos mais importantes estão as vitaminas, os carotenóides, os flavonóides, os antioxidantes tióis, os uratos, além de outros compostos (MCCALL; FREI, 1999; ZIECH et al., 2010). Segundo Matés et al. (1999), as enzimas antioxidantes mais eficientes são a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase.

4.1. Catalases (CAT)

A CAT, formalmente denominada de hidropoxidase, é encontrada nos peroxissomas, nos glioxissomas de plantas e no citoplasma de procariontes. Esta enzima tem como função decompor o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular (VALKO et al., 2006).

As catalases compõem uma família de hemoproteínas (GAO et al., 2003), enzimas tetraméricas intracelulares, com quatro grupos heme, onde o átomo de ferro está no estado férrico (KIRKMAN; GAETANI, 1984). Esta enzima é envolvida na dismutação do peróxido de hidrogênio e na detoxificação de alguns substratos, como fenol, alcoóis, ácido fórmico e formaldeído. Um dos papéis antioxidantes das CAT é reduzir o risco de formação do radical hidroxila ($HO^\bullet$), capaz de causar danos importantes aos sistemas biológicos (BETTERIDGE, 2000), a partir do H_2O_2 , via reação de Fenton (NORDBERG; ARNÉR, 2001), ou por reação com ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Esta redução é importante, tendo em vista que as membranas biológicas são extremamente permeáveis à espécie reativa H_2O_2 (PAMPLONA, 2009). Segundo Gill e Tujeta, (2010), sua ação, nos peroxissomos, ocorre junto as oxidases envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos, fotorrespiração e no catabolismo de purinas.

Entre as enzimas degradantes de H_2O_2 , a CAT tem sido considerada a mais eficiente, em termos energéticos, pois degrada os peróxidos de hidrogênio que são gerados rapidamente e, ainda, promovem um ganho de energia celular. A concentração da CAT, em mamíferos, pode variar de acordo com o tipo celular e a concentração de peróxido de hidrogênio (SCANDALIOS et al., 2005).

Muitos estudos têm utilizado a enzima CAT como um biomarcador de estresse oxidativo induzido por contaminantes ambientais, para avaliar os possíveis danos oxidativos causados por inseticidas organofosforados (ALMEIDA et al., 2010; SHAD; IQBAL, 2010) e herbicidas (LUSHCHAK et al., 2009; NWANI et al., 2010), e também para avaliar amostras de água impactadas por efluentes urbanos e industriais (McFARLAND et al., 1999; TAGLIARI et al., 2004; TABREZ; AHMAD, 2011; TSANGARIS et al., 2011). Quando ocorre a diminuição da CAT, conseqüentemente, há uma redução da capacidade de proteção celular contra os radicais livres (McFARLAND et al., 1999).

4.2. Superóxido dismutase (SOD)

A SOD (superóxido dismutase) é uma das enzimas antioxidantes intracelulares mais eficientes, pois catalisa a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ para O_2 e H_2O_2 (MCCORD; FRIDOVICH, 1969), protegendo o Citocromo C, ao reduzir o radical superóxido e diminuir a presença dos

radicais livres. A SOD é caracterizada por apresentar um metal na sua estrutura, e é encontrada nos compartimentos subcelulares que são alvos do estresse oxidativo mediado por ERO, em todos os organismos aeróbicos (GILL; TUJETA, 2010). Ela foi isolada na década de 40, porém, somente em 1969, os pesquisadores McCord e Fridovich evidenciaram a sua atividade antioxidante (McCORD; FRIDOVICH, 1969).

Existem várias isoformas de SOD que apresentam características distintas, de acordo com o centro ativo metálico, a constituição de aminoácidos, o número de subunidades e co-fatores (VALKO et al., 2006). Todas as formas de SOD são codificadas no núcleo e específicas para seus respectivos compartimentos subcelulares (GILL; TUTTEJA, 2010). Segundo Alscher et al. (2002), a classificação das SODs pode ser determinada pelo seu co-fator metálico, onde os mais conhecidos são: cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e o ferro (Fe-SOD). Outra SOD que tem sido descrita na literatura é a que apresenta o níquel como centro ativo (NiSOD) (SCANDALIOS, 2005).

4.3. Glutationas

A Glutationa é um composto tripeptídeo, encontrado tanto em organismos eucariotos como em procariotos (GHANTA; CHATTOPADHYAY, 2011). Segundo Cogo et al. (2009), a estrutura da glutathione é formada por um radical sulfidril e pode apresentar duas formas: reduzida de tiol (Glutationa - GSH) e oxidada (Glutationa dissulfeto - GSSG). A glutathione atua em diversas funções vitais, como na redução do estresse oxidativo, na desintoxicação do peróxido de hidrogênio, do hidroperóxido lipídico e de compostos eletrofílicos, na eliminação de radicais livres, na atuação como co-fator enzimático (GPx, GST, entre outros) e como redutores de hidroperóxido orgânicos e inorgânicos, modulação de funções celulares críticas (síntese de DNA, processos associados aos microtúbulos e funções imunológicas), e fornecimento de um reservatório para cisteína (LU, 1999; MASELLA et al., 2005). Atua também na prevenção ou até mesmo na redução dos sintomas de inflamações, doenças como o câncer, *Alzheimer* e *Parkinson*, AIDS, infecções e diabetes (GHANTA; CHATTOPADHYAY, 2011).

4.4. Glutationa reduzida (GSH)

A GSH é um composto tiol, que possui uma ligação de três aminoácidos (cisteína, ácido glutâmico e glicina), que desempenha a função de proteger as células e os tecidos contra os efeitos oxidativos. Ela pode ser encontrada de duas formas, livre ou ligada a proteínas, e está presente em quase todos os mamíferos, principalmente, no fígado. A estrutura da GSH é

caracterizada pela presença de uma ligação α -glutamil e um grupo sulfidril (SH) (IWASAKI et al., 2009). Em condições fisiológicas, a GSH é encontrada no núcleo, no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (MASELLA et al., 2005). Em eucariontes, a GSH está envolvida na desintoxicação de ERO e de contaminantes químicos, no qual desempenha um papel importante na proliferação e morte celular e, também, em diversos processos que envolvem o DNA e proteínas. Em bactérias, exerce a função de proteger a célula de compostos clorados e oxidativos, pH baixo e tensões osmóticas (GHANTA; CHATTOPADHYAY, 2011).

A síntese de GSH ocorre por duas reações consecutivas dependentes de ATP, onde a primeira etapa envolve a formação da γ -glutamilcisteína (γ -CE), a partir de *L*-glutamato e *L*-cisteína mediado pelo γ -CE sintetase, e a segunda que é catalisada pela glutathione sintetase, que adiciona o aminoácido glicina ao terminal C da GSH (MEISTER, 1995).

Segundo Grosicka-Maciag et al. (2010), a GSH é capaz de reduzir, de maneira direta, a quantidade de ERO dentro da célula, por reações não-enzimáticas, ou por meio de vias indiretas, pelas reações enzimáticas. Porém, se ocorrer um distúrbio na quantidade de GSH e um aumento nos níveis de oxidante, há o surgimento de estresse oxidativo, que leva a toxicidade e morte celular.

Diversos estudos ambientais vêm sendo desenvolvidos pela quantificação da GSH total, após a exposição de contaminantes como HPA (LIN; YANG, 2007), metais (GARCÍA-FERNANDEZ et al., 2002), fármacos (GROSICKA-MARCING et al., 2010), contaminantes industriais (FARMEN et al., 2010; HU et al., 2008; WANG et al., 2001; ZANG et al., 2009), agrotóxicos (BAYOUMI et al., 2001; DEHN et al., 2005; MARAN et al., 2010; MUNIZ et al., 2008; PEREZ-PERTEJO et al., 2008) e nanopartículas (SAQUIB et al., 2011).

4.5. Glutathione-redutase (GR)

A glutathione redutase é uma flavoproteína que utiliza NADPH como fonte de prótons e elétrons, para reduzir a glutathione dissulfeto (GSSG) em sulfidril GSH, que é um importante antioxidante celular (CARLBERG; MANNERNVIK, 1985). De acordo com Tandogan et al. (2011), o sistema de defesa celular pode ficar comprometido, se houver alterações na atividade dessa enzima, que acarretará em efeitos danosos, como o estresse oxidativo celular.

A presença de substâncias químicas, drogas ou substratos naturais podem influenciar na ativação ou inibição da propriedade redox dessa enzima. Caso ocorra a inibição

da GSH, a relação GSH/GSSG diminui, favorecendo a ação do estresse oxidativo e o desenvolvimento de algumas doenças (TANDOĞAN et al., 2011).

4.6. Glutathione peroxidase (GPx)

A GPx foi a primeira enzima antioxidante encontrada em mamíferos, sendo também a mais freqüente na maioria de suas células (ROTRUCK et al., 1973). Ela contém selênio-cisteína, como centro ativo, e, em casos de baixos níveis de selênio, ocorre a diminuição da sua atividade antioxidante (HAMANISHI et al., 2004). Sua função é promover a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) para excretar as espécies reativas de oxigênio dos tecidos e proteger as membranas biológicas e as estruturas moleculares da ação dos danos oxidativos (LEI et al., 2007).

Segundo alguns autores, a GPx é um biomarcador eficaz para indicar situações de estresse na presença compostos orgânicos e inorgânicos (COGO et al., 2009), para investigar o sistema de defesa antioxidante e seus danos oxidativos em diversos grupos de agrotóxicos, como os inseticidas organofosforados (ALMEIDA et al., 2010), inseticidas carbamatos (MARAN et al., 2010) e os bio-inseticidas (PEREZ-PERTEJO et al., 2008), e para estudos de ação biológica de efluentes urbanos e industriais (TSANGARIS et al., 2011).

4.7. Glutathione S-transferase (GST)

A GST é uma enzima multifuncional envolvida na desintoxicação de contaminantes químicos eletrofílicos, como agentes cancerígenos, poluentes ambientais e quimioterápicos. Ela também está envolvida com a remoção das ERO e regeneração das proteínas Thiol (SHEEHAN et al., 2001; HAYES et al., 2005). Esta enzima catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com compostos tóxicos, interagindo com o seu grupo sulfidril (SH), que leva a neutralização dos sítios eletrofílicos, para tornar seus produtos mais solúveis em água, menos tóxicos e facilitar a sua degradação e excreção (HABIG et al., 1974; CARLETTI et al., 2008). Segundo Dehn et al. (2005), essa conjugação mediada pela GST consome o GSH intracelular, sendo responsável pela primeira defesa contra a intoxicação.

De acordo com Hayes et al. (2005), as GSTs de mamíferos são subdivididas em três famílias: as GSTs citosólicas e GST mitocondriais, que compreendem enzimas solúveis; e as GSTs microssomais, que estão associadas à membrana e envolvidas no metabolismo dos eicosanóides e das glutathionas, por isso, denominadas de MAPEG (*membrane-associated proteins in eicosanoid e glutathione metabolism*).

Segundo Raza (2011), várias formas induzidas de glutathione S-transferase (GST) podem ter sido expressas, devido às respostas evolutivas das células para proteção de agentes químicos e do estresse oxidativo. Sua distribuição no organismo está relacionada com a resposta contra metabólitos endógenos e exógenos e a resistência a drogas, na terapia do câncer.

Alguns estudos têm utilizado a GST como um biomarcador para investigar os efeitos de drogas anti-câncer, herbicidas, pesticidas, químicos carcinogênicos, óleos, HPA (CARLETTI et al., 2008; ALMEIDA et al., 2010; RAZA, 2011), alguns metais como cádmio (CASALINO et al., 2004), ferro (DEMOST et al., 2002), alumínio (DUA; GILL, 2001), entre outros. A exposição aos metais pesados ou ao estresse oxidativo, por exemplo, pode desestabilizar a membrana lisossômica, causando a ruptura e liberação de diversos radicais e íons ácidos, que acarretam na inibição das atividades enzimáticas (COGO et al., 2009).

4.8. Outros antioxidantes

Segundo Zwart et al. (1999), existe um grupo de antioxidantes não-enzimáticos que inclui substâncias de baixo peso molecular, como vitaminas C e E, ácido úrico, ésteres de retinil, β -caroteno, entre outros.

A vitamina C (ácido ascórbico) é um elemento nutricional essencial ao homem, que atua como um excelente antioxidante em fase aquosa e possui dois grupos hidroxilas ionizáveis. Em condições fisiológicas, quase toda a vitamina C (AsCH_2) presente no sistema biológico encontra-se na forma de ascorbato (AsCH^-) que, após ser oxidada pelas ERO, forma o radical semidesidroascorbato ($\text{Asc}^{\cdot-}$) (VALKO et al., 2006).

A vitamina E possui diferentes formas, sendo a α -tocoferol, que representa a sua forma ativa em humanos, a mais conhecida delas. Ela atua como um antioxidante que protege a célula contra a peroxidação lipídica e essa proteção, geralmente ocorre devido a sua capacidade de inibir a formação de radicais livres e ativar as endonucleases (VALKO et al., 2006).

Outro antioxidante pertence ao grupo dos carotenóides é o β -caroteno, que é encontrado em plantas e microrganismos. Esta substância ajuda na prevenção do câncer, degeneração muscular, arteriosclerose e outras doenças. Sua atividade antioxidante ocorre pela sua capacidade de capturar radicais, como o oxigênio singlete, sem degradação e, também, pela sua reatividade química com os radicais hidroxila, peróxil e superóxido (VALKO et al., 2006).

5. ENSAIOS DE CULTURAS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Com o controle cada vez mais rigoroso do uso de animais de laboratório em experimentos biológicos, tornou-se necessário o desenvolvimento e a padronização de testes *in vitro* que pudessem detectar a toxicidade das substâncias químicas (ROGERO et al., 2003).

O modelo *in vitro* vem ganhando uma ampla aceitação na investigação toxicológica por proporcionar o uso de ferramentas avançadas, protocolos confiáveis e de rápida obtenção de resultados (BARLIE, 1994; PENG, 2011), além de possuir diferentes aplicações, inclusive a sua utilização em avaliações de danos biológicos causadas por poluentes ambientais (BERTHEUSSEN et al., 1997; EL-DEMERDASH et al., 2001; ZUCCO et al., 2004).

Uma das maiores aplicações da cultura celular é em avaliações de ação de produtos como fármacos, agrotóxicos, químicos industriais, dentre outros, sobre células individualizadas (CARVALHO, 1996; PENG, 2011). Apesar dos resultados obtidos com cultura de células não podem ser extrapolados, diretamente, para os animais, estes servem de referência para os efeitos das substâncias sobre sistemas biológicos em geral. É sabido que um produto que causa danos em células mantidas em culturas, também poderá apresentar um efeito similar sobre os sistemas biológicos integrais expostos ao mesmo agente (CARVALHO, 1996).

Métodos *in vitro* possibilitam uma melhor padronização das etapas experimentais, possibilitando manipular ou introduzir variáveis desejadas, como tempo de tratamento, tipos de combinações das substâncias testadas, temperatura, pH (BRUSICK, 1987; CARVALHO, 1996), sendo adequados para a determinação do modo de ação de agentes tóxicos (BRUSICK, 1987).

O método de cultura de células pode ser considerado adequado para estudos de estresse oxidativo induzido por fatores ambientais, por oferecerem importantes informações sobre a ação de poluentes. No entanto, devem ser estabelecidos os modelos de células *in vitro* mais apropriados para a avaliação de mecanismos de estresse oxidativo relacionados à toxicidade ambiental (PENG, 2011). As células de mamíferos, como as de roedores e as humanas, são muito empregadas em análises *in vitro*, e indicadas para a análise de danos no DNA, sendo, por isto, amplamente utilizadas em avaliações ambientais (BIANCHI, 2008; MANZANO, 2010; LEME, 2011).

De acordo com Nordberg e Arner (2001), a descoberta da importância dos danos causados pelos radicais livres nos mecanismos de toxicidade de muitos poluentes ambientais

permitiu uma maior aplicação dos biomarcadores de estresse oxidativo em organismos vivos, especialmente nos sistemas de mamíferos, tanto em ensaios *in vivo* como *in vitro*.

Quando os ensaios de estresse oxidativos são realizados com células de cultura, devem ser tomados alguns cuidados na interpretação dos resultados, pois, segundo Halliwell e Whiteman (2004), o próprio processo de cultivo celular pode induzir estresse oxidativo, promovendo a geração de ERO e impedindo a correta regulação adaptativa de antioxidantes. Sendo assim, há uma necessidade de se examinar, cuidadosamente, as respostas do meio de cultura, quando os compostos químicos são adicionados a ele, e se a presença das células é capaz de inibir as reações dos radicais livres presentes no meio.

A maioria das pesquisas sobre o estresse oxidativo, realizados com animais, tem sido feita com células ou órgãos de mamíferos, pois estes ensaios permitem analisar, mais eficientemente, a capacidade oxidativa de agentes específicos ou ainda avaliar a possível eficácia de um composto como antioxidante de ação protetora ao dano oxidativo promovido por uma substância tóxica. Além disso, muitos estudos com células de mamíferos relacionam os processos inflamatórios, de envelhecimento e de carcinogênese ao estresse oxidativo (BERLETT; STADTMAN, 1997; PENG, 2011). Diferentes espécies de mamíferos têm sido utilizadas como modelos para os estudos de estresse oxidativo, na tentativa de esclarecer os mecanismos fundamentais da origem dos danos celulares e das respostas tóxicas, principalmente devido ao interesse na área de saúde humana (KELLY et al., 1998).

Segundo Maran et al. (2010), as células de mamíferos possuem diversos mecanismos de defesa contra as ERO, sendo que a GSH é a enzima considerada de maior relevância nestes estudos, por fornecer a primeira linha de defesa contra a peroxidação lipídica.

5.1. Agrotóxicos

Os agrotóxicos têm sido indicados como substâncias tóxicas que promovem tanto estresse oxidativos como danos no DNA. Segundo Muniz et al. (2008), esta evidência tem sido comprovada pelos estudos epidemiológicos que avaliam as alterações da saúde de trabalhadores expostos a agrotóxicos.

Os danos oxidativos são considerados importantes danos promovidos pelos agrotóxicos organofosforados, havendo suficiente comprovação de indução de estresse oxidativo por estes compostos, conforme resultados obtidos em estudos realizados com animais e com células mantidas em cultura (NAG; NANDI, 1987; FLESSEL et al., 1993; BAGCHI et al., 1995; LODOVICI et al., 1997; YANG; SUN, 1998; BANERJEE et al., 2001;

DELESCLUSE et al., 2001; HALLIWELL, 2002). Os organofosforados também são descritos como indutores da redução das atividades de enzimas antioxidantes, do aumento da produção de peróxidos lipídicos e da redução dos níveis de antioxidantes celulares (JULKA et al., 1992).

Muniz et al. (2008) avaliaram a relação entre a exposição ocupacional a pesticidas organofosforados, os biomarcadores de estresse oxidativo e os danos ao DNA, por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro*. Foi verificado, em amostras de urina de trabalhadores rurais, um aumento significativo da presença de metabólitos de agrotóxicos organofosforados por meio de cromatografia gasosa, com detector fotométrico de chama pulsante (GC-PFPD); um aumento da 8-hidroxi-2'-desoguanosina (8-OH-dG), por HPLC; um aumento nas frequências de danos ao DNA e da atividade de reparo do DNA oxidativo, por meio do ensaio cometa em linfócitos; e altas taxas de malondialdeído (MDA), decorrente da peroxidação lipídica, no soro destes trabalhadores expostos, por meio do ensaio de placa de microtitulação (kit LPO-586), analisado por UV-Vis. Estes resultados foram comprovados em testes *in vitro*, realizados com culturas de linfócitos humanos tratados com um organofosfato comumente utilizado na agricultura (o AZM = Azinfosmetil), pelas taxas significativas de danos ao DNA, observadas por meio do ensaio cometa; pelo aumento de ERO e dos níveis de glutathiona reduzida. Segundo os autores, todos estes dados indicam que os pesticidas organofosforados induzem estresse oxidativo e dano ao DNA de trabalhadores agrícolas, e que os biomarcadores utilizados no presente estudo podem ser úteis para auxiliar na compreensão da associação entre os pesticidas e seus efeitos adversos à saúde humana.

Moore et al. (2009) avaliaram o potencial tóxico de diferentes concentrações do pesticida organofosforado malation, por meio dos ensaios de MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide), peroxidação lipídica e cometa em cultura de células humanas (HepG2). Os pesquisadores observaram que o inseticida foi capaz de induzir efeitos citotóxicos, pela diminuição significativa das taxas de viabilidade celular; e genotóxicos, pelo aumento das frequências de danos ao DNA, de maneira dose-dependente. Além disso, os autores comprovaram que a toxicidade dessa substância está diretamente associada ao estresse oxidativo, comprovado pela produção significativa de MDA.

Bayoumi et al. (2001) avaliaram, em células de ovário de *hamster* chinês (CHO-K1), os efeitos dos inseticidas organoclorados ciclodienos aldrin, dieldrin e endosulfan, considerados persistentes e com alta capacidade de biomagnificação nas cadeias tróficas, por meio de ensaios do vermelho neutro, de medição de LDH (lactato desidrogenase), dos conteúdos de glutathiona intracelular (oxidada e total) e suas formas enzimáticas (S-transferase,

redutase, peroxidase) e do ensaio de peroxidação lipídica, a fim de verificar o envolvimento das ERO na toxicidade destes pesticidas. Os autores constataram que o inseticida aldrin é mais citotóxico que o dieldrin e o endossulfam. Esta maior toxicidade foi comprovada pela indução de um significativo comprometimento da função lisossomal das células (CHO-K1) expostas. Neste estudo, foi verificado que os pesticidas induziram um aumento nos níveis das glutathionas peroxidase, redutase, S-transferase, e GSSG, significativo apenas para a GPx, e uma diminuição significativa no conteúdo de GSH, após exposição por 24 h. Foi verificada, ainda, após exposição aos três inseticidas, uma liberação de LDH no meio de cultura e uma alta produção de peróxido, mostrando que as alterações na permeabilidade da membrana podem ser uma consequência do estresse oxidativo induzido por esses compostos. Estudos anteriores realizados por Bayoumi et al. (2000), verificaram que a toxicidade do toxafeno, para células CHO-K1, promoveu a indução de um aumento nas atividades da GR, GPx e GST, e níveis totalmente alterados de GSH intracelular, quando as células foram expostas ao pesticida.

Dehn et al. (2005) avaliaram, em ensaios realizados com células HepG2, os efeitos de diferentes concentrações de alguns inseticidas organoclorados (clordano, *o,p'*-DDT, dieldrin, endossulfam, kepone, metoxicloro e toxafeno) sobre as atividades das enzimas do citocromo P450 (1A-EROD e 2B-PROD) e sobre os níveis intracelulares de GSH. O inseticida dieldrin induziu as respostas mais significativas, quanto às alterações das atividades enzimáticas P450 1A e 2B, e os inseticidas kepone e metoxicloro e as maiores concentrações testadas do clordano, endossulfam e toxafeno induziram um decréscimo significativo nos níveis de GSH das células humanas expostas. Houve uma correlação inversamente proporcional entre a atividade da P450 2B e os níveis intracelulares de GSH, o que sugere que as taxas de GSH influenciam a atividade catalítica do citocromo P450, afetando a capacidade de regulação da GSH pela célula. Os resultados observados demonstram a eficiência do bioensaio *in vitro*, realizado com a linhagem celular humana HepG2, para utilização em monitoramento ambiental.

Lueken et al. (2004) verificaram, por meio do ensaio de cometa, aplicado em fibroblastos humanos, um aumento significativo dos efeitos genotóxicos do peróxido de hidrogênio, um agente tóxico endógeno prevalente no metabolismo de xenobióticos pela redução de oxigênio, quando combinado com agrotóxicos (2,3,4,6-tetraclorofenol; glifosato, lindane; 2,4-ácido dicloroacético; 4-cloroanilina) e outros compostos químicos (ácido nitrilotriacético; *m*-xileno; *n*-hexanol) freqüentes no meio ambiente. As maiores taxas de fragmentação do DNA foram verificadas quando o H₂O₂ foi combinado com concentrações

baixas de 4-cloroanilina, 2,3,4,6-tetraclorofenol, *m*-xileno e *n*-hexanol, que são compostos considerados lipofílicos.

Maran et al. (2010) determinaram os efeitos citotóxicos agudos dos inseticidas aldicarbe e propoxur em células CHO-K1, na presença e ausência de tratamento sistêmico com BSO (D,L-butionina-(S,R)-sulfoximina), conhecido por atuar na biossíntese de GSH, a fim de verificar diferenças no conteúdo de GSH, na geração de MDA, e na atividade das enzimas redox. Os autores verificaram que o tratamento dos inseticidas com BSO induziu um decréscimo significativo nas atividades das enzimas glutathione redutase, glutathione peroxidase e glutathione S-transferase, e nas taxas de GSH, enquanto que o tratamento sem BSO provocou um aumento significativo nas taxas de GSSG e na produção de MDA das células expostas. Estes dados sugerem que os inseticidas podem danificar as células CHO-K1, via estresse oxidativo, mas que o BSO ameniza estes danos oxidativos, o que evidencia que a glutathione endógena é fundamental para a proteção destas celulares contra a peroxidação lipídica e a citotoxicidade induzidas pelos inseticidas aldicarbe e propoxur.

Pérez-Pertejo et al. (2008) avaliaram, em células de ovário de *hamster* (CHO-K1) e células de rim de macaco verde africano (Vero), o potencial tóxico do bio-inseticida Spinosad, usado em manejo integrado de pragas, por meio dos ensaios do vermelho neutro, antes e após a adição de antioxidantes (glutathione reduzida, e vitaminas C e E); de peroxidação lipídica, pela determinação de MDA; de medição de glutathione total intracelular; e de ensaios enzimáticos para determinação de glutathione redutase, glutathione peroxidase e glutathione transferase. O biopesticida provocou a redução da viabilidade das duas linhagens celulares, sendo mais citotóxico para as células CHO-K1. Foi verificado também, que a presença dos agentes antioxidantes diminuiu significativamente o efeito citotóxico desse composto químico, o que indica que a citotoxicidade é mediada por dano oxidativo. A maior concentração de Spinosad induziu um aumento significativo na produção de MDA. Todas as concentrações testadas causaram alterações no ciclo glutathione-redox, verificadas pela diminuição significativa dos níveis de glutathione total e reduzida, de glutathione-S-transferase e pelo aumento dos níveis de glutathione peroxidase e glutathione redutase das células CHO-K1 e Vero.

Uma pesquisa de revisão realizada por Farina et al. (2011) relata que o metilmercúrio, um poluente presente em fungicidas, detectado em altas concentrações no ambiente aquático, induz um aumento significativo nas taxas de ERO (ânion superóxido, hidrogênio peróxido e óxido nítrico) em células neuronais de ratos e de humanos. Este aumento nas taxas de ERO se dá por uma complexa seqüência de eventos moleculares em

cascata (disfunção mitocondrial, excitotoxicidade, ausência de homeostase do cálcio intracelular e diminuição da capacidade antioxidante celular) e estão relacionados com a origem de algumas doenças cerebrais.

5.2. Efluentes industriais e urbanos

5.2.1. Metais

Os metais desempenham papéis importantes em uma ampla variedade de processos biológicos (JOMOVA; VALKO, 2011). A homeostase de íons metálicos é mantida por mecanismos de armazenamento, absorção e secreção (BERTINI; CAVALLARO, 2008). A quebra da homeostase dos íons metálicos pode levar a ligação de metais em sítios não específicos de ligação com as proteínas, ou à substituição por metais, diferentes daqueles naturalmente associados à ela (NELSON, 1999).

Muitos estudos realizados com metais forneceram evidências de que eles são tóxicos e podem interagir com o DNA e proteínas, causando deterioração oxidativa destas macromoléculas biológicas. A geração de radicais livres em sistemas vivos está intimamente ligada com a participação de metais redox-ativos como ferro, cromo, cobre e cobalto, onde o estado redox da célula é mantida dentro de estritos limites fisiológicos (RAHMAN, 2007; MATÉS et al., 2002; 2008). O rompimento da homeostase do metal pode levar a uma formação descontrolada de radicais livres nocivos, que participam das modificações de bases do DNA, da peroxidação lipídica e da homeostase do cálcio e de radicais sulfidrilas (GUTTERIDGE, 1995; VALKO et al, 2007).

Têm sido realizadas muitas pesquisas sobre o estresse oxidativo, induzido por metais e compostos metálicos, em células de mamíferos mantidas em cultura e o papel da GSH nos processos de desintoxicação dessas substâncias. Ochi et al. (1988) mostraram o papel protetor da GSH na redução da toxicidade do cádmio, usando células de hamster chinês (V79), apesar de Chin e Templeton (1993) provarem que a exposição a doses muito altas de cádmio é capaz de esgotar totalmente os níveis de GSH intracelular, devido à produção de ERO, como observado em células mesangiais de rins humanos.

Müller et al. (1986) descreveram que a produção de EROs, induzida pelo cádmio, ocorre pela interação destas moléculas com sítios subcelulares críticos como mitocôndrias, peroxissomos e microssomos, resultando na geração de radicais livres e peroxidação lipídica nas membranas dessas estruturas. Qu et al. (2005) afirmaram que a produção de ERO não desempenha um papel essencial na transformação maligna induzida pela exposição crônica ao

cádmio nas células de fígado de rato. Matovic et al. (2011) relataram que esse metal causa estresse oxidativo, mediando efeitos citotóxicos e carcinogênicos em diferentes células de mamíferos, apesar de muitos resultados serem conflitantes, quando se comparam os ensaios realizados em sistema *in vivo* e *in vitro*.

Lu et al. (2011) avaliaram os efeitos do arsênio (As) em células RIN-m5F, derivadas de células β -pancreáticas de ratos. Os autores observaram que o As inorgânico induziu disfunção celular por reduzir o número de células viáveis de maneira dose-dependente (teste de MTT), alterar seus níveis de secreção de insulina (imunoensaio de antissoro insulina), produzir altas taxas de ERO intracelulares (citometria de fluxo, utilizando a sonda fluorescente DCFH-DA (2,7-diclorofluorescina diacetato) sensível a peróxido) e de MDA na membrana celular, um indicativo de dano oxidativo aos lipídios da membrana (ensaio de LPO – Calbiochem, San Diego, USA). Foi também verificada a indução de apoptose (detecção de apoptose Anexina V-Cy3TM), mediada pela ativação de MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), pela disfunção mitocondrial, que levou à ativação da PARP [polimerase poli(ADP-ribose), ensaio *Western Blot*] e por cascatas de caspases, mediadas por várias vias de sinalização celular (ensaio de atividade fluorométrica CaspACETM). Neste estudo os autores também observaram alterações na expressão de marcadores, como proteínas reguladas pela glicose (GRP78 e GRP94) e proteínas homólogas C/EBP (CHOP), relacionadas ao estresse do retículo endoplasmático que, posteriormente, desencadearam a ativação da calpaína, resultando no processo apoptótico. Com base nestes resultados, há evidências de que o As inorgânico é um químico que confere um sério fator de risco ambiental. Estudos realizados por Pi et al. (2003) já haviam mostrado que o arsênico estimula a produção de ERO, como os radicais de ânions superóxido, hidroxila e peroxil, em cultura de queratinócitos humanos. Sakurai et al. (2005) também já haviam observado um aumento na produção de ERO em células de fígado de rato (TRL1215), após exposição ao ácido monometilarsênico.

Fotakis e Timbrell (2006) estudaram os efeitos do cloreto de cádmio em culturas de células de fígado de rato (HTC) e humano (HepG2), quando associado à privação de aminoácidos individuais sulfurosos, como a metionina e a cistina. De acordo com Ohta e Cherian (1995), as deficiências nutricionais podem interferir na toxicidade do cádmio e alterar a distribuição do cádmio no organismo. Os resultados observados por Fotakis e Timbrell (2006) mostraram, pelo teste vermelho neutro em células HTC, que o esgotamento da cistina aumentou a toxicidade do cloreto de cádmio, provavelmente devido à diminuição dos níveis de glutatona intracelular. O mesmo não ocorreu para as células HepG2, devido ao fato destas células não utilizarem cistina para a síntese de GSH, ou pela falta de mecanismo de captação

da cistina por estas células, ou ainda pela falta de enzimas semelhantes às das células HTC. Já a privação de metionina não aumentou a toxicidade do cloreto de cádmio em nenhuma das linhagens celulares examinadas, tendo apenas induzido um efeito estatisticamente não significativo sobre a viabilidade de células HepG2. Portanto, os autores concluíram que somente a ausência de cistina aumenta a toxicidade induzida pelo cloreto de cádmio, sendo que este efeito é celular específico.

Estudos realizados por Bongiovanni et al. (2007) mostraram os efeitos dos flavonóides silimarina e quercetina em células CHO-K1, após exposição aguda e sub-crônica a arsenito sódico. As respostas de estresse oxidativo para arsenito incluíram um aumento da expressão da Hsp70, avaliada por *Western Blotting*; da peroxidação lipídica, analisada pela medição de dienos conjugados; e da atividade da γ -glutamil transpeptidase. Estas respostas foram eliminadas em experimentos agudos e minimizadas em experimentos subcrônicos por ambos os flavonóides. Os autores concluíram que a cultura de células CHO-K1 se caracterizou em um bioensaio eficaz para avaliação dos eventos celulares decorrentes da exposição ao arsenito. Além disso, os flavonóides antioxidantes foram eficazes para reduzir ou anular o estresse oxidativo celular, sugerindo que os mesmos devem ser incorporados na dieta alimentar, por oferecer um efeito protetor contra arsenito e outras substâncias químicas de ação semelhante.

Um estudo realizado por Rau et al. (2004) comparou as respostas tóxicas de duas linhagens celulares, a H-4-II-E (hepatoma de rato) e a PLHC-1 (carcinoma hepatocelular de peixe), após exposição a compostos metálicos pró-oxidantes, como o sulfato de cobre e o sulfato de ferro, associado a peróxido de hidrogênio, por meio da medição da citotoxicidade, peroxidação lipídica, glutathione total e porcentagem de dissulfeto de glutathione, mostrando que as células de fígado de rato são mais protegidas contra o estresse oxidativo provocado por essas substâncias químicas que as células de fígado de peixe.

Stohs e Bagchi (1995) descreveram que o mercúrio diminui os níveis de GSH nos túbulos renais concomitantemente à redução das atividades da SOD, GPx e catalase, mostrando o envolvimento das ERO na alteração da integridade da membrana, o que determina os efeitos nefrotóxicos de mercúrio. Keogh et al. (1994) e Steinebach e Wolterbeek (1994) mostraram a atuação eficaz da GSH na redução dos danos oxidativos causados pelo mercúrio, cádmio, cobre e chumbo em células epiteliais de intestino humano (I-407) e em células de hepatoma de rato (HTC).

Um estudo realizado por García-Fernández et al. (2002) comparou, em células CHO-K1, os efeitos citotóxicos de diferentes concentrações de 5 metais (Hg, Cd, Cu, Ni e

Pb), quanto ao conteúdo de GSH e às atividades enzimáticas das glutathione redutase, peroxidase e transferase, para verificar se as ERO têm envolvimento na toxicidade destes metais nas células de mamíferos. De todos os metais testados, o mercúrio mostrou-se o mais tóxico e o chumbo o menos tóxico para as células CHO-K1. O conteúdo total de GSH aumentou significativamente nas células expostas à menor concentração dos metais, mas diminuiu naquelas expostas à maior concentração; o conteúdo de GSSG diminuiu significativamente na menor concentração, enquanto que foram obtidos valores um pouco mais elevados para as culturas expostas às doses mais elevadas destes metais; as atividades da GPx foram, nas concentrações mais baixas 1,2; 1,5; 1,6; 2,0 e 2,5 vezes maior do que os resultados dos testes controles para o cobre, cádmio, mercúrio, níquel e chumbo, respectivamente; a atividade da GR permaneceu quase inalterada, exceto em baixas doses de níquel, mercúrio e chumbo; e a atividade da GST diminuiu, nas células expostas às maiores doses dos metais. Todos esses resultados mostram que, quando as células são expostas às menores concentrações dos metais, é ativado um mecanismo de defesa homeostática, enquanto que, com o aumento das concentrações dos metais, as células perdem essa habilidade de resposta aos danos citotóxicos. A relação entre a citotoxicidade dos metais, o conteúdo total de GSH e a energia de dissociação das ligações metal-enxofre confirmam o envolvimento dos mecanismos de defesa antioxidante na ação tóxica destes metais.

5.2.2. Água de abastecimento

Os eventuais problemas toxicológicos resultantes da desinfecção da água não dependem apenas dos poluentes presentes na água de captação, mas também dos próprios processos de desinfecção utilizados no tratamento da água captada. A cloração é um dos principais procedimentos usados para a desinfecção da água destinada ao consumo humano, mas esse processo resulta na formação de subprodutos com ação tóxica, derivados do processo de desinfecção por químicos (DBP – *disinfection by-product*). Isto se dá pela decorrente reação do cloro com compostos orgânicos (ácidos húmicos e fúlvicos), naturalmente encontrados na água ou decorrentes da poluição do recurso hídrico utilizado (WHO, 1996; BOORMAN et al., 1999).

Marabini et al. (2006) analisaram, em células HepG2, a toxicidade de amostras de água potável de uma cidade da Itália, tratadas com diferentes desinfetantes (hipoclorito de sódio, dióxido de cloro e ácido peracético), por meio do ensaio de vermelho neutro, medição de glutathione intracelular e método de DCFH-DA, para medição da produção das ERO. De maneira geral, os resultados sugeriram que a toxicidade da água de abastecimento deve estar

mais relacionada aos elementos presentes na própria água do que ao tipo de desinfetante utilizado no seu tratamento, apesar das amostras do outono terem induzido uma alta citotoxicidade às células testadas, quando comparada às de outras estações, principalmente, quando as águas foram desinfetadas com dióxido de cloro e ácido peracético. As poucas amostras de água do outono que não apresentaram citotoxicidade pelo ensaio do vermelho neutro, após exposição das células por 2h nestas amostras, induziram uma diminuição nas taxas de GSH intracelular e um aumento de ERO, enquanto que, após a exposição prolongada (24h), induziram um aumento de GSH, sem variações nos conteúdos de ERO. Segundo os autores, esta resposta poderia ser interpretada como uma adaptação celular a um estresse oxidativo inicial.

Os estudos realizados por Yuan et al. (2005) avaliaram, em células HepG2, o potencial tóxico de amostras de água potável, obtida por cloração de águas captadas em 3 diferentes recursos hídricos da cidade de Wuhan. Nesta avaliação, foram aplicados os ensaios de medição da lactato desidrogenase - LDH (teste de citotoxicidade), do cometa (teste de genotoxicidade), de formação de aldeídos reativos ao ácido tiobarbitúrico - TBA (teste de estresse oxidativo), e de análise dos conteúdos de glutathione (teste de potencial antioxidativo). Os autores mostraram que as águas derivadas dos 3 corpos hídricos exibiram citotoxicidade, devido a um aumento na atividade da LDH, e genotoxicidade, por induzir quebras no DNA, ambos efeitos registrados de maneira dose-dependente. Também foi observado um aumento na formação de MDA e uma diminuição nos índices de GSH das células, indicativos do estresse oxidativo causado pela água clorada.

Xie et al. (2010) avaliaram a toxicidade de amostras de água coletadas nas diversas etapas da estação de tratamento de água para abastecimento de uma cidade da região central da China, por meio dos ensaios de estresse oxidativo e do cometa, em células de fígado humano (L-02) mantidas em cultura. Entre as diferentes etapas de tratamento da água, as de pré e pós-cloração induziram aumento nos danos no DNA e nos níveis do marcador de dano oxidativo MDA, além de uma diminuição no conteúdo do marcador de defesa antioxidante, GSH. Por outro lado, após os processos de sedimentação e filtração, foi observada uma diminuição do risco genotóxico e uma inibição do estresse oxidativo nas células. Assim, o estresse oxidativo induzido pelas etapas de pré e pós-cloração deve estar correlacionado com os danos induzidos ao DNA. Estes resultados auxiliam a compreensão das influências das diferentes etapas de tratamento de água para a toxicidade das águas de abastecimento e podem melhorar as tecnologias utilizadas no processo de produção de água

potável e, assim, proteger o público exposto contra possíveis ações de compostos tóxicos formados, principalmente, durante o processo de cloração da água.

Estudos realizados por Zhang et al. (2011) mostraram, por meio de ensaios com células HepG2, uma associação entre estresse oxidativo e a genotoxicidade induzida pelo bromato de potássio (um sub-produto da ozonização de águas brometadas), que é utilizado como desinfetante de água potável e como aditivo alimentar. Pelo ensaio de cometa e pelo teste de micronúcleos, ficou comprovado que todas as concentrações testadas de bromato de potássio (1,56; 3,12; 6,25; 12,5 mM) induziram efeitos genotóxicos nas células HepG2, associados a mecanismos de estresse oxidativo. A comprovação deste efeito foi obtida pelos níveis aumentados de ERO intracelulares, pelo esgotamento dos níveis de GSH e pela presença de danos oxidativos ao DNA, verificados pelos testes de DCFH-DA, do ensaio de fluorescência para medição de GSH intracelular e da análise imunocitoquímica com 8-OHdG, respectivamente. Quando foi realizado um pré-tratamento das células com o antioxidante hidrotirosol (HT), houve um decréscimo acentuado na migração do DNA (ensaio do cometa). Os autores ainda mostraram que as maiores concentrações testadas do bromato de potássio aumentaram a estabilidade da membrana lisossomal e não alteraram o potencial de membrana mitocondrial das células expostas, sugerindo que o estresse oxidativo e os efeitos genotóxicos induzidos pelo bromato de potássio tenham ocorrido, possivelmente, devido a danos lisossomais, precursores de danos oxidativos ao DNA.

5.2.3. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)

Os HPA são caracterizados por um grupo diversificado de compostos orgânicos constituídos por dois ou mais anéis aromáticos. Os mecanismos de ação mais comuns dos HPA, que resultam em toxicidade para os organismos, estão relacionados com a interferência destes compostos sobre as funções das membranas celulares, por se ligarem aos seus sítios hidrofóbicos, causando deformidade e perturbação molecular, além de alterações no sistema enzimático (TUVIKENE, 1995).

Embora os HPA possam induzir efeitos tóxicos diretos, a maior preocupação com estes compostos é com a formação de metabólitos reativos, tais como epóxidos e dihydrodiois, que podem se ligar ao material genético e às proteínas celulares (ALBERS, 2002).

Hanzalova et al. (2010) investigaram o papel do dano oxidativo no mecanismo de ação de HPA (dos c-HPA benzo[*a*]pireno e (B[*a*]P); do dibenzo[*a,l*]pireno (DB[*a,l*]P); de uma mistura artificial de c-HPA (mistura c-HPA) e de material orgânico extraído de matéria

(extractable organic matter – EOM) particulada do ar urbano da cidade de Praga (República Tcheca). Neste estudo, foram usadas duas linhagens celulares (HepG2 e Fibroblasto diplóide de pulmão humano – HEL cell), expostas por 24 e 48 horas em várias concentrações dos compostos e misturas. Os autores observaram que os compostos testados induziram respostas diferentes nas 2 linhagens celulares, uma vez que demonstraram a alta capacidade da MOE e uma menor capacidade dos c-HPA para induzir dano oxidativo ao DNA, aos lipídios e às proteínas em células HepG2, enquanto que o estresse oxidativo induzido por estes mesmos compostos nas células HEL foi extremamente fraco. Devido à menor capacidade de indução de danos oxidativos dos c-HPA em comparação às MOE, para ambas as linhagens celulares, especula-se que outros compostos químicos diferentes, presentes na atmosfera, possam ser os responsáveis pelo aumento dos níveis de 8-oxodG, 15-F2t-ISOP e carbonilas de proteínas. As diferenças nas respostas das linhagens celulares podem ser atribuídas às suas características particulares das células, onde as células HepG2 teriam uma maior capacidade de metabolização de HPA (SEVASTYANOVA et al., 2007) e serem portadoras de um fenótipo transformado. Já as células HEL possuem um fenótipo normal e mimetizam melhor as condições *in vivo*, sendo adequadas para serem usadas como modelo para experimentação *in vitro* do pulmão, tecido alvo de exposição por inalação aos HPA.

Segundo Lin e Yang (2007), alguns HPA podem aumentar o conteúdo de GSH, agindo como um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo ou ainda como um processo de detoxificação celular. Os autores analisaram o metabolismo da GSH em células HepG2 expostas ao benzo[*a*]pireno e verificaram que a exposição à concentração subletal aumentou o nível de GSH, diminuiu a atividade da GR, mas não alterou a atividade da GPx nem aumentou a produção de ERO, o que pode indicar que o estresse oxidativo pode não ser um fator de risco importante para danos induzidos pelo benzo[*a*]pireno nas células HepG2. No entanto, este HPA induziu um aumento das atividades das enzimas monooxigenases, pertencentes à subfamília CYP1A e GST, mostrando ser capaz de ativar a ação de enzimas de detoxificação nas células humanas testadas.

5.2.4. Corantes

Zhang et al. (2009a) utilizaram-se de teste *in vitro*, realizados com células HepG2, para avaliar o papel do estresse oxidativo no dano ao DNA induzido pelo Sudan IV, um corante diazo encontrado em combustíveis, óleo, couro e alimentos. Nesta análise, os autores aplicaram os ensaios do micronúcleo e do cometa, de DCFH-DA para medição dos níveis de produção das ERO intracelulares, de coloração imunoperoxidase para 8-OHdG e de medição

de GSH intracelular pré-tratada com BSO, um inibidor específico da síntese de GSH. Foi observado um aumento da frequência de micronúcleos nas maiores concentrações testadas e um efeito dose-dependente na indução de quebras, observadas pela migração de DNA das células expostas ao químico, comprovando o alto potencial genotóxico do corante. Também foram constatados níveis elevados de ERO e de 8-OHdG das células HepG2 expostas ao corante. Verificou-se ainda que houve um aumento na eliminação de GSH, após o tratamento com BSO, o que aumentou dramaticamente a susceptibilidade das células à ação genotóxica do Sudan IV. Com base nesses resultados, os autores sugeriram que a toxicidade do Sudan IV, para células HepG2, seja decorrente de danos oxidativos promovidos pelo corante sobre a molécula de DNA.

5.2.5. Contaminantes alimentares

Exposição a substâncias como toxinas e químicos ambientais, tem um efeito detrimental sobre as células e, conseqüentemente, à saúde dos organismos expostos. Dentre os compostos tóxicos, especificamente as toxinas, as micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por certos fungos filamentosos, que não alteram nem o crescimento nem o desenvolvimento do fungo, mas alteram o metabolismo celular de outros organismos. As células de vários organismos respondem à presença de produtos químicos tóxicos por inúmeros mecanismos bioquímicos. Uma das primeiras respostas celulares à exposição tóxica, que pode potencialmente ser usado como um marcador precoce de toxicidade, é o aumento da proteína de choque térmico - *Heat shock protein* – Hsp (URANI et al., 2001; CARNEVALI; MARADONNA, 2003).

A Hsp 70 kDa é a proteína mais abundante do grupo das sub-famílias Hsp em células de mamíferos, e está intimamente ligada à citoproteção de uma variedade de eventos nocivos (WALTER et al., 1994). Segundo Hassen et al. (2005) e El Golli et al. (2006), têm sido mostrado que a exposição a um choque térmico sub-letal pode fornecer proteção contra outros tipos de estressores. Este fato tem sido associado à Hsp70, onde a proteção é, provavelmente, devido à capacidade da Hsp70 evitar agregação de proteínas e outras modificações proteicas (HARTL; MARTIN, 1995; HOFFMANN; RINAS, 2004). Outros mecanismos pelos quais a expressão da Hsp70 pode promover citoproteção seria a prevenção da danos oxidativo, o aumento das proteínas celulares e a estabilidade de antioxidante endógeno (POLLA et al., 1996).

Um estudo de revisão, realizado por Golli-Bennour e Bacha (2011), sobre os efeitos tóxicos de micotoxinas, avaliou se a indução de Hsp70, um parâmetro de resposta

protetora e adaptativa geral, é também um biomarcador sistemático para intoxicações por micotoxinas. De maneira geral, os autores concluíram que há uma forte relação entre o estresse oxidativo induzido pelas toxinas e a indução de Hsp70, e apontaram que a expressão dessa proteína é uma resposta alternativa importante para o sistema de defesa oxidativa contra a ação das micotoxinas oxidantes, mas não é um biomarcador sistemático para a exposição a todos os tipos de micotoxinas.

Zhang et al. (2009b) avaliaram, em células HepG2, o papel do estresse oxidativo na indução de danos no DNA, induzido pelo desoxinivalenol (DON), uma micotoxina citotóxica encontrada naturalmente em uma ampla variedade de alimentos para animais, como em grãos de cereais. Foram aplicadas diferentes bioensaios, como o pré-tratamento com o antioxidante HT no ensaio de cometa, o método de DCFH-DA para medição dos níveis de produção das ERO intracelulares, o ensaio de peroxidação lipídica para medição de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e o ensaio de coloração imunoperoxidase para 8-OHdG. As células expostas as altas concentrações de DON apresentaram um aumento: na migração do DNA, quase totalmente revertido com o tratamento com HT; nos níveis de ERO e de TBARS; e na intensidade de 8-OHdG, o que indica que o dano ao DNA induzido pela DON em células HepG2 está fortemente relacionado ao estresse oxidativo, e que a ação antioxidante do HT desempenha um papel vital na defesa contra a ação tóxica desse composto químico.

Marin-Kuan et al. (2011) analisaram algumas pesquisas sobre a ação da ocratoxina A, uma micotoxina produzida por fungos de origem alimentar, como o *Aspergillus* e *Penicillium*, e presente em vários alimentos. Os autores relataram que essa substância química é capaz de gerar estresse oxidativo, aumentando as taxas de DNA oxidativo, de danos aos lipídios e às proteínas, em diferentes sistemas-testes tanto *in vivo* como *in vitro*. Pelo ensaio de microarrays de c-DNA, Arbillaga et al. (2007) detectaram um aumento significativo na geração de ERO, devido a altas taxas de danos oxidativos ao DNA em células renais humanas HK-2 expostas à ocratoxina A. A indução de efeitos citotóxicos e altas frequências de dano oxidativo ao DNA, observadas em células de fibroblastos de pulmão de *hamster* chinês V79, células renais de macaco verde africano CV-1 e células renais de ratos (linhagem primária), mesmo em pequenas concentrações de ocratoxina A, pode ser um importante fator para a nefrocarcinogenicidade associada à ação desta toxina (KAMP et al., 2005). Segundo Schaaf et al. (2002), o estresse oxidativo provocado pela ocratoxina A contribui para a toxicidade em células LLC-PK₁ (linhagem celular de túbulo renal proximal de porcos), mas o

tratamento com antioxidantes (α -tocoferol e *N*-acetil-*L*-cisteína) previne a indução desses efeitos.

5.2.6. Fármacos

Grosicka-Maciag et al. (2010) investigaram os efeitos da *N*-acetil-*L*-cisteína (NAC) sobre o estresse oxidativo induzido pelo dissulfiram (DSF), um composto químico de uso terapêutico. Neste estudo, foram realizados os testes de MTT, ensaio de peroxidação lipídica, determinação de apoptose – TUNEL e Anexina V, determinação colorimétrica de GSH e GSSG, determinação de grupos carbonila de proteínas, e determinação das atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GR e GPx, aplicadas em células de fibroblastos de *hamster* chinês (V79). Foi verificado um aumento nas taxas de GSH, GSSG, de grupos carbonila de proteínas, na atividade da CAT, da GR e da GPx não dependente de selênio, além da presença de atividade pró-apoptótica e ausência da alteração nas atividades da SOD e da peroxidação lipídica, das células V79 expostas ao DSF. O tratamento com NAC restaurou a viabilidade das células tratadas com DSF, reduziu a atividade pró-apoptótica do GSF e as taxas de GSSG, o conteúdo de carbonilas de proteínas ficaram próximas às taxas observadas no controle, não reverteu o aumento da atividade da CAT e da GR e aumentou a atividade da GPx. Os autores concluíram que as propriedades oxidantes são parcialmente atribuíveis a alguns efeitos celulares de DSF e que os mecanismos induzidos pelo tratamento com NAC podem diminuir, ou até mesmo reverter totalmente alguns dos efeitos tóxicos do químico testado, comprovando a importância do estado redox inicial da célula à exposição a agentes terapêuticos. Estes resultados podem ser relevantes para a exploração eficiente das propriedades biológicas da NAC, sob a condição do nível modulado de GSH intracelular, para uma possível aplicação farmacológica.

Estudos realizados por Platel et al. (2011) mostraram, em células humanas TK6 linfoblastóides, que a versão modificada do ensaio cometa (com utilização das endonucleases de reparo Fpg e hOgg1) é uma ferramenta útil para o fornecimento dos primeiros elementos dos diferentes modos de ação de fármacos oxidantes, como o peróxido de hidrogênio, a bleomicina e o brometo de potássio, podendo ser usado para a determinação prévia de genotoxicidade de compostos químicos que possuem ação oxidante para o DNA.

5.2.7. Outros compostos químicos industriais

Estudos realizados por Srinivasan et al. (2001) mostraram a produção de ERO por metabólitos de BPC (bifenilas policloradas), que são compostos químicos industriais

persistentes e bioacumulativos, usados como fluidos dielétricos em condensadores e transformadores e como lubrificantes hidráulicos. Foram realizados ensaios *in vitro* em células HL-60 (linhagem celular oriunda de leucemia humana), onde as BPC hidroxiladas e as quinonas de BPC, após reação com GSH, produziram superóxido e outras ERO, de maneira dose e tempo dependente. As ERO formadas reagiram com o DNA celular e outros nucleófilos, resultando em dano oxidativo do tipo quebra da fita de DNA. Todos esses dados são indicativos importantes da toxicidade dos BPC para animais.

Park e Park (2008) avaliaram a citotoxicidade do OCS (octacloroestireno), um composto aromático halogenado persistente e bioacumulativo, gerado por diversos processos industriais, em células normais de fígado humanas (células Chang). Os autores mostraram que diferentes concentrações de OCS induziram a produção de ERO e a diminuição de taxas de GSH intracelular. Estes resultados foram obtidos por meio do ensaio fluorométrico, usando a oxidação intracelular de DCFH-DA; da ativação da caspase-3 citossólica, usando o kit de ensaio fluorescente caspase-3; da condensação cromatínica e da fragmentação do material genético, usando o corante fluorescente DAPI; da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo tais como a GST, da heme-oxigenase, da tioredoxinase redutase e da metalotioneína, por meio do ensaio de PCR em tempo real (q-RT-PCR). Segundo os autores, a associação de todos estes resultados sugere que a geração de ERO pelo OCS deve-se, principalmente, a um processo apoptótico do mecanismo tóxico deste composto químico.

Foram estudados, por Hu et al. (2008), os efeitos tóxicos do tricloroetileno (TCE), um importante poluente industrial usado como desengraxante de peças de metal e como solvente geral para gorduras, ceras, resinas, óleos, borracha ésteres, éteres de celulose, tintas e vernizes, que tem sido considerado um contaminante de ar e de águas subterrâneas, com potencial de prejudicar a saúde humana. Neste estudo, foi avaliadas a genotoxicidade e a mutagenicidade, usando os ensaios do cometa e do micronúcleo e os mecanismos de ação tóxica do TCE, por meio de ensaios de peroxidação lipídica, em células de hepatoma humano (HepG2). Os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade mostraram que o TCE causou um aumento significativo da migração do DNA e da presença de micronúcleos, para todas as concentrações testadas. O envolvimento da peroxidação lipídica nestas propriedades genotóxicas foi confirmado por meio da coloração de imunoperoxidase para 8-OHdG e por níveis de medição das TBARS. Os autores verificaram, ainda, o nível de GSH intracelular, por pré-tratamento com BSO, um inibidor da síntese de GSH específicos, e por co-tratamento com NAC, um precursor de GSH. Foi verificado que a eliminação de GSH, em células HepG2 com BSO, aumentou drasticamente a susceptibilidade celular à ação citotóxica e

genotóxica do TCE, enquanto que o dano ao DNA, induzido por este poluente, foi quase completamente anulado, quando o conteúdo de GSH intracelular foi elevado pelo NAC. Estes resultados indicam que o TCE exerce efeitos genotóxicos em células HepG2, provavelmente, pela indução de danos no DNA, via estresse oxidativo, e que a GSH, principal antioxidante intracelular, é responsável pela defesa celular contra os danos ao DNA causados pelo TCE.

Wang et al. (2001) avaliaram os efeitos tóxicos do tricloroetileno e do tetracloroetileno, compostos orgânicos voláteis amplamente utilizados como agentes industriais de limpeza a seco e desengordurante de metais, comumente identificados como contaminantes ambientais de águas subterrâneas, águas superficiais e solo, usando sistema de exposição a vapor *in vitro*, análise de taxas de proliferação celular, determinação de GSH intracelular, e teste de micronúcleo em células CHO-K1. Foi detectado um aumento significativo na frequência de micronúcleos e uma inibição do crescimento celular, após exposição aos dois compostos, de maneira dose e tempo-dependente. As doses mais baixas dos químicos induziram um aumento nos índices de GSH intracelular, enquanto que as mais altas reduziram rapidamente tais níveis, sendo que os dados mais significativos foram observados para os ensaios com tetracloroetileno, sugerindo que este composto é mais tóxico que o tricloroetileno para células CHO-K1.

5.2.8. Nanopartículas

As nanopartículas podem gerar ERO por interagir com a superfície celular. O estresse oxidativo produzido em células de mamíferos pelas nanopartículas está relacionado com a área, a reatividade e a composição química da superfície celular e com a quantidade de nanopartículas internalizadas (SUZUKI et al., 2007; WALLACE et al., 2007). Os radicais produzidos sob condições de estresse oxidativo induzem uma variedade de lesões no DNA, incluindo as quebras das fitas desta biomolécula (SHIGENAGA; AMES, 1991).

De acordo com Eom e Choi (2011), atualmente as nanopartículas têm sido amplamente aplicadas no campo da medicina, da farmacologia e em processos indústrias. Das várias nanopartículas produzidas, o dióxido de silício (SiO₂) é a que tem um potencial amplo de aplicações. Os autores afirmam que as nanopartículas de SiO₂ promovem efeitos citotóxicos por estresse oxidativo em células epiteliais de brônquio humano (Beas-2B). Os efeitos observados foram a redução de 20% da viabilidade celular e o aumento do número de células na fase G1, os quais são mediados por mecanismos de estresse oxidativo, comprovado pelo aumento nas taxas de ERO intracelulares e na expressão da proteína heme-oxigenase 1.

Constatou-se ainda, que o aumento na expressão dessa proteína é desencadeado pela indução prévia de fatores de transcrição Nrf-2 e da expressão da forma fosforilada da ERK (quinase reguladora de sinal extracelular).

Bhattacharya et al. (2009) demonstraram que o dióxido de titânio induziu a formação de adutos de DNA, detectado pela medição de 8-OhdG. Os autores interpretaram esta indução, à provável formação de ERO intracelulares. Gurr et al. (2005) demonstraram, em células epiteliais do pulmão humano, que essa mesma nanopartícula induziu a geração de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, levando à peroxidação lipídica e ao dano oxidativo ao DNA.

Estudos realizados por Kim et al. (2009) mostraram os efeitos citotóxicos induzidos por nanopartículas de prata (Ag-NP) e o papel que o estresse oxidativo desempenha na citotoxicidade destes compostos em células HepG2. Neste estudo, foram aplicados diferentes ensaios toxicológicos como: teste morfológico e de localização intracelular de nanopartículas, teste de citotoxicidade MTT, ensaio de estresse oxidativo com DCFH-DA, ensaio de dano ao DNA usando γ -H2AX, e Real Time Reverse Transcriptase -Polymerase Chain Reaction - q-RT-PCR. As Ag-NP exibiram uma alta citotoxicidade, comparável à de íons prata em ensaios de citotoxicidade *in vitro*. Estas nanopartículas também induziram estresse oxidativo intracelular, danos oxidativos ao DNA e ficaram aglomeradas no citoplasma e no núcleo das células tratadas. Os autores comprovaram que a citotoxicidade das Ag-NP é decorrente, principalmente, do estresse oxidativo induzido nas células humanas expostas a estes compostos, que está relacionado com o aumento dos níveis de expressão dos genes GPx-1, CAT e SOD-1. Foi demonstrado que a citotoxicidade e os danos oxidativos ao DNA foram totalmente impedidos, quando houve a ação do antioxidante *N*-acetilcisteína.

Kim et al. (2011) avaliaram que o estresse oxidativo exerce um papel importante nos efeitos genotóxicos induzidos por Ag-NP em células BEAS-2B (células epiteliais de brônquio humano). Pelo ensaio de localização intracelular de nanopartículas, foi verificada a presença de agregados de Ag-NP envolvidos com uma vesícula endocítica presentes no citoplasma e no núcleo das células pulmonares. As nanopartículas estimularam a ocorrência de danos oxidativos ao DNA e a formação de micronúcleos, de maneira dose-dependente, além de terem aumentado a geração de ERO, efeitos estes que foram parcialmente bloqueados pela ação da SOD.

Os estudos discutidos acima estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo dos principais efeitos de contaminantes ambientais na indução de danos oxidativos em células de mamíferos.

Contaminante	Linhagem celular	Metodologias	Resultados	Bibliografia
Toxafeno	CHO-K1	medição de GSH, GST, GR e GPx	aumento de GR, GPx, GST, e alterações nos níveis de GSH	Bayoumi et al. (2000)
Aldrin, dieldrin e endosulfan	CHO-K1	ensaios vermelho neutro; medição de LDH; ensaio de peroxidação lipídica; medição de GSH, GSSG, GST, GR e GPx	comprometimento da função lisossômica; liberação de LDH no meio; alta produção de peróxido; aumento de GPx, GST, GR, GSSH, e diminuição de GSH	Bayoumi et al. (2001)
Peróxido de hidrogênio combinado com 2,3,4,6-tetraclorofenol, glifosato, lindane, 2,4-ácido dicloroacético, 4-cloroanilina	Fibroblastos humanos	ensaio do cometa	aumento da fragmentação de DNA para 4-cloroanilina e 2,3,4,6-tetraclorofenol	Lueken et al. (2004)
Clordano, <i>o,p'</i> -DDT, dieldrin, endossulfam, kepone, metoxicloro e toxafeno	HepG2	medição de 1A-EROD e 2B-PROD; medição de GSH	com o aumento de 1A-EROD e 2B-PROD, diminuição de GSH; com a diminuição de 1A-EROD e 2B-PROD, aumento de GSH	Dehn et al. (2005)
Azinfosmetil	Linfócitos humanos	medição de 8-OHdG; ensaio do cometa modificado; ensaio de peroxidação lipídica	aumento de ERO; aumento da fragmentação de DNA e maior atividade de reparo de DNA oxidado; altas taxas de MDA e aumento de GSH	Muniz et al. (2008)
Spinosad	CHO-K1	ensaio de vermelho neutro; ensaio de peroxidação lipídica; medição de GSH; GR; GPx; GST	redução da viabilidade celular; aumento de MDA; aumento de GPx e GR e diminuição de GSH e GST	Pérez-Pertejo et al. (2008)
Malation	HepG2	ensaio de MTT; ensaio de peroxidação lipídica; ensaio do cometa	diminuição da viabilidade celular; produção de MDA; aumento dos danos ao DNA	Moore et al. (2009)
Aldicarbe e propoxur	CHO-K1	ensaio de peroxidação lipídica; medição de GSH, GR, GPx e GST (na presença ou ausência de BSO)	com BSO: diminuição de GSH, GR, GPx e GST; sem BSO: aumento de GSSG e MDA	Maran et al. (2010)
Metilmercúrio	células neuronais humanas	medição de GSH, GPx, Trx e TrxR	produção de ERO; esgotamento de GSH; inibição da GPx, Trx e TrxR	Farina et al. (2011)

Cádmio	Hepatócitos de Rato	ensaio de peroxidação lipídica; quantificação de TBARS	aumento de TBARS	Müller (1986)
Cádmio	V79	medição de GSH	aumento de GSH intracelular	Ochi et al. (1988)
Cádmio	Células mesangiais de rins humanos	medição de GSH	esgotamento de GSH intracelular	Chin e Templeton (1993)
Mercurio	I-407	medição de GSH	redução de danos oxidativos pela ação de GSH	Keogh et al. (1994)
Cádmio, cobre e chumbo	HTC	medição de GSH	redução de danos oxidativos pela ação de GSH	Steinebach e Wolterbeek (1994)
Mercurio	Células dos túbulos renais	medição de GSH, GPx, CAT e SOD	produção de ERO	Stohs e Bagchi (1995)
Mercurio, cádmio, cobre, níquel e chumbo	CHO-K1	medição de GSH, GR, GPx e GST	aumento de GSH; GST e GPx; diminuição da GSSG	García-Fernández et al. (2002)
Arsênio	Queratinócitos humanos HaCaT	Western blotting; RT-PCR; método de DCFH-DA	acumulação do fator de transcrição Nrf2; produção de H ₂ O ₂	Pi et al. (2003)
Peróxido de hidrogênio combinado com sulfato de cobre e o sulfato de ferro	H-4-II-E e PLHC-1	ensaio de peroxidação lipídica; medição de GSH	aumento de TBARS; aumento de GSH intracelular	Rau et al. (2004)
Cádmio	Células de fígado de rato TRL1215	método de DCFH-DA; Northern Blotting	produção de ERO; aumento da expressão de oncogenes	Qu et al. (2005)

METAIS

Ácido monometilarsênico	TRL1215	Ensaio de azul alamar; Ensaio de cristal violeta; TUNEL; Ensaio de citometria de fluxo para apoptose; ensaio de cometa; ensaio de CaspACE TM ; medição de DCFH-DA	esgotamento de GSH intracelular; indução de necrose e apoptose; aumento da atividade da caspase-3; aumento na produção de ERRO	Sakurai et al. (2005)
Cloreto de cádmio	HTC e HepG2	ensaio do vermelho neutro; medição de GSH	aumento da toxicidade na presença de cisteína; diminuição de GSH intracelular em HTC	Fotakis e Timbrell (2006)
Arsenito sódico	CHO-K1	ensaio de <i>Western Blotting</i> ; ensaio de peroxidação lipídica; ensaio enzimático	aumento da expressão da proteína (hsp70) e redução ou esgotamento do estresse oxidativo celular	Bongiovanni et al. (2007)
Arsênio	RIN-m5F	ensaio do MTT; método de DCFH-DA; ensaio de peroxidação lipídica; ensaio de <i>Western Blot</i> ; ensaio de Anexina V-Cy3 TM ; ensaio de CaspACE TM ; RT-PCR	redução da viabilidade celular; produção de ERO intracelulares; produção de MDA; indução de apoptose; disfunção mitocondrial; alterações na expressão de GRP78 e GRP94 C/EBP (CHOP)	Lu et al. (2011)
Amostras de água potável clorada	HepG2	ensaio do cometa; medição de LDH; quantificação de TBARS; GSH	aumento da fragmentação de DNA, aumento da atividade de LDH, aumento da formação de MDA e diminuição de GSH	Yuan et al. (2005)
Água combinada com hipoclorito de sódio, dióxido de cloro e ácido peracético	HepG2	ensaio de vermelho neutro; GSH intracelular; método de DCFH-DA	diminuição da viabilidade celular, diminuição de GSH intracelular e aumento de ERRO	Marabini et al. (2006)
Amostras do tratamento de água de rio para o abastecimento público	L-02	ensaio do cometa; ensaio de peroxidação lipídica; GSH	aumento dos danos ao DNA, aumento de MDA e diminuição de GSH	Xie et al. (2010)
Bromato de potássio	HepG2	ensaio do cometa; teste do micronúcleo; método de DCFH-DA; GSH intracelular; medição de 8-OHdG	aumento nos níveis de ERO intracelulares, esgotamento dos níveis de GSH e danos oxidativos ao DNA; HT: diminuição dos danos ao DNA	Zhang et al. (2011)

METAIS

S T A

Benzo[a]pireno	HepG2	GSH; GR; GPx; GST; CYP1A	aumento de GSH, GST e CYP1A, e diminuição de GR	Lin e Yang (2007)
HPA				
c-HPA: o benzo[a]pireno (B[a]P), o dibenzo[a,l]pireno (DB[a,l]P) e uma mistura artificial de c-HPA	HepG2 e HEL	medição de 8-oxodG; 15-F2t-IsoP e grupos carbonila de proteína	danos oxidativos ao DNA, lipídios e proteínas, aumento de 8-oxodG, 15-F2t-ISOP e carbonilas de proteínas	Hanzalova et al. (2010)
CORANTE				
Sudan IV	HepG2	ensaio do cometa; teste do micronúcleo; método de DCFH-DA; medição de 8-OHdG; GSH intracelular	aumento de danos ao DNA, aumento de ERO e da 8-OHdG, com BSO: esgotamento da GSH	Zhang et al. (2009)
CONTAMINANTES ALIMENTARES				
Ocratoxina A	LLC-PK ₁	MTT; método de DCFH-DA; medição de GSH; ensaio de oxi-DNA biotrina	diminuição da viabilidade celular; aumento de ERO; esgotamento de GSH; aumento dos danos oxidativos ao DNA	Schaaf et al. (2002)
Ocratoxina A	V79, CV-1 e células renais de ratos	azul de tripan; citometria de fluxo - anexina V e iodeto de propídeo; ensaio de cometa; medição de GSH	efeitos citotóxicos (diminuição da viabilidade celular e indução de apoptose); danos oxidativos ao DNA; alterações nos níveis de GSH de acordo com as concentrações testadas	Kamp et al. (2005)
Ocratoxina A	HK-2	MTT; medição de LDH; ensaio de cometa; método de DCFH-DA; ensaio de microarrays de c-DNA	diminuição da viabilidade celular; liberação de LDH ao meio; indução de danos oxidativos ao DNA; produção de ERO; aumento da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo	Arbillaga et al. (2007)

CONTAMINANTES ALIMENTARES

Desoxinivalenol	HepG2	ensaio do cometa modificado; método de DCFH-DA; ensaio de peroxidação lipídica para medição de TBARS ; medição de 8-OHdG	aumento na fragmentação do DNA e aumento de ERO, TBARS e 8-OHdG	Zhang et al. (2009)
Micotoxina	diferentes linhagens celulares	medição de antioxidantes enzimático e não enzimático	aumento da expressão da Hsp70 como resposta para o sistema de defesa oxidativa	Golli-Bennour e Bacha (2011)
Ocratoxina A	diferentes linhagens celulares	medição de ERO; medição de atividade antioxidante; microarranjos de c-DNA	danos oxidativos ao DNA, lipídios e proteínas	Marin-Kuan et al. (2011)

FÁRMACOS

Dissulfiram	V79	teste de MTT; ensaio de peroxidação lipídica; determinação de apoptose – TUNEL e Anexina V; GSH/GSSG, determinação de grupos carbonila de proteínas; SOD; CAT; GR; GPx	com NAC: aumento da viabilidade celular, reduziu a atividade pró-apoptótica do GSF, diminuição de GSSG e carbonilas de proteínas, diminuição da CAT e da GR e aumentou GPx	Maciag et al. (2010)
Bleomicina e o brometo de potássio	TK6	ensaio do cometa modificado	danos ao DNA primário	Platel et al. (2011)

Peróxido de Hidrogênio combinado com ácido nitrilotriacético, m-xileno, n-hexanol		Fibroblastos humanos	Ensaio do cometa	aumento da fragmentação de DNA para m-xileno e n-hexanol	Lueken et al. (2005)
Bifenilas policloradas		HL-60	medição da produção de superóxido (teste de NBT); ensaio de DCFH-DA	aumento da produção de superóxido; produção de ERO; danos oxidativos ao DNA	Srinivasan et al. (2001)
Octacloroestireno		Células Chang	método de DCFH-DA; ensaio fluorescente caspase-3; RT-PCR;	produção de ERO, diminuição de GSH intracelular, ativação da caspase-3- citossólica, fragmentação do DNA, expressão de genes GST, a heme-oxigenase, a tioredoxinase redutase e a metalotioneína	Park e Park (2008)
Tricloroetileno		HepG2	ensaio do cometa; teste do micronúcleo; ensaios de peroxidação lipídica; medição de TBARS; 8-OHdG; GSH intracelular	fragmentação do DNA; com BSO: aumento dos danos ao DNAE esgotamento de GSH; com NAC: esgotamento dos danos ao DNA e aumento de GSH intracelular	Hu et al. (2008)
Dióxido de titânio		células epiteliais do pulmão humano	deteção de 8-OHdG; ensaio de cometa; método de DCFH-DA	formação de adutos de DNA; produção de ERO	Bhattacharya et al. (2009)
Dióxido de titânio		células epiteliais do pulmão humano	medição de produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico; ensaio de cometa; ensaio de peroxidação lipídica; teste de micronúcleo	produção de ERO; dano oxidativo ao DNA; aumento de MDA; indução de micronúcleos	Gurr et al. (2005)
Dióxido de silício		Beas-2B	ensaio de MTT; citometria de fluxo com iodeto de propídeo; método de DCFH-DA; <i>Western Blotting</i>	redução da viabilidade celular; aumento de células na fase G1; aumento de ERO, como H ₂ O ₂ ; aumento da expressão da heme-oxigenase 1, da Nrf-2 e ERK	Eom e Choi (2011)
Nanopartículas de prata		HepG2	ensaio do MTT; método de DCFH-DA; ensaio de dano ao DNA usando γ -H2AX, e RT-PCR	diminuição da viabilidade celular; aumento na produção de ERO; danos oxidativos ao DNA; aumento na expressão dos genes GPx, CAT e SOD1	Kim et al. (2009)
Nanopartículas de prata		BEAS-2B	método de DCFH-DA; teste de micronúcleo; ensaio de cometa	aumento na produção de ERO; aumento de micronúcleos (dose-dependente); danos oxidativos ao DNA	Kim et al. (2011)

*STA: Sistema de tratamento de água

OUTROS CONTAMINANTES

NANOPARTICULAS

6. DOENÇAS ASSOCIADAS AOS DANOS OXIDATIVOS

O estabelecimento de relação entre o estresse oxidativo celular e a origem de várias doenças humanas é de fundamental importância para a compreensão dos compostos envolvidos com a toxicologia ambiental. De maneira geral, as patologias induzidas por danos oxidativos estão associadas aos processos degenerativos, de envelhecimento, cardiovasculares e à carcinogenicidade (SOHAL et al., 2002).

As células possuem mecanismos elaborados para realizar a manutenção de sua homeostase redox, mas alterações nesse estado, causadas pela presença de elevados níveis de ERO, podem levá-las à morte, pela desregulação de suas vias mitogênicas e apoptóticas (XIONG et al., 2011).

Os poluentes podem interferir nas diferentes macromoléculas presentes nas células. Um dos alvos mais importantes de sua ação é o material genético, que, ao acumular lesões, perde a sua função fisiológica e informativa (FRIDOVICH, 1998). A peroxidação lipídica também é um dano oxidativo importante associado aos efeitos tóxicos de diversas substâncias químicas, às lesões teciduais e ao desenvolvimento de estados patológicos (VALKO et al., 2006). Além disso, a oxidação de proteínas pode ativar o sistema imune, induzindo o aparecimento de doenças auto-imunes (VICTOR; DE LA FUENTE, 2003), e afetando importantes eventos de regulação celular (XIONG et al., 2011).

A relação das principais doenças induzidas pela presença de ERO nas células está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Relação das ERO com a indução de algumas patologias humanas

Patologias	Alvo/Mecanismos de Ação das ERO	Referências Bibliográficas
Acidente vascular cerebral isquêmico	promovem danos no DNA e peroxidação lipídica	Steinberg (1997); Bolokadze et al. (2004); Valko et al. (2007)
	afetam as taxas de GSH intracelular	Maurice et al. (1997)
Artrite reumatóide		
	promovem peroxidação lipídica, detectada por altas taxas de MDA	Steinberg (1997); Valko et al. (2007); Valavanidis et al. (2006)
Aterosclerose	promovem danos oxidativos no DNA e no RNA, especialmente na base guanina	Nunomura et al. (2001); Klaunig et al. (2011)
	promovem a peroxidação lipídica	Mattson et al. (1999)
Doença de <i>Alzheimer</i>	diminuem a capacidade de reparo do DNA	Lovell et al. (1999)
	causam a carbonilação de proteínas e aumentam as taxas de nitrotirosinas	Hensley et al. (1998); Dalle-Donne et al. (2003)
	causam dano oxidativo no DNA mitocondrial	Lin e Beal (2006)
	promovem danos oxidativos no DNA nuclear, como 8-OHdG, promovendo o aumento da expressão da p53 em células cerebrais	Bae et al. (2005)
Doença de <i>Huntington</i>	promovem danos oxidativos no DNA mitocondrial, como 8-OHdG	Polidori et al. (1999)
	promovem peroxidação lipídica e alterações proteicas (heme-oxigenases e nitrotirosinas)	Browne et al. (1999)
	promovem danos oxidativos no DNA, modificações proteicas, peroxidação lipídica	Jenner e Olanow (1996); Rao e Balachandran (2002)
Doença de <i>Parkinson</i>	promovem alterações na ação de antioxidantes intracelulares	Jenner e Olanow (1996)
	promovem danos oxidativos no DNA, especialmente na base guanina, detectadas pelas altas concentrações de 8-OHdG	Klaunig et al. (2011)
Esclerose lateral amiotrófica	promovem a oxidação de proteínas por meio de reações de carbonilação e nitração	Bowling et al. (1993)

Câncer cervical, gástrico, ovariano, hepatocelular, melanoma, nasofaríngeo e renal	promovem danos oxidativos no DNA	Kriston et al. (2011)
	promovem danos oxidativos no DNA, especialmente na base guanina	Martinez et al. (2009); Kriston et al. (2011)
	diminuem a capacidade de reparo do DNA	Martinez et al. (2009)
Câncer de cólo retal	promovem a redução das taxas e da atividade de agentes antioxidantes e o aumento das taxas de MDA, relacionadas à peroxidação lipídica	Kriston et al. (2011)
	promovem danos oxidativos no DNA, especialmente na bases guanina e adenina, modificações em diversas proteínas, alteram o sistema de reparo do DNA, peroxidação lipídica (detectada pelos altos níveis de TBARS) e redução da atividade de agentes antioxidantes	Kriston et al. (2011)
Câncer de mama	promovem a diminuição da capacidade de reparo do DNA mitocondrial, aumento de danos oxidativos no DNA nuclear e a diminuição das taxas de agentes antioxidantes	Kriston et al. (2011)
	promovem danos oxidativos nas bases do DNA, diminuição da atividade de agentes antioxidantes e afetam o sistema de reparo do DNA	Kriston et al. (2011)
Câncer de pulmão		
Hiperplasia e câncer de próstata		
Linfoma e leucemia	promovem danos oxidativos no DNA, especialmente nas bases guanina, adenina e citosina	Kriston et al. (2011)

CÂNCER

Doença pulmonar crônica	promovem uma formação excessiva de proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al. (2003)
Doença renal crônica	promovem uma formação excessiva de proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al. (2003)
	promovem a carbonilação de lipídios e carboidratos	Singh et al. (2001)
	promovem danos oxidativos no DNA, modificações proteicas e peroxidação lipídica	Piconi et al. (2003)
Diabetes mellitus	agem nas lipoproteínas causando peroxidação lipídica	Yan et al. (1994); Abuja e Albertini (2001)
	afetam ciclos de S-glutationilação	Xiong et al. (2011)
	promovem a carbonilação de proteínas importantes, inclusive enzimas	Dalle-Donne et al. (2003)
	promovem a carbonilação de lipídios e carboidratos	Singh et al. (2001)
	promovem a S-glutationilação da isomerase dissulfeto, esgotando os níveis de GSH intracelular, o que leva à apoptose e necrose dos hepatócitos.	Xiong et al. (2011)
Injúrias hepatotóxicas	promovem danos oxidativos no DNA, especialmente na base guanina, detectadas pelas altas concentrações de 8-OHdG	Klaunig et al. (2011)
	promovem carbonilação de proteínas	Dalle-Donne et al. (2003)
Sepsis	promovem peroxidação lipídica, detectada pela presença de TBARS	Winterbourn et al. (2000)

OUTRAS PATOLOGIAS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As células respondem a agentes tóxicos ou estressores por meio de mecanismos que envolvem desde vias de comunicação até processos de transdução de sinal. Embora existam muitos estudos toxicológicos que tratam das bases biológicas da resposta celular aos contaminantes ambientais, poucos são os trabalhos que trazem informações consistentes sobre os reais mecanismos moleculares desta ação.

A avaliação de indução de estresse oxidativo vem sendo cada vez mais aplicada em estudos ambientais e a importância destes estudos reside no fato da potencialidade dos danos oxidativos alterarem a fisiologia dos organismos, constituindo o principal mecanismo da toxicidade de poluentes.

Os agentes oxidantes são classificados em dois principais tipos: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN), ambas normalmente geradas tanto por fatores exógenos como endógenos celulares. Quando a concentração de ERO é considerada fisiológica (basal), elas podem atuar como moléculas sinalizadoras, desempenhando papéis celulares importantes, que mantêm a homeostase entre a célula com o seu ambiente imediato. As ERO podem se apresentar na forma de radicais livres e na forma de não radicais, sendo ambas capazes de induzir alterações genéticas e/ou epigenéticas.

Como exposto acima, a exposição a químicos ambientais pode levar a efeito danoso às células e, conseqüentemente, à saúde dos organismos expostos. Muitos estudos sobre estresse oxidativo mostram haver uma correlação direta entre os danos oxidativos ocasionados pela toxicidade das ERO e a presença de químicos ambientais.

A presente revisão apresentou aspectos importantes sobre a aplicação de ensaios de estresse oxidativo em células de mamíferos (dosagem de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, ensaio de peroxidação lipídica, entre outros), utilizados em avaliação de efeitos tóxicos induzidos por diferentes contaminantes ambientais (agrotóxicos, efluentes urbanos e industriais e nanopartículas). Os estudos mostram que esses ensaios são excelentes ferramentas a serem aplicadas na área da toxicologia ambiental, por serem eficientes na obtenção de resultados que sinalizam a indução de alterações dos mecanismos redox, mecanismos estes que podem, inclusive, estar correlacionados com o aparecimento de várias doenças humanas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUJA, P. M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, v. 306, p. 1–17, 2001.
- ALBERS, P. H. Petroleum and Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; JR. BURTON, G. A.; JR. CAIRNS J. (Eds) **Handbook of Ecotoxicology**, (2nd ed.) Lewis Publishers, p. 341-371, 2002.
- ALMEIDA, J. R.; OLIVEIRA, C.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 1369–1381, 2010.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, J. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331 – 1341, 2002.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 7915–7922, 1993.
- ARBILLAGA, L.; AZQUETA, A.; VAN DELFT, J.H.M.; LÓPEZ DE CERAIN, A. *In vitro* gene expression data supporting a DNA non-reactive genotoxic mechanism for ochratoxin A. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 220, p. 216-224, 2007.
- ARNAIZ, R. R. **Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos** 2.ed. México: La Ciencia, v. 124, p. 95, 1995.
- BAE, B. I.; XU, H.; IGARASHI, S.; FUJIMURO, M.; AGRAWAL, N.; TAYA, Y.; HAYWARD, S. D.; MORAN, T. H.; MONTELL, C.; ROSS, C. A.; SNYDER, S. H.; SAWA, A. p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. **Neuron.**, v. 47, n. 1, p. 29–41, 2005.
- BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; HASSOUN, E. A.; STOHS, S. J. In vivo and in vitro generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. **Toxicology**, v. 104, p. 129–140, 1995.
- BANERJEE, B. D.; SETH, V.; AHMED, R. S. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. **Rev. Environ. Health**, v. 16, n. 1, p. 1–40, 2001.
- BARLIE, F. B.; **Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanism and methods**. Boca Raton: CRC press, 1994.
- BASS, D. A.; PARCE, J. W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometry studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **J. Immunol.**, v. 130, n. 4, p. 1910 –1917, 1982.
- BAYOUMI, A. E.; PEREZ-PERTEJO, Y.; ORDONEZ, C.; REGUERA, R. M.; BALANA-FOUCE, R.; ORDONEZ, D. Changes in the glutathione- redox balance induced by the pesticides heptachlor, chlordane, and toxaphene in CHO-K1 cells. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 65, p. 748–755, 2000.
- BAYOUMI, A. E.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. J.; ORDÓNEZ, C.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; CUBRÍA, J. C.; REGUERA, R. M.; BALANA-FOUCE, R.; ORDÓNEZ, D. Cyclodiene

organochlorine insecticide-induced alterations in the sulfur-redox cycle in CHO-K1 cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 315-323, 2001.

BEHREND, L.; HENDERSON, G.; ZWACKA, R. M. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, p. 1441-1444, 2003.

BENSAAD, K.; VOUSDEN, K. H. Savoir and Slayer: the two faces of p53. **Nat. Med.** v. 11, p. 1278-1279, 2005.

BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J Biol Chem.**, v. 272, p. 20313-20316, 1997.

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

BERTINI, I.; CAVALLARO, G. Metals in the “omics” world: copper homeostasis and cytochrome c oxidase assembly in a new light. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 13, p. 3-14, 2008.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v. 49, p. 3-8, 2000.

BHATTACHARYA, K.; DAVOREN, M.; BOERTZ, J.; SCHINS, R. P. F.; HOFFMANN, E.; DOPP, E. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. **Parti. Fibre Toxicol.**, v. 6, p. 17-27, 2009.

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

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. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v. 74, n. 4, p. 826-33, 2011.

BOLOKADZE, N.; LOBJANIDZE, I.; MOMTSELIDZE, N.; SOLOMONIA, R.; SHAKARISHVILI, R.; MCHEDLISHVILI, G. Blood rheological properties and lipid peroxidation in cerebral and systemic circulation of neurocritical patients. **Clin Hemorheol Microcirc.**, v. 30, n. 2, p. 99-105, 2004.

BONGIOVANNI, G. A.; SORIA, E. A.; EYNARD, A. R. Effects of the plant flavonoids silymarin and quercetin on arsenite-induced oxidative stress in CHO-K1 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 971-976, 2007.

BONT, R.; LAREBEKE, N. V. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**, v. 19, p. 169-185, 2004.

BOORMAN, G. A.; DELLARCO, V.; DUNNIK, J. K.; CHAPIN, R. E.; HUNTR, S.; HAUCHMAN, F.; GARDNER, H.; COX, M.; SILLS, R. C. Drinking water disinfection byproducts: review and approach to toxicity evaluation. **Environ. Health Perspect.**, v. 107, n. 1, p. 207-217, 1999.

BOWLING, A. C.; SCHULZ, J. B.; BROWN, R. H. J.; BEAL, M. F. Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurochem.**, v. 61, n. 6, p. 2322-2325, 1993.

- BRUSICK, D. J. **Principles of Genetic Toxicology**. 2 ed. Estados Unidos: Plenum Publishing Corporation, p. 432, 1987.
- BURTON, G. J.; CHARNOCK-JONES, D. S.; JAUNIAUX, E. Working with oxygen and oxidative stress in vitro. **Methods Mol Med.**, v. 122, p. 413-25, 2006.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, p. 287–299, 2011.
- CADENAS, E.; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Rad Biol Med**, v. 29, 2000.
- 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.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484-490, 1985.
- CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BUCCIARELLI, T.; BOCCIO, P. D.; FEDERICI, L.; ILIO, C. D. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, v. 90, p. 48-57, 2008.
- CARNEVALI, O.; MARADONNA, F. Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 131, p. 203–209, 2003.
- CARVALHO, T. U. Cultura de Células Animais. In: BENCHIMOL, M. (Org). **Métodos de Estudo da Célula**. Rio de Janeiro: FENORTE/UENF, cap. 2, p. 45-58, 1996.
- CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, V.; CALZARETTI, G.; LANDRISCINA, C. Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. **Toxicology**, v. 200, p. 29–38, 2004.
- CHIN, T. A.; TEMPLETON, D. M. Protective elevations of glutathione and metallothionein in cadmium-exposed mesangial cells. **Toxicology**, v. 77, p. 145–156, 1993.
- CLAXTON, L.D.; HOUK, V. S.; HUGHS, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, v.410, p.237-243, 1998.
- COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, p. 37-42, 2009.
- COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB J.**, v. 17, p. 1195–1214, 2003.
- D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews**, v. 8, p. 813-824, 2007.
- DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 169-176, 2003.
- DEGANUTO, M.; PITTIS, M. G.; PINES, A.; DOMINISSINI, S.; KELLEY, M.; GARCIA, R.; QUADRIFOGLIO, F.; BEMBI, B.; TELL, G. Altered intracellular redox status in

Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress. **J. Cell. Physiol.**, v. 212, p. 223–235, 2007.

DEHN, P. F.; ALLEN-MOCHERIE, S.; KAREK, J.; THENAPPAN, A. Organochlorine insecticides: impacts on human HepG2 cytochrome P4501A, 2B activities and glutathione levels. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 261–273, 2005.

DELESCLUSE, C.; LEDIRAC, N.; LI, R.; PIECHOCKI, M. P.; HINES, R. N., GIDROL, X.; RAHMANI, R. Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, n. 4, p. 399–407, 2001.

DESMOTS, F.; RISSEL, M.; PIGEON, C.; LOYER, P.; LOREAL, O.; GUILLOUZO A. Differential effects of iron overload on gst isoform expression in mouse liver and kidney and correlation between gsta4 induction and overproduction of free radicals. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 1, p. 93–101, 2002.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCIOGLU, M.; RODRIGUEZ, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 32, p. 1102–1115, 2002.

DUA, R.; GILL, K. D. Aluminium Phosphide Exposure: Implications on Rat Brain Lipid Peroxidation and Antioxidant Defence System. **Pharmacology & Toxicology**, v. 89, p. 315–319, 2001.

DUIKAN, S.; FAREWELL, A.; BALLESTEROS, M.; TADDEI, F.; RADMAN, M.; NYSTROM, T. Protein oxidation in responses to increased transcriptional or translation errors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, p. 5746–5749, 2000.

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

EL GOLLI, E.; HASSEN, W.; BOUSLIMI, A.; BOUAZIZ, C.; LADJIMI, M. M.; BACHA, H. Induction of Hsp 70 in Vero cells in response to mycotoxins cytoprotection by sub-lethal heat shock and by Vitamin E. **Toxicol. Lett.**, v. 166, p. 122–130, 2006.

EOM, H.; CHOI, J. SiO₂ Nanoparticles Induced Cytotoxicity by Oxidative Stress in Human Bronchial Epithelial Cell, Beas-2B. **Environmental Health and Toxicology**, v. 26, 2011.

FANG, J.; SEKI, T.; MAEDA, H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 61, p. 290–302, 2009.

FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. T. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 256, p. 405–417, 2011.

FARMEN, E.; HARMAN, C.; HYLLAND, K.; TOLLEFSEN, K.-E. Produced water extracts from North Sea oil production platforms result in cellular oxidative stress in a rainbow trout *in vitro* bioassay. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 1092–1098, 2010.

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.

- FLESSEL, P.; QUINTANA, P. J.; HOOPER, K. Genetic toxicity of malathion: a review. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 22, n. 1, p. 7–17, 1993.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. Sulfur amino acid deprivation in cadmium chloride toxicity in hepatoma cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, p. 334–337, 2006.
- FRACÁCIO, R.; RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.B.; LIMA, D.; NASCIMENTO, A.P.; RODRIGUES, M.H. Abordagem ecotoxicológica. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; SILVA, J.S.V.; MARINELLI, C.E.; ABDON, M.M. (Eds.). **A bacia hidrográfica do Rio do Monjolinho**. São Carlos: Rima Editora, p. 104-113, 2000.
- FRANCO, R.; SÁNCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E. M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. **Mutation Research**, v. 674, p. 3–22, 2009.
- FREEMAN, T. A.; PARVIZI, J.; DELLA VALLE, C. J.; STEINBECK, M. J. Reactive oxygen and nitrogen species induce protein and DNA modifications driving arthrofibrosis following total knee arthroplasty. **Fibrogenesis Tissue Repair**, v. 2, p. 5, 2009.
- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: A radical explanation. **J. Exp. Bot.**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.
- GALARIS, D.; SKIADA, V.; BARBOUTI, A. Redox signaling and cancer: the role of “labile” iron. **Cancer Lett.**, v. 266, p. 21–29, 2008.
- GAO, Z.; XU, H.; CHEN, X.; CHEN, H. Antioxidant status and mineral contents in tissues of rutin and baicalin fed rats. **Life Science**, v. 73, p. 1599-1607, 2003.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. J.; BAYOUMI, A. E.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; MOTAS, M.; REGUERA, R. M.; ORDÓÑEZ, C.; BALAÑA-FOUCE, R.; ORDÓÑEZ, D. Alterations of the glutathione–redox balance induced by metals in CHO-K1 cells. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 132, p. 365–373, 2002.
- GHANTA, S.; CHATTOPADHYAY, S. Glutathione as a signaling molecule - another challenge to pathogens. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, p. 783-788, 2011.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.
- GOLLI-BENNOUR, E. E.; BACHA, H. Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins’ exploration. **Toxicology**, v. 287, p. 1– 7, 2011.
- GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 12, p. 281:1309, 1998.
- GROSICKA-MACIĄG, E.; KURPIOS-PIEC, D.; GRZELA, T.; CZECZOT, H.; SKRZYCKI, M.; SZUMIŁO, M.; RAHDEN-STARON, I. Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against disulfiram-induced oxidative stress and apoptosis in V79 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 248, p. 210–216, 2010.

GURR, J. R.; WANG, A. S.; CHEN, C. H.; JAN, K. Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. **Toxicology**, v. 213, p. 66–73, 2005.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. The measurement and the mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends Biochem. Sci.**, v. 35, p. 15:129, 1990.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin. Chem.**, v. 41, p. 1819–1828, 1995.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases – the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? **Free Radic. Biol. Med.**, v. 32, n. 10, p. 968–974, 2002.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231–255, 2004.

HAMANISHI, T.; FURUTA, H.; KATO, H.; DOI, A. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients. **Diabetes**, v. 53, p. 2455-2460, 2004.

HANZALOVA, K.; ROSSNER JR, P.; SRAM, R. J. Oxidative damage induced by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from urban air particulate matter. **Mutation Research**, v. 696, p. 114–121, 2010.

HARTL, F. U.; MARTIN, J. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 5, p. 92–102, 1995.

HASSEN, W.; EL GOLLI, E.; BAUDRIMONT, I.; MOBIO, T. A.; LADJIMI, M.; CREPPY, E. E.; BACHA, H. Cytotoxicity and HSP70 induction in Hep G2 cells in response to Zearalenone and cytoprotection by sub-lethal heat shock. **Toxicology**, v. 207, p. 293–301, 2005.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione Transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 51-88, 2005.

HENSLEY, K.; MAIDT, M. L.; YU, Z.; SANG, H.; MARKESBERY, W. R.; FLOYD, R. A. Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. **J Neurosci.**, v. 18, n. 20, p. 8126–8132, 1998.

HOFFMANN, F.; RINAS, U. Roles of heat-shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 89, p. 143–161, 2004.

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

HU, C.; JIANG, L.; GENG, C.; ZHANG, X.; CAO, J.; ZHONG, L. Possible involvement of oxidative stress in trichloroethylene-induced genotoxicity in human HepG2 cells. **Mutation Research**, v. 652, p. 88–94, 2008.

IMLAY, J. A. Pathways of oxidative damage. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 57, p. 395–418, 2003.

IMLAY, J. A.; LINN S. DNA damage and oxygen radical toxicity. **Science**, v. 9, p. 240–1302, 1988.

IQBAL, M.; GIRI, U.; GIRI, D. K.; ALAM, M. S.; ATHAR, M. Age-dependent renal accumulation of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-modified proteins following parenteral administration of ferric nitrilotriacetate commensurate with its differential toxicity: implications for the involvement of HNE-protein adducts in oxidative stress and carcinogenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 365, p. 101–112, 1999.

IWASAKI, Y.; SAITO, Y.; NAKANO, Y.; MOCHIZUKI, K.; SAKATA, O.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 3309–3317, 2009.

JENNER, P.; OLANOW, C. W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 47, p. S161–S170, 1996.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, p. 65–87, 2011.

JULKA, D.; PAL, R.; GILL, K. D. Neurotoxicity of dichlorvos: effect on antioxidant defense system in the rat central nervous system. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 56, n. 2, p. 144–152, 1992.

KAMP, H.G.; EISENBRAND, G.; SCHLATTER, J.; WÜRTH, K.; JANZOWSKI, C. Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. **Toxicology**, v. 206, p. 413–425, 2005.

KAPPUS, H.; SIES, H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism, redox cycling and lipid peroxidation. **Experientia**, v. 37, p. 1233–1241, 1981.

KASAI, H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8 hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res.*, v. 387, n. 3, p. 147–163, 1997.

KASPRZAK, K. S. Possible role of oxidative damage in metalinduced carcinogenesis. **Cancer Invest.**, v. 13, p. 411–430, 1995.

KELLY, S. A., HAVRILLAL, C. M.; BRADY, T. C.; ABRAMO, K. H.; LEVIN, E. D. Oxidative Stress in Toxicology: Established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 7, 1998.

KEOGH, J. P.; STEFFEN, B.; SIEGERS, C. P. Cytotoxicity of heavy metals in the human small intestinal epithelial cell line I-407: the role of glutathione. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 43, p. 351–359, 1994.

- KIM, S.; CHOI, J. E.; CHOI, J.; CHUNG, K.; PARK, K.; YI, J.; RYU, D. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1076–1084, 2009.
- KIM, H. R.; KIM, M. J.; LEE, S. Y.; OH, S. M.; CHUNG, K. H. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. **Mutation Research**, v. 726, p. 129–135, 2011.
- KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. **Biochemistry**, v. 81, p. 4343–4347, 1984.
- KLAUNIG, J.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 239–267, 2004.
- KLAUNIG, J. E.; XU, Y.; BACHOWSKI, S.; JIANG, J. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. In: Wallace, K.B. (Ed.), **Free Radical Toxicology**. Taylor & Francis, London, p. 375–400, 1997.
- KLAUNIG, J. E.; WANG, Z.; PU, X.; ZHOU, S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, p. 86–99, 2011.
- KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol. Pathol.**, v. 31, p. 620–650, 2002.
- KRYSTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 711, p. 193–201, 2011.
- LEBEL, C. P.; ISHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 29,79-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 5, p. 227–231, 1992.
- LEI, X. G.; CHENG, W. H.; MCCLUNG, J. P. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 27, p. 41–61, 2007.
- 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, 2008.
- LEME, D. M. Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de misturas comerciais de diesel e biodiesel puras e em simulações de vazamento em água e em solo. 2010. 226 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP. 2010.
- LESSER, M. P. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 68, p. 253–78, 2006.
- LI, Z.; WU, J.; DELEO, C. J. RNA damage and surveillance under oxidative stress. **IUBMB Life**, v. 58, p. 581–588, 2006.
- LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, p. 787–795, 2006.

- LIN, T.; YANG, M.S. Benzo[a]pyrene-induced elevation of GSH level protects against oxidative stress and enhances xenobiotic detoxification in human HepG2 cells. **Toxicology**, v. 235, p.1-10, 2007.
- LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 42, p. 656–666, 2001.
- LODOVICI, M.; CASALINI, C.; BRIANI, C.; DOLARA, P. Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. **Toxicology**, v. 117, n. 1, p. 55–60, 1997.
- LOVELL, M. A.; GABBITA, S. P.; MARKESBERY, W. R. Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. **J Neurochem.**, v. 72, n. 2, p. 771–776, 1999.
- LU, S. C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. **FASEB**, v. 13, p. 1169–1183, 1999.
- LU, T.; SU, C.; CHEN, Y.; YANG, C.; WU, C.; HUNG, D.; CHEN, C.; CHENG, P.; LIU, S.; HUANG, C. Arsenic induces pancreatic β -cell apoptosis via the oxidative stress-regulated mitochondria-dependent and endoplasmic reticulum stress-triggered signaling pathways. **Toxicology Letters**, v. 201, p. 15–26, 2011.
- LU, J. M.; LINA, P. H.; YAOA, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. **J Cell Mol Med.**, v. 14, n. 4, p. 840–860, 2010.
- LUEKEN, A.; JUHL-STRAUSS, U.; KRIEGER, G.; WITTE, I. Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H₂O₂) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. **Toxicology Letters**, v. 147, p. 35-43, 2004.
- LUSHCHAK, O. V.; KUBRAK, O. I.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v. 76, p. 932–937, 2009.
- MANZANO, B. C. Avaliação dos potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das águas do ribeirão Tatu, região de Limeira-SP, após o recebimento de efluentes urbanos. 2010. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2008.
- MASELLA, R.; BENEDETTO, R.; VARI, R.; FILES, C.; GIOVANNINI, C.; Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **J. Nutr. Biochem.**, v. 16, n.10, p. 577-586, 2005.
- MARABINI, L.; FRIGERIO, S.; CHIESARA, E.; RADICE, S. Toxicity evaluation of surface water treated with different disinfectants in HepG2 cells. **Water Research**, v. 40, p. 267 – 272, 2006.
- MARAN, E.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; FONT, G.; RUIZ M. J. Effects of aldicarb and propoxur on cytotoxicity and lipid peroxidation in CHO-K1 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1592–1596, 2010.
- MARIN-KUAN, M.; EHRLICH, V.; DELATOUR, T.; CAVIN, C.; SCHILTER, B. Evidence for a role of oxidative stress in the carcinogenicity of ochratoxin A. **Journal of Toxicology**, v. 645361, p. 1-15, 2011.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation — DNA damage by malondialdehyde. **Mut. Res.-Fund. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 424, p. 83–95, 1999.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 361–370, 2000.

MARTIGNONI, E.; BLANDINI, F.; GODI, L.; DESIDERI, S.; PACCHETTI, C. Peripheral markers of oxidative stress in Parkinson's disease. The role of L-DOPA. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, n. 3–4, p. 428–437, 1999.

MARTINEZ, C. A. R.; CORDEIRO, A.T.; PRIOLLI, D. G.; MIRANDA, D. D. C.; BARTCHEWSKY, J. W.; MARGARIDO, N. F.; RIBEIRO, M. L. Avaliação da expressão tecidual do gene de reparo MLH1 e dos níveis de dano oxidativo ao DNA em doentes com câncer colorretal. **Rev bras Coloproct**, v. 29, n. 3, p. 303-313, 2009.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GOMEZ, C.; CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 595–603, 1999.

MATES, J. M.; PEREZ-GOMEZ, C.; NUNEZ DE CASTRO, I.; ASENJO, M.; MARQUEZ, J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 34, p. 439–458, 2002.

MATÉS, J. M.; SEGURA, J. A.; ALONSO, F. J.; MÁRQUEZ, J. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. **Arch. Toxicol.**, v. 82, p. 273–299, 2008.

MATOVIĆ, V.; BUHA, A.; BULAT, Z.; ĐUKIĆ-ĆOSIĆ, D. Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 62, p. 65-76, 2011.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Toxic and genotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium - a review. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, n. 1, p. 77-85, 2005.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the Genotoxic and Mutagenic Effect of Chromium residues Present in Tannery Effluents Using the Micronucleus and Comet Assay in *Oreochromis niloticus* and Chromosomes Aberrations in *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MATTSON, M. P.; PEDERSEN, W. A.; DUAN, W.; CULMSEE, C.; CAMANDOLA, S. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 893, p. 154–175, 1999.

MAURICE, M. M.; NAKAMURA, H.; VOORT, E. A. M.; VLIET, A.; STAAL, F. J.; TAK, P.; BREEDVELD, F. C.; VERWEIJ, C. Evidence for the role of an altered redox state in hyporesponsiveness of synovial T cells in rheumatoid arthritis. **J. Immunol.**, v. 158, p. 1458–1465, 1997.

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, p. 4334–4340, 2010.

MC CORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 60409–60455, 1969.

MCCALL, M. R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Rad. Biol. Med.**, v. 26, p. 1034–1053, 1999.

MCFARLAND, V. A.; INOUE, L. S.; LUTZ, C. H.; JARVIS, A. S.; CLARKE, J. U.; MCCANT, D. D. Biomarkers of Oxidative Stress and Genotoxicity in Livers of Field-Collected Brown Bullhead, *Ameiurus nebulosus*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 37, p. 236–241, 1999.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428–435, 2008.

MEISTER, A. Glutathione Metabolism. **Methods in Enzymology**, v. 251, p. 3–7, 1995.

MOORE, P. D.; YEDJOU, C. G.; TCHOUNWOU, P. B. Malathion-Induced Oxidative Stress, Cytotoxicity, and Genotoxicity in Human Liver Carcinoma (HepG2) Cells. **Environmental Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 221–6, 2009.

MULLER, L. Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: Mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. **Toxicology**, v. 40, 285–295, 1986.

MUNIZ, J. F.; MCCAULEY, L.; SCHERER, J.; LASAREV, M.; KOSHY, M.; KOW, Y. W.; NAZAR-STEWART, V.; KISBY, G. E. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: A pilot study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 227, p. 97–107, 2008.

NAG, M.; NANDI, N. In vitro and in vivo effect of organophosphate pesticides on monoamine oxidase activity in rat brain. **Biosci. Rep.**, v. 7, n. 10, p. 801–803, 1987.

NELSON, N. Metal ion transporters and homeostasis. **EMBO J.**, v. 18, p. 4361–4371, 1999.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radicals Biol. Med.**, v. 31, p. 1287–1312, 2001.

NUNOMURA, A.; PERRY, G.; ALIEV, G.; HIRAI, K.; TAKEDA, A.; BALRAJ, E. K.; JONES, P. K.; GHANBARI, H.; WATAYA, T.; SHIMOHAMA, S.; CHIBA, S.; ATWOOD, C. S.; PETERSEN, R. B.; SMITH, M. A. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v. 60, n. 8, p. 759–767, 2001.

NUNOMURA, A.; MOREIRA, P. I.; TAKEDA, A.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Oxidative RNA damage and neurodegeneration. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, p. 2968–2975, 2007.

NWANI, C. D.; LAKRA, W. S.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S. K. Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Enzymes in the Freshwater Fish *Channa Punctatus* (Bloch). **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 7, p. 3298–3312, 2010.

OCHI, T.; OTSUKA, F.; TAKAHASHI, K.; OHSAWA, M. Glutathione and metallothioneins as cellular defense against cadmium toxicity in cultured Chinese Hamster cells. **Chem. Biol. Interact.**, v. 65, p. 1–14, 1988.

- OHTA, H.; CHERIAN, M. G. The influence of nutritional deficiencies on gastrointestinal uptake of cadmium and cadmium-metallonthionein in rats. **Toxicology**, v. 97, p. 71, 1995.
- PAMPLONA, J. H. Avaliação dos Efeitos Tóxicos da Dipirona Sódica em Peixe *Rhamdia Quelen*: Estudo Bioquímico, Hematológico e Histopatológico. 2009. Mestrado em Farmacologia. 70 p. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, Curitiba.
- PARK, E.; PARK, K. Induction of oxidative stress in human Chang liver cells by octachlorostyrene, the persistent and bioaccumulative toxicant. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 367–375, 2008.
- PENG, J. Is *in vitro* cell culture suitable for study of environmental-induced oxidative stress? **Journal of Environmental and Analytical Toxicology**, v. 1, p. 1-2, 2011.
- PÉREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R.M.; ORDÓÑEZ, D.; BALAÑA-FOUCE, R. Alterations in the glutathione-redox balance induced by the bio-insecticide Spinosad in CHO-K1 and Vero cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 251-258, 2008.
- PI, J.; QU, W.; REECE, J.M.; KUMAGAI, Y.; WAALKES, M.P. Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide. **Experimental Cell Research**, v. 290, p. 234-245, 2003.
- PICONI, L.; QUAGLIARO, L.; CERIELLO, A. Oxidative stress in diabetes. **Clin Chem Lab Med.**, v. 41, n. 9, p. 1144-1149, 2003.
- PINCHUK, I.; SCHNITZER, E.; LICHTENBERG, D. Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL. **Biochim. Biophys. Acta- Lipids Lipid Metab.**, v. 1389 p. 155–172, 1998.
- PLATEL, A.; NESSLANY, F.; GERVAIS, V.; CLAUDE, N.; MARZIN, D. Study of oxidative DNA damage in TK6 human lymphoblastoid cells by use of the thymidine kinase gene-mutation assay and the *in vitro* modified comet assay: Determination of No-Observed-Genotoxic-Effect-Levels. **Mutation Research**, v. 726, p. 151– 159, 2011.
- POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI F.; Chiarpotto, E. Oxidative stress and cell signalling, **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1163–1182, 2004.
- POLLA, B. S.; KANTENGWA, S.; FRANCOIS, D. Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 6458–6463, 1996.
- QU, W.; DIWAN, B. A.; REECE, J. M.; BORTNER, C. D.; PI, J.; LIU, J.; WAALKES, M. P. Cadmium-induced malignant transformation in rat liver cells: Role of aberrant oncogene expression and minimal role of oxidative stress. **International Journal of Cancer**, v. 114, p. 346-355, 2005.
- RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.
- RAO, A. V.; BALACHANDRAN, B. Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. **Nutr Neurosci.**, v. 5, n. 5, p. 291–309, 2002.

RAU, M. A.; WHITAKER, J.; FREEDMAN, J. H.; DI GIULIO, R. T. Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 137, p. 335–342, 2004.

RAZA, H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. **The FEBS Journal**, v. 278, p. 4243–4251, 2011.

REGOLI, F.; GORBI, S.; FRENZILLI, G.; NIGROB, M.; CORSIC, I.; FOCARDIC, S.; WINSTOND, G. W. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 419–423, 2002.

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.

ROTRUCK, J. T.; POPE, A. L.; GARTHER, H. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v. 179, p. 588–590, 1973.

RYTER, S. W.; KIM, H. P.; HOETZEL, A.; PARK, J. W.; NAKAHIRA, K.; WANG, X.; CHOI, A. M. Mechanisms of cell death in oxidative stress, Antioxid Redox. **Signal**, v. 9, p. 49–89, 2007.

SAKURAI, T.; OCHIAI, M.; KOJIMA, C.; OHTA, T.T.; SAKURAI, M.H.; TAKADA, N.O.; QU, W.; WALLKES, M.P.; HIMENO, S.; FUJIWARA, K. Preventive mechanism of cellular glutathione in monomethylarsonic acid-induced cytolethality. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, p. 54–65, 2005.

SAQUIB, Q.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; SIDDIQUI, M. A.; ABOU-TARBOUSH, F. M.; AZAM, A.; MUSARRAT, J. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. **Toxicol In Vitro**, 2011.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995–1014, 2005.

SCHAAF, G.J.; NIJMEIJER, S.M.; MAAS, R.F.M.; ROESTENBERG, P. DE GROENE, E.M.; FINK-GREMMELS, J. The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1588, p. 149–158, 2002.

SEVASTYANOVA, O.; BINKOVA, B.; TOPINKA, J.; SRAM, R. J.; KALINA, I.; POPOV, T.; NOVAKOVA, Z.; FARMER, P. B. In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles part II: human cell lines, **Mutat. Res.**, v. 620, p. 123–134, 2007.

SHAH, M. D.; IQBAL, M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. **Food Chem Toxicol.**, v. 48, n. 12, p. 3345–53, 2010.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem. J.**, v. 360, p. 1–16, 2001.

- SHIGENAGA, M. K.; AMES, B. N. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 10, p. 211–216, 1991.
- SHIMURA-MIURA, H.; HATTORI, N.; KANG, D.; MIYAKO, K.; NAKABEPPU, Y. Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigral neurons in Parkinson's disease. **Ann. Neurol.**, v. 46, n. 6, p. 920–924, 1999.
- SILVA, J.; FONSECA, M.B. **Genética Toxicológica**. 1 ed. Brasil: Alcance, p. 47, 2003.
- SINGH, R.; BARDEN, A.; MORI, T.; BEILIN L. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, v. 44, p. 129–146, 2001.
- SITKOVSKY, M.; LUKASHEV, D. Regulation of immune cells by local tissue oxygen tension: HIF-1alpha and adenosine receptors. **Nat Rev Immunol.**, v. 5, n. 9, p. 712–721, 2005.
- SOHAL, R. S.; MOCKETT, R. J.; ORR, W. C. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, p. 575–586, 2002.
- SRINIVASAN, A.; LEHMLER, H. J.; ROBERTSON, L. W.; LUDEWIG, G. Production of DNA strand breaks *in vitro* and reactive oxygen species *in vitro* and in HL-60 cells by PCB metabolites. **Toxicological Sciences**, v. 60, p. 92–102, 2001.
- STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging and age-related diseases. **Ann. New York Acad. Sci.**, v. 928, p. 22–38, 2001.
- STEINBERG, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 20963–20966, 1997.
- STEINEBACH, O. M.; WOLTERBEEK, H. T. Role of cytosolic copper metallothionein and glutathione in copper toxicity in rat hepatoma tissue culture cells. **Toxicology**, v. 92, p. 75–90, 1994.
- STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 18, p. 321–336, 1995.
- SUZUKI, H.; TOYOOKA, T.; IBUKI, Y. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis, **Environ. Sci. Technol.**, v. 41, p. 3018–3024, 2007.
- TABREZ, S.; AHMAD, M. Oxidative stress-mediated genotoxicity of wastewaters collected from two different stations in northern India. **Mutation Research**, v. 726, p. 15–20, 2011.
- 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.
- TANDOGAN, B.; GÜVENÇ, A.; ÇALIS, I.; ULUSU, N. N. In vitro effects of compounds isolated from *Sideritis brevibracteata* on bovine kidney cortex glutathione reductase. **Acta Biochimica Polonica**, v. 58, n. 4, p. 471–475, 2011.
- TSANGARIS, C.; VERGOLYAS, M.; FOUNTOULAKI, E.; GONCHARUK, V. V. Genotoxicity and oxidative stress biomarkers in *Carassius gibelio* as endpoints for toxicity testing of Ukrainian polluted river waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 2240–2244, 2011.

TUUVIKENE, A. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Annales Zoologici Fennici*, v. 32, p. 295-309, 1995.

URANI, C.; MELCHIORETTO, P.; MORAZZONI, F.; CANEVALI, C.; CAMATINI, M. Copper and zinc uptake and Hsp 70 expression in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro*, v. 15, p. 497-502, 2001.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 64, p. 178-189, 2006.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem*, v. 266, p. 37-56, 2004.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, v. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 39, p. 44-84, 2007.

VENTURA, B. C.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 90, p. 42-41, 2008.

VENTURA-CAMARGO, B. C.; MALTEMPI, P. P. P.; MARIN-MORALES, M. A. The use of the cytogenetic to identify mechanisms of action of an azo dye in *Allium cepa* meristematic cells. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, v. 1, n. 3, p. 1-12, 2011.

VÍCTOR, V. M.; DE LA FUENTE, M. Several functions of immune cells in mice changed by oxidative stress caused by endotoxin. *Physiol. Res.*, v. 52, p. 789-796, 2003.

WALLACE, W. E.; KEANE, M. J.; MURRAY, D. K.; CHISHOLM, W. P.; MAYNARD, A. D.; ONG, T. M. Phospholipid lung surfactant and nanoparticle surface toxicity: Lessons from diesel soots and silicate dusts. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 9, p. 23-38, 2007.

WALTER, L.; RAUH, F.; GUNTHER, E. Comparative analysis of the three major histocompatibility complex-linked heat shock protein 70 genes of the rat. *Immunogenetics*, v. 40, p. 325-330, 1994.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 27, p. 612-616, 1999.

WANG, J.L.; CHEN, W-L; TSAI, S-Y; SUNG, P-Y; HUANG, R-N. An *in vitro* model for evaluation of vapor toxicity of trichloroethylene and tetrachloroethylene to CHO-K1 cells. *Chemico-Biological Interactions*, v. 137, p. 139-154, 2001.

WHO - World Health Organisation. Guideline for Drinking Water Quality, second ed. **Health Criteria and Other Supporting Information**, 1996.

- WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, v.410, p. 223-236, 1998.
- WINSTON, G.W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquat. Toxicol.**, v. 19, p. 137–161, 1991.
- WINTERBOURN, C. C.; BUSS, I. H.; CHAN, T. P.; PLANK, L. D.; CLARK, M. A.; WINDSOR, J. A. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. **Crit Care Med.**, v. 28, n. 1, p. 143-149, 2000.
- XIE, S.; LIU, A.; CHEN, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, H.; JIN, B.; LU, W.; LI, X.; LU, W. DNA Damage and Oxidative Stress in Human Liver Cell L-02 Caused by Surface Water Extracts During Drinking Water treatment in a Waterworks in China. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 51, p. 229-235, 2010.
- XIONG, Y.; UYS, J.D.; TEW, K.D.; TOWNSEND, D.M. S-Glutathionylation: from molecular mechanisms to health outcomes. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, p. 233-270, 2011.
- YANG, W.; SUN, A. Y. Paraquat-induced free radical reaction in mouse brain microsomes. **Neurochem. Res.**, v. 23, n. 1, p. 47–53, 1998.
- YUAN, J.; WU, X.; LU, W.; CHENG, X.; CHEN, D.; LI, X.; LIU, A.; WU, J.; XIE, H.; STAHL, T.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Chlorinated river and lake water extract caused oxidative damage, DNA migration and cytotoxicity in human cells. **Int. J. Hyg. Environ.-Health**, v. 208, p. 481–488, 2005.
- ZHANG, Y.; AN, Y.; JIANG, L.; GENG, C.; CAO, J.; JIANG, L.; ZHONG, L. The Role of Oxidative Stress in Sudan IV-Induced DNA Damage in Human Liver-Derived HepG2 Cells. **Environmental Toxicology**, v. 26, n. 3, p. 292-299, 2009a.
- ZHANG, X.; JIANG, L.; GENG, C.; CAO, J.; ZHONG, L. The role of oxidative stress in deoxynivalenol-induced DNA damage in HepG2 cells. **Toxicon**, v. 54, p. 513–518, 2009b.
- ZHANG, Y.; JIANG, L.; JIANG, L.; GENG, C.; LI, L.; SHAO, J.; ZHONG, L. Possible involvement of oxidative stress in potassium bromate-induced genotoxicity in human HepG2 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, p. 186-191, 2011.
- ZIECH, D.; FRANCO, R.; GEORGAKILAS, A. G.; GEORGAKILA, S.; MALAMOU-MITSI, V.; SCHONEVELD, O.; PAPPA, A.; PANAYIOTIDIS, M. I. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 334–339, 2010.
- ZUCCO, F.; DE ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in vitro**, v. 18, p. 153-163, 2004.
- ZWART, L. L.; MEERMAN, J. H. N.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Biomarkers of free radical damage. Applications in experimental animals and in humans. **Free Radicals Biol. Med.**, v. 26, p. 202–226, 1999.

**Avaliação dos possíveis impactos da indústria de petróleo, sob os aspectos de
genotoxicidade e mutagenicidade**

Raquel Vaz Hara¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Av. 24-A, 1515, 13.506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

O aumento da descarga de substâncias tóxicas no meio ambiente tem afetado a integridade dos ecossistemas naturais. Os agentes químicos podem causar danos aos organismos expostos, entre eles danos mutagênicos. Testes com plantas são frequentemente utilizados em monitoramento ambiental, e a espécie *Allium cepa* é empregada como um bioindicador de danos genéticos muito eficaz. O presente estudo teve por finalidade avaliar o potencial genotóxico e mutagênico das águas servidas de uma importante refinaria do estado de São Paulo, bem como dos rios envolvidos com a sua atividade (rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba), por meio do ensaio de aberrações cromossômicas e micronúcleos em *Allium cepa*. Foram realizadas três coletas, uma no ano de 2010 e duas no ano de 2011, contemplando as três diferentes condições climáticas da região em sete pontos: P1: Água de capacitação da refinaria; P2: Efluente bruto; P3: Entrada da lagoa de estabilização (LE) da refinaria; P4: Saída da lagoa de estabilização; P5: Montante do descarte de efluente da refinaria no rio Atibaia; P6: Jusante da descarga do efluente da refinaria no rio Atibaia; P7: Rio Piracicaba. Os ensaios com células meristemáticas de *A. cepa* demonstraram um aumento nas frequências de aberrações cromossômicas e de micronúcleos, que sugerem a presença de compostos genotóxicos e mutagênicos em determinados locais amostrados, como: P5 e P3 na coleta de agosto/2010; P2 na coleta de março de 2011; e P6 e P1 na coleta de maio/2011. Com a análise das células F1, foi possível observar que os danos ocorridos nas células meristemáticas foram fixados e repassados para as células filhas, em alguns sítios amostrados, como: P1 (agosto/2010), P2 (março/2011), P6 e P7 (maio/2010). Assim, podemos concluir que as águas dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba apresentaram potencial genotóxico e/ou mutagênico em algumas das amostras estudadas. No entanto, o tratamento de efluente da refinaria está sendo eficiente, pois em nenhuma das coletas o P4 (efluente final que é lançando no rio Atibaia) apresentou indícios de compostos genotóxicos e mutagênicos, quando submetidos aos testes com *A. cepa*, mostrando que esse efluente tratado não interfere na qualidade das águas dos rios envolvidos nesse estudo.

Palavras-chave: *Allium cepa*, avaliação hídrica, derivados do petróleo, aberrações cromossômicas; micronúcleo

ABSTRACT

The increase in the discharge of toxic substance in the environment has affected the integrity of natural ecosystems. Chemical agents can cause damages in the exposed organisms, including mutagenic damages. Tests with plants are frequently used in environmental monitoring and the species *Allium cepa* is employed as a very effective bioindicator of genetic damages. The present study aimed to assess the genotoxic and mutagenic potential of wastewaters of an important refinery of São Paulo State, as well as rivers related to its activity (Jaguari, Atibaia and Piracicaba rivers), by the chromosome aberration and micronucleus assay in *Allium cepa*. Three collections were performed, one in 2010 and two in 2011, contemplating the three different climate conditions of the region in seven sites: P1: water capacity of the refinery; P2: raw effluent; P3: entrance of the refinery stabilization pond; P4: exit of the stabilization pond; P5: upstream tge refinery effluent discharge in the Atibaia river; P6: downstream, the refinery effluent discharge in the Atibaia river; P7: Piracicaba river. The assays with meristematic cells of *A. cepa* showed an increase in the frequencies of chromosome aberrations and micronucleus, which suggest the presence of genotoxic and mutagenic compounds in certain locations sampled, such as: P5 and P3 in the collection of August 2010; P2 in the collection of March 2011; and P6 and P1 in the collection of May 2011. Analyzing the F1 cells, it was possible to observe that the damages occurred in the meristematic cells were fixed and passed on to the daughter cells, in some sites sampled, such as: P1 (August 2010), P2 (March 2011), P6 and P7 (May 2010). Thus, we can conclude that the treatment of the refinery effluent is effective, since none of the collections the site P4 (final effluent that is discharged in the Atibaia River) presented evidence of genotoxic and mutagenic compounds, when submitted to the tests with *A. cepa*. However, some samples of the Jaguari, Atibaia and Piracicaba rivers presented genotoxic and/or mutagenic potential, fact that may have occurred due to the discharge of toxic substances derived from other anthropogenic sources.

Key-words: *Allium cepa*, hydric assessment, petroleum derivatives, chromosome aberrations, micronucleus.

1. Introdução

O petróleo é utilizado no mundo todo como fonte primária de energia e matéria-prima para diversos produtos como plásticos, solventes, produtos farmacêuticos, cosméticos, combustíveis, borracha sintética e entre outros. Devido a essa intensa produção, o petróleo e seus derivados formam uma importante classe de contaminantes ambientais (MAZZEO et al., 2011).

Para o desenvolvimento das atividades de uma refinaria de petróleo é necessária uma grande quantidade de água e, conseqüentemente, são gerados volumes significativos de águas residuais. Segundo Saien e Shahrezaei (2012), o tratamento das águas residuais de uma refinaria de petróleo baseia-se em métodos físico-químicos e biológicos, processos esses que buscam minimizar a concentração de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos presentes nas águas servidas. No entanto, os hidrocarbonetos aromáticos, que representam a classe mais tóxica, não são facilmente degradados com os tratamentos convencionais, sendo, por isso, necessária a associação de técnicas mais avançadas.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), produzidos pela combustão incompleta de matérias orgânicas, são considerados contaminantes ambientais preocupantes (OHE et al., 2004). Segundo Sun e Zhang (2012), estes compostos pertencem ao grupo de poluentes orgânicos persistentes e, por isso, considerados como de preocupação global. As suas principais fontes são os despejos de resíduos domésticos e industriais, e as suas mais significativas emissões são atmosféricas e hídricas (SOUZA et al., 2012). Além disso, muitos estudos ambientais têm confirmado a ação mutagênica e carcinogênica dos HPA em amostras de solos, de rios e lagos, em sedimentos e no ar (HARVEY, 1997; LINSACK et al., 2011; ANA et al., 2012).

Os compostos com possível potencial mutagênico ou genotóxicos podem se associar e participar de misturas complexas ambientais e causar efeitos adversos aos organismos expostos, induzindo danos, inclusive, para a saúde humana (DEARFIELD ET AL., 2002). As substâncias bioativas podem ser tóxicas para o material genético e induzir aberrações cromossômicas, tanto estruturais como numéricas (RUSSEL, 2002).

A espécie *Allium cepa* tem sido considerada um importante organismo-teste para avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade de poluentes ambientais. Estes efeitos podem ser avaliados por meio dos testes de aberrações cromossômicas e/ou de micronúcleos, tanto em células de meristemas radiculares como em células F₁ da raiz

(MATSUMOTO; MARIN MORALES, 2004; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO et al., 2010; 2011). O teste do *Allium cepa*, além de apresentar alta sensibilidade e custo baixo, apresenta vantagens como facilidade de medir parâmetros microscópios e macroscópios, e uma boa correlação com outros testes, como os desenvolvidos com mamíferos (FRISKESJÖ, 1985; RANK; NIELSEN, 1994).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a potencialidade citotóxica, genotóxica e mutagênica de amostras de águas usadas pela refinaria de petróleo de Paulínia-SP, do efluente lançado por esta empresa e das águas dos rios envolvidos com a sua atividade (rio Jaguari, rio de captação da empresa; rio Atibaia, rio receptor do efluente da empresa; e rio Piracicaba, derivado dos dois rios anteriores), por meio dos teste de aberrações cromossômicas e do micronúcleo em células meristemáticas e do micronúcleo em células F₁ de organismo-teste *Allium cepa*.

2. Materiais e Métodos

2.4. Localização da área de estudo e coleta das amostras de água

A área de estudo está localizada no município de Paulínia-SP, onde se encontra a maior refinaria de petróleo do complexo Petrobras. Essa refinaria capta água do rio Jaguari e despeja seu efluente no rio Atibaia. A junção destes dois rios, logo após passarem pela refinaria, origina o rio Piracicaba. Estes três rios pertencem a uma importante bacia hidrográfica do estado de São Paulo-Brasil (PCJ: bacia do Piracicaba, Capivari e Jundiaí) (Figura 1).

Para a avaliação dos impactos ambientais na região da refinaria, foram coletadas amostras de água em sete pontos distintos na área de influência da indústria, como segue:

- P1: Água de capacitação da refinaria – Rio Jaguari;
- P2: Efluente bruto- entrada do tratamento biológico do efluente;
- P3: Entrada da lagoa de estabilização (LE) da refinaria;
- P4: Saída da lagoa de estabilização (água destinada ao despejo no Rio Atibaia, município de Paulínia-SP);
- P5: Água do Rio Atibaia – montante, 200 metros do descarte das águas industriais;

P6: Água do rio Atibaia – jusante, cerca de 500 metros abaixo da descarga do efluente industrial tratado, proveniente da LE;

P7: Rio Piracicaba – cerca de 500m após a confluência dos rios Jaguari e Atibaia.

As coletas foram realizadas, nos anos de 2010 e 2011, em três períodos distintos, que caracterizam as diferentes condições climáticas típicas da nossa região (agosto/2010, março/2011 e maio/2011).



Figura 1: Mapa hidrográfico da Bacia do PCJ (Fonte: CONSÓRCIO PCJ, 2005).

2.5. Material Biológico

Os ensaios com *Allium cepa* foram realizados com sementes da variedade Baía Periforme.

2.6. Bioensaio com *Allium cepa*

As sementes de *Allium cepa* foram colocadas para germinar em placas de Petri forradas com papel filtro umedecidos com amostras das águas coletadas nos pontos de 1 a 7. Os controles foram realizados da mesma forma, sendo utilizada água Mili-Q para o controle negativo e uma solução aquosa de metilmetano sulfonato (MMS: 4×10^{-4} M) para o controle positivo.

Após germinação, quando as radículas atingiram cerca de 1,5 centímetros, foi feita a coleta e a fixação em *Carnoy* 3:1 (3 partes de etanol para 1 de ácido acético – v:v) de uma parte das radículas. A outra parte foi transferida para placas de Petri contendo água Mili-Q, por um período de 48 horas, para se estimar a potencialidade de recuperação do organismo exposto, quando as condições retornam à normalidade. Posteriormente, estas raízes também foram coletadas e fixadas em *Carnoy* 3:1.

2.6.1. Testes de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em Células Meristemáticas de *Allium cepa*

Para os testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de raiz de cebola foi adotado o protocolo descrito por Grant (1982), com algumas modificações, como segue: as raízes foram fixadas em *Carnoy* e lavadas com água destilada, para serem submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N a 60° C. Após essa etapa, as raízes foram transferidas para frascos escuros contendo reativo de *Schiff* por, aproximadamente, 2 horas.

Para a confecção das lâminas para análise de aberrações cromossômicas e de micronúcleos, foi utilizada a região meristemática das raízes. O material foi recoberto com lamínula e suavemente esmagados em uma gota de Carmim Acético (2%). As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas, permanentemente, com resina sintética.

Para a análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos foram confeccionadas 10 lâminas para cada amostra de água coletada. Foram contadas, no mínimo, 500 células de cada lâmina observada.

Para a análise dos efeitos genotóxicos e mutagênicos, foram considerados os diferentes tipos de aberrações cromossômicas, em diferentes fases do ciclo celular. As perdas, aderências cromossômicas, pontes, atrasos e brotos nucleares foram usados na avaliação da genotoxicidade e a presença de quebras cromossômicas e micronúcleos para registrar a presença de mutagenicidade (Figura 2).

Após a obtenção dos resultados de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, realizou-se a análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$), o qual possibilita a comparação dos tratamentos com o controle negativo.

2.6.2. Testes de Micronúcleo em Células F1 de *Allium cepa*

O procedimento para confecção das lâminas para análise de indução de MN foi realizado como descrito acima. Porém, o material utilizado foi a região F₁, localizado a 1 milímetro acima da região meristemática (Figura 3).

A contagem de micronúcleos e a análise estatística também foram realizadas de acordo com o descrito acima para as lâminas de células meristemáticas.

3. Resultados

3.4. *Allium cepa*

Nas amostras coletadas em agosto/2010, foi observado que somente o P5 apresentou um aumento significativo de mutagenicidade, quando comparado com o controle negativo (Tabela 1). No entanto, as sementes submetidas a um período de recuperação de 48 horas em água Mili-Q teve as características celulares normalizadas. Desta forma, foi observado que a média de danos com potencial mutagênico verificado no P5 diminuiu, após as 48 horas de recuperação, de $1,45 \pm 2,40$ para $0,55 \pm 0,64$. Já a amostra do P1 e P3 apresentaram um aumento significativo nas médias referente ao potencial genotóxico, após o período de recuperação.

Nas amostras coletadas no período de março/2011 foram verificados valores estatisticamente significativos, apenas para o P2, tanto para o potencial genotóxico como mutagênico. Foi observado que, após as 48 horas do período de recuperação, o P2 manteve-se genotóxico, mas o potencial mutagênico foi recuperado. O P7 apresentou diferença estatisticamente significativa, quando comparado ao controle negativo, para o período de recuperação, mas com uma média menor que a observada pelo controle negativo (Tabela 2).

As raízes expostas à amostra de março/2011 do rio Atibaia – 500 m a jusante do lançamento de efluente da refinaria (P6), submetidas à recuperação, apresentaram problemas na coloração da região meristemática, parte das raízes não foram coradas e a outra parte apresentou células em processo de morte celular e/ou em fase de interfase, o que impediu a contabilização dos dados para este tipo de análise, tanto para as células meristemáticas quanto para as células F₁.

Nas amostras coletadas em maio/2011, foi possível observar que somente o P6 apresentou contaminantes com característica mutagênica, quando comparado ao controle negativo. Também foi observado que, após o período de recuperação, somente as raízes expostas as amostras de água do rio Jaguari (P1) apresentaram um aumento

significativo tanto para o potencial genotóxico como para o potencial mutagênico, quando comparado com o CN correspondente (Tabela 3).

Neste estudo, também foi realizada a análise para verificar se houve fixação dos danos mutagênicos (MN), promovidos pela exposição das sementes às amostras testadas e se houve transferência do dano para as células F_1 . Desta forma, foi possível observar que para a coleta de agosto/2010 o P1 e P7 apresentaram valores significativos para mutagenicidade em células F_1 , mas somente o P1 manteve o mesmo resultado após o período de recuperação (Tabela 4).

Para a coleta realizada em março/2011 (Tabela 5), foi observado que houve a indução de um resultado positivo de mutagenicidade para células meristemáticas diretamente expostas as amostras do P2 e para células meristemáticas expostas ao P7, submetidas a um período de recuperação de 48 horas em água mili-Q. As células F_1 apresentaram resultados significativos de mutagenicidade para os P5 e P7, quando expostas diretamente. Após a recuperação, o único ponto que apresentou um aumento na frequência de MN em células F_1 foi o P2 (Tabela 5).

Os testes realizados com as amostras coletadas em maio/2011 mostraram que as águas coletadas no P6 induziram uma frequência significativa de MN em células meristemáticas, para a exposição direta, e que as águas do P1 levaram a respostas mutagênicas das células meristemáticas, após período de recuperação. Para este período de coleta, foi observado que águas coletadas em P6 também foram mutagênicas para células F_1 , tanto para o teste de exposição direta como após o período de recuperação. Também foi observado um valor significativo de mutagenicidade para células F_1 , após recuperação, para as águas coletadas no ponto 7 (Tabela 6).

3.5. Análises físico-químicas e químicas das amostras

Foram determinados diversos parâmetros físico-químicos e químicos, representados nas tabelas 7, 8, 9, 10, 11 e 12, das amostras coletadas no rio Jaguari (P1), das amostras das águas servidas da refinaria de petróleo (P2, P3), do rio Atibaia (P4, P5 e P6) e do rio Piracicaba (P7).

O pH medido em todas as amostras analisadas nesse estudo manteve-se dentro da Resolução do CONAMA 357/2005, para rios de água doce e efluente tratado (entre a faixa de 6,0 a 9,0) (Tabelas 7, 9 e 11).

De acordo com a CETESB (2010), os rios são considerados pouco poluídos, quando apresentam cerca de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (micro Siemens/cm – unidade de medida de

condutividade). Quando os rios recebem despejo doméstico e/ou industrial esse valor é geralmente aumentado. Todas as nossas amostras apresentaram valores elevados de condutividade, exceto a amostra do rio Jaguari (Tabela 7, 9, 11).

Na quantificação dos sólidos sedimentáveis, foi observado nesse trabalho que o P2 (efluente bruto da refinaria) apresentou valores elevados para sólidos em suspensão (1,90 mL/L) para a coleta de maio/2011, valor este acima dos níveis aceitáveis pela legislação (1,0 mL/L). No entanto, após o tratamento deste efluente, foi observada uma diminuição considerável da concentração desses sólidos sedimentáveis (Tabelas 11).

Segundo a Resolução do CONAMA 357/2005, o OD deve apresentar valores superiores a 5 mg O₂/L para rios de classe 2 e superiores a 2 mg/L para rios de classe 4. Assim, pode-se observar que os valores medidos nos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba atendem a legislação ambiental.

Foram observados em nossas análises químicas, altos índice de DQO para as amostras de efluente bruto, porém com o sistema de tratamento adotado pela refinaria de petróleo houve uma diminuição dos níveis de DQO para ser lançado no rio Atibaia. Já a análise de DBO apresentou índices superiores ao valor máximo permitido para os pontos: P1, P5 e P6 para amostras coletadas em agosto/2011; P1 e P5 em março de 2011; e P1 em maio/2011 (Tabelas 7, 9 e 11).

Pelas análises químicas realizadas neste trabalho, foi observado que os teores de cloretos apresentaram valores elevados para todas as coletas (Tabelas 7, 9 e 11). Esta alteração pode ser explicada pela própria origem do petróleo (extração de reservas marinhas). Porém, foi também observado que, a cada tratamento realizado na empresa, decrescia a concentração de cloreto, e o ponto a jusante do lançamento do efluente (P6) apresentou níveis aceitáveis pela legislação do CONAMA 357/2005 para esse rio, mostrando então que este parâmetro não interferiu na qualidade das águas do rio Atibaia.

As quantificações de compostos nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato) mostraram valores aceitáveis pela legislação ambiental. A dosagem de sulfetos mostrou índices cima da legislação CONAMA 357/2005 apenas para o P1, nas coletas de março/2011 e maio/2011. As análises de óleos e graxas mostraram valores de referência para esta mesma legislação, para todos os pontos amostrados (Tabelas 7, 9, 11.). A análise de fenol só mostrou valores superiores à legislação para o P5, na coleta de março de 2011.

Dentre os metais analisados, os encontrados em maior quantidade, e que não se enquadram na legislação, foram o alumínio (para P5 em março/2011), o ferro (para P1 em maio/2011) e o fósforo (para P1 em agosto/2010; P1, P5 e P6 em março/2011; P1 e P6 em maio/2011) (Tabelas 8, 10 e 12).

Tabela 1. Resultados do teste de Allium cepa em células meristemáticas expostas às diferentes amostras de água do entorno e do efluente da refinaria de petróleo, realizada em Agosto de 2010.

	Aderência	Atraso	C-metáfase	Perda	Ponte	Quebra	Broto	MN	Genotoxicidade	Mutagenicidade
CN	0,79±0,91	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,30±0,48	0,00±0,00	1,08±0,73	0,00±0,00
CP	0,48±0,67	0,00±0,00	0,00±0,00	0,29±0,47	0,39±0,51	0,10±0,32	1,64±1,96	2,14±1,18	2,81±2,50*	2,24±1,11*
P1	0,57±0,80	0,00±0,00	0,00±0,00	0,39±0,67	0,19±0,41	0,00±0,00	0,48±0,93	0,48±0,93	1,63±1,35	0,48±0,68
P2	0,68±0,80	0,00±0,00	0,00±0,00	0,39±0,50	0,58±0,81	0,00±0,00	0,10±0,32	0,19±0,60	1,74±0,76	0,19±0,69
P3	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,29±0,47	0,97±1,02	0,00±0,00	0,39±0,69	0,48±0,68	1,65±1,21	0,48±0,68
P4	1,08±0,97	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,32	0,30±0,67	0,00±0,00	0,59±0,83	0,29±0,65	2,06±1,26	0,29±0,65
P5	0,20±0,41	0,00±0,00	0,00±0,00	0,29±0,46	0,10±0,40	0,10±0,30	0,29±0,65	1,35±2,36	0,96±0,78	1,45±2,40*
P6	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,58±0,93	0,19±0,40	0,00±0,00	0,29±0,65	0,48±0,67	1,06±1,15	0,48±0,67
P7	0,91±0,87	0,10±0,30	0,00±0,00	0,09±0,28	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,27±0,44	1,09±0,95	0,27±0,44
Recuperação										
CN	0,55±0,77	0,28±0,63	0,00±0,00	0,00±0,00	0,17±0,36	0,00±0,00	0,20±0,42	0,26±0,56	1,21±0,89	0,26±0,56
CP	0,27±0,44	0,28±0,45	0,00±0,00	0,18±0,38	0,37±0,67	0,00±0,00	0,09±0,28	1,40±1,16	1,19±0,96	1,40±1,16*
P1	1,35±1,05	0,00±0,00	0,19±0,59	0,00±0,00	0,17±0,37	0,18±0,39	0,61±1,02	0,64±0,85	2,33±0,68*	0,82±1,16
P2	0,83±0,94	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,28±0,45	0,10±0,30	0,55±0,63	0,82±0,88	1,67±0,98	0,91±0,95
P3	1,52±0,88	0,25±0,41	0,08±0,26	0,00±0,00	0,09±0,29	0,00±0,00	0,28±0,45	0,26±0,42	2,23±1,02*	0,26±0,42
P4	1,10±0,58	0,00±0,00	0,09±0,27	0,09±0,27	0,09±0,27	0,09±0,29	0,28±0,45	0,91±1,38	1,64±1,06	1,01±1,66
P5	0,61±0,59	0,09±0,28	0,00±0,00	0,00±0,00	0,17±0,36	0,09±0,28	0,27±0,43	0,46±0,65	1,13±0,92	0,55±0,64
P6	1,16±1,19	0,09±0,29	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,45±1,15	0,55±0,62	1,70±1,44	0,55±0,62
P7	0,10±0,30	0,00±0,00	0,00±0,00	0,08±0,26	0,94±0,65	0,00±0,00	0,46±0,49	0,27±0,60	1,09±0,95	0,27±0,44

*estatisticamente significativo p<0,05 (Mann-Whitney); CN: controle negativo; CP: controle positivo; MN: micronúcleo.

Tabela 2. Resultados do teste de A. cepa em células meristemáticas expostas as diferentes amostras de água do entorno e do efluente da refinaria de petróleo, realizada em Março de 2011.

	Aderência	Atraso	C-metáfase	Perda	Ponte	Quebra	Broto	MN	Genotoxicidade	Mutagenicidade
CN	0,09±0,29	0,19±0,41	0,00±0,00	0,17±0,37	0,09±0,29	0,00±0,00	0,19±0,40	0,18±0,39	0,74±0,59	0,18±0,39
CP	0,75±0,60	0,00±0,00	0,00±0,00	0,27±0,43	0,55±0,63	0,36±0,62	3,51±2,67	5,43±5,57	5,07±2,77*	5,79±5,52*
P1	0,18±0,57	0,46±0,67	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,31	0,09±0,29	0,10±0,31	0,45±0,63	0,84±1,06	0,55±0,62
P2	0,74±0,76	0,67±1,15	0,00±0,00	0,34±0,58	0,00±0,00	0,00±0,00	1,14±0,95	1,57±2,07	2,89±1,15*	1,57±2,07*
P3	0,18±0,37	0,28±0,44	0,09±0,30	0,09±0,30	0,10±0,31	0,00±0,00	0,09±0,28	0,27±0,43	0,83±0,68	0,27±0,43
P4	0,64±0,64	0,00±0,00	0,00±0,00	0,09±0,28	0,19±0,40	0,29±0,65	0,28±0,45	0,19±0,40	1,20±0,49	0,47±1,03
P5	1,47±0,74	0,28±0,45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,08±0,26	0,00±0,00	0,00±0,00	0,25±-,55	1,83±1,01	0,24±0,54
P6	0,92±0,88	0,00±0,00	0,00±0,00	0,18±0,38	0,09±0,28	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,31	1,19±1,06	0,08±0,31
P7	0,56±0,63	0,19±0,40	0,00±0,00	0,10±0,30	0,54±0,62	0,17±0,36	0,19±0,40	0,45±0,85	1,48±1,32	0,62±1,08
Recuperação										
CN	0,36±0,61	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,64±0,75	1,30±1,27	1,00±0,80	1,30±1,26
CP	0,49±0,69	0,00±0,00	0,20±0,42	0,10±0,32	0,09±0,28	0,19±0,39	1,04±0,81	5,23±2,12	1,91±1,18*	5,42±2,20*
P1	0,87±1,19	0,10±0,31	0,10±0,31	0,00±0,00	0,10±0,31	0,09±0,29	0,17±0,36	0,63±0,59	1,34±1,07	0,72±0,70
P2	0,94±1,30	0,00±0,00	0,19±0,40	0,10±0,30	0,08±0,26	0,09±0,30	0,80±0,79	1,42±1,26	2,11±1,52*	1,51±1,18
P3	0,61±0,76	0,00±0,00	0,19±0,40	0,17±0,36	0,08±0,26	0,10±0,30	0,27±0,44	1,09±1,22	1,32±0,85	1,17±1,32
P4	1,09±0,91	0,00±0,00	0,09±0,28	0,19±0,40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,17±0,55	0,67±0,96	1,54±0,99	0,67±0,91
P5	0,93±0,85	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,19±0,40	0,00±0,00	0,64±0,96	1,22±0,89	1,76±1,56	1,22±0,89
P6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P7	1,03±0,83	0,00±0,00	0,10±0,31	0,00±0,00	0,19±0,40	0,00±0,00	0,54±0,77	0,36±0,46	1,67±1,35	0,36±0,46*

*estatisticamente significativo $p < 0,05$ (Mann-Whitney); CN: controle negativo; CP: controle positivo; MN: micronúcleo; (-) amostra não analisada

Tabela 3. Resultados do teste de A. cepa em células meristemáticas expostas as diferentes amostras de água de entorno e do efluente da refinaria de petróleo, realizada em Maio de 2011.

	Aderência	Atraso	C-metáfase	Perda	Ponte	Quebra	Broto	MN	Genotoxicidade	Mutagenicidade
CN	0,53±0,60	0,18±0,57	0,00±0,00	0,08±0,26	0,00±0,00	0,00±0,00	0,44±0,47	0,64±0,91	1,23±1,06	0,64±0,91
CP	0,90±0,99	0,34±0,44	0,00±0,00	0,64±0,77	0,86±0,99	0,56±0,91	4,87±4,81	12,47±10,29	7,54±5,36*	13,03±10,43*
P1	0,98±0,91	0,09±0,28	0,00±0,00	0,08±0,26	0,27±0,62	0,00±0,00	1,23±1,86	0,97±1,30	2,64±2,92	0,97±1,30
P2	0,36±0,46	0,10±0,30	0,00±0,00	0,00±0,00	0,09±0,28	0,10±0,31	1,77±1,37	1,48±1,86	2,31±1,79	1,58±1,91
P3	0,84±0,70	0,00±0,00	0,00±0,00	0,18±0,39	0,26±0,60	0,24±-,39	1,54±2,04	1,02±2,23	2,83±2,33	1,26±2,24
P4	0,26±0,42	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,08±0,26	0,00±0,00	0,71±0,92	1,39±1,88	1,04±0,80	1,39±1,88
P5	0,42±0,60	0,00±0,00	0,00±0,00	0,29±0,64	0,18±0,38	0,10±0,31	0,81±1,33	0,81±1,16	1,70±1,84	0,90±1,38
P6	1,00±0,95	0,18±0,38	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,98±0,90	1,58±1,21	2,15±1,79	1,58±1,21*
P7	0,09±0,30	0,28±0,45	0,00±0,00	0,28±0,45	0,19±0,39	0,27±0,61	0,37±0,65	1,40±1,97	1,12±0,97	1,31±1,93
Recuperação										
CN	1,11±0,87	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,28±0,62	1,01±1,30	1,39±0,67	1,01±1,30
CP	1,25±1,29	0,00±0,00	0,17±0,36	0,18±0,39	0,35±0,60	0,27±0,43	1,55±1,06	7,41±3,43	3,50±2,08*	7,68±3,51*
P1	1,21±1,47	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,31	0,00±0,00	0,27±0,44	1,10±0,82	3,53±4,87	2,40±1,65*	3,80±5,12*
P2	0,19±0,62	0,08±0,26	0,00±0,00	0,08±0,26	0,18±0,37	0,00±0,00	0,55±1,00	3,06±5,93	1,08±1,10	3,06±5,93
P3	0,68±0,65	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,30	0,00±0,00	0,00±0,00	0,84±0,81	1,50±0,76	1,65±1,11	1,50±0,76
P4	0,85±0,69	0,00±0,00	0,10±0,30	0,09±0,29	0,00±0,00	0,09±0,30	0,35±0,59	1,12±0,88	1,38±0,77	1,21±0,79
P5	0,99±0,99	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,09±0,27	0,09±0,27	0,64±0,76	1,07±0,93	0,72±0,72
P6	0,27±0,61	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,56±0,48	1,87±1,60	0,83±0,79	1,87±1,60
P7	0,27±0,61	0,00±0,00	0,00±0,00	0,09±0,28	0,09±0,28	0,18±0,38	0,37±0,78	0,82±0,81	0,81±0,90	0,91±0,99

*estatisticamente significativo p<0,05 (Mann-Whitney); CN: controle negativo; CP: controle positivo; MN: micronúcleo.

Tabela 4. Comparação entre a frequência de MN de células meristemáticas e de células F₁ encontrados no teste de *A. cepa* para as amostras coletadas em Agosto de 2010.

	Exposição – amostras		Recuperação - 48h	
	MN em células meristemáticas	MN em células F1	MN em células meristemáticas	MN em células F1
CN	0,00±0,00	1,92±1,08	0,26±0,56	2,04±1,27
CP	2,14±1,18*	5,95±2,11*	1,40±1,15*	4,90±1,63*
P1	0,48±0,68	3,49±1,80*	0,64±0,85	3,77±1,47*
P2	0,19±0,60	1,47±1,26	0,82±0,88	2,26±1,55
P3	0,48±0,68	2,25±1,19	0,26±0,42	3,09±1,42
P4	0,29±0,65	2,57±1,57	0,91±1,38	1,61±0,75
P5	1,35±2,36*	1,75±1,23	0,46±0,65	3,49±2,21
P6	0,48±0,67	1,85±1,59	0,55±0,62	2,15±1,58
P7	0,27±0,44	3,42±1,84*	0,27±0,60	2,34±1,24

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

Tabela 5. Comparação entre a frequência de MN de células meristemáticas e de células F₁ encontrados no teste de *A. cepa* para as amostras coletadas em Março de 2011.

	Exposição – amostras		Recuperação - 48h	
	MN em células meristemáticas	MN em células F1	MN em células meristemáticas	MN em células F1
CN	0,18±0,39	2,91±1,21	1,30±1,26	2,01±1,14
CP	5,43±5,57*	5,43±5,58	5,23±2,12*	13,67±4,43*
P1	0,45±0,63	2,95±2,44	0,63±0,59	2,17±1,40
P2	1,57±2,07*	2,12±2,40	1,42±1,26	4,39±1,70*
P3	0,27±0,43	3,05±1,37	1,09±1,22	2,53±2,47
P4	0,19±0,40	3,04±2,10	0,67±0,91	2,78±2,35
P5	0,25±0,54	1,76±1,45*	1,22±0,89	2,75±1,70
P6	0,10±0,31	1,95±1,32	-	-
P7	0,45±0,85	1,86±2,58*	0,36±0,46*	2,83±2,00

*estatisticamente significativo $p < 0,05$ (Mann-Whitney); (-) amostra não analisada

Tabela 6. Comparação entre a frequência de MN de células meristemáticas e de células F1 encontrados no teste de *A. cepa* para das amostras coletadas em Maio de 2011.

	Exposição – amostras		Recuperação - 48h	
	MN em células meristemáticas	MN em células F1	MN em células meristemáticas	MN em células F1
CN	0,64±0,91	1,36±1,18	1,01±1,30	1,55±1,17
CP	12,47±10,29*	2,03±1,41	7,41±3,43*	8,59±2,86*
P1	0,97±1,30	1,08±0,82	3,53±4,87*	4,69±7,42
P2	1,48±1,86	1,85±2,12	3,06±5,93	3,86±3,21
P3	1,02±2,23	2,73±3,13	1,50±0,76	2,43±2,48
P4	1,39±1,88	2,15±1,24	1,12±0,87	2,05±1,47
P5	0,81±1,16	1,81±1,61	0,64±0,76	1,43±1,36
P6	1,58±1,21*	2,62±1,56*	1,87±1,60	4,18±2,82*
P7	1,40±1,97	2,23±2,50	0,82±0,81	3,16±1,95*

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

Tabela 7. Resultados das análises físicas e químicas das amostras de água e efluente da refinaria coletadas em Agosto/2010.

	Unidades	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
pH	-	7,60	7,91	8,20	8,39	7,84	7,84	6,49
Condutividade	uS/cm	107,70	2740,0	2780,00	2800,00	295,00	347,00	0,278
Temperatura	°C	20,0	30,0	30,0	24,0	20,0	20,0	20,4
Sólidos sedimentáveis	mL/L	0,10	0,70	0,10	0,10	0,10	0,10	-
Sólidos solúveis e em suspensão	g/L	0,1110	20,230	18,370	20,560	0,2270	0,2080	-
Material volátil	g/L	0,1110	20,230	18,370	20,560	0,2270	0,2080	-
Turbidez	NTU	12,40	80,00	21,00	11,50	16,60	17,00	1,3
Oxigênio Dissolvido	mg/L	6,27	0,60	5,82	5,79	6,33	6,07	3,34
DQO	mg/L	7,68	1920,00	128,00	160,00	12,48	14,40	-
DBO	mg/L	7,00	1792,00	30,70	30,30	11,40	12,50	-
Cloretos	mg/L	7,86	712,97	762,14	774,43	20,65	33,43	-
Amônia	mg/L	*	*	*	*	*	*	-
Nitrito	mg/L	0,1923	**	**	0,0806	0,2562	0,2434	-
Nitrato	mg/L	2,0554	9,4430	6,2211	5,2786	2,2014	2,2264	-
Sulfetos	mg/L	1,00	750,00	9,00	7,00	1,00	4,00	-
Óleos e graxas	mg/L	-	-	-	1,2	1,0	0,8	-
Fenóis	µg/mL	**	**	**	0,00	0,00	0,00	-

*Problemas técnicos com o equipamento; **Amostragem com nível abaixo de detecção

(-) amostra não analisada

Tabela 8. Resultados dos metais encontrados nas amostras de água e efluente da refinaria coletadas em Agosto/2010.

	Unidades	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Arsênio	µg/L	< 2	< 2	5	3	< 2	< 2	< 2
Selênio	µg/L	< 5	45,0	40,0	40,0	< 5	< 5	< 5
Mercúrio	µg/L	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Alumínio	mg/L	< 0,010	0,02	0,02	< 0,010	< 0,010	0,02	-
Bário	mg/L	0,046	0,59	0,57	0,62	0,06	0,07	-
Cálcio	mg/L	5,85	33,80	33,00	35,40	7,28	7,66	-
Ferro	mg/L	0,021	0,20	0,02	0,02	0,03	0,16	-
Potássio	mg/L	3,87	15,80	14,00	14,30	6,14	6,10	-
Magnésio	mg/L	1,99	12,00	11,20	11,80	2,20	2,31	-
Sódio	mg/L	11,7	638	670,00	673,00	50,60	65,60	-
Fósforo	mg/L	0,15	1,31	0,85	0,74	< 0,10	< 0,10	-
Silício	mg/L	5,90	15,80	16,20	14,90	5,79	5,74	-
Estrôncio	mg/L	0,064	2,77	2,47	2,63	0,08	0,12	-

(-) amostra não analisada

Tabela 9. Resultados das análises físicas e químicas das amostras de água e efluente da refinaria coletadas em Marco/2011.

	Unidades	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Ph		7,17	7,33	8,06	7,84	7,40	7,51	6,16
Condutividade	uS/cm	56,70	2380,00	1740,00	1930,00	174,00	173,00	0,073
Temperatura	°C	25	31	29	29	25	25	25,06
Sólidos sedimentáveis	mL/L	<0,1	0,30	<0,1	<0,1	0,10	<0,1	-
Sólidos solúveis e em suspensão	g/L	0,2830	16,250	13,720	13,800	0,2410	0,7440	-
Material volátil	g/L	0,2670	0,3450	0,3270	0,2860	0,1370	0,6790	-
Turbidez	NTU	19,48	25,85	20,70	17,65	25,63	23,58	41,1
Oxigênio Dissolvido	mg/L	5,35	2,83	1,50	5,79	7,48	7,63	8,32
DQO	mg/L	14,56	600,00	120,00	120,00	12,48	24,96	-
DBO	mg/L	7,80	200,00	52,70	53,40	11,60	8,70	-
Cloretos	mg/L	2,95	700,68	442,53	516,29	8,85	12,78	-
Amônia	mg/L	0,58	41,70	0,59	0,90	1,17	1,06	-
Nitrito	mg/L	0,0103	*	0,2027	0,4533	0,1596	0,1628	-
Nitrato	mg/L	0,3407	13,1756	2,4426	2,4760	1,0879	1,0920	-
Sulfetos	mg/L	9,00	157,00	9,00	7,00	4,00	9,00	-
Óleos e graxas	mg/L	-	-	-	0,20	0,40	0,70	-
Fenóis	µg/mL	-	-	-	2,490	3,960	-	-

* Valores não detectados;

(-) amostra não analisada

Tabela 10. Resultados dos metais encontrados nas amostras de água e efluente da refinaria coletadas em Março 2011

	Unidades	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Arsênio	µg/L	6,5 ± 0,1	17,4 ± 0,7	7,1 ± 0,7	8,9 ± 0,2	7,3 ± 0,4	6,5 ± 0,3	<2
Selênio	µg/L	< 5	42,8 ± 0,6	9,3 ± 0,7	11,1 ± 0,7	< 5	< 5	<5
Mercúrio	µg/L	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	<1
Alumínio	mg/L	0,032	0,040	0,110	< 0,025	0,38	0,20	-
Bário	mg/L	0,047	0,61	0,24	0,44	0,12	0,077	-
Cálcio	mg/L	6,04	50,1	43,5	47,4	11,1	10,4	-
Ferro	mg/L	0,133	0,16	0,13	0,092	1,15	0,89	-
Potássio	mg/L	4,05	14,6	16,0	14,4	6,50	7,13	-
Magnésio	mg/L	2,15	14,5	13,8	14,2	2,57	2,55	-
Sódio	mg/L	16,4	529	528	471	39,8	38,20	-
Fósforo	mg/L	0,24	1,37	0,89	0,60	1,06	0,16	-
Silício	mg/L	6,93	19,3	20,6	17,2	7,51	7,73	-
Estrôncio	mg/L	0,077	3,08	2,89	2,95	0,10	0,120	-

(-) amostra não analisada

Tabela 11. Resultados das análises físicas e químicas das amostras de água e efluente da refinaria coletadas em Maio/2011.

	Unidades	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
pH	-	7,60	7,46	7,90	7,90	7,56	7,68	6,71
Condutividade	uS/cm	100,90	2400,00	1960,00	1770,00	256,50	257,50	0,179
Temperatura	°C	20	30	29	26	20	20	22,21
Sólidos sedimentáveis	mL/L	<0,1	1,90	0,10	<0,1	<0,1	0,20	-
Sólidos solúveis e em suspensão	g/L	0,1340	19,660	14,400	12,720	0,1800	0,1200	-
Material volátil	g/L	0,0740	0,6740	0,4540	0,3880	0,0760	0,1160	-
Turbidez	NTU	19,48	25,85	20,70	17,65	25,63	23,58	4,3
Oxigênio Dissolvido	mg/L	10,14	5,34	9,36	7,96	9,16	8,53	6,78
DQO	mg/L	8,32	552,00	110,40	128,80	9,36	11,44	-
DBO	mg/L	6,50	484,00	31,20	32,30	8,50	10,00	-
Cloretos	mg/L	5,9	565,46	467,12	381,07	14,75	17,7	-
Amônia	mg/L	1,26	37,15	0,69	1,50	2,24	2,53	-
Nitrito	mg/L	0,1293	*	0,0135	0,1620	0,1796	0,1851	-
Nitrato	mg/L	1,3750	13,3841	3,5103	2,5844	1,4674	1,5174	-
Sulfetos	mg/L	6,00	370,00	8,00	10,00	5,00	8,00	-
Óleos e graxas	mg/L	-	-	-	1,80	2,20	1,00	-
Fenóis	µg/mL	-	-	-	-	-	-	-

* Valor não detectado

(-) amostra não analisada

Tabela 12. Resultados dos metais encontrados nas amostras de água e efluente da refinaria coletadas em Maio/2011

	Unidades	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Arsênio	µg/L	< 2	11,3 ± 0,5	6,1 ± 0,5	5,5 ± 0,2	< 2	< 2	<2
Selênio	µg/L	< 5	50,7 ± 0,6	17,6 ± 0,7	12,4 ± 0,4	< 5	< 5	<5
Mercúrio	µg/L	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	<1
Alumínio	mg/L	< 0,025	< 0,025	0,058	0,18	0,067	0,055	-
Bário	mg/L	0,045	0,23	0,52	0,60	0,058	0,083	-
Cálcio	mg/L	5,64	30,1	28,9	30,9	6,63	8,02	-
Ferro	mg/L	0,32	0,090	0,12	0,94	0,79	0,89	-
Potássio	mg/L	3,62	12,5	11,1	12,4	5,43	5,50	-
Magnésio	mg/L	1,96	11,0	11,2	11,6	1,96	2,15	-
Sódio	mg/L	10,8	468	502	521	52,3	59,90	-
Fósforo	mg/L	0,11	0,69	0,60	0,57	< 0,10	0,13	-
Silício	mg/L	6,10	9,47	14,9	14,8	6,65	6,38	-
Estrôncio	mg/L	0,058	2,15	2,10	2,32	0,063	0,130	-

(-) amostra não analisada

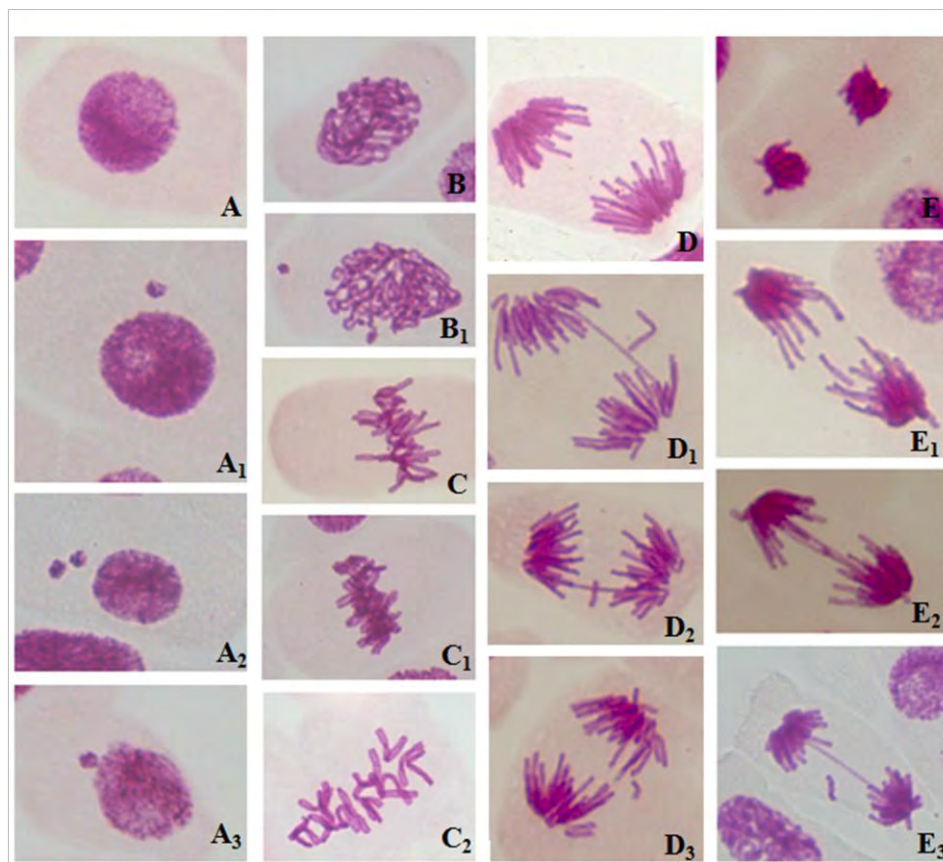


Figura 2. A: interfase; A₁: interfase com MN; A₂: interfase com dois MN; A₃: broto nuclear; B: prófase; B₁: prófase com MN; C: metáfase; C₁: metáfase com aderência cromossômica; C₂: c-metáfase; D: anáfase; D₁: anáfase com ponte e perda cromossômica; D₂: anáfase com ponte cromossômica; D₃: anáfase com quebra cromossômica; E: telófase; E₁: telófase com quebra cromossômica; E₂: telófase com pontes cromossômicas; E₃: telófase com ponte e quebra cromossômica.

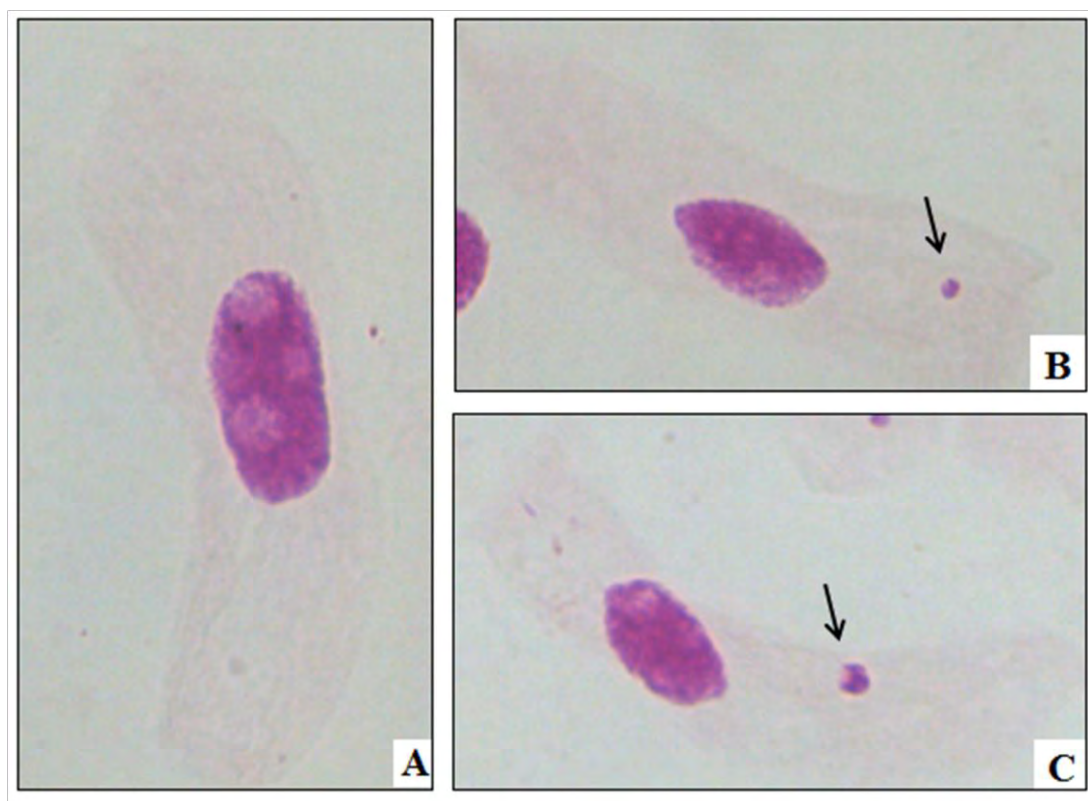


Figura 3. A: Célula F₁ de *A. cepa*; B e C: Células F₁ com MN.

4. Discussão

Segundo Fenech (2000), os contaminantes são capazes de induzir aberrações cromossômicas por diversos mecanismos, sendo a ação clastogênica e a aneugênica as mais comumente observadas. A ação clastogênica é caracterizada pela quebra de cromossomo durante a divisão celular, e a ação aneugênica ocorre quando um agente promove a inativação de uma estrutura citoplasmática, por exemplo, o fuso mitótico, levando a perda de um ou mais cromossomos.

A espécie *A. cepa*, possui um sistema da enzima citocromo P450 envolvida em processos de desintoxicação, que auxilia na biotransformação de compostos químicos (GUENCHEVA; HENRIQUES, 2003). Estudos realizados por Friskesjö (1985), com o composto benzo[α]pireno, mostram que a espécie *Allium cepa* é indicada para avaliar a genotoxicidade dos HPA. O autor observou que a metabolização desses contaminantes nas células de *A. cepa* ocorre devido à presença de um sistema de enzimas oxidases.

Segundo Aina et al. (2006), os HPA presentes no petróleo bruto são considerados tóxicos, com potencial mutagênico e carcinogênico. Assim, os nossos resultados mostraram que somente a amostra do efluente bruto (P2) da refinaria de petróleo, coletada em março/2011, apresentou efeitos genotóxicos e mutagênicos, que se manteve genotóxico após o período de recuperação. No entanto, podemos inferir que as raízes foram capazes de recuperar a normalidade, para os danos causados por contaminantes mutagênicos.

Hoshina e Marin-Morales (2009) estudaram o processo de tratamento de efluente gerado pela mesma refinaria de petróleo estudada neste trabalho e a influência do descarte desse efluente no rio Atibaia, por meio do sistema teste *A. cepa*. Foi observado que os compostos químicos presentes nos efluentes apresentam potencial citotóxico e ação aneugênica e/ou clastogênica. Os autores observaram que houve um aumento nas frequências de MN, AC e morte celular na amostra coletada após a descarga do efluente final da refinaria, e sugeriram que as substâncias e/ou compostos presentes no efluente tratado pode atuar em sinergia com os contaminantes de outros efluentes industriais afetando a qualidade do rio Atibaia.

Em nosso estudo, o P6 apresentou um aumento significativo do potencial mutagênico, para a coleta realizada em maio/2011, e, nesse caso, suspeita-se que haja entre o lançamento de efluente da refinaria de petróleo e o P6 algum lançamento

clandestino que descarte outros contaminantes ambientais, uma vez que a amostra coletada a jusante do descarte do efluente, bem como o efluente gerado pela refinaria não apresentaram indícios de compostos tóxicos com a capacidade de causar danos ao material genético das células expostas. Outra hipótese para o efeito mutagênico nessa amostra é que os componentes descartados no efluente da refinaria podem ter sido somados os compostos que já são trazidos pelo rio Atibaia, entrando em sinergismo para formar compostos que reagem na molécula de DNA.

Um estudo realizado por Locatelli (2006) investigou a caracterização de alguns compostos orgânicos no rio Atibaia. O autor observou que ao longo desse rio ocorre uma intensa contaminação por esgoto doméstico das cidades da região.

Na coleta realizada em agosto/2010 houve um aumento significativo de micronúcleo em células meristemáticas expostas a amostra de água coletada no P5, indicando a presença, nesta amostra, de substâncias com potencial mutagênico. Esses resultados observados para a coleta do inverno sugerem que o rio Atibaia pode estar recebendo efluentes de outra natureza antes de receber o efluente da refinaria. Pela análise do P6 (jusante do lançamento de efluente da refinaria), para o mesmo período, podemos concluir que o rio recuperou a qualidade de suas águas, após o recebimento do efluente. O rio Atibaia percorre 16 cidades ao longo do seu percurso e é alvo de diversas descargas de efluentes contaminados com resíduos industriais e urbanos. Além disso, o rio Anhumas (um efluente do rio Atibaia) encontra a água límpida do rio Atibaia, lançando neste rio grande parte dos resíduos de esgoto da cidade de Campinas-SP, o que vem somar para o comprometimento das características físicas e químicas desse rio.

Com a exposição das raízes a um período de recuperação de 48 horas em água Mili-Q, pudemos observar que a água do rio Jaguari (P1), utilizada nas atividades da refinaria de petróleo, já estava apresentando um aumento no potencial genotóxico e mutagênico para as águas coletadas em maio/2011. Para a coleta de agosto/2010, esse mesmo ponto apresentou um aumento significativo nos níveis de genotoxicidade. Neste período foi também observado o mesmo resultado para o efluente lançado no rio Atibaia (P3). Esses dados sugerem que alguns contaminantes presentes nessas amostras não foram capazes de causar aberrações cromossômicas nas células meristemáticas durante o período de exposição, porém induziram danos posteriores às células (após 48 horas).

Um estudo realizado para avaliar a toxicidade e a genotoxicidade das amostras de água coletadas ao longo do rio do Sinos – RS, desenvolvido por Nunes et al. (2011), mostrou que essa região, influenciada por diversas atividades industriais (couro,

petroquímica, metalúrgica, entre outros), apresentava contaminantes com potencial citotóxico, tóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Neste estudo, os autores utilizaram a linhagem celular V79 (células de pulmão de *hamster* chinês), para os ensaios do cometa e do MN, e também a espécie *A. cepa* para o teste de MN. Os autores observaram, por meio do ensaio do cometa, um aumento significativo na frequência de danos no DNA em todas as amostras coletadas durante a primavera. Já o teste de *A. cepa* indicou que a maioria das amostras apresentou uma ação citotóxica, mas não mutagênica, pois todas as amostras estudadas não induziram a níveis significativos de MN. Por fim, os autores inferiram que os testes com a linhagem V79 e *A. cepa* mostraram-se eficiente para detectar a toxicidade e a genotoxicidade de misturas complexas.

Segundo a CETESB (2010), Quando os valores de DQO são maiores que os valores registrados para DBO, é indicativo de alta carga de matéria quimicamente oxidável, mas de difícil biodegradação. Além disso, DQO é um parâmetro indispensável nos estudos de caracterização de esgotos sanitários e de efluentes industriais. Já o DBO representa a quantidade de oxigênio necessária para oxidação da matéria orgânica, por meio da microbiota aeróbica presente em uma amostra. O seu aumento num corpo d'água se dá devido ao lançamento de efluente de origem predominantemente orgânica. Segundo Guerra (2009), o alto teor de matéria orgânica em um ambiente aquático pode induzir à saída de moléculas de oxigênio do sistema. Pelas nossas análises físico-químicas, os rios Jaguari e Atibaia apresentaram níveis elevados de DQO, DBO e o rio Atibaia apresentou ainda uma alta condutividade. Esses parâmetros são subjetivos, mas indicam que o ambiente estudado está impactado por ação antropogênica.

Outro parâmetro que se mostou fora dos limites aceitáveis pela resolução do CONAMA 357/05, em quase todas as amostras estudadas, foi a condutividade. Este parâmetro corresponde à capacidade da água conduzir corrente elétrica, característica esta dependente de concentrações de íons dissolvidos e da temperatura. Normalmente, quando a condutividade apresenta níveis superiores a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ indica que o ambiente está poluído.

Segundo Matsumoto e Marin-Morales (2005), tem sido diagnosticado um aumento de contaminação por metais nos recursos hídricos, em consequência do aumento de atividades industriais, agrícolas e urbanas, o que vem ocasionando impactos severos nos ecossistemas. Neste estudo também foi observado níveis elevados de metais, segundo a resolução ambiental, destacando-se o Al, Fe e P.

Leme e Marin-Morales (2008) estudaram quatro pontos distintos do rio Guaecá, após este rio ser impactado por um vazamento de oleoduto. As autoras avaliaram o impacto do local por meio de testes realizados com células meristemáticas e F_1 de *Allium cepa*. Pelas análises químicas realizadas, as autoras puderam certificar a presença de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) nas águas deste rio. As pesquisadoras observaram que as águas impactadas por esses contaminantes apresentavam efeitos genotóxicos e mutagênicos sobre o organismo testado. Pelas análises das células F_1 , foi observado que as alterações induzidas nas células meristemáticas (genotóxicas e mutagênicas) não foram reparadas ou sofreram reparos incompletos, o que acarretou no aumento significativo na frequência de MN nestas células F_1 . Mazzeo et al. (2011) estudaram diversas concentrações da mistura BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), compostos orgânicos voláteis encontrados no petróleo, que apresentam um perigo devido ao seu potencial poluidor de águas subterrâneas. Para a avaliação, os autores utilizaram o teste de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células meristemáticas e F_1 de raízes de *A. cepa*. Os autores comprovaram o potencial mutagênico e genotóxicos dessa mistura, pela presença elevada de micronúcleos e aberrações cromossômicas e nucleares nas células meristemáticas. Assim, o estudo realizado comprovou que os danos causados nas células meristemáticas não foram repassados para as células da região F_1 . Frente a esses resultados é possível inferir que o organismo *A. cepa* é sensível para detectar efeitos tóxicos dos hidrocarbonetos presentes no petróleo.

Com os dados obtidos em nosso estudo, para a coleta de março/2011, também observamos que as alterações induzidas nas células meristemáticas das sementes expostas a amostra de efluente bruto não foram reparadas, levando a frequência significativa de MN nas células F_1 . Porém, como as amostras dos efluentes tratados não apresentaram resultados significativos de mutagenicidade, podemos inferir, mais uma vez, que o processo de tratamento do efluente está sendo eficaz.

As análises de MN feitas nesse estudo para células F_1 indicaram que os danos promovidos nas células meristemáticas são repassados de geração para geração. Observamos que na coleta de agosto/2010, o P1 não apresentou danos significativos nas células meristemáticas. Porém, foi observado um aumento significativo de MN em células F_1 tanto para o período de exposição direta como para o período de recuperação. O mesmo fato ocorreu com o P7 que não apresentou MN nas células meristemáticas, mas houve um aumento significativo em células F_1 , com relação ao CN. Além disso, os

dados observados no P5 mostrou que os danos ocasionados nas células meristemáticas não foram passados para as células filhas. Na coleta de maio/2011, foram encontrados dados semelhantes, pois o P6 apresentou um aumento significativo nas células F₁ e, após o período de recuperação, também houve um aumento significativo na frequência de MN no P7. Assim, as alterações ocorridas nessas coletas sugerem que os rios Atibaia, Jaguari e Piracicaba estão sofrendo interferência de outras atividades, uma vez que nossos testes evidenciaram a eficiência do sistema de tratamento de efluentes realizados pela refinaria de petróleo.

Rodrigues et al. (2010) testaram a genotoxicidade do efluente gerado por uma refinaria de petróleo, por meio de ensaios *in vivo* (teste do MN em *A. cepa*) e ensaio *in vivo* (ensaio do cometa em células HTC). Pelas análises químicas, foi comprovada a presença de vários compostos aromáticos e orgânicos (tolueno, etilbenzeno, xileno, pireno, benzo[α]pireno e compostos fenólicos) em baixas concentrações. Os resultados encontrados por estes autores indicaram que os HPA presentes nos efluentes estudados foram incapazes de induzir a formação de MN em células F₁ de *A. cepa*. No entanto, houve a indução de danos no DNA nas células HTC, que podem ter ocorrido por essas células serem metabolizadoras de compostos químicos.

Com bases nos dados apresentados nesse trabalho, podemos inferir que o tratamento de efluente da refinaria está sendo eficiente, pois em nenhuma das coletas o P4 (efluente final que é lançando no rio Atibaia) apresentou indícios de compostos genotóxicos e mutagênicos, quando submetidos aos testes com *A. cepa*. No entanto, algumas amostras dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba apresentaram potencial genotóxico e/ou mutagênico, fato este que pode ter ocorrido devido ao lançamento de substâncias tóxicas provenientes de outras fontes antropogênicas.

Além disso, este estudou evidenciou a importância de se realizar um monitoramento ambiental dos corpos d'água que recebem, diariamente, efluentes industriais e urbanos, pois os compostos químicos presentes nesses efluentes podem constituir um perigo para todo o ecossistema. Sendo assim, ensaios que utilizam plantas como organismo teste, dentre eles a espécie *A. cepa*, têm se mostrado muito eficiente para esse tipo de monitoramento e são considerados excelentes ferramentas para avaliar a qualidade dessas águas, por serem bioindicadores sensíveis da presença de poluentes ambientais.

5. Agradecimentos

Agradecemos à Profa. Dejanira Francheschi de Angelis, do departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro-SP, pelo apoio geral ao trabalho e pelo auxílio constante, principalmente na realização das coletas. Ao Programa de Recursos Humanos ANP/PRH-05 da UNESP de Rio Claro-SP e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro.

6. Referências

AINA, R.; PALIN, L.; CITTERIO, S. Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens*L. **Chemosphere**, v. 65, p. 666–673, 2006.

ANA, G. R.; SRIDHAR, M. K.; EMEROLE, G. O. Polycyclic aromatic hydrocarbon burden in ambient air in selected Niger Delta communities in Nigeria. **J Air Waste Manag Assoc.**, n. 62, v. 1, p. 18-25, 2012.

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.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Variáveis de qualidade das águas.** Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/Águas-Superficiais/34-Variáveis-de-Qualidade-das-águas>> Acesso: 07.05.2012.

DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L. R.. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutat. Res.**, v. 521, p. 121–135, 2012.

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

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

GRANT, W. F.; Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency. Gene-Tox program. **Mutation Research**, v.99, p.273-291, 1982.

GUENCHEVA, T. N.; HENRIQUERS, J. A. P. Metabolismo de xenobióticos. Citocromo P450. In: DA SILVA, J.; ERDTMAN, B.; PEGAS FENRIQUES, J. A. **Ed Genética Toxicológica**, Brasil, p. 225-243, 2003.

GUERRA, R. C. **Estudos do lodo gerado em reator biológico, pelo tratamento da água de produção do petróleo, no Terminal Marítimo Almirante Barroso, município de São Sebastião, SP. Visando sua disposição final.** 126p. Tese

(Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2009.

HARVEY, R. G. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**. New York: Wiley-VCH, 1997, p. 682.

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

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

LINSAK, D. T.; LINSAK, Z.; BESIC, D.; VOJCIĆ, N.; TELEZAR, M.; COKLO, M.; SUSNIĆ, S.; MIĆOVIĆ, V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in Kostrena coastal area. *Coll Antropol.*, v. 35, n. 4, p. 1193-6, 2011.

LOCATELLI, M. A. F. **Investigação Sobre a Emissão e Caracterização dos Hidrocarbonetos policíclicos AROMATICOS (HPA) na Bacia do Rio Atibaia**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic Potential Evaluation of the Water of a River That Receives Tannery Effluent Using the *Allium cepa* Test System. **Cytologia**, v. 69, n. 4, p. 399-408, 2004.

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

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *Science of the Total Environment*, v. 408, p. 4334-4340, 2010.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Danos celulares no *Allium cepa* sistema de teste, causadas por mistura BTEX prévias e após processo de biodegradação. *Chemosphere*, v. 85, p. 13-18, 2011.

NUNES, E. A.; LEMOS, C. T.; GAVRONSKI, L.; MOREIRA, T. N.; OLIVEIRA, N. C. D.; SILVA, J. Genotoxic assessment on river water using different biological systems. **Chemosphere**, v. 84, p. 47–53, 2011.

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

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

RODRIGUES, F. P.; ANGELI, J. P.; MANTOVANI, M. S.; GUEDES, C. L.; JORDÃO, B. Q. Genotoxic evaluation of an industrial effluent from an oil refinery using plant and animal bioassays. **Genet Mol Biol.**, v. 33, n. 1, p. 169-75, 2010.

RUSSEL, P. J. **Chromosomal mutation**. B. Cummings (Ed.), Genetics, Pearson Education Inc., San Francisco, pp. 595–621, 2002

SAIEN, J.; SHAHREZAEI, F. Organic Pollutants Removal from Petroleum Refinery Wastewater with Nanotitania Photocatalyst and UV Light Emission. **International Journal of Photoenergy**, v. 2012, 2012.

SOUZA, D. S.; RAMOS, A. P.; NUNES, F. F.; MORESCO, V.; TANIGUCHI, S.; LEAL, D. A.; SASAKI, S. T.; BÍCEGO, M. C.; MONTONE, R. C.; DURIGAN, M.; TEIXEIRA, A. L.; PILOTTO, M. R.; DELFINO, N.; FRANCO, R. M.; MELO, C. M.; BAINY, A. C.; BARARDI, C. R. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicol Environ Saf.**, n. 76, v. 2, p. 153-61, 2012.

SUN, L.; ZANG, S. History of Fuel Consumption Inferred from Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments from the South Lianhuan Lake, Northeast China. **Bull Environ Contam Toxicol.**, 2012.

Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de águas servidas e receptoras de efluentes de refinaria de petróleo

Raquel Vaz Hara¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, 13.506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

Nos últimos anos tem crescido a preocupação com a composição química das águas residuais geradas pelas indústrias de refino de petróleo, mesmo após o seu tratamento. Esses efluentes são despejados nos rios e podem apresentar substâncias capazes de interferir na saúde de todo ecossistema. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial mutagênico e genotóxico do efluente gerado pela maior refinaria de petróleo do Brasil, antes e após tratamento, bem como da qualidade das águas dos rios seu entorno Jaguari, Atibaia e Piracicaba. A mutagenicidade, avaliada por meio do teste do micronúcleo em células de mamíferos mantidas em cultura, indicou que somente a amostra de efluente bruto da refinaria apresentou diferença significativa, em relação ao controle negativo, para todas as coletas estudadas. Já com os dados de genotoxicidade, obtidos pelo ensaio do cometa, foi observado que nenhuma das amostras de água e efluente testadas apresentou potencial genotóxico. Esses dados indicam que o sistema de tratamento de efluente da refinaria foi eficiente, por não interferirem na qualidade das águas dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba.

Palavras-chave: HPA; cultura de células de mamíferos, ensaio do cometa, micronúcleo, efluente industrial

ABSTRACT

In the last years the concern about the chemical composition of residual waters generated by petroleum refinery industries, even after its treatment, has grown. These effluents are discharged in rivers and can present substances that can interfere in the health of the whole ecosystem. In this context, the aim of this study was to assess the mutagenic and genotoxic potential of the effluent generated by the largest Brazilian petroleum refinery, before and after treatment, as well as the quality of the waters of the rivers around the refinery, Jaguari, Atibaia and Piracicaba. The mutagenicity, evaluated by the micronucleus test in mammalian cell culture, showed that only the raw effluent sample presented significative difference in relation to the negative control, for all the collections studied. Now, the genotoxic data, obtained by the comet assay, showed that no samples of water and effluent tested presented genotoxic potential. These data suggest that the effluent treatment system of the refinery was efficient, since it did not interfere in the quality of the waters of the Jaguari, Atibaia and Piracicaba rivers.

Key-words: PAHs; mammalian cell culture, comet assay, micronucleus, industrial effluent

1. Introdução

Uma das principais tarefas do monitoramento ambiental é avaliar o comprometimento dos ecossistemas, frente a ações antrópicas diversas. Para se fazer um bom controle da poluição, é necessário escolher parâmetros que respondam de maneira fiel às agressões que perturbam as condições ambientais. Dentre as avaliações dos ambientais aquáticos, por exemplo, vem sendo cada vez mais utilizados recursos que avaliem o potencial genotóxico e/ou mutagênico nas águas superficiais, com a intenção de diagnosticar a presença de compostos tóxicos que possam causar alterações no meio biológico. (RAJAGURU et al., 2003). Uma das grandes causas da poluição do meio ambiente é o lançamento de efluentes industriais não tratados.

Sabendo que a água é o destino final de todo poluente, há hoje uma preocupação muito grande em se avaliar a qualidade de nossos recursos hídricos, por ser a água o bem mineral indispensável a todos os seres vivos do planeta. Por isso, segundo Kim et al. (2008) e Xiang et al. (2012), há uma constante necessidade de se identificar, caracterizar e avaliar as substâncias tóxicas presente em um efluente, a fim de se estabelecer um nível aceitável para sua descarga.

Nos últimos anos, houve um aumento acentuado no consumo de energia e um consequente crescimento na economia. Devido a esse alto consumo de recursos energéticos, grandes quantidades de HPA são, constantemente, liberados no meio ambiente. Assim, muitos pesquisadores têm estudado as ações biológicas dos HPA e seus derivados, por eles representarem uma classe de compostos toxicológicos que podem criar uma variedade de efeitos genotóxicos, imunotóxicos e carcinogênicos, muitos já comprovados por ensaios realizados tanto sistema *in vivo* quanto *in vitro* (GUO et al., 2011).

Muitos estudos tem utilizado cultura de células de mamíferos como sistemas-testes de investigação do potencial genotóxico e mutagênico de poluentes ambientais (MATSUMOTO et al., 2003; 2005; PARK et al., 2006; MARANBINI et al., 2007; TSUBOY et al., 2007; DURGO et al., 2008; CHEQUER et al., 2009; LAGERQUVIST et al., 2011). Dentre os sistemas *in vitro*, as células de ovário de *hamster* chinês (CHO-K1) têm sido consideradas um organismo-teste sensível para avaliar amostras contaminadas com agentes tóxicos (MATSUMOTO et al., 2005; AOUDADENE et al., 2008).

Dentre os testes de mutagenicidade realizados com cultura de células, a quantificação da presença de micronúcleos é considerada uma importante ferramenta de avaliação. Os micronúcleos são estruturas celulares que podem aparecer em decorrência de diferentes ações de agentes bioativos. Os compostos de ação clastogênica induzem a formação de micronúcleos por uma ação direta sobre a molécula de DNA. Neste caso, o agente vai interagir com o DNA e promover uma quebra nesta molécula. O fragmento derivado da quebra vai, então, originar uma estrutura de constituição semelhante a do núcleo, porém isolado do mesmo, denominado de micronúcleo (MN). Os agentes aneugênicos são aqueles que interagem com outras moléculas da célula como, por exemplo, as proteínas do fuso mitótico, ocasionando a perda de cromossomos. Neste caso, os MNs são estruturas derivadas de cromossomos inteiros que foram perdidos durante o ciclo celular. Assim, os MNs são estruturas que aparecem na célula decorrente de porções de DNA ou de cromossomos inteiros que se perderam durante o ciclo celular (FENECH, 2000; KIRSGH-VOLDERS et al., 2003).

O ensaio do cometa tem ganhado espaço em diversas áreas e representa uma ferramenta eficaz para avaliar danos no DNA em diferentes tipos celulares, em resposta à exposição a diferentes agentes (COLLINS, 2004). Segundo Liao et al. (2009), o ensaio do cometa baseia-se na quantificação de fragmentos de DNA desnaturado que migraram para fora do nucleóide durante um processo de eletroforese.

O objetivo deste estudo foi realizar testes para avaliar a mutagenicidade e a genotoxicidade de águas servidas e de recursos hídricos na área de influência de uma refinaria de petróleo do estado de São Paulo-Brasil. Desta forma, houve a necessidade de se avaliar a qualidade das águas dos rios Jaguari e Atibaia e Piracicaba, para estimar o grau de comprometimento ambiental que esta atividade industrial pode estar causando no ambiente de seu entorno e também verificar se o tratamento realizado pela refinaria está sendo eficiente. Para essa avaliação, utilizamos o teste do micronúcleo e do ensaio do cometa em células de *hamster* chinês (CHO-K1) mantidas em cultura.

2. Materiais e Métodos

2.4. Localização da área de estudo e coleta das amostras de água

Os rios Atibaia, Jaguari e Piracicaba, avaliados neste estudo, pertencem à bacia do PCJ (Piracicaba, Capivari e Jundiá). Os rios Atibaia e Jaguari passam pelo município de Paulínia-SP, uma região altamente industrializada do estado de São Paulo-

Brasil. Dentre as indústrias desta região, está uma refinaria de petróleo do sistema Petrobras, considerada a principal fonte de renda da região e a maior refinaria do país. Essa refinaria produz vários produtos derivados do petróleo como a gasolina, diesel, gás doméstico, asfalto, nafta e querosene. O rio Piracicaba, que se origina da junção dos rios Atibaia e Jaguari, é considerado um dos mais importantes rios paulistas, principalmente por ser responsável pelo abastecimento de grandes cidades deste estado (Figura 1).

Para a realização do presente estudo, foram determinados 7 (sete) pontos distintos de coleta das amostras de água: P1: Água de capacitação pela refinaria – Rio Jaguari; P2: Efluente bruto- entrada do tratamento biológico do efluente; P3: Entrada da lagoa de estabilização (LE) da refinaria; P4: Saída da lagoa de estabilização (água destinada aos despejos no Rio Atibaia, município de Paulínia-SP); P5: Água do Rio Atibaia – montante, 200 metros do descarte das águas industriais; P6: Água do Rio Atibaia – jusante, cerca de 500 metros abaixo da descarga do efluente industrial tratado, proveniente da LE; P7: Rio Piracicaba – cerca de 500m após a confluência dos rios Jaguari e Atibaia.

As coletas das amostras de água foram realizadas em três períodos distintos do ano de 2011: maio/2011, julho/2011 e novembro/2011, para a realização dos ensaios de avaliação do potencial mutagênico, por meio do teste do MN, e em 2 períodos: novembro/2011 e março/2012, para avaliação do potencial genotóxico, por meio do ensaio do cometa.



Figura 1: Mapa hidrográfico da região da Bacia do PCJ (Fonte:CONSÓRCIO PCJ, 2005).

2.5. Material Biológico

O material biológico utilizado neste estudo, como organismo-teste, foram células de mamíferos (Células de Ovário de Hamster – CHO-K1) fornecidas pela Prof^a Dr^a Silvia Tamie Matsumoto da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, e estocadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

2.6. Manutenção da CHO-K1 (cells Chinese hamster ovary)

Para o cultivo das células, foi utilizado o meio DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12*; Invitrogen), com solução antibiótica/antimicótica, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF; Cultilab). Os frascos de cultura de 25 cm² foram mantidos em temperatura controlada (37°C).

As células foram descongeladas e, após o crescimento celular, lavadas com PBS e tripsinizadas com Tripsina-EDTA 0,025%. Os pré-frascos foram preparados com cerca de 1×10^6 células cada. Para a realização deste estudo, foi necessária a preparação de 54 pré-frascos (27 para o ensaio do MN e 27 para o cometa). Após o crescimento das células nos pré-frascos por 24h (2 ciclo completos de divisão celular e tempo necessário para a aderência das células nos frascos), as células foram expostas às diferentes amostras de água e aos controles.

2.7. Determinação dos tratamentos

O tratamento controle negativo foi realizado expondo as células em PBS e o controle positivo em solução aquosa de metilmetanosulfonato (MMS – 4×10^{-4} M). Para a realização dos ensaios com as amostras, o pH foi corrigido para 7,3 e as mesmas foram filtradas (esterilizadas) em filtro de seringa de membrana de poliestersulfona (diâmetro de 33 mm e 0,22 µm de porosidade - Millipore®). Todos os ensaios foram realizados a 37°C com período de exposição de 3 horas.

O volume das amostras e dos controles utilizados nos ensaios foi de 20% do volume total do frasco, conforme indicações de Reifferscheid et al. (2008), que descrevem que a alteração da osmolaridade causada pela adição de 20% de amostra na cultura celular não induz efeitos citotóxicos ou genotóxicos para as células expostas. O

material exposto foi posteriormente submetido ao ensaio do cometa e ao teste do micronúcleo.

2.8. Ensaio do cometa em CHO-K1

Após os tratamentos, foi realizada a coleta da suspensão celular. Os frascos foram lavados com PBS, tripsinizados e inativados com meio de cultura com soro. Todo o conteúdo foi transferido para tubos Falcon® e centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi resuspendido em 0,5 mL de meio.

Para o ensaio de viabilidade celular, foram corados 20 µL da suspensão celular com 20 µL de Azul de Tripán (GIBCO®) e as células contadas em câmaras de Neubauer.

Para o ensaio do cometa, misturou-se 20 µL da suspensão celular + 120µL de agarose de baixo ponto de fusão a 37°C. Esse conteúdo foi distribuído em uma lâmina coberta com agarose comum. Posteriormente, as lâminas foram banhadas em solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100mM, Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8g de NaOH sólido para 1 L), pH 10, no escuro, em geladeira a 6°C, por no mínimo 1 hora. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese, contendo uma solução tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, com pH>13), onde foram matidas por 20 min, seguida de uma corrida de eletroforese a 25 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm), por mais 20 min. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas em tampão de neutralização com 3 banhos de 5 min (pH 7,2) e fixadas em etanol absoluto por 10 min.

As lâminas foram coradas com 50 µL de solução de GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada) e analisadas imediatamente após a sua coloração. Foram analisados em microscopia de epifluorescência Leica, objetiva de 40x, filtro B - 3⁴ (excitação: λ =420n-490nM, barreira: λ =520nM), 100 nucleóides por lâmina, totalizando 300 nucleóides por tratamento. Os nucleóides foram classificados de acordo com a migração dos fragmentos como: classe 0 – nucleóide sem danos e que não apresenta cauda; classe 1: nucleóide com cauda menor que o seu diâmetro; classe 2: nucleóide com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes do seu diâmetro; classe 3: nucleóide com cauda 2 vezes maior que o seu diâmetro (Figura 2) (SPEIT et al., 1996). Os escores de cada tratamento foram

submetidos ao teste estatístico ANOVA: um critério/*Dunnett* ($p < 0,05$), para comparação dos resultados entre os tratamentos e o controle negativo.

2.9. Teste do micronúcleo em células CHO-K1

Após a exposição aos tratamentos, o meio de cultura foi trocado e adicionado neste novo meio 3 $\mu\text{g/mL}$ de citocalasina B por frasco, onde as culturas permaneceram, por 18 horas, para obtenção de células binucleadas. Na sequência, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas com tripsina 0,025%. Após o desprendimento das células, todo o conteúdo do frasco foi transferido para tubos Falcon[®], onde foi adicionada 1 gota de formol 40%. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos. Em seguida, parte do sobrenadante foi descartada e adicionado 1,5 mL de solução hipotônica de citrato de sódio 1%. Após nova homogeneização, os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado, restando apenas 0,5 mL de volume nos tubos e o material foi fixado com a adição de 5 mL de solução fixadora de Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético) e armazenado em geladeira.

Para a confecção das lâminas, o material foi centrifugado a 1000 rpm. A suspensão celular foi gotejada em uma lâmina pré-lavada e coberta por um filme de água destilada a 4°C. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por, aproximadamente, 10 minutos.

Foram contabilizadas 1.000 células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração, por réplica, totalizando 3.000 células por tratamento. Foram observadas células binucleadas normais e células binucleadas portadoras de micronúcleo, ponte e/ou broto nucleares (Figura 3) (FENECH et al., 2003).

A análise de significância dos resultados foi feita pelo teste estatístico ANOVA: um critério/*Dunnett* ($p < 0,001$).

3. Resultados

3.4. Ensaio do cometa

Para o desenvolvimento do protocolo do ensaio do cometa, é necessário que se realize, previamente, um teste de viabilidade celular com todas as amostras a serem

avaliadas, para que se possa utilizar nas análises de genotoxicidade concentrações amostrais que apresentem uma viabilidade celular superior a 80%. O teste de viabilidade é desenvolvido com uma pequena amostra de células, obtidas de uma suspensão celular, submetida à coloração em Azul de Trypan. Neste teste, foram consideradas células inviáveis (mortas) aquelas que incorporaram o corante e, viáveis (vivas) as que excluíram o azul de tripan.

Neste estudo foi observado que todos os tratamentos apresentaram valores acima de 80% de viabilidade para ambas as coletas, novembro/2011 e março/2012 (Tabela 1 e 2).

No ensaio do cometa, nenhuma das amostras de água e efluente coletadas em novembro/2011 e março/2012, apresentaram indícios de genotoxicidade, quando comparadas com os resultados obtidos para o controle negativo (Tabela 1 e 2).

3.5. Teste do MN

Os resultados do teste do MN indicaram mutagenicidade somente para o P2 – efluente bruto, para as três coletas realizadas em 2011 (Tabelas 3, 4 e 5).

Para a coleta realizada em julho/2011, a frequência de broto nuclear foi significativa para P2, P5 e P6. A frequência de pontes nucleares foi significativa somente para o P2 (Tabela 4).

3.6. Análises Físico-químicas e Químicas

Foram analisados diversos parâmetros físico-químicos e químicos das amostras coletadas na área de influência de uma refinaria de Paulínia-SP, tais como pH, condutividade, temperatura, sólidos sedimentáveis, sólidos solúveis e em suspensão, material volátil, turbidez, oxigênio dissolvido (OD), demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), cloretos, amônia, nitrito, nitrato, sulfetos, óleos e graxas e fenóis (Tabelas 6, 8, 10) . Além desses parâmetros, foram determinados alguns metais como arsênio, selênio, mercúrio, alumínio, bário, cálcio, ferro, potássio, magnésio, sódio, fósforo silício e estrôncio (Tabelas 7, 9 e 11).

Nas nossas análises físico-químicas foi observado que houve um aumento da condutividade nos efluentes da refinaria, principalmente no P3, provavelmente devido ao excesso de cloretos e de sais presente neste efluente (Tabelas 6, 8, 10). Esses valores elevados não interferiram na condutividade do rio Atibaia, pois o P6 (localizado a

jusante do lançamento de efluente), ponto onde ocorre a dispersão total dos componentes do efluente, não apresentou valores discordantes com os propostos pela legislação brasileira.

O rio Jaguari apresentou valores fora do permitido pela resolução do CONAMA 357/2005 que é estabelecido como maior de 5 mg de O₂/L para a coleta realizada em julho/2011 (OD = 3,47 mg/L). No entanto, mesmo atendendo os valores estabelecidos pela legislação ambiental os demais pontos apresentaram uma diminuição nos valores desse parâmetro quando comparados com as coletas de maio/2011 e novembro/2011, provavelmente decorrentes da alta intensidade de chuva do período, exceto o P7 (Tabela 7).

Pelas nossas análises, podemos observar que o efluente bruto apresentou valores elevados de DQO para todas as coletas. No entanto, com o processo de tratamento de efluente os valores encontrados para P3 e P4 diminuíram consideravelmente (Tabelas 6, 8, 10). Já a análise de DBO, apresentou valores acima do aceitável pela legislação, ou seja, valores que ultrapassaram os níveis de 5 mg/L para rios de classe 2 e 10 mg/L para rios de classe 4, para o P1 na coleta de maio/2011 e para P1, P5 e P6 para as coletas realizadas em Julho/2011 e Novembro/2011 (Tabelas 6, 8, 10).

Pela avaliação química do efluente da refinaria, foi possível observar que a quantidade de cloreto encontrada nas amostras se enquadram na legislação do CONAMA 357/05 para todos os pontos. No entanto, as amostras de efluentes (P2, P3 e P4) apresentaram níveis elevados em todas as coletas, mas, houve uma dispersão adequada destes íons no rio, o que leva a índices mais reduzidos nos pontos localizados abaixo do descarte da refinaria (Tabelas 6, 8, 10).

Os compostos amônia, nitrito e nitrato são considerados fontes de nitrogênio e são medidos para avaliar a qualidade das águas. Nesse estudo, todos os pontos atenderam a legislação ambiental, quanto a estes parâmetros. Além disso, os sulfetos também foram quantificados dentro dos níveis aceitáveis pela legislação brasileira (Tabelas 6, 8, 10).

Além disso, foi realizada nesse estudo a quantificação dos metais considerados extremamente tóxicos a saúde humana. A quantidade de arsênio, selênio, mercúrio, alumínio, bário, ferro e fósforo são determinados pela legislação ambiental como aceitável de acordo com o tipo de águas. Em nossas análises, o arsênio, selênio, mercúrio, alumínio e bário estão dentro do limite estabelecido pela resolução do CONAMA 357/2005 para todas as amostras.

Já o ferro mostrou-se fora dos níveis aceitáveis pela legislação para as amostras coletadas no rio Jaguari em todas as coletas. E os níveis de fósforo apresentaram valores elevados para os pontos: P1 e P6 na coleta de maio/2011; e P1, P5 e P6 nas coletas de julho/2011 e novembro/2011 (Tabelas 7, 9 e 11).

Tabela 1. Resultados do ensaio do cometa com células CHO-K1 após exposição de 3 horas às diferentes amostras de água do entorno e do efluente da refinaria, realizada em novembro de 2011

Tratamento	Células analisadas	Danos			Score	Viabilidade Celular (%)
		classe 0	classe 1	classe 2	classe 3	
CN	302	99,33±651	6,67±4,51	3,00±2,00	0,00±0,00	12,67±8,50 98,71
CP	200	0,00±0,00	15,33±18,58	32,33±28,75	19,00±17,69	137,00±120,24* 99,50
P1	300	94,00±3,00	4,67±2,52	1,00±0,00	0,33±0,58	7,67±4,04 97,84
P2	300	85,33±5,77	9,67±4,16	3,33±1,53	1,67±0,58	21,33±8,14 97,76
P3	300	90,33±3,79	8,00±1,73	1,33±1,53	0,33±0,58	7,67±4,04 97,74
P4	300	85,00±3,46	11,67±0,58	2,33±2,31	1,00±1,00	19,33±7,57 98,80
P5	300	81,67±6,66	13,00±3,61	4,67±2,52	0,67±0,58	24,33±10,26 98,92
P6	300	83,67±6,11	12,33±6,11	3,00±1,00	1,00±1,00	21,33±6,51 97,92
P7	300	89,67±3,51	8,33±4,04	2,00±1,00	0,00±0,00	12,33±3,21 98,33

*estatisticamente significativo $p < 0,05$ (ANOVA: um critério/Dunnnett)

Tabela 2. Resultados do ensaio do cometa com células CHO-K1 após exposição de 3 horas às diferentes amostras de água do entorno e do efluente da refinaria, realizada em março de 2012

Tratamento	Células analisadas	Danos			Score	Viabilidade Celular (%)
		classe 0	classe 1	classe 2	classe 3	
CN	300	94,67±3,79	4,67±3,21	0,67±1,15	0,00±0,00	99,28
CP	300	0,00±0,00	0,67±1,15	19,33±4,04	80,00±5,20	97,90
P1	300	89,00±5,20	10,00±4,36	1,00±1,00	0,00±0,00	98,50
P2	300	88,67±6,66	11,33±6,66	0,00±0,00	0,00±0,00	97,91
P3	300	92,67±5,69	6,00±5,57	0,67±0,58	0,67±0,58	98,77
P4	300	84,00±7,55	15,00±7,55	1,00±0,00	0,00±0,00	99,26
P5	300	87,33±6,66	12,33±6,35	0,33±0,58	0,00±0,00	99,46
P6	300	91,67±3,51	8,00±4,00	0,00±0,00	0,33±0,58	98,67
P7	300	88,33±5,03	11,67±5,03	0,00±0,00	0,00±0,00	99,28

*estatisticamente significativo $p < 0,05$ (ANOVA: um critério/Dunnnett)

Tabela 3. Resultados do teste do MN com células CHO-K1 expostas por 3 horas a diferentes amostras de água do entorno e do efluente da refinaria coletadas em maio de 2011.

Tratamentos	Frequência de MN	Média±DP MN	Frequência de Broto	Média±DP Broto	Frequência de Ponte	Média±DP Ponte
CN	1,39	14,00±1,00	0,93	9,33±3,51	1,32	13,33±6,81
CP	8,70	87,00±8,72*	11,93	119,33±7,64*	11,03	110,33±25,32*
P1	2,57	25,67±2,89	0,97	9,67±3,05	1,90	19,00±1,00
P2	4,83	48,33±3,79*	3,67	36,67±0,58*	2,30	23,00±1,73
P3	2,26	29,33±11,85	1,43	14,33±7,57	2,86	28,67±8,50
P4	2,17	21,67±3,05	1,60	15,33±3,21	1,93	19,33±3,79
P5	3,80	38,00±4,36	1,80	18,00±6,56	3,00	30,00±5,29
P6	3,50	35,00±3,00	2,40	24,00±5,20	2,63	26,33±4,04
P7	2,37	23,67±2,31	1,50	15,00±6,24	1,30	13,00±2,65

*estatisticamente significativo (p<0.001)

Tabela 4. Resultados do teste do MN com células CHO-K1 expostas por 3 horas á diferentes amostras de água do entorno e do efluente da refinaria coletadas em julho de 2011.

Tratamentos	Frequência de MN	Média±DP MN	Frequência de Broto	Média±DP Broto	Frequência de Ponte	Média±DP Ponte
CN	1,70	17,00±3,61	1,33	13,33±4,16	1,23	12,33±1,53
CP	15,37	150,36±23,07*	9,23	92,33±9,29*	4,00	40,00±3,46*
P1	2,90	29,00±2,00	1,53	15,33±4,04	2,96	17,00±2,65
P2	5,95	59,67±3,51*	4,25	42,67±12,22*	1,70	29,67±4,04*
P3	2,30	23,00±7,81	1,70	17,00±3,46	0,90	9,00±2,65
P4	2,60	26,00±4,36	1,23	12,33±0,60	0,60	6,00±2,65
P5	3,47	34,67±7,77	2,57	25,67±4,04*	1,87	18,67±2,52
P6	3,97	39,67±3,05	2,27	22,67±2,08*	2,33	23,33±6,43
P7	3,19	32,00±5,29	2,19	22,00±7,21	1,79	18,00±5,20

*estatisticamente significativo (p<0.001)

Tabela 5. Resultados do teste do MN com células CHO-K1 expostas por 3 horas á diferentes amostras de água do entorno e do efluente da refinaria coletadas em novembro de 2011.

Tratamentos	Frequência de MN	Média±DP MN	Frequência de Broto	Média±DP Broto	Frequência de Ponte	Média±DP Ponte
CN	0,97	9,67±2,89	0,57	5,67±4,62	0,70	7,00±1,73
CP	15,77	157,67±17,01*	8,00	80,00±14,11*	3,67	36,67±8,33*
P1	0,93	9,33±1,15	0,63	6,33±0,58	1,00	10,00±3,00
P2	3,23	32,33±1,53*	1,23	12,33±5,91	2,47	24,67±8,08
P3	1,47	18,00±2,65	0,77	7,67±0,58	1,57	15,67±2,89
P4	2,10	21,00±3,61	0,83	8,33±2,08	1,30	13,00±1,00
P5	2,33	23,33±4,16	0,77	7,67±2,52	2,00	20,00±2,00
P6	1,80	18,00±1,00	0,80	8,00±1,00	1,27	12,70±3,06
P7	1,90	19,00±3,00	1,37	13,67±1,15	1,83	18,33±4,73

* estatisticamente significativo (p<0.001)

Tabela 6. Resultados das análises físicas e químicas das amostras de água e efluente da refinaria coletadas em maio/2011.

	Unidades	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
pH	-	7,60	7,46	7,90	7,90	7,56	7,68	6,71
Condutividade	uS/cm	100,90	2400,00	1960,00	1770,00	256,50	257,50	0,179
Temperatura	°C	20	30	29	26	20	20	22,21
Sólidos sedimentáveis	mL/L	<0,1	1,90	0,10	<0,1	<0,1	0,20	-
Sólidos solúveis e em suspensão	g/L	0,1340	19,660	14,400	12,720	0,1800	0,1200	-
Material volátil	g/L	0,0740	0,6740	0,4540	0,3880	0,0760	0,1160	-
Turbidez	NTU	19,48	25,85	20,70	17,65	25,63	23,58	4,3
Oxigênio Dissolvido	mg/L	10,14	5,34	9,36	7,96	9,16	8,53	6,78
DQO	mg/L	8,32	552,00	110,40	128,80	9,36	11,44	-
DBO	mg/L	6,50	484,00	31,20	32,30	8,50	10,00	-
Cloretos	mg/L	5,9	565,46	467,12	381,07	14,75	17,7	-
Amônia	mg/L	1,26	37,15	0,69	1,50	2,24	2,53	-
Nitrito	mg/L	0,1293	**	0,0135	0,1620	0,1796	0,1851	-
Nitrato	mg/L	1,3750	13,3841	3,5103	2,5844	1,4674	1,5174	-
Sulfetos	µg/L	6,00	370,00	8,00	10,00	5,00	8,00	-
Óleos e graxas	mg/L	-	-	-	1,80	2,20	1,00	-
Fenóis	µg/mL	-	-	-	*	*	*	-

(*)valores abaixo do nível de detecção

(-) amostra não analisada

Tabela 7. Resultados dos metais encontrados nas amostras de água e efluente da refinaria coletadas em maio/2011

	Unidades	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Arsênio	µg/L	< 2	11,3 ± 0,5	6,1 ± 0,5	5,5 ± 0,2	< 2	< 2	<2
Selênio	µg/L	< 5	50,7 ± 0,6	17,6 ± 0,7	12,4 ± 0,4	< 5	< 5	<5
Mercúrio	µg/L	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	<1
Alumínio	mg/L	< 0,025	< 0,025	0,058	0,18	0,067	0,055	-
Bário	mg/L	0,045	0,23	0,52	0,60	0,058	0,083	-
Cálcio	mg/L	5,64	30,1	28,9	30,9	6,63	8,02	-
Ferro	mg/L	0,32	0,090	0,12	0,94	0,79	0,89	-
Potássio	mg/L	3,62	12,5	11,1	12,4	5,43	5,50	-
Magnésio	mg/L	1,96	11,0	11,2	11,6	1,96	2,15	-
Sódio	mg/L	10,8	468	502	521	52,3	59,90	-
Fósforo	mg/L	0,11	0,69	0,60	0,57	< 0,10	0,13	-
Silício	mg/L	6,10	9,47	14,9	14,8	6,65	6,38	-
Estrôncio	mg/L	0,058	2,15	2,10	2,32	0,063	0,130	-

(-) amostra não analisada

Tabela 8. Resultados das análises físicas e químicas das amostras de água e efluente da refinaria coletadas em Julho/2011.

	Unidades	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Coliformes totais	UFC/mL	0,80 x10 ³	300,00 x10 ³	9,00 x10 ³	22,00 x10 ³	13,00 x10 ³	4,00 x10 ³	-
Coliformes termotolerantes	UFC/mL	2,60 x10 ³	80,00 x10 ³	0,23 x10 ³	1,30 x10 ³	17,00 x10 ³	8,00 x10 ³	-
pH		7,99	7,77	8,32	8,47	8,10	7,89	6,34
Condutividade	uS/cm	110,6	2430,0	2440,0	2630,0	340,3	358,1	0,160
Temperatura	°C	18	25	25	21	18	18	18,54
Sólidos sedimentáveis	mL/L	<0,1	0,30	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	-
Sólidos solúveis e em suspensão	g/L	0,3920	21,540	17,720	18,120	0,4100	0,3960	-
Material volátil	g/L	0,3160	0,4940	0,4260	0,2500	0,0840	0,1300	-
Turbidez	NTU	19,48	25,85	20,70	17,65	25,63	23,58	13,8
Oxigênio Dissolvido	mg/L	3,47	2,68	2,92	2,72	3,54	3,28	5,39
DQO	mg/L	17,92	1408,00	140,80	105,60	22,4	29,12	-
DBO	mg/L	12,20	1300,00	33,30	28,00	14,70	20,40	-
Cloretos	mg/L	7,87	540,87	540,87	614,63	17,70	21,64	-
Amônia	mg/L	0,77	22,60	2,88	3,22	1,95	2,21	-
Nitrito	mg/L	0,1636	0,0487	0,0742	0,0375	0,2035	0,2043	-
Nitrato	mg/L	1,9650	11,7663	3,7110	3,5041	2,1734	2,2008	-
Sulfetos	µg/L	10,00	290,00	15,00	28,00	25,00	21,00	-
Óleos e graxas	mg/L	-	-	-	2,30	3,70	1,10	-
Fenóis	µg/mL	-	-	-	*	*	*	-

(*) valores abaixo do nível de detecção

(-) amostra não analisada

Tabela 9. Resultados dos metais encontrados nas amostras de água e efluente da refinaria coletadas em Julho/2011

	Unidades	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Arsênio	µg/L	3,3 ± 0,5	9,6 ± 0,5	14,5 ± 0,6	9,1 ± 0,1	3,9 ± 0,2	3,5 ± 0,3	<2
Selênio	µg/L	< 5	11,4 ± 0,5	16 ± 1,0	11,8 ± 0,2	< 5	< 5	<5
Mercurio	µg/L	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	<1
Alumínio	mg/L	0,039	< 0,025	0,200	0,17	0,056	0,082	-
Bário	mg/L	0,051	0,24	0,56	0,66	0,077	0,069	-
Cálcio	mg/L	6,01	30,3	29,1	32,4	7,11	7,40	-
Ferro	mg/L	0,35	0,14	0,64	1,01	0,85	0,87	-
Potássio	mg/L	3,83	13,4	12,8	14,3	5,76	5,84	-
Magnésio	mg/L	2,18	11,3	10,4	11,7	2,10	2,26	-
Sódio	mg/L	11,30	473	488	523	53,6	60,20	-
Fósforo	mg/L	0,12	0,68	0,72	0,60	0,11	0,12	-
Silício	mg/L	7,17	9,31	15,6	15,8	6,77	7,11	-
Estrôncio	mg/L	0,061	2,11	2,17	2,42	0,068	0,092	-

(*) valores abaixo do nível de detecção

(-) amostra não analisada

Tabela 10. Resultados das análises físicas e químicas das amostras de água e efluente da refinaria coletadas em Novembro/2011.

	Unidades	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
pH	-	7,52	7,4	8,05	8,63	7,87	7,61	6,44
Condutividade	uS/cm	101,5	1919	1985	1976	186,1	159,0	0,317
Temperatura	°C	23	23	29	28	23	29	24
Sólidos sedimentáveis	mL/L	0,40	0,10	<0,1	0,10	0,10	0,20	-
Sólidos solúveis e em suspensão	g/L	0,3280	15,620	13,460	14,780	0,2320	0,2340	-
Material volátil	g/L	0,2180	0,4120	0,3240	0,3060	0,1580	0,0460	-
Turbidez	NTU	49,0	80,0	48,0	39,0	80,0	80,0	3,8
Oxigênio Dissolvido	mg/L	6,23	0,48	5,34	10,63	6,08	6,08	14,02
DQO	mg/L	24,96	1568,00	196,00	235,20	26,00	20,80	-
DBO	mg/L	18,50	1364,00	33,50	29,10	15,30	18,30	-
Cloretos	mg/L	4,94	457,12	37,06	382,99	4,94	10,87	-
Amônia	mg/L	0,69	27,10	34,60	13,47	0,77	0,77	-
Nitrato	mg/L	0,2075	0,0000	0,2266	27,887	0,2338	0,2450	-
Nitrato	mg/L	1,5883	0,7328	11,1321	2,9264	5,6039	0,8829	-
Sulfetos	µg/L	0,032	0,178	0,029	0,021	0,023	0,030	-
Óleos e graxas	mg/L	-	-	-	2,1	3,2	2,9	-
Fenóis	µg/mL	*	*	0,00	0,00	0,00	*	-

(*) valores abaixo do nível de detecção

(-) amostra não analisada

Tabela 11. Resultados dos metais encontrados nas amostras de água e efluente da refinaria coletadas em Novembro/2011

	Unidades	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Alumínio	mg/L	0,082	0,250	0,200	0,230	0,140	0,160	-
Bário	mg/L	0,063	0,260	0,360	0,450	0,061	0,090	-
Cálcio	mg/L	6,82	31,00	28,6	30,7	6,80	8,06	-
Ferro	mg/L	0,320	0,380	0,470	0,820	0,760	0,890	-
Potássio	mg/L	3,96	13,00	11,7	13,00	6,14	6,19	-
Magnésio	mg/L	2,02	11,30	9,3	10,5	2,03	2,26	-
Sódio	mg/L	10,6	506,00	468	503	51,20	58,3	-
Fósforo	mg/L	0,120	0,510	0,560	0,560	0,110	0,140	-
Silício	mg/L	4,8	9,66	6,33	7,4	4,89	5,15	-
Estrôncio	mg/L	0,092	2,190	2,090	2,32	0,065	0,130	-

(-)-amostra não analisada

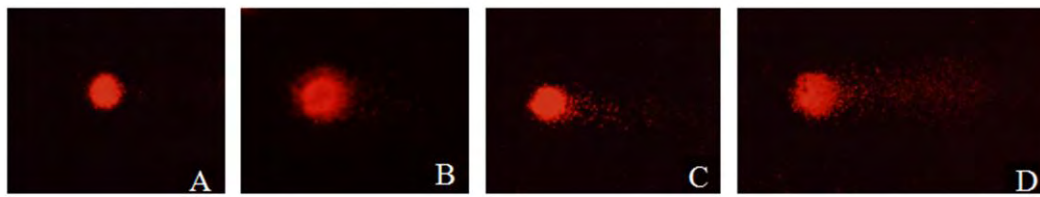


Figura2. A: classe 0; B: classe 1; C: classe 2; D: classe 3.

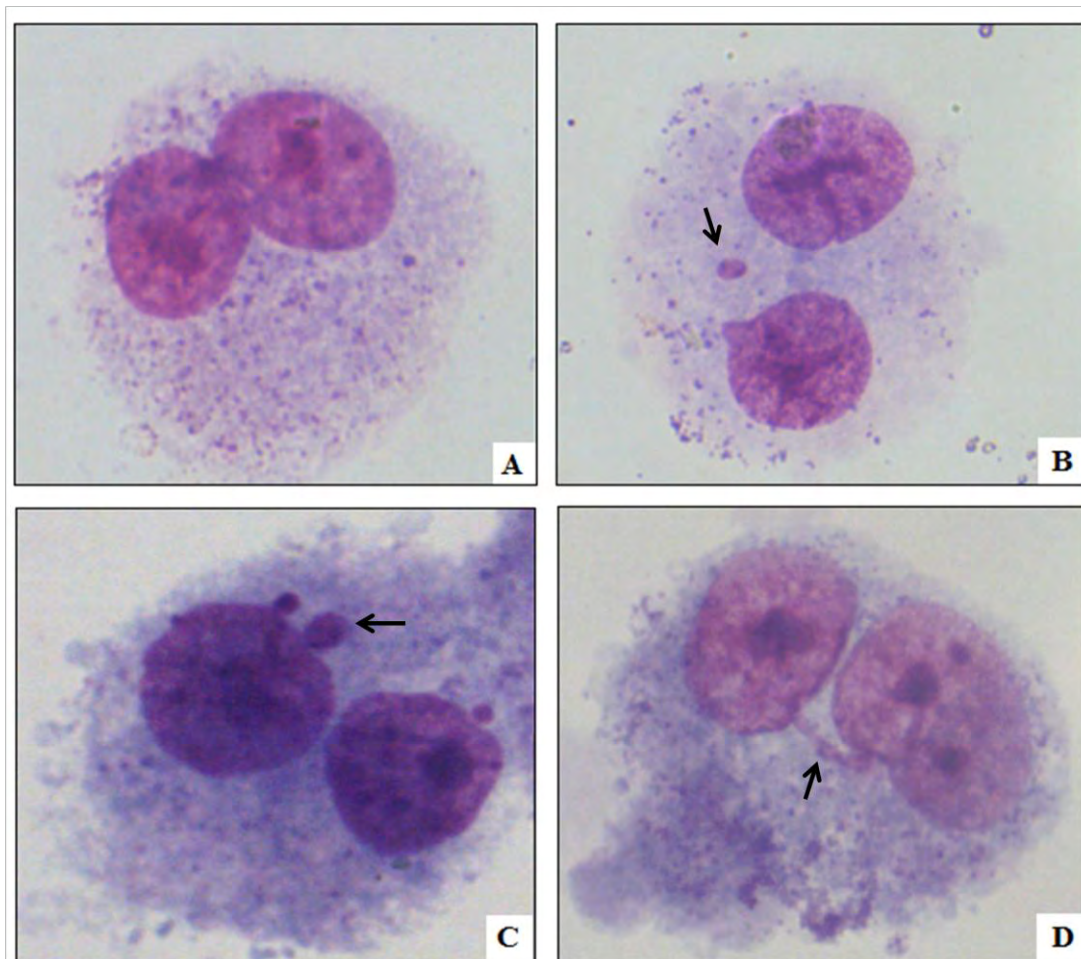


Figura 3. A) Célula binucleada; B) Célula binucleada com MN; C) Célula binucleada com broto nuclear; D) Célula binucleada com ponte entre os núcleos.

4. Discussão

O uso de biomarcadores tem sido cada vez mais indicado para estudos de avaliações de efeitos de agentes poluidores, por permitirem uma detecção previa da poluição (van der OOST et al., 200; LEMOS et al., 2007; HOSHINA et al, 2008).

Com o controle cada vez mais rigoroso do uso de animais de laboratório em experimentos biológicos, tornou-se necessário o desenvolvimento e a padronização de testes *in vitro* que pudessem detectar a toxicidade das substâncias químicas (ROGERO et al., 2003). A utilização de testes *in vitro*, além de não esbarrar em fatores éticos, leva a uma diminuição do número de animais experimentais utilizados na pesquisa, uma redução nos custos operacionais e de infra-estrutura. Segundo RABELLO-GAY et al. (1991), estudos realizados com sistemas *in vitro* têm ganhado destaque dentre os sistemas testes por fornecerem condições experimentais controláveis como a disponibilidade e reprodutibilidade e a fácil obtenção dos resultados.

Dentre os mamíferos, células de roedores (CHO-K1, V79, linfócitos) e células humanas (linfócitos, hepatócitos, HepG2) são indicadas para a análise de danos no DNA, decorrentes de ação de agentes químicos, sendo, por isto, amplamente utilizadas em avaliações de poluentes ambientais. Dentre as células de mamíferos, as células CHO-K1 (Chinese *Hamster* Ovary Chinês) são muito usadas para a análise da indução de danos no DNA. A vantagem em utilizar essas células está na facilidade de crescimento em cultura e ciclo celular relativamente curto (10 a 14 horas) (PRESTON et al., 1987).

Estudos desenvolvidos já em 1984 por Brown e Donelly citam que águas residuais de refinaria de petróleo podem conter diversas substâncias químicas com potencialidades tóxicas, tais como graxas e óleos, fenóis, cresóis, xilenos, sulfitos, amônia, sólidos em suspensão cianetos, compostos nitrogenados e metais como cromo, ferro, níquel, cobre, molibdênio, selênio, vanádio e zinco. Segundo Krishnamurthi et al. (2007), o lodo gerado pela atividade da refinaria de petróleo e de indústrias petroquímicas podem conter composto tóxicos como os HPA. Os estudos realizados por estes autores, por meio de ensaios com cultura de células de mamíferos (CHO-K1), revelaram um potencial genotóxico para lodos gerados por este tipo de atividade industrial.

Rodrigues et al. (2010) testaram a genotoxicidade do efluente gerado por uma refinaria de petróleo, por meio de ensaios *in vivo* (teste do MN em *A. cepa*) e ensaio *in vitro* (ensaio do cometa em células HTC). Pelas análises químicas, foi

comprovada a presença de vários compostos aromáticos e orgânicos (tolueno, etilbenzeno, xileno, pireno, benzo[α]pireno e compostos fenólicos) em baixas concentrações. Os resultados encontrados por estes autores indicaram que os HPA presentes nos efluentes estudados foram incapazes de induzir formação de MN em células F_1 de *A. cepa*. No entanto, houve a indução de danos no DNA nas células HTC, que podem ter ocorrido por essas células serem metabolizadoras de compostos químicos.

No presente estudo, foram realizados ensaios *in vitro* (teste do cometa e do MN), com células CHO-K1 expostas a diversas amostras de águas de rios que estão sob a influência das atividades da refinaria de Paulínia-SP (rio Jaguari, Atibaia e Piracicaba), além de amostras coletadas ao longo do próprio sistema de tratamento da refinaria.

O teste do MN em células CHO-K1, realizado nesse estudo, mostrou que, para as três coletas realizadas no ano de 2011, o efluente bruto (P2) gerado pela refinaria de petróleo apresentou potencial mutagênico. Esta mutagenicidade foi inferida pelo aumento significativo na frequência de MN observada para os ensaios realizados com o efluente bruto para todas as coletas realizadas nesse estudo.

Muitos estudos têm associado a incidência de anormalidades nucleares (AN) aos ensaios convencionais de MN (CAVAS; ERGENE-GÖZÜRAKA, 2005). Mesmo não sendo plenamente conhecidos os mecanismos que levam a formação de AN, muitos estudos sugerem que estas alterações são induzidas em resposta a exposição de células a agentes genotóxicos (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001). Já a presença de células micronucleada é reconhecidamente indicativa de atividade aneugênica ou clastogênica, pois, de acordo com Al-Sabti e Metcalfe (1995), a formação de MN pode estar relacionada com a perda de cromossomos inteiros, pelo mau funcionamento dos fusos mitótico, ou por fragmentos cromossômicos, devido a quebras cromossômicas. Fenech et al. (2003) cita, ainda, que pode ser feita uma melhor avaliação do potencial detrimental de um agente se for contabilizada, junto com a análise de MN, a quantidade de brotos nucleares presentes em células binucleadas. Os nossos resultados mostraram um aumento significativo na frequência de anormalidades nucleares, especificamente de brotos nucleares, para os ensaios realizados com o efluente bruto (coleta de maio e julho) e para às amostras coletadas em julho/2011 no rio Atibaia (P5 e P6). Também foi observado um aumento nos níveis de pontes nucleares entre os núcleos das células binucleadas, quando as células foram expostas ao

efluente bruto coletado em julho de 2011. Segundo Fenech e Crott (2002) e Fenech et al. (2003), as pontes nucleares ocorrem quando os centrômeros dos cromossomos dicêntricos ou das cromátides são tracionados para pólos opostos durante a anáfase, evento este que pode indicar ação clatogênica de contaminantes ambientais.

Outros estudos realizados nesta mesma refinaria por Hoshina et al. (2008) mostraram que amostras de águas servidas pela refinaria (efluente bruto da refinaria) apresentaram efeitos tóxicos, causando letalidade de peixes expostos. Após a diluição da amostra, os autores encontraram ainda efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, comprovada pela presença de MN, AN e morte das células de sangue dos peixes expostos, o que sugeriu que o efluente bruto contém substâncias com atividades tóxicas, aneugênicas e/ou clastogênicas. Barros et al. (2006) avaliaram, por meio de ensaios com *Dugesia trigrina* (planária), a toxicidade do efluente desta mesma refinaria, para as mesmos locais amostrados neste trabalho. Os autores encontraram efeito tóxico, observado pela não regeneração das planárias expostas somente ao efluente bruto. Estes resultados mostraram, assim como os nossos resultados, que o tratamento realizado pela refinaria em seu efluente bruto foi eficiente para reduzir a até mesmo para eliminar os efeitos tóxicos deste efluente.

Pelas análises físico-químicas realizadas com as amostras de água e do efluente desse estudo, verificamos que o P2 apresentou diversos parâmetros com níveis elevados como cloretos, amônia, sulfetos, DQO e DBO. Além disso, o oxigênio dissolvido apresentou valores críticos. No entanto, as águas servidas da refinaria, após passar pelo sistema de tratamento de efluente, mostrou uma diminuição considerável em quase todos esses parâmetros, o que nos permitiu concluir que o efluente despejado no rio Atibaia não interfere na qualidade de suas águas.

Segundo Marinelli et al. (2000), o aumento da condutividade elétrica ao longo de um rio é evidenciado devido a presença de materiais dissolvidos e pode contribuir para o comprometimento da qualidade da água do rio. Além disso, quando os níveis de oxigênio dissolvido estão baixos há o comprometimento da qualidade da água, pois não há concentração suficiente para biodegradar a matéria orgânica (BELLANGER et al., 2004) e podem indicar eutrofização devido ao despejo de efluentes domésticos e industriais (MATHEUS; TUNDISI, 1988).

Um estudo realizado por Cardozo et al. (2006), em pequenas bacias urbanas da região metropolitana de Porto Alegre-RS, permitiu avaliar a composição química de amostras de águas destes locais. Neste estudo, foram detectadas diferentes

concentrações de clorofórmio, bromodiclorometano, tolueno, etilbenzeno, *m* e *p*-xileno e 1,4-diclorobenzeno. Foi testado o potencial tóxico destas amostras em vários sistemas biológicos. Os testes do MN realizados em células V79 mostraram que somente a amostra coletada na região de maior densidade populacional apresentou efeito genotóxico. Assim, os autores concluíram que as maiores concentrações de poluentes orgânicos e inorgânicos estão presentes nas áreas mais urbanizadas, representando um risco para a comunidade aquática e para o uso desta água em atividades humanas. Para o nosso trabalho, como os parâmetros analisados nas amostras de efluente bruto (P2) da refinaria estão fora dos limites indicados pela legislação ambiental, o que evidencia a presença de compostos tóxicos para os organismos expostos a eles, podemos sugerir que os efeitos mutagênicos observados nos testes do MN em células CHO-K1 são resultantes da presença desses contaminantes nas amostras avaliadas.

O ensaio do cometa ocorre em 3 etapas: lise celular, desnaturação do DNA e corrida eletroforética, que após a coloração, permite a visualização de fragmentos de DNA provindos da quebra causada por compostos genotóxicos. Neste estudo, as células CHO-K1 foram expostas por 3 horas as amostras testadas para em seguida serem submetidas ao processo de lise, desnaturação e eletroforese. Com a análise dos resultados, pode-se verificar que nenhuma das amostras estudadas apresentou potencial genotóxico, quando comparadas ao controle negativo. Esse fato pode ter ocorrido, pelo fato das células de ovário de *hamster* chinês não serem metabolizadores de compostos químicos. No entanto, somente o controle positivo (testado com solução aquosa de MMS) apresentou um aumento significativo nos valores relacionados ao score de danos, no qual validou o teste.

Um estudo desenvolvido por Vicente-Hubert et al. (2012), com amostras contaminadas com HPA, analisou amostras de águas coletadas no estuário do rio Sena (França), onde cada ponto foi escolhido com base em estudos anteriores sobre a distribuição de HPA neste local. No estudo realizado por esses autores foi avaliada a genotoxicidade, por meio do ensaio do cometa com a linhagem de hepatoma humano (HepG2), e pelo teste de AMES. Após a exposição por 24h aos tratamentos, foi verificado que a maioria das concentrações utilizadas no ensaio do cometa se mostraram genotóxicas para os hepatócitos humanos.

Frente ao exposto, pode-se observar que muitos estudos estão sendo realizados para comprovar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do petróleo

e seus derivados. Estes compostos estão presentes em grandes concentrações no meio ambiente, acarretando uma possível ameaça para o ecossistema e para a saúde humana. Assim, testes com linhagens celulares de mamíferos veem sendo constantemente empregados na avaliação dos efeitos tóxicos de contaminantes ambientais, cujos resultados mostram ser altamente indicados para este fim.

Os nossos dados obtidos com a análise de MN, brotos e pontes nucleares em células CHO-K1, mostram que as águas servidas da refinaria, especialmente as águas do efluente bruto, apresentam substâncias potencialmente genotóxicas e mutagênicas, comprovadas pelas alterações induzidas nestas células, após a exposição das mesmas nas amostras deste efluente. Foi observado também que as amostras dos efluentes coletadas após o tratamento realizado pela refinaria não apresentaram estes efeitos, comprovando assim a eficiência do tratamento realizado. Estes dados corroboram os estudos de Hoshina et al. (2008) e de Barros et al. (2006), onde os autores também verificaram que o efluente bruto levou a danos em outros organismos testes expostos, mas que após o tratamento da empresa para descarte do seu efluente final no rio Atibaia, este não mais apresentava qualquer efeito danos sobre os organismos expostos.

5. Agradecimentos

Agradecemos à Profa. Dejanira Francheschi de Angelis, do departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro-SP, pelo apoio geral ao trabalho e pelo auxílio constante, principalmente na realização das coletas. Ao Programa de Recursos Humanos ANP/PRH-05 da UNESP de Rio Claro-SP e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro.

6. Referências

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

AOUADENE, A.; DI GIORGIO, C.; SARRAZIN, L.; MOREAU, X.; DE JONG, L.; GARCIA, F.; THIERY, A.; BOTTA, A.; DEMEO, M. Evaluation of the Genotoxicity of River Sediments From Industrialized and Unaffected Areas Using a Battery of Short-Term Bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 49, p. 283-299, 2008.

BARROS, G. S.; ANGELIS, D. F.; FURLAN, L. T.; CORRÊA-JÚNIOR, B. Utilização de planárias da espécie *Dugesia (Girardia) tigrina* em testes de toxicidade de efluentes de refinaria de petróleo. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 1, p. 67–70, 2006.

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.*, 19 (2004), pp. 1295–1314

BROWN, K.W.; DONELLY, K. C. Mutagenic activity of runoff and leachate water from hazardous waste and land treatment. *Environ. Pollut. (Ser. A)*, v. 35, 229–246, 1984.

CARDOZO, T. R.; ROSA, D. P.; FEIDEN, I. R.; ROCHA, J. A.; DE OLIVEIRA, N. C.; PASTORIZA, T. F.; DA MOTTA, M. D.; DE LEMOS, C. T.; TERRA, N. R.; VARGAS, V. M. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutat Res.**, v. 603, n. 1, p. 83-96, 2006.

CAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜRAKA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.*, v. 74, p. 264–271, 2005.

CHEQUERA, F. M. D.; ANGELI, J. P. F.; FERRAZA, E. R. A.; TSUBOYB, M. S.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA, D. P. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research**, v. 676, p. 83–86, 2009.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol. Biotechnol.*, v. 26, p. 249–261, 2004.

DURGO, K.; OREŠCANIN, V.; LULIC, S.; KOPJAR, N.; ŽELJEŽIC, D.; COLIC, J. F. The assessment of genotoxic effects of wastewater from a fertilizer factory. **J. Appl. Toxicol.**, v. 29, p. 42–51, 2009.

FANG, Y.; YING, G.; ZHANG, L.; ZHAO, J.; SU, H.; YANG, B.; LIU, S. Use of TIE techniques to characterize industrial effluents in the Pearl River Delta region. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 143–152, 2012.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutat. Res.**, 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.

GUO, Y.; WU, K.; HUO, X.; XU, X. Sources, distribution, and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. **J Environ Health.**, v. 73, n. 9, p. 22-5, 2011.

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

KIM, E. H.; JUN, Y. R.; JO, H. J.; SHIM, S. B.; JUNG, J. H. Toxicity identification in metal plating effluent: implications in establishing effluent discharge limits using bioassays in Korea. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 57, p. 637–644, 2008.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE JR., M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLS, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Mutat. Res.**, v. 540, p. 153–163, 2003.

KOBAYASHI, H. *et al.*; A. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun.**, v.3, p.103-115, 1995.

KRISHNAMURTHI, K.; DEVI, S. S.; CHAKRABARTI, T. The Genotoxicity of Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Containing Sludge Samples. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2007.

LAGERQVISTA, A.; HÅKANSSONA, D.; LUNDINB, C.; PROCHAZKAB, G.; DREIJC, K.; SEGERBÄCKB, D.; JERNSTRÖMC, B.; TÖRNQVISTD, M.; FRANKE, H.; SEIDEL, A.; ERIXONA, K.; JENSSENA, D. DNA repair and replication influence the number of mutations per adduct of polycyclic aromatic hydrocarbons in mammalian cells. **DNA Repair**, v. 10, p. 877– 886, 2011.

LEMOES, C. T.; RÖDEL, P. M.; TERRA, N. R.; OLIVEIRA, N. C. D.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using the micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotox. Environ. Saf.**, v. 66, p. 391–401, 2007.

MARABINI, L.; FRIGERIO, S.; CHIESARA, E.; MAFFEI, F.; FORTI, G. C.; HRELIA, P.; BUSCHINI, A.; MARTINO, A.; POLI, P.; ROSSI, C.; RADICE, S. *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity of chlorinated drinking waters sampled along the

distribution system of two municipal networks. **Mutation Research**, v. 634, p. 1–13, 2007.

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.

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

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

PARK, S.; LEE, S.; YE, S.; YOON, S.; CHUNG, M.; CHOI, J. Benzo[a]pyrene-induced DNA damage and p53 modulation in human hepatoma HepG2 cells for the identification of potential biomarkers for PAH monitoring and risk assessment. **Toxicology Letters**, v. 167, p. 27–33, 2006.

RABELLO-GAY, M.; RODRIGUES, M.A.R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991.

RAJAGURU, P.; SUBA, S.; PALANIVEL, M.; KALAISELVI, K. Genotoxicity of a Polluted River System Measured Using the Alkaline Comet Assay on Fish and Earthworm Tissues. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, p. 85–91, 2003.

REIFFERSCHIED, G.; ZIEMANN, C.; FIEBLINGER, D.; DILL, F.; GMINSKI, R.; GRUMMTE, H.; HAFNER, C.; HOLLERT, H.; KUNZ, S.; RODRIGO, G.; STOPPER, H.; SELKE, D. Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the *in vitro* micronucleus test—Results of a round-robin study in the context of standardisation according to ISO. **Mutation Research**, v. 649, p. 15–27, 2008.

RODRIGUES, F. P.; ANGELI, J. P.; MANTOVANI, M. S.; GUEDES, C. L.; JORDÃO, B. Q. Genotoxic evaluation of an industrial effluent from an oil refinery using plant and animal bioassays. **Genet Mol Biol.**, v. 33, n. 1, p. 169–75, 2010.

SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatine buds are related genotoxic events. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 38, p. 38–45, 2001.

TSUBOY, M. S.; ANGELI, J. P. F.; MANTOVANI, M. S.; KNASMULLER, S.; UMBUZEIRO, G. A.; RIBEIRO, L. R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1650–1655, 2007.

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

VINCENT-HUBERT, F.; HEAS-MOISAN, K.; MUNSCHY, C.; TRONCZYNSKI, J. Mutagenicity and genotoxicity of suspended particulate matter in the Seine river estuary. **Mutat Res.**, v. 741, n. 1-2, p. 7-12, 2012.

6. Conclusão Geral

Os resultados obtidos neste estudo, por meio dos ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade realizados com os bioindicadores *Allium cepa* e células CHO-K1, com amostras das águas dos rios Jaguari-SP, Atiabaia-SP, Piracicaba-SP, bem como dos efluentes gerados pela refinaria de Paulínia-SP, permitem inferir que:

- as análises realizadas em células meristemáticas e em células F₁ de *A. cepa* mostraram-se sensíveis para avaliar os efeitos dos contaminantes presentes, tanto no efluente bruto como nas águas dos rios estudados neste trabalho.;
- 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 excelentes ferramentas para a avaliação de danos no DNA induzidos por contaminantes ambientais;
- algumas amostras dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba apresentaram potencial genotóxico e/ou mutagênico, fato este que pode ter ocorrido devido ao lançamento de substâncias tóxicas provenientes de outras fontes antropogênicas, quando avaliados em células meristemáticas e F₁ de *A. cepa*. Esta conclusão está baseada nos ensaios realizados com o efluente lançado pela refinaria no rio Atibaia, que não induziram potencial genotóxico e/ou mutagênico no organismo testado;
- o teste do MN com bloqueio de citocinese em células CHO-K1 mantidas em cultura representa um ensaio fácil e sensível para avaliação da mutagenicidade de amostras ambientais.
- o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese em células CHO-K1 foi sensível para avaliar os efeitos da exposição do efluente bruto gerado pela refinaria de petróleo, indicando que essa amostra continha contaminantes potencialmente mutagênicos em todas as coletas realizadas;
- pelo ensaio do cometa, realizado em células CHO-K1, não foi diagnosticado efeito genotóxico para as amostras de água e de efluente estudadas. Este ensaio tem respondido de forma eficiente para diagnóstico de comprometimento ambiental, sendo, por isso, considerado uma ferramenta adequada para se avaliar impactos ambientais;
- o tratamento de efluente da refinaria se mostrou eficiente, pois em nenhuma das coletas realizadas no P4 (efluente final que é lançado no rio Atibaia) foi observado

indicativos da presença de compostos genotóxicos e mutagênicos, certificados pelos testes realizados com *A. cepa* e com cultura de células – CHO-K1;

- pelas análises físico-químicas e químicas das amostras, também foi observado que o efluente bruto apresentou quase todos os parâmetros estudados fora dos padrões estabelecidos pela legislação federal. No entanto, após os tratamentos biológicos, físico-químico e por lagoa de estabilização, observamos que os índices anteriormente fora da legislação se enquadraram em níveis aceitáveis, comprovando a eficácia do sistema de tratamento adotado pela refinaria de Paulínia-SP;

- os rios Jaguari e Atibaia apresentaram altos níveis de DQO e DBO. Além disso, o rio Atibaia mostrou também alta condutividade. A partir desses resultados, podemos sugerir que ambos os rios estão recebendo resíduos domésticos e industriais, que estão comprometendo a qualidade desses corpos d'água;

7. Referências Bibliográficas

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Programme on Chemical Safety – IPCS. **Selected petroleum products**, Geneva, 1982 (Environmental Health Criteria, v.20).

AARDEMA, M. J.; ALBERTINI, S.; ARNI, P.; HENDERSON, L. M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; MACKAY, J. M.; SARRIF, A. M.; STRINGER, D. A.; TAALMAN, R. D. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. **Mutat. Res.**, v. 410, p. 3–79, 1998.

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

ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J., Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, v.560, p.57–67, 2004.

AOUADENE, A.; DI GIORGIO, C.; SARRAZIN, L. MOREAU, X.; DE JONG, L.; GARCIA, F.; THIERY, A.; BOTTA, A.; DE MEO, M. Evaluation of the Genotoxicity of River Sediments From Industrialized and Unaffected Areas Using a Battery of Short-Term Bioassays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 49, p. 283-299, 2008.

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

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

BAULIG, A.; GARLATTI, M.; BONVALLOT, V.; MARCHAND, A.; BAROUKI, R.; MARANO, F.; BAEZA-SQUIBAN, A. Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 285, p. L671–679, 2005.

BÉKAERT, C.; RAST, C.; FERRIER, V.; BISPO, A.; JOURDAIN, M. J.; VASSEUR, P. Use of *in vitro* (Ames and Mutatox tests) and *in vivo* (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from a contaminated soil. **Geochemistry**, v. 30, p. 953-962, 1999.

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. *Ecotoxicol Environ Saf.*, v. 74, n. 4, p. 826-33, 2011.

BIHARI, N.; FAFANDEL, M.; HAMER, B.; KRALJ-BILEN, B. PAH content, toxicity and genotoxicity of coastal marine sediments from the Rovinj area, Northern Adriatic, Croatia. **Science of the Total Environment**, v. 366, p. 602–611, 2006.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGSCIUTTO, A.; GIERI, P.; PAMPANIN, D. M.; Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, v.78, p.93–98, 2006.

BRIEDE, J. J.; GODSCHALK, R. W.; EMANS, M. T.; DE KOK, T. M.; VAN AGEN, E.; VAN MAANEN, J.; VAN SCHOOTEN, F. J.; KLEINJANS, J. C. In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo[a]pyrene metabolism. **Free Radic. Res.**, v. 38, 995–1002, 2005.

BYERS, W.; DOERR, W.; KRISHNAN, R.; PETERS, D. How to Implement Industrial Water Reuse. A Systematic Approach, v. 1AIChE, 1995.

CABARAVDIC, M. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of cells to benzo(a) pyrene. *Med Arh.*, v. 64, n. 4, p. 215-8, 2010.

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

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.

CARTER, S. B. Effects of cytochalasins on mammalian cells. **Nature**, v. 213, p. 261–264, 1967.

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

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

CHANDRA, S.; CHAUHAN, L. K.; MURTHY, R. C.; SAXENA, P. N.; PANDE, P. N.; GUPTA, S. K.; Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of the Total Environment**, v.347, p.46–52, 2005.

CHAUHAN, L. K. S.; SAVENA, P. M.; GUPTA, S. K.. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cell of *A. cepa*. *Environ. Exp. Bot.*, v. 42, p. 181–189, 1999.

CHENG, J.; LENG, S.; NIU, Y.; DUAN, H. Different change of olive tail moment and cytokinesis-block micronucleus frequency of the cells of 4 kinds treated with polycyclic aromatic hydrocarbon. **Wei Sheng Yan Jiu.**, v. 37, n. 3, p. 273-6, 2008.

COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n, 3, p. 249-61, 2004.

DEGUCHI, Y.; TOYOIZUMI, T.; MASUDA, S.; YASUHARA, A.; MOHRI, S.; YAMADA, M.; INOUE, Y.; KINAE, N.; Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. **Mutation Research**, v.627, p.178–185, 2007.

DIAMOND, M. L.; GINGRICH, S. E.; FERTUCK, K.; McCARRY, B. E.; STERN, G. A. Evidence for organic film on an impervious urban surface: Characterization and potential teratogenic effects. **Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 2900-2908, 2000.

DiPAOLO, J. A.; DeMARINIS, A. J.; EVANS, C. H.; DONIGER, J. Expression of initiated and promoted stages of irradiation carcinogenesis *in vitro*. **Cancer Letters**, v. 14, p. 243-249, 1981.

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

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

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

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. **Cytobios**, v. 43, p. 233–246, 1985.

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

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.

FENG, S.; MAI, B.; WEI, G.; WANG, X. Genotoxicity of the sediments collected from Pearl River in China and their polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals. **Environ Monit Assess.**, 2011.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A.. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pest. Biochem. Physiol.*, v. 88, p. 252–259, 2007.

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

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v. 681, p. 80–92, 2009.

GRANT, W. F.; Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency. Gene-Tox program. **Mutation Research**, v.99, p.273-291, 1982.

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

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

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P.; Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v.169, p.1–15, 2009.

HE, J. L.; CHEN, W. L.; JIN, L. F.; JIN, H. Y. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. **Mutation Research**, v. 469, p. 223–231, 2000.

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

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

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

International Agency for Research on Cancer (IARC). **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some non-heterocyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures**, v. 92, p. 1–18, 2005.

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

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

KOBAYASHI, H. *et al.*; A. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun.**, v.3, p.103-115, 1995.

KRISHNAMURTHI, K.; DEVI, S. S.; CHAKRABARTI, T. The Genotoxicity of Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Containing Sludge Samples. **Métodos Toxicol Mech.**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2007.

KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K.; Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p.211–221, 2006.

LAGERQVISTA, A.; HÅKANSSON, D.; LUNDIN, C.; PROCHAZKA, G.; DREIJ, K.; SEGERBÄCK, D.; JERNSTRÖM, B.; TÖRNQVIST, M.; FRANK, H.; SEIDEL, A.; ERIXON, K.; JENSSEN, D. DNA repair and replication influence the number of mutations per adduct of polycyclic aromatic hydrocarbons in mammalian cells. **DNA Repair**, v. 10, p. 877– 886, 2011.

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, 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A.; *Allium cepa* Test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mut. Res.**, 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.

LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, p. 46–53, 2009.

LV, J.; SHI, R.; CAI, Y.; LIU, Y.; Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Pollution in Soil of Suburban Areas in Tianjin, China. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 2010.

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

MARIN-MORALES, M. A.; LEME, D. M.; MAZZEO, D. E. C. A review of the Hazardous effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on living organisms. In: HAINES, P. A.; HENDRECKSON, D. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons – Pollution, health effects and chemistry. Nova Science Publishers, Inc, p.1-49, 2009.

MAS, S.; JUAN, A.; TAULER, Romà.; OLIVIERI, A. C.; ESCANDAR, G. M.; Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review. **Talanta**, v.80, p.1052–1067, 2010.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. T. A.; MARIN-MORALES, M. A. Investigation of the genotoxic of water of a river receiving tannery effluents by means of the in vitro comet assay. *Cytologia*, v. 68, n. 4, p. 395-401, 2003.

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

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Toxic and genotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium - a review. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 18, n. 1, p. 77-85, 2005.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the Genotoxic and Mutagenic Effect of Chromium residues Present in Tannery Effluents Using the Micronucleus and Comet Assay in *Oreochromis niloticus* and Chromosomes Aberrations in *Allium cepa*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 148-158, 2006.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Danos celulares no *Allium cepa* sistema de teste, causadas por mistura BTEX prévias e após processo de biodegradação. *Chemosphere*, v. 85, p. 13-18, 2011.

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.

MONARCA, S.; FERETTI, D.; ZERBINI, I.; ALBERTI, A.; ZANI, C.; RESOLA, S.; GELATTI, U.; NARDI, G. Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity testes and chemicals analyses. **Environmental Research Section**, v. 88, p. 64-69, 2002.

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

MPO/SEPURB, Ministério do Planejamento e Orçamento /Secretaria de Política Urbana; SRHSO, Secretaria de Recursos Hídricos, Saneamento e Obras; CONSÓRCIO FIGUEIREDO FERRAZ / COPLASA S.A. "**Programa de Investimentos para Proteção e Aproveitamento dos Recursos Hídricos das Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí**", 1999.

NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J.; Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e seus derivados nitrados (NHPA): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v.23, n.6, 2000.

OBERHOLSTER, P. J.; BOTHA, A.-M.; CLOETE, T. E.; Biological and chemical evaluation of sewage water pollution in the Rietvlei nature reserve wetland area, South Africa. **Environmental Pollution**, p.1-9, 2008.

ODEIGAH, P. G.; NURUDEEN, O.; AMUND, O. O. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. **Hereditas**, v. 126, p. 161-167, 1997.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v. 567, p. 109 -149, 2004.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 123, p. 291–298, 1978.

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

PARK, S.; LEE, S.; YE, S.; YOON, S.; CHUNG, M.; CHOI, J. Benzo[a]pyrene-induced DNA damage and p53 modulation in human hepatoma HepG2 cells for the identification of potential biomarkers for PAH monitoring and risk assessment. **Toxicology Letters**, v. 167, p. 27–33, 2006.

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I.; MOJAS, N.; ERBEN, R.; PAPES, D.; Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research**, v.490, p.209–214, 2001.

PEREIRA, T. S.; GOTOR, G. N.; BELTRAMI, L. S.; NOLLA, C. G.; ROCHA, J. A.V.; BROTO, F. P.; COMELLAS, L. R.; VARGAS, V. M. F. Salmonella mutagenicity assessment of airborne particulate matter collected from urban areas of Rio Grande do Sul State, Brazil, differing in anthropogenic influences and polycyclic aromatic hydrocarbon levels. **Mutation Research**, v. 702, p. 78–85, 2010.

RADIĆ, S.; STIPANIČEV, D.; VUJČIĆ, V.; RAJČIĆ, M. M.; ŠIRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 5, p. 1228–1233, 2010.

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

RYDBERG, B.; JOHANSON, K. J. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells, in: P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg, C.F. Fox (Eds.), DNA Repair Mechanisms, Academic Press, New York, p. 465–468, 1978.

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

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, L. E. A simple technique for quantitation follow levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184–191, 1988.

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

SPEIT, G.; HANELT, S.; HELBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicol. Let.**, v. 88, p. 91-98, 1996.

SPEIT, G.; VASQUEZ, M.; Hartmann, A.; The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutation Research**, v.681, p.3-12, 2009.

TARANTINIA, A.; MAITREB, A.; LEFEBVRE, E.; MARQUES, M.; MARIEA, C.; RAVANATA, J.; DOUKI, T. Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures. **Mutation Research**, v. 671, p. 67–75, 2009.

TUVUKENE, A. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Annales Zoologici Fennici**, v. 32, p. 295-309, 1995.

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

VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S.; Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, v.631, p.36–43, 2007.

VENTURA-CAMARGO, B. C.; MALTEMPI, P. P. P; MARIN-MORALES, M. A. The use of the cytogenetic to identify mechanisms of action of an azo dye in *Allium cepa* meristematic cells. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, v. 1, n. 3, p. 1-12, 2011.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPERS, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. *Environ. Contam. Toxicol.*, v. 43, p. 284–291, 2002.

XUE, W.; WARSHAWSKY, D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, p. 73– 93, 2005.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G.; Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **analytica chimica acta**, v.606, p.135–150, 2008.

ZÍLIO, E. L.; PINTO, U. B. Identificação e distribuição dos principais grupos de compostos presentes nos petróleos brasileiros. *Bol. Téc. PETROBRAS*, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2002.

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