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

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DO BIOSURFACTANTE RAMNOLIPÍDIO E SUAS IMPLICAÇÕES QUANDO USADO NA BIORREMEDIAÇÃO DE ÁGUAS CONTAMINADAS POR PETRÓLEO

THAÍS CRISTINA CASIMIRO FERNANDES

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

Março – 2011

THAÍS CRISTINA CASIMIRO FERNANDES

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DO
BIOSURFACTANTE RAMNOLIPÍDIO E
SUAS IMPLICAÇÕES QUANDO USADO NA
BIORREMEDIAÇÃO DE ÁGUAS
CONTAMINADAS POR PETRÓLEO**

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular).

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales

Rio Claro
Março/2011

À Bernadete Casimiro Alves Fernandes (*In memoriam*)

“Se enxerguei mais longe foi por estar sentado aos ombros de gigantes”. Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Uma vez ouvi uma definição sobre pesquisadores que me deixou um tanto preocupada. A descrição dizia que um bom cientista, além de ser inteligente e usar jaleco branco, tinha que ser feio, anti-social, ter um tom de pele pálido meio esverdeado, balbuciar coisas sem sentido e ser odiado pela comunidade científica. Confesso que não sou lá aquelas coisas quanto a beleza e realmente me pego falando sozinha, às vezes, mas se essas características realmente fizessem parte dos critérios para designar o quão bom um pesquisador seria creio que eu tivesse que procurar outra atividade para me dedicar.

Para conseguir desempenhar um bom trabalho dependendo do bem estar das pessoas que amo e da convivência que tenho com elas, dos profissionais que me cercam e da troca de informações entre as diversas áreas do conhecimento e de um ambiente agradável de trabalho. Durante os 4, quase 5, anos de doutorado muitas foram as dificuldades pessoais e profissionais, assim como muitas foram as alegrias e a possibilidade de amadurecer profissionalmente. No fim das contas o saldo foi positivo porque caminhando ao meu lado estiveram pessoas grandiosas, as quais gostaria, sinceramente, de agradecer.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu pai, **Josué Carlos Fernandes**, pelo incentivo e pelos exemplos de determinação e coragem;

À minha mãe, **Bernadete Casimiro Alves Fernandes**, que me ensinou a ser forte e a nunca desistir nos momentos de dificuldade;

À minha admirável orientadora, Profa. Dra. **Maria Aparecida Marin Morales**, exemplo de profissional e de ser humano. Você sempre será meu referencial no trabalho e na vida.

À minha amiga-irmã, **Iracema Monteiro da Silva**. Obrigada por sempre estar ao meu lado, pela dedicação à nossa amizade, por respeitar meu jeito de ser e, principalmente, pelos ótimos momentos que passamos juntas.

Ao meu “amigo-pai” **Leonardo Gomes**. Obrigada por me mostrar que dedicação e perseverança são atributos essenciais para se concretizar um sonho;

Ao meu querido amigo **Elias Júnior Câmara Gomes Sales** pela alegria de sua companhia, pela disponibilidade em me ajudar no que quer que fosse, pelos cafézinhos e, principalmente, por ser paciente;

Ao meu amigo **Leandro Zandonadi** por suportar meu mau humor, pela dedicação, companhia e por sempre ter uma história pra contar e me fazer rir;

Ao meu amigo **Flamarion Dutra Alves** que me acompanhou durante todo o doutorado e se tornou uma pessoa muito especial e querida. Obrigada pela companhia e por todo cuidado que tem comigo. Tenho muita admiração pela sua determinação e força;

Ao meu amigo **Lutiane Queiroz de Almeida** pela companhia e pelo carinho durante nosso período de convivência;

Aos meus amigos de infância, **Juliano Rodrigo Guerreiro** e **Valquíria Marli da Silva**, agradeço por continuarem a fazer parte da minha vida e por sempre torcerem por mim;

À profa. Dra. **Sílvia Tamie Matsumoto** da Universidade Federal do Espírito Santo-UFES, grande amiga e profissional competente;

À minha família querida que sempre esteve torcendo pelo meu sucesso e que sempre me incentivou. Obrigada por entenderem minha ausência e pelo carinho. Vocês são muito importantes para mim.

Às todos os pesquisadores do Laboratório de Mutagênese, principalmente, à **Cintya Aparecida Christofolletti, Renata Caritá, Jaqueline Bianchi, Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo, Cristiane Sueli Talhiaferro, Nádia Corroqué, Márcia Hoshina e Matheus Mantuanelli Roberto** pela ajuda imprescindível no desenvolvimento desse doutorado;

À pesquisadora **Roberta Lovaglio** que sempre esteve disponível para me judar e dar informações sobre o famigerado biossurfactante ramnolipídio;

Ao Prof. Dr. **Jonas Contiero** do laboratório de Microbiologia Industrial da UNESP-Rio Claro que disponibilizou o uso do biossurfactante produzido em seu laboratório para a realização dos testes desenvolvidos nessa tese;

À Dra. **Bruna de Campos Ventura** pela ajuda na revisão de literatura;

Ao pesquisador **Renato Salaroli**, da Universidade de São Paulo, por me ajudar com os procedimentos relacionados à microscopia eletrônica;

À Profa. Dra. **Maria Isabel de Souza Camargo** pela apoio acadêmico e ajuda na discussão dos resultados desta tese;

À Profa. Dra. **Carmem Fontanetti Christofolletti** pelas dicas e sugestões;

À Profa. Dra. **Dejanira Francesci de Angelis** pela confiança e por ser sinônimo de dedicação e sucesso profissional;

Ao Prof. **Dimas Dias Brito**, do Instituto de Geociências e Ciências Exatas da UNESP-Rio Claro, pela brilhante coordenação do Programa de Recursos Humanos da Agência Nacional do Petróleo. Programa esse que me permitiu obter conhecimentos, sobre diversos aspectos, relacionados a indústria do petróleo;

Aos técnicos **Mônica e Antônio** do laboratório de microscopia eletrônica da UNESP-Rio Claro;

À **Sandra**, técnica do Laboratório de Mutagênese da UNESP-Rio Claro;

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Rio Claro;

À coordenação do Curso de Pós Graduação do programa de Biologia Celular e Molecular;

Ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus Rio Claro, em especial a todos os professores e funcionários, por ter fornecido subsídio para que este trabalho pudesse ser realizado e pelos anos de convivência;

Ao laboratório de Mutagênese por fornecer a estrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa;

À todos os professores do Programa por terem contribuído para minha formação;

Ao Programa de Recursos Humanos ANP/FINEP/MCT-CTPETRO, PRH-05, Universidade Estadual Paulista (UNESP)-Rio Claro pelo suporte financeiro.

À Deus por me permitir vivenciar toda essa experiência.

Enfim....

“Aos que se tornaram familiares, aos que nasceram familiares e aos que conheci antes de ontem;

Aos que me deixaram louca e aos que enlouqueci;

Aos que me criticaram em tudo e a um ou outro que aturou minha “chatice”;

Aos amigos que passaram e aos que se estagnaram em mim;

Aos que me consideram muito e aos que com razão fizeram pouco;

Aos que conhecem o que penso e aos que só conhecem o que faço;

Aos que passam o dia todo comigo e aos que estão o tempo todo em mim.

Este trabalho é a soma de todos vocês. E se não é melhor, é por falta de memória, mas não por falta de amigos”.

Efraim Rodrigues

RESUMO

O ramnolipídio é um biossurfactante da classe dos glicolipídios, produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Estudos têm mostrado que, mesmo com um grande potencial de uso do ramnolipídio na indústria cosmética e na área da saúde, este composto é, principalmente, promissor para uso na indústria do petróleo. Apesar dos biossurfactantes serem considerados menos tóxicos e mais biodegradáveis que os surfactantes sintéticos, estes compostos ainda não foram investigados quanto a sua ação genotóxica direta ou indireta sob o material genético de organismos expostos. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi investigar os possíveis danos celulares promovidos pela ação do biossurfactante ramnolipídio e suas implicações no material genético quando utilizado como agente biorremediador de águas impactadas por petróleo, por meio dos bioindicadores *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus* e as células humanas mantidas em cultura - HepG2. Para a realização da investigação, o biossurfactante ramnolipídio foi produzido em condições de laboratório e a partir da concentração indicada para o uso em processos de biorremediação (1g/L), foram estabelecidas as concentrações utilizadas no estudo. Para avaliar o potencial tóxico, genotóxico e mutagênico das concentrações de ramnolipídio, assim como seu efeito sinérgico com o petróleo, foram realizados os testes de germinação de sementes, aberrações cromossômicas e teste do micronúcleo em *A. cepa*; teste do micronúcleo em eritrócitos circulantes, ensaio do cometa com sangue periférico e células de brânquias e análise ultraestruturais de eritrócitos circulantes em *O. niloticus*; e teste do MTT, teste do micronúcleo e ensaio do cometa em células HepG2. Nossos resultados mostraram que as concentrações 1g/L e 2g/L de ramnolipídio são tóxicas para *A. cepa*. No entanto, quando as concentrações 1g/L e 10g/L foram utilizadas no processo de biorremediação, estas concentrações não promoveram danos tóxicos, genotóxicos ou mutagênicos adicionais àqueles observados para as células expostas somente às frações solúveis do petróleo, indicando a ausência de efeitos sinérgicos entre o ramnolipídio e os HPAs. Para *O. niloticus*, as concentrações do ramnolipídio utilizadas na biorremediação das águas contaminadas por petróleo apresentam pequena atividade tóxica, verificada pela indução da formação de vacúolos

citoplasmáticos e retração nuclear. Porém, as mesmas amostras não promoveram qualquer ação mutagênica ou genotóxica nas células do organismo teste estudado. Ensaio com células HepG2 (células de hepatoma humano), expostas às diversas concentrações do ramnolipídio e às amostras de água biorremediadas com o biossurfactante, indicaram atividade tóxica do biossurfactante para as concentrações maiores ou igual a 1g/L e atividade mutagênica para a concentração 1g/L e as duas concentrações utilizadas na biorremediação (1g/L e 10g/L). Concluímos, portanto, que o biossurfactante ramnolipídio possui baixa atividade tóxica, genotóxica e mutagênica para *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*, mas promove danos celulares e alterações significativas no material genético de HepG2. Dessa forma, o ramnolipídio parece ser uma substância natural promissora para substituir os surfactantes sintéticos em programas de biorremediação do petróleo. No entanto, sua ação prejudicial, registradas para os testes com células humanas, indica que este produto, deve ser melhor investigado, e usado com cautela, principalmente para fins terapêuticos.

Palavras chaves: *Allium cepa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Oreochromis niloticus*, HepG2, genotoxicidade e mutagenicidade.

ABSTRACT

Rhamnolipids belong to the glycolipid class of biosurfactants, which are produced by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Studies have shown that, even being potentially used in the cosmetics industry, this compound is especially promising in the petroleum industry. Although the biosurfactants are considered less toxic and more biodegradable than the synthetic surfactants, these compounds have not yet been investigated when it comes to their either direct or indirect genotoxic action upon the genetic material of exposed organisms. Thus, the purpose of this study was to investigate the possible cell damage promoted by the action of rhamnolipid biosurfactants and their implications for the genetic material when they are used as a bioremediation agent of petroleum-impacted water, by using *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus* and human cells kept in culture – HepG2. In order to carry out this investigation, the rhamnolipid biosurfactant was produced under laboratory conditions, and the recommended concentration for use in bioremediation processes (1g/L) was also used; the concentrations used in the study were established. To assess the toxic, genotoxic and mutagenic potential of rhamnolipid concentrations, as well as their synergy with petroleum, seed germination, chromosome aberration tests and micronucleus test in *A. cepa*; micronucleus test in circulating red blood cells, comet assay in the peripheral blood and gill cells, and ultrastructural analysis of circulating blood cells in *O. niloticus*; and MTT test, micronucleus test and comet assay in HepG2 cells. Our studies showed that the 1 g/L and 2 g/L rhamnolipid concentrations are toxic to *A. cepa*. However, when 1 g/L and 10 g/L concentrations were used in the bioremediation process, these concentrations did not cause toxic, genotoxic or mutagenic damage besides the ones observed for the cells exposed to soluble petroleum fractions only, thus indicating lack of synergy between rhamnolipids and HPAs. For *O. niloticus*, the concentrations used in the bioremediation of petroleum-contaminated water had little toxic activity, observed by the induction of cytoplasmic vacuole formation and nuclear retraction. The same samples, however, did not promote any mutagenic or genotoxic action to the cells in the test organism studied. Assays in HepG2 cells (human hepatoma cells), exposed to different rhamnolipid concentrations and biosurfactant remediation of water

samples, indicate toxic activity of the biosurfactant for concentrations higher than or equal to 1 g/L, and mutagenic activity for the 1 g/L concentration and the two concentrations used in the bioremediation (1 g/L and 10 g/L). Therefore, we conclude that rhamnolipid biosurfactant has low toxic, genotoxic and mutagenic activity for *A. ceppa* and *O. niloticus*, but it causes cell damage and significant alterations of the genetic material in HepG2. This way, rhamnolipids seem to be a promising natural substance to substitute synthetic biosurfactants in petroleum bioremediation programs. Nevertheless, its harmful action, observed for tests with human cells, indicate that this product must be better investigated and handled with care, especially when they used for therapeutic purposes.

Key words: *Allium cepa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Oreochromis niloticus*, HepG2, genotoxicity and mutagenicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Contaminação dos recursos hídricos por petróleo e seus derivados	17
3.2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)	20
3.3. Surfactantes sintéticos	24
3.4. Biossurfactantes.....	28
3.5. Bioindicadores de impactos ambientais	33
3.5.1. Bioindicador: <i>Allium cepa</i>	35
3.5.2. Bioindicador: peixes	36
3.5.3. Bioindicador: HepG2	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. Substância estudada.....	43
4.2. Processo de obtenção do ramnolipídio	43
4.2.1. Microorganismo.....	43
4.2.2. Inóculo e produção de ramnolipídio	43
4.2.3. Extração do ramnolipídio.....	44
4.2.4. Investigação das propriedades tensoativas do ramnolipídio	44
4.3. Investigação toxicológica	45
4.3.1. Simulação de um derrame de petróleo cru pesado.....	45
4.3.2. Avaliação do potencial tóxico, genotóxico e mutagênico	47
4.3.2.a. Sistema-teste <i>Allium cepa</i>	48
4.3.2.b. Sistema-teste <i>Oreochromis niloticus</i>	49
4.3.2.c. Sistema-teste HepG2	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58

5.1. Artigo 1: Rhamnolipid biosurfactant: characterization, toxicity and application	59
5.2. Artigo 2: Biosurfactante ramnolípido como uma estratégia promissora na remediação de ambientes contaminados por petróleo.....	81
5.3. Artigo 3: influência do dispersante ramnolípido na indução de alterações celulares no organismo pelágico <i>Oreochromis niloticus</i>	108
5.4. Artigo 4: Ação tóxica, genotóxica e mutagênica do biosurfactante ramnolípido observada em testes <i>in vitro</i> com células HepG2.....	140
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	164
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	166

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional verificado nas últimas décadas, juntamente com os avanços tecnológicos e o aumento dos produtos industriais, tem levado a economia global a uma expansão importante. Porém, a geração de resíduos e a conseqüente contaminação ambiental, derivada das atividades humanas, têm comprometido à saúde do homem e a qualidade dos ecossistemas. Em decorrência disso, vêm sendo adotadas diversas medidas de prevenção de riscos ambientais, na tentativa de impedir novos impactos, ou ainda, quando em contaminações já instaladas, sendo implantadas estratégias que busquem uma rápida recuperação das áreas degradadas. Dentre as atividades industriais que mais estão envolvidas com as contaminações ambientais, está a indústria do petróleo, cujos impactos promovidos ao ambiente podem ser vistos tanto durante a sua extração, como no refino, no transporte e até mesmo na utilização do petróleo e seus derivados.

Existem muitas formas de se limpar um ambiente contaminado por óleo, porém, a eficácia desta limpeza depende, diretamente, da escolha acertada que se faz, dentre as metodologias disponíveis para aquela ação. Para a limpeza de ecossistemas aquáticos impactados por petróleo, existem diversas estratégias aplicáveis, que podem ser usadas com mais ou menos eficiência, dependendo do caso a ser considerado. Dentre as estratégias de despoluição destes ambientes temos: a limpeza natural, a remoção manual, o uso de materiais absorventes, a implantação de bombeamento a vácuo, o *skimmer*, o jateamento com água a diferentes pressões ou o jateamento com areia, corte de vegetação, queima *in situ*, trincheiras, remoção de sedimentos e produtos dispersantes. Os dispersantes, conhecidos também como surfactantes, são compostos anfipáticos que se agregam e/ou se acumulam, preferencialmente, nas interfaces de fases fluidas que possuem diferentes graus de polaridade, separando-as devido à redução da tensão superficial e interfacial. Os surfactantes, compostos usados na descontaminação de ambientes

poluídos por petróleo e seus derivados, agem por meio da dispersão do óleo em pequenas partículas, facilitando sua retirada do ambiente e sua degradação por microorganismos.

Apesar dos surfactantes serem considerados eficientes na remoção do óleo, estudos vêm mostrando que eles conferem uma maior toxicidade aos organismos do que o próprio ambiente impactado. Já foi provado que ambientes remediados com surfactantes demoraram mais para se recuperarem dos impactos do que os ambientes não remediados por estes produtos. Assim, há hoje uma preocupação ambiental, caracterizada por uma conscientização de sustentabilidade, que tem levado ao desenvolvimento de técnicas com eficiente potencial despoluidor e baixa reatividade orgânica, denominadas de tecnologias limpas.

Os biossurfactantes são compostos sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, que apresentam vantagens de utilização em programas de redução da poluição ambiental, quando comparados aos surfactantes sintéticos, pela diversidade estrutural, baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e produção a partir de substratos renováveis e de baixo custo, como resíduos agro-industriais. Apesar destas vantagens, as características químicas destes compostos levam a uma preocupação sobre a sua real eficácia em processos de biorremediação. É sabido que são compostos químicos capazes de interagir com os lipídios da membrana celular, e, desta forma, alterar a estrutura, a organização e as funções da membrana plásmica, principalmente às relacionadas à permeabilidade seletiva, o que pode promover a morte celular por lise ou facilitar a passagem de compostos tóxicos para o interior da célula. A potencialidade dos biossurfactantes promoverem danos celulares merece, então, uma maior atenção, antes que estes produtos sejam utilizados como agentes biorremediadores.

Para uma melhor avaliação da eficiência dos biossurfactantes na remediação de poluição ambiental, principalmente para os impactos causados pelo petróleo e seus derivados, deve ser melhor investigado o seu modo de ação, principalmente em relação as interações possíveis entre estes composto e o material genético dos organismos vivos eventualmente expostos.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar a ação tóxica, genotóxica e mutagênica do biossurfactante ramnolipídio, assim como avaliar os mesmos parâmetros quando essa substância foi utilizada na biorremediação de águas impactadas por petróleo.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Investigar o efeito tóxico da concentração 1g/L e 2g/L do biossurfactante ramnolipídio e de amostras de água resultantes de uma simulação de um derrame de petróleo cru pesado, biorremediado com as concentrações 1g/L e 10g/L do biossurfactante ramnolipídio, avaliado por meio do teste de germinação de sementes de *Allium cepa*;
2. Analisar os efeitos genotóxicos e mutagênicos promovidos em diferentes regiões de desenvolvimento da espécie de planta *Allium cepa* quando expostas às amostras de água resultantes de uma simulação de um derrame de petróleo cru pesado biorremediado com as concentrações 1g/L e 10g/L do biossurfactante ramnolipídio;
3. Investigar os efeitos genotóxicos e mutagênicos da concentração 1g/L e 10g/L quando utilizadas na biorremediação de águas impactadas por petróleo, por meio da exposição dos organismos *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus* e de cultura de células humanas (Hepg2);
4. Investigação do potencial citotóxico de amostras de água resultantes de uma simulação de um derrame de petróleo cru pesado biorremediado com as

concentrações 1g/L e 10g/L do biossurfactante ramnolipídio, avaliado por meio de análises ultraestruturais de eritrócitos circulantes da espécie de peixe *Oreochromis niloticus*;

5. Análise do efeito citotóxico das concentrações 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 1,8 e 2,0g/L do biossurfactante ramnolipídio por meio do teste do MTT em células HepG2;
6. Contribuir com informações que servirão como subsídio e apoio para a tomada de decisões quanto à escolha do método e procedimento mais adequado na limpeza e recuperação de ambientes afetados por petróleo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Contaminação dos recursos hídricos por petróleo e seus derivados

A água é um elemento imprescindível para a manutenção da vida e também um fator de crescimento econômico, estando sua disponibilidade diretamente relacionada à possibilidade de maior desenvolvimento, inclusive social, de uma dada região. A importância deste bem mineral torna o seu desperdício e a poluição dos mananciais uma grave ameaça à existência da vida e ao desenvolvimento sustentável das populações humanas (LEME, 2007).

O petróleo é considerado o recurso energético mais importante do mundo. Pelo seu amplo uso em diversas atividades humanas, este composto, há muito tempo, vem sendo explorado, transportado, estocado e utilizado pelo homem. Porém, esta sua intensa utilização também está associada a um aumento da probabilidade de riscos de acidentes, tanto com o próprio petróleo como com os seus derivados. Dentre os riscos mais comuns, registrados com esta classe de composto estão os derrames de óleos que, sem dúvida, são considerados os maiores indutores de problemas ambientais (KINGSTON, 2002).

No Brasil, a forte industrialização e o desenvolvimento econômico, sobretudo a partir da década de 70, exigiram grande estruturação de toda a cadeia produtiva dos derivados do petróleo, desde novas descobertas de campos petrolíferos à formação de vários pólos petroquímicos e a ampliação das redes de distribuição. Segundo a Agência Nacional do Petróleo, em 2004 existiam no Brasil 13 refinarias, 48 terminais aquaviários, 26 terminais terrestres, 485 bases de distribuição, 179 distribuidoras, 33.620 postos de revenda e uma comercialização de, aproximadamente, 230 mil m³/dia dos principais derivados de petróleo (MARIANO, 2006). Dessa maneira, o uso crescente de derivados de petróleo em processos industriais vem proporcionando a geração de uma diversidade de produtos intensamente utilizados pela sociedade atual. Uma das conseqüências negativas do uso e manipulação de hidrocarbonetos é a geração de resíduos e efluentes

altamente poluidores (MOREIRA e DOURADO, 2005). Além dos fatores citados acima, tal crescimento traz consigo também, riscos como os acidentes ambientais. Tais acidentes são responsáveis por grandes contaminações do solo e da água e, por isso, geram grandes problemas ecológicos, sociais e de saúde pública. Estes riscos associados à indústria do petróleo colocam suas atividades em constante necessidade de gerenciamento. A avaliação dos danos no ambiente, tanto terrestre quanto aquático, é parte fundamental dentro das demandas geradas pelos derrames de óleo. Sabe-se que a periculosidade do petróleo e seus derivados, quando em contato com os organismos vivos, é muito grande. Os efeitos variam em intensidade, tipo e duração da resposta, de acordo com vários fatores, podendo ocorrer desde situações onde nenhuma alteração significativa é percebida, até a destruição total de um ecossistema (CETESB, 2004).

Contaminações da água por hidrocarbonetos de petróleo podem ser resultantes de acidentes com tanques de óleo, grandes derramamentos, descargas de resíduos municipais e industriais, além de pequenos vazamentos diários, provenientes de atividades rotineiras de navegação e pesca (PACHECO e SANTOS, 2001). Tanto o petróleo como seus derivados, quando presentes na água, espalham-se rapidamente, cobrindo grandes extensões com uma camada fina de óleo, que pode variar quanto à sua espessura (CEDRE, 2004). O movimento da película de óleo na água é governado por convecção e difusão turbulenta, derivados de ações das correntezas, ondas e ventos. À medida que a película de óleo se espalha sobre a superfície da água, este óleo vai sofrendo transformações na sua composição. Frações leves evaporam, componentes solúveis em água são dissolvidos e componentes imiscíveis tornam-se emulsionados. A formação da mistura óleo-água, ou emulsão de óleo em água, depende da turbulência da água, mas normalmente ocorrem poucos dias depois do derramamento inicial (WANG et al., 2005). Os movimentos de óleo na superfície da água, por dissolução e emulsão, expõem os organismos presentes no ambiente a moléculas e partículas deste óleo (ALBERTS, 2002).

Os derivados de petróleo podem apresentar comportamentos variados, dependendo das características da área atingida. O impacto do petróleo sobre ambientes de água doce pode ser mais severo que os de ambientes marinhos, devido a pouca movimentação hidrológica desses últimos. Em rios e riachos de

pequena vazão, estes compostos tendem a permanecer no ambiente por um longo período, interagindo com gramíneas das margens ou com os sedimentos de fundo dos rios, afetando as relações tróficas dos organismos que interagem com estes microambientes (USEPA, 1999).

Como a maior parte dos acidentes com petróleo ocorre em ambientes marinhos, ainda são escassos os dados sobre os potenciais efeitos da contaminação deste composto em ecossistemas dulcícolas (KATSUMITI, 2006).

Desde a década de trinta vem havendo um crescimento progressivo da indústria do petróleo. Foram descobertos novos campos petrolíferos, aperfeiçoadas as explorações submarinas, construídos petroleiros transoceânicos, inaugurados terminais de carga e descarga de petróleo e derivados, refinarias e oleodutos interestaduais e internacionais. Conseqüentemente, foram sendo liberados cada vez mais petróleos, seus derivados e resíduos oleosos para o meio ambiente, decorrentes da sua utilização em motores e das lavagens de tanques, navios cargueiros, petroleiros, pesqueiros, da descarga de água de lastro e de vazamentos decorrentes das operações de transporte terrestre/aquático (CETESB, 2004).

Nas regiões interioranas, os maiores problemas envolvendo derrames de óleo e derivados estão associados às dutovias. Apesar da grande tecnologia associada aos dutos, ainda são freqüentes os acidentes relacionados com este meio de transporte. A CETESB vem monitorando acidentes envolvendo dutos no estado de São Paulo, desde 1980, registrando a maior parte deles nas regiões metropolitanas. Os impactos negativos causados por estes vazamentos compreendem, de maneira geral, a contaminação de solos, de recursos hídricos subterrâneos e superficiais, da fauna e flora da área, além de colocar em risco a vida humana (OLIVEIRA et al., 2007). O quadro abaixo exemplifica alguns acidentes com dutos que afetaram diversos rios brasileiros.

Quadro 1. Alguns acidentes em dutos que levaram a contaminação de rios brasileiros.

LOCAL	ANO	SUBSTÂNCIA	DESCRIÇÃO DO ACIDENTE
Araucária - PR	2000	Óleo	4 milhões de litros de óleo foram despejados nos rios Barigüi e Iguaçu - PR, devido a uma ruptura da junta de expansão de uma tubulação da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR-Petrobrás)
São Pedro da Cipa - MT	2001	Diesel	Vazamento de 4000 litros de óleo diesel de um duto da Petrobrás no Córrego Caninana, afluente do Rio Nhundiaquara que é um dos principais rios da região.
Barueri - SP	2001	Óleo	O rompimento de um duto da Petrobrás em Barueri em São Paulo ocasionou o vazamento de 200 mil litros de óleo que se espalhou por residências e atingiram as águas dos Rios Tietê e do Córrego Cachoeirinha.
São Sebastião - SP	2004	Petróleo	Na manhã do dia 18 de fevereiro de 2004 foi constatado afloramento de petróleo e contaminação do rio Guaecá na região da Praia de Guaecá, em São Sebastião. A PETROBRAS/TRANSPETRO identificou a causa do vazamento como sendo uma fenda longitudinal no oleoduto subterrâneo OSBAT. O vazamento atingiu o lençol freático do rio Guaecá, localizado em uma Unidade de Conservação (área do Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo São Sebastião), e o petróleo aflorou na sua nascente.
Coari-AM	2010	Petróleo	Vazamento de 55 mil litros de óleo bruto do poço Marta 4, da Petrobras, no município de Coari - AM, a 680 km de Manaus, atingiu um afluente do rio Uruçu.

Fonte: IBAMA (2010); CETESB (2010).

3.2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

O petróleo é composto basicamente por hidrocarbonetos (97%), e elementos como nitrogênio, enxofre e oxigênio (YENDER et al., 2002; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2003). Os hidrocarbonetos podem ser classificados em dois grandes grupos: alifáticos e aromáticos. Os hidrocarbonetos aromáticos são formados por, pelo menos, um anel aromático e podem ser separados em dois grupos: os compostos monoaromáticos e os poliaromáticos, também chamados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Embora os HPAs correspondam à menor fração presente no petróleo, destacam-se por serem estáveis, persistentes no meio ambiente, além de poderem apresentar efeitos tóxicos para os organismos aquáticos. Do ponto de vista toxicológico, a principal preocupação com os HPA são as evidências de sua associação com diversos tipos de neoplasias em seres humanos, principalmente as de pulmão, bexiga, reto e esôfago (MASTRANGELO et al., 1996; INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY- IPCS, 1998; XUE e WARSHAWSKY, 2005).

Os HPAs, por serem formados por anéis aromáticos múltiplos, são mais resistentes à biodegradação microbiológica, sendo bastante persistentes no

ambiente. Entre os HPAs mais comuns encontrados no petróleo e em seus derivados estão o pireno, o criseno, o naftaleno, o antraceno, o fenantreno, o benzopireno e seus vários isômeros e derivados. Embora os efeitos tóxicos dos HPAs sobre os organismos sejam bem documentados, pouco se sabe sobre o seu mecanismo de carcinogênese. Acredita-se que as posições químicas dos anéis aromáticos tenham um papel importante na determinação do nível de sua carcinogenicidade (CUNHA, 2007).

Como os HPAs não são mutágenos diretos, eles necessitam sofrer ativação metabólica preliminar para se tornarem capazes de reagir com o DNA e outras macromoléculas (NETTO et al., 2000). Eles são considerados potentes carcinógenos, pois suas moléculas possuem uma “região de baía” formada por ramificação na seqüência dos anéis benzênicos. Esse tipo de organização dos átomos de carbono confere um alto grau de reatividade bioquímica. Na verdade, os derivados dos HPAs, obtidos por meio de diversas reações metabólicas no organismo, são agentes carcinogênicos mais potentes que as moléculas originais dos HPAs (XUE e WARSHAWSKY, 2005; MARIN-MORALES et al, 2009) (Figura 1).

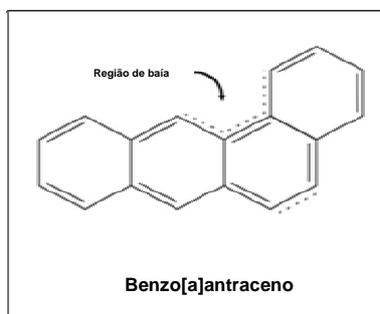


Figura 1. HPA Benzo[a]antraceno e a indicação de sua região de baía (Modificado de MARIN-MORALES et al., 2009).

A maioria dos seres vivos tem a capacidade de metabolizar xenobióticos pelo processo denominado biotransformação (TUVIKENE, 1995). Biotransformação é caracterizada como um conjunto de reações enzimáticas responsável pela conversão das substâncias lipossolúveis em hidrossolúveis, facilitando, assim, seu processo de excreção. No entanto, embora a finalidade da biotransformação de xenobióticos seja a desintoxicação, nem sempre o metabólito originado é menos tóxico do que a própria molécula química. Assim, a biotransformação de xenobióticos podem aumentar a toxicidade de alguns compostos químicos pela

formação de metabólitos eletrofílicos, extremamente reativos, que pode apresentar um grande potencial de se ligar, covalentemente, com macromoléculas no interior das células como o DNA, RNA e proteínas, resultando em diversas alterações, tais como distúrbios no sistema imunitário, mutações e até mesmo a morte do organismo (STANLEY, 1992, 1994, LANDIS e YU, 1998; GUECHEVA e HENRIQUES, 2003).

A biotransformação dos HPAs envolve uma série de enzimas que catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise (oxigenases de função mista, citocromo P-450, NADPH-citocromo-c-redutase), bem como as que catalisam reações de conjugação (sulfotransferase, epóxido hidrolase, glutation-S-transferase e UDP-glicotransferase), que estão presentes em todos os tecidos (MUTTI e BERGAMASCHI, 1996). Essas enzimas são vinculadas às membranas e apresentam ampla distribuição no organismo, com elevada concentração no retículo endoplasmático do fígado, rins, pulmões, intestino e vias respiratórias. Além disso, as enzimas CYP são caracterizadas por uma família protéica, possivelmente a maior família já encontrada na natureza (cerca de 215), com uma ampla distribuição entre as bactérias, fungos, plantas e animais (GUECHEVA e HENRIQUES, 2003).

As monoxigenases dependentes do citocromo P450 (CYP1A) são responsáveis pela oxidação enzimática dos HPA. Elas agem, principalmente, sobre a região de elevada densidade eletrônica ou no nível da região angular da molécula do HPAs, formando óxidos de arenos (epóxidos), que podem, espontaneamente, formar fenóis ou, por ação das epóxido-hidrolases, produzirem dihidrodíóis vicinais. Alguns fenóis são oxidados para quinonas e outros podem sofrer nova epoxidação, levando à formação de epóxidos secundários (dihidrodiolépóxidos). O carbono benzílico dos dihidrodíol-epóxidos é capaz de reagir com as bases nucleofílicas do DNA, notadamente a guanina, e, eventualmente, iniciar um processo mutagênico (MUTTI e BERGAMASCHI, 1996; ANGERER et al., 1997).

Segundo GESAMP (The Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection) há fortes evidências que os HPA são capazes de causar câncer em peixes e moluscos (KENNISH, 1996). Sua atividade mutagênica está fortemente relacionada com a sua própria estrutura molecular. Portanto, a forma molecular dos isômeros dos HPA está diretamente relacionada com a atividade biológica e, conseqüentemente, com sua toxicidade (IRWIN, 1997).

Segundo relatório da CETESB (2005) estudos com animais reportam alterações enzimáticas nas mucosas do trato gastrointestinal e aumento no peso do

fígado, a partir da ingestão de HPA (efeito agudo). Também há relatos de indução de alterações no sistema imune, leucemia, câncer e tumores no pulmão e estômago. Os compostos aromáticos mais solúveis alcançam a corrente sanguínea, a partir de contatos com a pele ou de ingestão, podendo ser filtrados pelo sistema excretor e eliminados na urina. Esses compostos aromáticos têm uma capacidade, em potencial, de causar danos nas células sanguíneas, no tecido ósseo (medula óssea) e no sistema nervoso. Eles causam também irritações e dermatite na pele, na mucosa e nos olhos (CETESB, 2005). Cole (1994) ainda reforça que os HPA, derivados de derrames de óleo, podem afetar vertebrados, devido a uma tendência destes compostos se acumularem nos tecidos adiposos e de causarem danos ao fígado e rins de seres humanos.

O quadro abaixo classifica os 16 hidrocarbonetos, considerados prioritários para a EPA, segundo sua atividade tóxica.

Quadro 2. Efeitos tóxicos de 16 HPAs considerados poluentes prioritários pela USEPA.

NOMENCLATURA (IUPAC)	EFEITO
Naftaleno	Tóxico
Acenafteno	Mutagênico
Antraceno	Mutagênico
Fluoranteno	Carcinogênico e mutagênico
Criseno	Carcinogênico e mutagênico
Benzo(b)fluoranteno	Carcinogênico e mutagênico
Benzo(a)pireno	Carcinogênico e mutagênico
Benzo(g,h,i)perileno	Carcinogênico
Acenaftileno	Mutagênico
Fluoreno	Mutagênico
Fenantreno	Tóxico e mutagênico
Pireno	Carcinogênico e mutagênico
Benzo(a)antraceno	Carcinogênico e mutagênico
Benzo(k)fluoranteno	Carcinogênico e mutagênico
Dibenzo(a,h)antraceno	Carcinogênico e mutagênico
Indeno(1,2,3-cd)pireno	Carcinogênico

Fonte: Modificado de SIMS et al. (1988).

3.3. Surfactantes sintéticos

Existem muitas formas de limpar o ambiente contaminado por óleo, o que leva à necessidade de buscar uma técnica adequada para a minimização dos impactos ambientais. Paradoxalmente, os procedimentos de limpeza têm sido definidos, principalmente, pela demanda sócio-econômica e pelos aspectos estéticos. Os aspectos ecológicos são, muitas vezes, colocados em segundo plano, o que leva a impactos adicionais e muitas vezes mais sérios do que os derivados do próprio derrame do petróleo (MICHEL et al., 1992; IPIECA, 2000; ITOPIF, 2001; CETESB, 2002).

As opções mais freqüentemente utilizadas na limpeza dos ambientes costeiros são: limpeza natural, remoção manual, uso de materiais absorventes, bombeamento a vácuo, “skimmers” (equipamento desenvolvido para remover o óleo da superfície da água, utilizando discos giratórios e cordas absorventes), jateamento com água a diferentes pressões, jateamento com areia, corte de vegetação, queima *in situ*, trincheiras, remoção de sedimentos, biorremediação e produtos dispersantes (surfactantes) (CANTAGALLO et al., 2007).

Segundo a CETESB (2002), uma má escolha do método de limpeza pode maximizar os danos ambientais. Os surfactantes são compostos anfifílicos, termo usado para denominar uma ampla classe de moléculas que apresentam uma poção molecular hidrofílica (cabeça) e outra hidrofóbica (cauda). A “cauda” geralmente é composta por uma ou duas cadeias carbônicas hidrofóbicas (alifática, linear ou ramificada; grupos aromáticos ou policíclicos). A “cabeça”, de acordo com a sua carga, permite classificar os surfactantes em: não-iônicos, iônicos e zwitterionicos ou anfóteros, conforme indicado no quadro 3 (ZANA, 2005; HAMME et al., 2006).

Quadro 3. Exemplos de surfactantes comerciais e sua classificação quanto à porção hidrofílica

Tipo	Agente tensoativo
Catiônico	Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB)
	Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB)
	Cloreto de cetilpiridino (CICP)
Aniônico	Dodecil sulfato de sódio (SDS)
	Dihexadecil fosfato (DHF)
	Bis (2-etilhexil)sulfosuccinato sódico (Aerosol OT)
Não iônico	Polioxietileno (9-10) p-tercotil fenol (Triton X-1000)
	Polioxietileno (23) dodecanol (brij 35)
	Polisorbatos (incluindo Tween)
Zwitteriônicos	3-(dodecildimetil amônio) propano 1-sulfato (SB-12)
	4-(dodecildimetil amônio) butirato (DAB)

Fonte. MANIASSO (2001); HAMME et al. (2006).

As moléculas dos surfactantes se agregam e se acumulam, preferencialmente, nas interfaces de fases fluidas, que possuem diferentes graus de polaridade, separando as interfaces óleo/água, ar/água ou água/sólido, formando micelas (FIECHTER,1992; URUM e PEKDEMIR, 2004). Características como estas fazem dos surfactantes substâncias capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial de meios líquidos, formar micro-emulsões em soluções de água e hidrocarbonetos, permitindo a separação das fases e reduzir a viscosidade de óleos crus pesados (FIECHTER, 1992; HOLMBERG, 2002; VANCE- HARROP et al., 2003).

As micelas se formam após uma determinada concentração, denominada Concentração Micelar Crítica (CMC). Essa concentração crítica dos surfactantes corresponde à menor quantidade requerida para maior redução da tensão superficial, a qual é influenciada pela temperatura, força iônica e pH (MULLIGAN, 2005) (Figura 2).

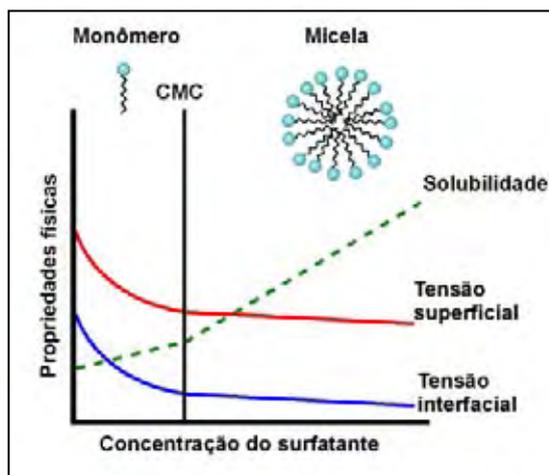


Figura 2. Tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante (MULLIGAN, 2005).

Os surfactantes também são capazes de formar hemi-micelas de monômeros de surfactantes, as quais incorporam metais pesados, sendo esses removidos por tensão interfacial e atração eletrostática. Os agrotóxicos, por exemplo, também podem ser solubilizados pelos surfactantes, facilitando sua degradação por microorganismos (MULLIGAN, 2005). Tais propriedades conferem a estas substâncias a capacidade detergente, emulsificante, espumante, espessante e dispersante, tornando-as um produto químico de grande versatilidade em suas aplicações (GREEK, 1990; 1991).

Para a redução ou minimização dos danos ambientais causados pelos derramamentos de óleo, diversos métodos de limpeza são internacionalmente utilizados, sendo os surfactantes uma opção interessante como agente dispersor. Agentes tenso-ativos, como os surfactantes, auxiliam na descontaminação de ambientes poluídos por resíduos de hidrocarbonetos, por meio da dispersão desses em pequenas gotas, facilitando sua retirada do ambiente e sua degradação por microorganismos (BANAT, 1995; BOGNOLO, 1999; BANAT et al., 2000; MAIER e SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; MAKKAR e CAMEOTRA, 2001; MULLIGAN, 2005).

A opção de uso de agente dispersor em contaminações por HPAs depende do tipo de ecossistema impactado, devido às características e sensibilidade ambiental. Outro aspecto importante a ser considerado, é o tipo de impacto sofrido, que é dependente do tipo de óleo derramado e dos fatores técnicos, tais como acesso e tipo de equipamento passível de ser utilizado, além dos custos operacionais (MILANELLI, 1994).

Segundo Healy et al. (1996), a contaminação ambiental por derrames de óleo, associados à surfactantes utilizados na indústria e na limpeza de ambientes atingidos por esses contaminantes, principalmente em vazamentos de óleo, freqüentemente acabam levando a uma maior degradação do ambiente.

Dispersantes químicos vêm sendo aplicados em marismas atingidos por derrames de petróleo e em inúmeras situações de simulações de contaminação (GETTER et al., 1984, CETESB, 2002, 2005). Em muitos casos, os dispersantes têm causado danos adicionais aos já provocados pelo óleo e, em alguns casos, podem ainda aumentar a penetração do óleo no sedimento na zona entre marés (GETTER et al., 1984; CETESB, 2002, 2005). Segundo a CETESB (2002) vários dispersantes, testados nas mesmas condições (tempo de exposição e concentração), podem apresentar efeitos muitas vezes mais tóxicos para as espécies de mangue do que quando estas estão expostas ao óleo. Quando foi aplicado dispersante em um manguezal logo após o óleo ter atingido as raízes das plantas deste ambiente, foi observada a morte dos vegetais. Estes resultados comprovam que a aplicação de surfactantes deve ser feita antes do óleo alcançar esse ecossistema. Além disso, existem casos em que a aplicação do dispersante não alterou o efeito do óleo e, em outros, reduziu, consideravelmente, o seu efeito.

Muitos países usam dispersantes na limpeza de praia. Todavia, a biota pode ficar exposta aos efeitos tóxicos do produto e do óleo dispersado (IPIECA, 2001). No

Brasil, a legislação ambiental proíbe a aplicação de dispersantes em praias (BRASIL, 2000). O uso de dispersantes pode ser um método atrativo para ser usado em recifes de coral próximos a um outro ecossistema ameaçado pelo óleo, mas por simulação feita no Panamá, onde foi aplicado dispersante em uma área de coral, na tentativa de se proteger um manguezal da contaminação por óleo cru, foi observado que o óleo, quimicamente dispersado causou declínio na abundância e no crescimento de corais e outros organismos associados (IPIECA, 1992). Outro trabalho que testou efeitos de cinco tipos de dispersantes de terceira geração sobre larvas de uma espécie de coral pôde constatar o aumento da toxicidade da mistura óleo-dispersante, pela indução de mortalidade, redução de taxas de estabelecimento e deformações morfológicas e comportamentais dos organismos (EPSTEIN et al., 2000). Segundo Sobreira (2004), áreas rochosas contaminadas por óleo bruto, demoraram de 5 a 8 anos para se auto-depurarem, enquanto áreas que estiveram sujeitas à ação do petróleo bruto tratado com dispersante levaram de 9 a 10 anos.

Portanto, devido ao pouco conhecimento relacionado à utilização desta técnica, principalmente no que se refere à toxicidade e eficiência dos produtos mais recentes, e também levando em consideração a sensibilidade intrínseca dos organismos de recifes, esta técnica deve ser evitada para esse fim (GUNDLACH e HAYES 1978, API 1985, NOAA 2000, CETESB 2002).

A grande maioria dos surfactantes, disponíveis comercialmente, é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle ambiental, levou pesquisadores e agências ambientais à procurarem por surfactantes naturais, como alternativa aos produtos sintéticos existentes.

Apesar da toxicidade e a genotoxicidade dos surfactantes ter sido investigada por diversos autores (WARNE e SCHIFKO, 1999, ANASTÁCIO et al. 2000, PETTERSSON et al. 2000, MORRALL et al., 2003; NALECZ -JAWECKI et al., 2003; EWA et al., 2005), os resultados obtidos ainda são considerados, relativamente, limitados. Devido à sua grande diversidade de aplicações e as diversificadas composições dessas substâncias, há um grande interesse dos pesquisadores e das agências de regulação ambiental em compreender melhor a atividade dos surfactantes sobre os organismos, antes que eles possam ser aplicados em programas de descontaminação por petróleo e seus derivados (EWA et al., 2005)

3.4. Biossurfactantes

Os biossurfactantes constituem um grupo de diversas moléculas sintetizadas por microrganismos (NITSCHKE et al., 2005a; CAMEOTRA e MAKKAR, 2004), produzidos, principalmente, pelo crescimento aeróbio em meios aquosos a partir de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou uma mistura desses. Alguns microrganismos excretam biossurfactante no meio durante o crescimento microbiano, para auxiliar no transporte e translocação de substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999). Já alguns microrganismos mantêm os biossurfactantes associados à parede celular, facilitando a penetração dos hidrocarbonetos no espaço periplasmático (KOCH et al., 1991). Os biossurfactantes tornam as moléculas pouco solúveis em moléculas disponíveis aos microrganismos, devido ao aumento da hidrofobicidade da superfície celular de alguns gêneros bacterianos e/ou devido ao aumento da solubilidade desses compostos (ZHANG e MILLER, 1994; ALTAHHAN et al., 2000).

Os biossurfactantes, quanto a sua estrutura química, são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, como os surfactantes. Segundo ZAJIC e SEFFENS (1984), os biossurfactantes podem ser classificados em cinco grupos, de acordo com a sua constituição química: (1) glicolipídios; (2) lipopolissacarídeos; (3) lipopeptídios; (4) fosfolipídios; (5) ácidos graxos e lipídios neutros (quadro 3). A maior parte dos biossurfactantes é aniônica ou neutra; alguns são catiônicos, como, por exemplo aqueles que contêm grupos amino (JACOBUCCI, 2000).

Quadro 4. Tipos de biossurfactantes e os respectivos microrganismos produtores.

TIPO DE BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMO
Glicolipídios	
- ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- sorofosfolipídios	<i>Torulopsis bombicola, Torulopsis apícola</i>
- trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e Lipoproteínas	
- peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
- viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- gramicidina	<i>Bacillus subtilis</i>
- polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
- ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>

- fosfolípidios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
- emulsam	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- carboidrato-lípido-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lípido-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
- vesículas	<i>Actinobacter calcoaceticus</i>
- células	Várias bactérias

Fonte. Nitschke e Pastore (2002).

Assim como a sua composição pode variar, as propriedades físico-químicas dos biossurfactantes também são bastante variáveis: os valores de CMC podem estar situados numa faixa de 1 a 200 mg/L, enquanto para os surfactantes sintéticos os valores podem chegar a 2420 mg/L, como no caso do dodecilsulfato de sódio (SDS). As massas molares dos biossurfactantes situam-se entre 500 a 1500 Da (VAN HAMME et al., 2006).

Quando comparados aos surfactantes de origem química, os biossurfactantes oferecem diversas vantagens, tais como: (a) aceitabilidade ecológica, pois são potencialmente aplicáveis em proteção ambiental (RAHMAN et al., 2002) pela sua baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (COSTA et al., 2006; MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; RAHMAN et al., 2002); (b) são efetivos em ampla faixa de temperatura e pH (BANAT et al., 2000; MULLIGAN, 2005); (c) podem ser produzidos a partir de fontes renováveis (NITSCHKE et al., 2005b; BENINCASA et al., 2002); (d) podem ser mais eficientes que os surfactantes químicos (BANAT, 1995).

Segundo revisão realizada por Nitschke e Pastore (2002), o maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde eles podem se aplicados, principalmente, em biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem e a recuperação melhorada de petróleo. Além disso, podem ser utilizados no melhoramento da qualidade do óleo, na síntese de novos polímeros, cosméticos e produtos relacionados e na síntese de bioplásticos. A utilização *in situ* e *ex situ* de biossurfactantes tem sido bastante estudada e desponta como alternativa viável para diversos campos específicos (MEIRA, 2007).

Os acidentes com derramamento de óleo se tornaram numerosos e têm causado muitos problemas ecológicos e sociais. Como os biossurfactantes aumentam a interação superficial água e óleo, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos impactados (BANAT, 1995). Uma vez que microrganismos degradadores estão presentes nos ecossistemas aquáticos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de poluentes (ATLAS, 1991).

Os biossurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Alternativamente, podem ser utilizados microrganismos produtores ou a adição de fatores de crescimento de microrganismos selvagens capazes de produzir estes compostos (LANG e WAGNER, 1993). Alguns estudos demonstraram que o uso de biossurfactantes aumenta a biodisponibilidade de compostos aromáticos pouco solúveis, como os HPAs. O tratamento de amostras contaminadas por fenantreno e naftaleno com biossurfactantes resultou em aumento nas suas taxas de mineralização e solubilização (NITSCHKE E PASTORE, 2002).

O uso de biossurfactantes na biodegradação de pesticidas vem sendo objeto de investigação. Surfactante produzido por *Pseudomonas* mostraram-se eficientes na degradação de hexaclorociclohexano e também emulsificaram, em menor grau, outros organoclorados como DDT e o ciclodienos (KARANTH et al., 1999). Os biossurfactantes também são utilizados na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo (MILLER, 1995). Surfactantes produzidos por *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *B. subtilis* demonstraram resultados promissores na remoção de piche em areias contaminadas (BOGNOLO, 1999).

Resíduos e frações de óleos pesados que se sedimentam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo e água, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru, após quebra da emulsão. Os sólidos resultantes da ação dos biossurfactantes carregam uma quantidade

limitada de óleo residual, tornando o descarte destes resíduos menos problemático (BOGNOLO, 1999).

Segundo Banat et al. (1991), a utilização de biossurfactantes para a limpeza de tanques, em substituição aos surfactantes convencionais, promove a limpeza e recuperação de 90% dos hidrocarbonetos presentes no resíduo.

A MEOR, uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo, consiste em utilizar microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual (BANAT, 1995). Segundo o autor, os microrganismos produzem polímeros e surfactantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha. Os biossurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas. O mecanismo de MEOR, *in situ*, deve-se, provavelmente, a múltiplos efeitos dos microrganismos no ambiente e no óleo. Estes efeitos incluem: formação de gás e aumento da pressão; produção de ácido e degradação da matriz calcárea; redução na viscosidade do óleo e da tensão interfacial pela produção de biossurfactantes; produção de solventes; degradação de macromoléculas do óleo, resultando em diminuição da viscosidade (NITSCHKE E PASTORE, 2002).

A utilização de biossurfactantes em MEOR envolve várias estratégias, como a injeção de microrganismos produtores de biossurfactantes no reservatório e subsequente propagação *in situ*; ou a injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento de microrganismos selvagens produtores de surfactantes; ou, ainda, a produção de biossurfactantes em reatores e posterior injeção no reservatórios (BANAT, 1995). Esta última estratégia é mais cara, devido à necessidade de capital para produção, purificação e introdução do biossurfactante (NITSCHKE E PASTORE, 2002). As outras estratégias requerem que o reservatório contenha bactérias capazes de produzir quantidades suficientes de biossurfactantes (BANAT et al., 2000).

A surfactina, um dos mais conhecidos biossurfactantes, possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral (PEYPOUX et al., 1999). O biossurfactante produzido por *R. erythropolis* inibiu o vírus do herpes simples e vírus da parainfluenza (UCHIDA et al., 1989). A iturina, lipopeptídeo produzido por *B. subtilis*, demonstrou atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras

(THIMON et al., 1995). Segundo Nitschke e Pastore (2002), biossurfactante produzido por *Lactobacillus* inibiu a adesão de bactérias entéricas patogênicas.

Os biossurfactantes são usados na agricultura, especialmente em formulações de herbicidas. Os compostos ativos destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas (LIN, 1996). Surfactantes de *Bacillus* foram utilizados para emulsificar formulações de agrotóxicos organofosforados imiscíveis (PATEL e GOPINATHAN, 1986). Dentre os biossurfactantes, os ramnolipídios possuem potencial para o controle biológico de fitopatógenos que produzem zoósporos (STANGUELLINI e MILLER, 1997).

Compostos tenso-ativos, produzidos por culturas de *Pseudomonas sp.* e *Alcaligenes sp.*, foram utilizados para flotação e separação de calcita (CaCO_3) e scheelita. A recuperação foi de 95% para CaCO_4 e 30% para CaCO_3 , ressaltando que reagentes químicos convencionais são incapazes de separar estes dois minerais (KOSARIC et al., 1984).

O biodispersan, polissacarídeo aniônico produzido por *A. calcoaceticus* A2, foi utilizado na prevenção da flocculação e dispersão de misturas de pedra calcária e água (ROSENBERG et al., 1988). Biossurfactantes de *C. bombicola* demonstraram eficiência na solubilização de carvão (POLMAN, et al., 1994).

Sorolipídios e ramnolipídios são os biossurfactante glicolipídicos mais amplamente utilizados na indústria dos cosméticos (LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL, 2009), devido a sua compatibilidade com as células da pele, sendo utilizados na constituição de cremes faciais (YAMANE, 1987; BROWN, 1991). Existem patentes para o uso de ramnolipídio como lipossomas e emulsões, componentes importantes para produção de diferentes cosméticos (ISHIGAMI et al. 1988). Segundo Lang e Philp (1998), os biossurfactantes micolatos também são adequados para aplicações em cremes, pastas e filmes.

A emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas (BANAT et al., 2000). Os biossurfactantes são utilizados como emulsionantes no processamento de matérias-primas. Esses agentes tenso-ativos encontram aplicação em panificação e em produtos derivados de carne onde influenciam suas características reológicas e a emulsificação de gorduras (VATER, 1986). O bioemulsificante produzido por

Candida utilis tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (SHEPHERD, et al., 1995).

Busscher et al. (1996) descobriram que um biossurfactante produzido pela bactéria termofílica *Streptococcus spp* pode ser usado para controle de incrustações em pasteurizadores, pois retardam a colonização de *Streptococcus thermophilus*.

Outros campos de utilização dos biossurfactantes incluem as indústrias de papel, têxtil e cerâmica. O biodispersante tem aplicação na indústria de tintas, (LIN, 1996), pois gera maior espalhabilidade e aumenta as propriedades de mistura. Também tem sido utilizados biossurfactantes para a estabilização de espuma necessárias na fabricação de extintores de incêndio (REISER, et al., 1989).

3.5. Bioindicadores de impactos ambientais

A água é um meio indispensável para a manutenção da vida no planeta. Além disso, a água é imprescindível para o desenvolvimento da agricultura, indústria, produção de energia e transportes. No entanto, atividades antrópicas influenciam na qualidade das águas de forma negativa, promovendo a degradação dos ecossistemas aquáticos, o que nos alerta sobre a necessidade de monitoramentos ambientais que permitam identificar os níveis de impacto e suas conseqüências para os organismos que dependem direta ou indiretamente desse bem natural (WOLSKA, et al., 2007)

Desde a década de 70, pesquisadores e gestores de recursos hídricos da Europa Ocidental e da América do Norte argumentam que as metodologias tradicionais de classificação de águas, baseadas em características físicas, químicas e bacteriológicas, não são suficientes para analisar a sua qualidade e atender aos seus usos múltiplos (CAIRNS e PRATT, 1993). Para a realização de avaliações eficientes, é de fundamental importância a aplicação de análises integradas, que associem respostas de metodologias tradicionais aos aspectos biológicos do sistema (METCALFE, 1989; ROSENBERG e RESH, 1993).

O uso de bioindicadores e biomarcadores vem sendo, nas últimas décadas, amplamente utilizado na avaliação da toxicidade de compostos químicos originados de atividades antrópicas (OLIVEIRA RIBEIRO e SILVA DE ASSIS, 2005). Bioindicadores são definidos como uma espécie capaz de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes, em diferentes níveis de organização biológica (ADAMS, 2002). Biomarcadores são alterações biológicas que

expressam a exposição e/ou o efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente (WALKER et al., 1996). Um biomarcador eficiente deve apresentar grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (STEGEMAN et al., 1992; BAINY et al., 1993).

Como os ecossistemas são ambientes dinâmicos e interativos, os estudos de identificação da influência de xenobiontes devem ser feitos em diferentes organismos, pois os efeitos e a influência de diferentes contaminações não deve se limitar, apenas, aos organismos diretamente expostos a um ambiente poluído. Diversos organismos, desde microorganismos até cultura de células humanas, podem ser utilizados como indicadores de impactos ambientais.

Dentre os diversos bioindicadores utilizados para o estudo dos efeitos tóxicos causados por diversos xenobióticos destaca-se a espécie *Allium cepa*; diversas espécies de peixes; e células de mamíferos mantidas em culturas, como as HepG2, que são células metabolizadoras que permitem a análise das atividades de agentes pró-mutágenos.

3.5.1. Bioindicador: *Allium cepa* (cebola)

As plantas superiores apresentam características que os tornam excelentes bioindicadores para avaliar impactos ambientais causados por xenobióticos, sendo freqüentemente utilizados em estudos de monitoramento. Essa característica se deve à sua sensibilidade para detectar substâncias mutagênicas em diferentes ambientes e também devido a possibilidade de se avaliar diversos parâmetros genéticos, que vão desde mutações pontuais até aberrações cromossômicas (CA) em células de diferentes órgãos e tecidos, tais como folhas, raízes e pólen (GRANT, 1994).

Dentre os vegetais superiores, *Allium cepa* tem sido indicado como um eficiente organismo-teste de citotoxicidade e genotoxicidade (FISKEJÖ, 1985; MATSUMOTO et al., 2005, 2006; FERNANDES et al., 2007 e 2009; LEME et al., 2008; CARITÁ et al., 2008; LEME e MARIN-MORALES, 2009). O uso deste sistema-teste foi introduzido por Levan (1938), quando o autor observou que a colchicina promovia distúrbios no fuso mitótico das células deste organismo. Desde então, a espécie tem sido citada como um dos melhores sistemas-teste utilizados para a avaliação do potencial genotóxico de substâncias químicas ambientais, devido ao seu baixo custo, boa sensibilidade, eficiente correlação com sistema-teste de

mamíferos e crescimento rápido de suas raízes (GRANT, 1982; RANK; NIELSEN, 1994; SMAKA-KINCL et al., 1996; CHAUHAN et al., 1999; ATEEQ et al., 2002; FATIMA e AHMAD, 2006; MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; MIGID et al., 2007). Além disso, também fornece parâmetros microscópicos como alterações anafásicas, aderências cromossômicas, pontes, fragmentações cromossômicas, C-metáfases e micronúcleos, que podem caracterizar evidências de eventuais mutações no material genético da célula (FERNANDES et al., 2007 e 2009).

Segundo Leme e Marin-Morales (2009), entre os parâmetros analisados no sistema-teste *A. cepa*, as alterações cromossômicas são as mais utilizadas para se detectar genotoxicidade de agentes diversos. Já o índice mitótico e algumas anomalias nucleares são utilizados para avaliar a citotoxicidade, enquanto que a análise de micronúcleos é indicada para avaliação dos efeitos mutagênicos de diferentes substâncias químicas.

Ao longo das várias décadas, muitos autores propuseram modificações nos testes realizados com o sistema *A. cepa*, para que estes se tornassem mais sensíveis na avaliação de químicos ambientais e de amostras complexas. Ma et al. (1995) propuseram modificações do teste, introduzindo a avaliação de efeitos mutagênicos pela indução de micronúcleos em células F_1 de raízes de cebola expostas a poluentes ambientais

Para Ma et al. (1995), dentre todos os *end points* verificados em células meristemáticas de vegetais, os micronúcleos são os mais efetivos e simples para indicar danos citológicos. Porém, para Rank e Nielsen (1997), a avaliação de alterações cromossômicas como *end point* não é válida apenas para detecção do potencial genotóxico, mas também para avaliação de mecanismos de ação dos agentes testados, fornecendo informações tanto de efeitos clastogênicos como de efeitos aneugênicos. De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), mesmo que as análises de micronúcleos em células meristemáticas e em células F_1 sejam adequadas para monitoramento ambiental, é recomendável a realização de uma análise combinada de micronúcleos em células meristemáticas e F_1 e a análise de alterações cromossômicas em células meristemáticas, a fim de tornar os resultados mais confiáveis.

Estudos de sensibilidade e de correlação entre sistemas-teste são fundamentais para a avaliação mais precisa de riscos ambientais, bem como para a

extrapolação de dados para outros organismos alvos (LEME e MARIN-MORALES, 2009). O sistema-teste *A. cepa* tem mostrado alta sensibilidade e boa correlação quando comparado com outros sistemas teste, principalmente com os de mamíferos (CHAUHAN et al., 1999). Bianchi (2008) demonstrou essa característica ao avaliar os efeitos genotóxicos do agrotóxico Malation. A autora obteve resultados positivos tanto no sistema-teste *A. cepa* como em células de mamíferos mantidas em cultura, reforçando a eficiência e compatibilidade dos resultados obtidos para os dois organismos utilizados como bioindicadores.

3.5.2. Bioindicador: Peixes

Os peixes são organismos muito utilizados nas avaliações de toxicidade ambiental, por apresentarem características especiais como, por exemplo, ampla distribuição geográfica (RODRIGUEZ-CEA et al., 2003) e alta sensibilidade às mudanças ambientais. Somado a essas características, como participam de diferentes níveis tróficos, são importantes também para as avaliações do potencial de bioacumulação de um dado poluente, como os metais pesados e os compostos orgânicos (DE LEMOS E TERRA, 2003). Como os peixes fazem parte da alimentação humana, eles podem afetar, diretamente, a nossa saúde, o que torna o seu uso ainda mais atrativo para os programas de biomonitoramento da poluição aquática (RAJAGURU et al., 2002; ZHOU et al., 2008). Desta forma, estes organismos têm sido amplamente utilizados em avaliações laboratoriais de toxicidade e como indicadores biológicos da qualidade de recursos hídricos.

Para que uma espécie de peixe possa ser considerada um bom organismo indicador da qualidade da água, ela deve ser residente, ou seja, não apresentar migração trófica ou reprodutiva, ser constante no ambiente e os espécimes selecionados para o experimento não devem apresentar displasias e/ou tumores/neoplasias, externamente detectáveis nos tecidos analisados (MALABARBA et al., 2004). Sanchez-Galan et al. (1998) acrescentam que, para que uma espécie seja ideal para estudos de genética toxicológica, é necessário que esta se encontre distribuída nos diversos ecossistemas; apresente alta sensibilidade na detecção de poluentes, mesmo quando estes estiverem presentes em baixas concentrações no ambiente; seja adequada para ensaios laboratoriais; e permita captura de indivíduos em populações naturais, sem o comprometimento da conservação da espécie.

Muitas espécies de peixes são usadas como sentinelas para a avaliação da qualidade da água por oferecer diversos parâmetros de avaliação (RAMSDORF, 2007; RIVERO et al., 2008). Os parâmetros genéticos, que são indicados para a identificação dos efeitos dos poluentes e para a avaliação das alterações do potencial tóxico ou genotóxico dos contaminantes, oferecem importantes informações sobre a característica ambiental, após um impacto sofrido (JESUS e CARVALHO, 2008).

Segundo Kligerman (1982), os primeiros pesquisadores a utilizarem peixes na avaliação de efeitos mutagênicos de agentes químicos foram Tsoi (1970, 1974) e Longwell (1976), sendo este último o primeiro a usar a análise citogenética para avaliar danos cromossômicos de peixes coletados em ambientes poluídos.

O teste do micronúcleo e anormalidades nucleares e do ensaio do cometa são importantes ferramentas utilizadas para avaliar danos no material genético de organismos expostos a substâncias químicas com potencialidade genotóxica e mutagênica, sendo esses testes aplicados, com sucesso, em espécies peixes (CARITÁ, 2010).

O teste do micronúcleo foi originalmente desenvolvido para mamíferos, mas foi, subsequente, modificado para aplicação em peixes (CARRASCO, 1990; AL-SABTI e METCALFE, 1995). Em geral, para a realização do ensaio do micronúcleo, podem ser amostradas células de vários tecidos como brânquias, epitélio (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005), fígado (RAO et al., 1997), rim (PALHARES e GRISOLIA, 2002; RODRIGUEZ-CEA, 2003; BARŠIENÉ et al., 2006) e sangue periférico (PALHARES e GRISOLIA, 2002; VENTURA et al., 2008).

A aplicação do teste do micronúcleo em eritrócitos de peixe é muito popular. Os tecidos de proliferação de eritrócitos estão localizados nos órgãos hematopoiéticos, sendo que, nos peixes, o rim anterior é o principal deles. O timo e o endotélio do coração e dos vasos sanguíneos são os locais de menor atividade hematopoiética (SOLDATOV, 2005). Segundo Schlegel e MacGregor (1984), enquanto os eritrócitos micronucleados dos órgãos hematopoiéticos refletem um dano genotóxico que ocorreu durante um tempo equivalente ao ciclo celular, os da circulação periférica refletem eventos que ocorreram em um tempo igual ao da vida útil dos eritrócitos circulantes. Portanto, a aplicação do teste do micronúcleo em amostras de sangue periférico é especialmente indicada para as condições de

exposição crônica. Este é o caso, por exemplo, de estudos ecotoxicológicos, *in situ*, utilizando tanto espécies marinhas como de água doce.

Os peixes são sensíveis aos efeitos de contaminantes ambientais, sendo que algumas espécies respondem de maneira similar à resposta dos mamíferos (AL-SABTI e METCALFE, 1995), podendo, então, ser usados para avaliar possíveis propriedades genotóxicas de agentes físicos e químicos. Os ensaios de micronúcleo em peixes têm se mostrado bem adequados, quando usados para a avaliação do potencial genotóxico de várias substâncias como a aflatoxina B1, as bifenilas policloradas - PCBs (AL-SABTI, 1986), o benzo[a]pireno (MARIA et al., 2002; GRAVATO e SANTOS, 2003), o cádmio (RODRIGUEZ-CEA et al., 2003), o cromo (AL-SABTI et al., 1994; MATSUMOTO et al., 2006), o mercúrio e o selênio (AL-SABTI et al., 1994); a mitomicina C (BAHARI et al., 1994; PALHARES e GRISOLIA, 2002) a ciclofosfamida (RODRIGUEZ-CEA et al., 2003) e o raio-X (BAHARI et al., 1994).

Além da avaliação ambiental realizada por meio de *endpoints* como aberrações cromossômicas, trocas entre cromátides-irmãs e a formação de micronúcleo, o ensaio cometa também tem sido bastante utilizado. Segundo Pax-Y-Miño et al. (2002) esse ensaio é de fácil aplicação; permite a obtenção de resultados em tempo reduzido e a detecção de danos diretos no DNA. São utilizados dois protocolos principais para execução do ensaio do cometa, onde a variação se dá, basicamente, pela diferença do pH utilizado no teste (versão neutra e versão alcalina). Östling e Johanson (1994) foram os primeiros a desenvolverem a técnica de eletroforese em microgel para detectar danos no DNA em célula individual, sob condições de pH neutro. Subseqüentemente, Singh et al. (1988) desenvolveram uma técnica de microgel que envolve eletroforese sob condições alcalinas (pH 13). Com a elevação do pH, a sensibilidade do teste foi aumentada, podendo-se visualizar, além das quebras de fita dupla e *crosslink*, visualizadas na versão neutra, as quebras de fita simples e os sítios álcali-lábeis. (TICE et al., 2000). A partir de então, os estudos de monitoramento *in situ* e em laboratórios, realizados com peixes, tem utilizado a versão alcalina do ensaio do cometa, que é um teste de genotoxicidade que avalia os contaminantes ambientais.

As células mais utilizadas para avaliação de danos no DNA, por meio do ensaio do cometa, em peixes, são os eritrócitos circulantes (LEE e STEINERT, 2003). No entanto, diversos autores têm utilizado suspensão de células de

brânquias, por essas estarem em contato direto com o meio ambiente e, conseqüentemente, com os xenobióticos presentes na água (DIECKMAN et al., 2007; CAVALCANTE et al., 2008; ALI et al., 2009). O ensaio do cometa pode ser realizado em qualquer tipo celular, desde que se obtenha células individualizadas. Kilemade et al. (2004), após análise de danos no DNA em células obtidas de diversos tecidos como epiderme, brânquias, baço e fígado da espécie de peixe *Scophthalmus maximus* L., verificaram que as células de fígado e de brânquia são mais sensíveis que as células de baço e da epiderme.

3.5.3. Bioindicador: Cultura de HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line)

Segundo Morales (2008), o uso de culturas de células é uma alternativa eficiente para ser aplicada em diversos ensaios de toxicidade, pela sua facilidade de manipulação e observação de parâmetros microscópicos, bioquímicos e moleculares. O modelo *in vitro* ganhou, nos últimos anos, uma ampla aceitação na investigação toxicológica, por proporcionar ferramentas avançadas, protocolos confiáveis e possuir diferentes aplicações, desde estudos de morte celular até a toxigenômica (MAZZEO, 2009).

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

Testes *in vitro*, com células de mamíferos, podem ser utilizados nos estudos de avaliação da mutagenicidade e genotoxicidade dos químicos ambientais (CARDOZO et al., 2006), pois apresentam uma boa correlação entre o efeito observado e o efeito esperado no homem (BRUSICK, 1987).

Várias linhagens celulares de mamíferos podem ser utilizadas em testes de genotoxicidade de amostras ambientais, como as células de hepatoma de camundongo (HTC), células de hepatoma humano (HepG2), células de carcinoma humano (HeLa), células de ovário de hamster (CHO), células de pulmão de hamster (V79 e CHL), células epiteliais de pulmão humano (L132 e A549), células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), fibroblastos de ratos (L929), fibroblastos humanos (RTL-W1 e NIH-3T3), leucócitos de ratos e camundongos e linfócitos

humanos. Dentre as linhagens utilizadas em mutagênese, as células metabolizadoras, que expressam as enzimas de fase I e de fase II, são muito usadas em avaliações ambientais, pois possuem um papel fundamental na metabolização e detoxicação de xenobióticos que podem reagir com o DNA e, assim, induzir possíveis eventos mutacionais (TSUBOY et al., 2007). Testes utilizando células metabolizadoras mantidas em cultura, como as HTC e HepG2, constituem umas das melhores ferramentas para se detectar e avaliar os riscos que compostos químicos podem conferir a saúde do homem, pois são capazes de refletir o metabolismo de compostos genotóxicos melhor do que outros modelos *in vitro*, que exigem ativação metabólica exógena (GÁBELOVÁ et al., 2004; PARK e CHOI, 2007).

Cultura de células HepG2, uma linhagem celular derivada de hepatomas humanos, tem sido considerada uma importante ferramenta para avaliação de mutágenos e, principalmente, de pró-mutágenos (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003; KNASMÜLLER et al., 2004). São facilmente manuseadas e possuem a maioria das características morfológicas das células do fígado, além de conter grande parte das enzimas responsáveis pela ativação de vários compostos (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003). Desta maneira, estas células vêm sendo consideradas uma ferramenta importante para avaliação da genotoxicidade, pois vários compostos genotóxicos são mutágenos indiretos (KNASMÜLLER et al., 1998; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003; KNASMÜLLER et al., 2004).

As células HepG2 foram isoladas, em 1979, de hepatoblastoma primário e apresenta morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmáticas características das células normais do fígado humano (KNASMÜLLER et al., 1998). Essas células conservam as atividades das enzimas de fase I, tais como as do citocromo P450 CYP1A1, CYP1A2, CYP2B e CYP2E1, como também as enzimas da fase II, incluindo glutatona-S-transferases, sulfotransferases, N-acetiltransferases e glucuronosiltransferases, sendo que tais enzimas estão envolvidas no metabolismo de carcinógenos, as quais apresentam importante função na ativação e detoxificação de carcinógenos reativos de DNA (UHL et al., 1999; MAJER et al., 2004). Portanto, é aceitável que os ensaios com células de HepG2 reflitam mais adequadamente os danos causados por mutágenos que os testes *in vitro* feitos com bactérias ou células de mamíferos, os quais requerem a adição de misturas de

ativação exógena para mimetizar o metabolismo de compostos de ação indireta (UHL et al., 2000; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

A linhagem de células HepG2 têm sido utilizada em um largo número de estudos de genotoxicidade, onde alguns protocolos foram desenvolvidos, com sucesso, para testes com os seguintes *endpoints*: aberrações cromossômicas, troca entre cromátides irmãs, micronúcleo e mutações gênicas, os quais podem ser mensurados diretamente por tais células (NATARAJAN e DARROUDI, 1991; KANASMULLER et al., 1998; UHL et al., 1999; JIN et al., 2009)

Vários protocolos têm sido utilizados para avaliar a viabilidade e a citotoxicidade de diversas substâncias. Dentre os ensaios mais conhecidos destacam-se ensaio de Trypan *Blue*, liberação de cromo, avaliação da síntese de DNA, avaliação do metabolismo celular (teste do MTT) e microscopia eletrônica. Por ser um ensaio relativamente simples de ser realizado, apesar de criterioso como todos os outros, o experimento de MTT é um dos mais utilizados para se determinar a citotoxicidade de substâncias em cultura de células (COSTA e SOUZA, 2005).

O teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um teste amplamente utilizado para a determinação da viabilidade de células isoladas. Estudos de citotoxicidade, avaliados por esse teste, também tem utilizado células HepG2, para avaliar o potencial de contaminantes em induzir morte celular (TULLY et al., 2000).

O MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), que tem sua estrutura molecular em forma de anel, é clivado na célula por uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica, dando origem a cristais de formazan, que têm coloração violeta e são insolúveis. Para que seja possível a leitura dos resultados obtidos nesse teste, o produto violeta insolúvel em água deve ser dissolvido em um solvente específico e a leitura da intensidade de cor da solução realizada em um leitor de microplacas com um filtro de 570nm (LOCCI et al., 2000). A clivagem do MTT tem várias propriedades desejáveis para a amostragem de sobrevivência e proliferação celular. O MTT é clivado por todas as células vivas, metabolicamente ativas, mas não por células mortas ou em processo de morte. Desta maneira, também é possível verificar ausência de proliferação, uma vez que, células ativas produzem mais formazan que células onde o ciclo celular foi inibido (MOSMANN, 1983).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SUBSTÂNCIA ESTUDADA

A substância avaliada neste estudo foi o biossurfactante ramnolipídio, um biossurfactante pertencente à classe dos glicolipídios. Esta classe de surfactantes é constituída por carboidratos ligados a longas cadeias de ácidos graxos associadas a moléculas de ramnosos (Figura 3) (NITSCHKE et al., 2005).

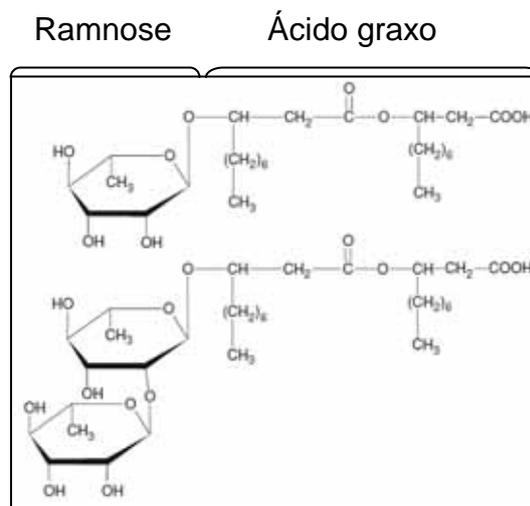


Figura 3. Estrutura química do biossurfactante ramnolipídio.

4.2. PROCESSO DE OBTENÇÃO DO RAMNOLIPÍDIO

4.2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado para a produção de ramnolipídio foi a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* LBI. A linhagem usada foi isolada de solo contaminado por petróleo (BENINCASA et al., 2002).

4.2.2. Inóculo e Produção de ramnolipídio

Para o preparo do pré-inóculo, o microrganismo foi semeado em meio inclinado, permanecendo neste ambiente por 24 horas à 30°C. Em seguida, para a obtenção de uma suspensão microbiana, foi adicionado ao meio 3 mL de água destilada estéril. Esta suspensão foi padronizada a 610 nm, densidade óptica de $0,65 \pm 0,01$ (aprox. 10^8 CFU/ml). Posteriormente, foram transferidos 4 mL desta solução para frascos de Erlenmeyer, contendo 200 mL de meio mineral (ROBERT et al., 1989). Foi acrescido nestes frascos, como única fonte de carbono do meio, 4 mL de óleo de soja. O frasco com este inóculo permaneceu por 24 horas em shaker a

200 rpm e 30°C. A produção de ramnolipídios foi feita em frascos de Erlenmeyer (volume de 1 L), contendo 300 mL de meio mineral, 6 mL do inóculo e 6 mL de óleo de soja. Os frascos foram incubados em shaker à 30°C, 200 rpm por um período de 120 horas. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,8.

4.2.3. Extração do ramnolipídio

Para realização da extração dos ramnolipídios, o caldo com o produto (biossurfactante) foi centrifugado a 12.000 rpm, durante 20 minutos. O sobrenadante foi separado e acidificado com H₂SO₄ 6M para pH 2,0, sendo adicionado, a seguir, um volume equivalente ao do caldo de clorofórmio/metanol (2:1). A mistura foi vigorosamente agitada por 10 minutos e, em seguida, mantida em repouso até a completa separação das fases. A fase orgânica foi removida e a operação se repetiu com a fase aquosa. Para a concentração do produto, foi utilizado rotavapor, que promoveu a evaporação dos solventes. O produto extraído foi uma mistura de mono e di-ramnolipídio.

4.2.4. Investigação das propriedades tensoativas do ramnolipídio

Para a determinação da tensão superficial do ramnolipídio, foi seguido o método do anel de De Nöuy, utilizando tensiômetro Krüss K6. Neste processo, foi utilizada uma concentração de 1g/L de ramnolipídio, considerada padrão para este produto (COSTA et al., 2006; COSTA et al., 2009 e NITSCHKE et al., 2010). A tensão interfacial do ramnolipídio foi obtida a partir de uma solução contendo 1 g/L do biossurfactante e n-hexadecano, na proporção de 1:1 (10 mL da concentração do biossurfactante e 10 mL de n-hexadecano), utilizando para esta avaliação o tensiômetro Krüss K6. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3. INVESTIGAÇÃO TOXICOLÓGICA

4.3.1. Simulação de um derrame de petróleo cru pesado

Todos os experimentos realizados para avaliar o potencial tóxico, genotóxico e mutagênico do ramnolipídio quando utilizado na biorremediação de águas impactadas por petróleo foram desenvolvidos a partir de uma simulação, em água doce, de um derrame de óleo cru pesado, proveniente da Bacia de Campos/RJ - Brasil. O experimento foi realizado em recipientes cilíndricos, montados com tubos de PVC (Poli Cloreto de Vinila) de 1,20 m de comprimento e 150 mm de diâmetro

(Figura 4). Estes recipientes receberam um volume equivalente a 20 L de água (coletada em um tanque de criação de peixes, abastecido com água de poço artesiano) e 5 mL de petróleo, criando assim uma pluma de óleo de, aproximadamente, 0,2 mm ou 200 μm . Foi colocada na base dos tubos uma bomba de circulação com uma vazão de aproximadamente 480 L/h, com o intuito de simular a movimentação de um corpo d'água.

Nos tubos foram simuladas as seguintes situações: derrame de petróleo (água + petróleo = P); derrame de petróleo biorremediado com biossurfactante ramnolipídio na concentração de 1 g/L (água + petróleo + biossurfactante 1 = PB1) e derrame de petróleo biorremediado com biossurfactante ramnolipídio na concentração 10 g/L (água + petróleo + biossurfactante 2 = PB2). A proporção de biossurfactante utilizado nas misturas foi de 5% do total de óleo derramado (conforme resolução CONAMA 269 para surfactante sintético). Foram realizados, nas mesmas condições acima citadas, experimentos com água e biossurfactante (água + biossurfactante 1g/L = B1; água + biossurfactante 10 g/L = B2). A proporção de biossurfactante foi a mesma utilizada nos experimentos que continham o petróleo. Um controle ambiental – CA, realizado com água coletada no tanque de criação de peixes, acompanhou os experimentos (Figura5).

Os tubos utilizados na simulação com as misturas descritas acima, foram vedados com papel alumínio e expostos em ambiente externo, por 16 horas (das 16h às 8h). Esse procedimento foi realizado para garantir que apenas os hidrocarbonetos hidrossolúveis fossem incorporados na água do experimento. Em seguida, as misturas foram expostas a luz solar intensa, por 6 horas (das 8h às 14h), para que os produtos de degradação também fossem incorporados ao solvente (Figura 5A).

Posteriormente, foram coletadas as frações solúveis do petróleo contidas na água (PB1, PB2 e P), por diferença de densidade (Figura 5B), bem como amostras de B1, B2 e CA, para a realização de análises qualitativa e quantitativa de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) e de pH. A análise de hidrocarbonetos foi realizada pela empresa Analytical Technology Serviços Analíticos e Ambientais Ltda. O equipamento utilizado para análise foi um cromatógrafo gasoso marca Thermo, modelo Focus, acoplado a um espectrômetro de massas marca Thermo, modelo DSQ. A coluna utilizada para a análise foi VB-5,

30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m. A empresa seguiu as normas de análise estabelecidas pela USEPA 8270D.

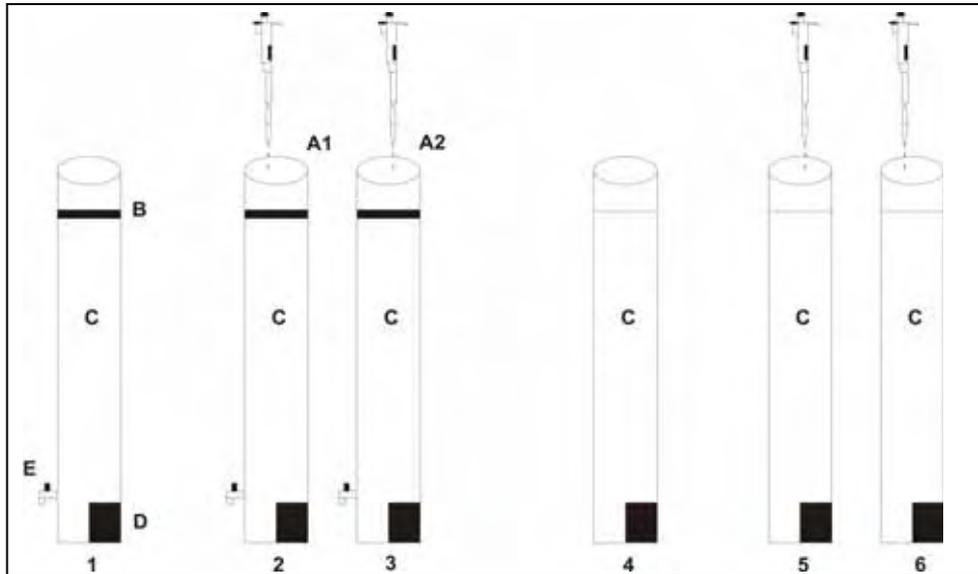


Figura 4. Esquema ilustrativo do experimento **1.** Água + Petróleo (P); **2.** Água + petróleo + biossurfactante 1 g/L (PB1); **3.** Água + petróleo + biossurfactante 10 g/L (PB2); **4.** Água coletada nos tanques de criação de peixe (CA) **5.** Água + biossurfactante 1g/L (B1); **6.** Água + biossurfactante 10 g/L (B2); **A1 e A2.** Adição nas amostras, por meio de gotejamento realizado com micropipeta, de 0,25 mL de biossurfactante, na concentração 1 g/L (A1) e 2 g/L (A2); **B.** Representação da pluma de óleo (200 μ m); **C.** 20 L de água obtida nos tanques de criação de peixes, que são abastecidos com água de poço artesiano; **D.** Bomba de circulação de água; **E.** Torneira para promover a vazão para coleta da amostra que contém a fração solúvel do petróleo.



Figura 5. Simulação de derrame de petróleo cru pesado, remediado com biossurfactante ramnolípido. **A.** simulação realizada em ambiente externo; **B.** Coleta da fração solúvel do petróleo contida na água por diferença de densidade.

4.3.2. Avaliação do potencial tóxico, genotóxico e mutagênico

4.3.2.a. Sistema-teste *Allium cepa*

- Avaliação do potencial tóxico

Para investigar o potencial tóxico das concentrações de 1 g/l e 2 g/L do biossurfactante ramnolipídio (BIO1 e BIO2, respectivamente) e das amostras P, PB1, PB2, B1, e B2 foi realizado o teste de germinação de sementes. Este teste foi desenvolvido em placas de Petri, contendo 100 sementes de *A. cepa* em cada placa. As sementes ficaram expostas por 5 dias nos tratamentos. Durante o ensaio, as placas de Petri foram cobertas com papel alumínio e mantidas em condições de BOD. O controle negativo foi realizado com água ultrapura. Após 5 dias de exposição, foram contabilizadas as sementes germinadas, cujos resultados foram comparados, estatisticamente, aos dados obtidos no controle negativo. Após a quantificação do índice de germinação, as raízes, com aproximadamente 2 cm de comprimento, foram coletadas e fixadas em Carnoy (3:1), para, posteriormente, serem preparadas as lâminas para análise da frequência de aberrações cromossômicas e de micronúcleo.

- Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico

Para avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade das amostras P, PB1, PB2, B1 e B2, foram avaliados dois parâmetros: aberrações cromossômicas e micronúcleos.

Todos os testes foram realizados em duplicata, utilizando as sementes que germinaram nas amostras P, PB1, PB2, B1 e B2. O controle negativo foi realizado em água ultrapura, o controle positivo aneugênico em trifluralina (0,84 mg/L) e o controle positivo clastogênico em Metil-metanosulfonato - MMS (10 mg/L).

O potencial genotóxico, obtido por meio do teste de aberrações cromossômicas, foi realizado em células de 2 diferentes regiões da planta: região meristemática da raiz e região embrionária do caule (hipocótilo), enquanto que a investigação do potencial mutagênico foi avaliado tanto em células localizadas nas regiões citadas acima como também na região F₁ da raiz (Figura 5).

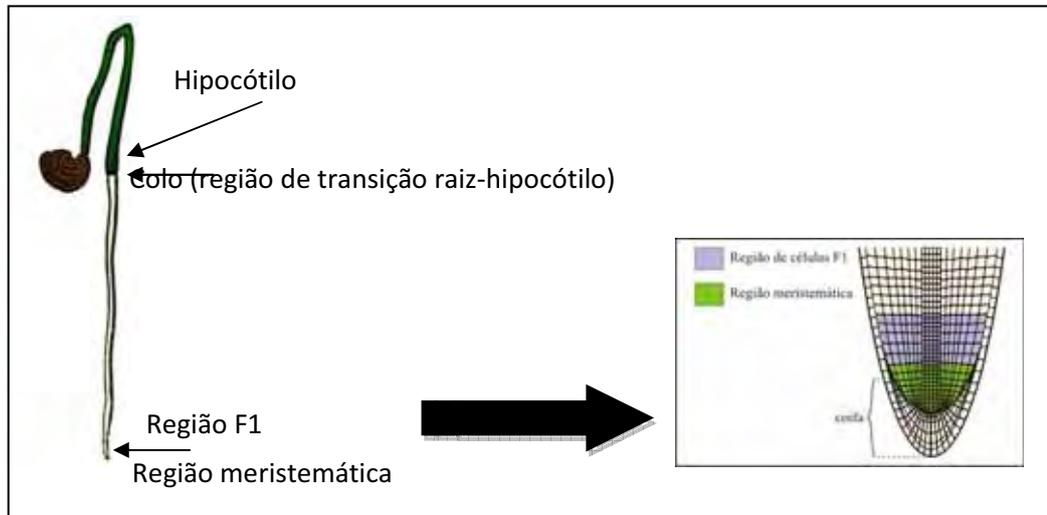


Figura 6. Esquema ilustrativo das regiões de plântula de *A. cepa*, utilizadas para a avaliação do potencial genotóxico (região meristemática da raiz e hipocótilo) e do potencial mutagênico (região meristemática da raiz, região F₁ e células do hipocótilo) das amostras e concentrações estudadas.

As raízes fixadas foram coradas por meio da reação de Feulgen e as três regiões determinadas para análise foram seccionadas e preparadas, em lâmina, pelo método comum de esmagamento suave. Foram preparadas 10 lâminas para cada uma das amostras avaliadas, sendo analisadas cerca de 500 células por lâminas, para cada uma das regiões da planta. A análise foi realizada em microscópio de luz, utilizando aumento de 1000 vezes.

4.3.2. b. Sistema teste *Oreochromis niloticus*

Para a realização dos testes com a espécie *O. niloticus* (Periformes, Cichlidae), conhecida popularmente como tilápia do Nilo, os espécimes foram transferidos do tanque de criação, com sistema de aeração e filtragem, para aquários com capacidade de 50 L, onde foram aclimatados por 7 dias, sob aeração e à temperatura de 23°C. Após o período de aclimação, foram montados 7 grupos experimentais (P, PB1, PB2, B1, B2, CA, controle negativo e controle positivo) em aquários com capacidade de 50L, onde foram expostos, por um período de 96h, 6 exemplares por tratamento. Todos os indivíduos, antes de serem tratados, foram pesados (média – 15 g) e mensurados (média – 10 cm) (Figura 6). O controle negativo foi realizado, expondo os peixes à água do tanque onde foram criados. O controle positivo foi realizado injetando, intraperitonealmente, em cada espécime, 3 mL de ciclofosfamida/50g de massa corpórea (concentração de 0,04mg/g). Após 96h de exposição aos tratamentos, foram coletadas amostras de sangue de todos os

indivíduos, por meio de punção cardíaca, utilizando, para este procedimento, seringas de 1mL previamente heparinizadas. Após a coleta das amostras de sangue para o ensaio do cometa, teste do micronúcleo e para a avaliação de alterações ultraestruturais, os animais foram sacrificados por rompimento medular. Após o sacrifício dos peixes, foram retirados os seus arcos branquiais, que foram utilizados no preparo da suspensão de células branquiais, utilizada no ensaio do cometa.



Figura 7. Exemplar de *O. niloticus* com aproximadamente 8 cm de comprimento e cerca de 10 g.

- Teste do micronúcleo utilizando eritrócitos circulantes

O sangue coletado dos indivíduos tratados foi utilizado para a preparação de lâminas, pelo método do esfregaço (extensões sanguíneas), sendo a primeira gota descartada, para evitar a contaminação do material. As lâminas foram fixadas em etanol 100%, por dez minutos e, depois de 24h, submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N a 60°C, por 11 minutos. Imediatamente após a hidrólise, as lâminas foram submetidas ao reativo de Schiff, por duas horas.

Os testes foram realizados em duplicata, sendo analisado um total de 6000 eritrócitos por tratamento (1000 células por indivíduo), nos quais foi quantificada a frequência de eritrócitos portadores de micronúcleos. Os resultados obtidos nos tratamentos foram comparados e analisados estatisticamente, pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com os resultados do teste controle negativo.

- Ensaio do cometa

Obtenção da suspensão celular

Células branquiais: A extração das brânquias dos peixes foi realizada após a exposição dos organismos por 96h nos tratamentos e a retirada do sangue periférico destes exemplares. Os filamentos branquiais foram separados e limpos, com o auxílio de um pincel e solução salina, para a eliminação da maior quantidade

possível de sangue do material. Em seguida, o arco branquial foi cortado e descartado. Os filamentos branquiais foram então armazenados em 700 μL de solução de ringer para vertebrados e mantidos em gelo, até o momento da preparação da suspensão celular. A metodologia seguiu o protocolo descrito por Kilemade et al. (2004). Para o preparo da suspensão, os filamentos foram picotados com o auxílio de lâminas de metal, sobre uma placa de cera, e o macerado resultante foi colocado em um tubo de microcentrífuga. Para a melhor dissociação das células, foram adicionados 200 μL de tripsina a 0,25% (0,125 g de tripsina em pó + 50 mL de solução salina + 0,5 mL de EDTA 0,5 M), sendo a mistura homogeneizada manualmente por inversão periódica. Após 15 minutos, foram acrescentados, no mesmo tubo, 200 μL de soro bovino fetal. O tubo foi novamente homogeneizado. Passados outros 15 minutos, o filtrado foi coletado, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e homogenizado para a obtenção da suspensão celular branquial.

Sangue periférico: O ensaio foi realizado segundo metodologia descrita por Singh et al. (1988), com algumas modificações. Foi realizada uma coleta, por punção cardíaca, de 3 μL sangue de todos os peixes experimentados. O sangue foi diluído em 1000 μL de solução fisiológica de vertebrados.

Preparo das lâminas

Após o preparo das suspensões celulares (células branquiais e de sangue periférico) 15 μL da suspensão de células branquiais foram adicionadas em 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C. Sendo posteriormente gotejada sobre uma lâmina recoberta com uma fina camada de agarose de ponto de fusão a 60°C. O mesmo procedimento foi realizado para as células de sangue periférico, no entanto, apenas 10 μL da suspensão celular foram adicionadas à agarose de baixo peso de fusão. As lâminas foram cobertas por lamínula e mantidas por 20 minutos à 5°C. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em uma solução de lise (1 mL triton X-100, 10mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0. Solução de lise estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, ~8,0g de NaOH sólido para 1L), em temperatura de aproximadamente 5°C, por, no mínimo, uma hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese, contendo tampão (NaOH 300mM + EDTA 1 mM, pH 12,1) à 5°C, onde permaneceram por 20 minutos (células de sangue periférico) ou por 30 minutos (células branquiais), para que houvesse o desenovelamento do DNA. Na seqüência,

foi realizada a corrida de eletroforese em corrente de 49 V e 300mA por 20 minutos. Após a corrida de eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em tampão (Tris 0,4M-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, secas a temperatura ambiente e fixadas em etanol 100%, por dez minutos. A coloração foi feita, no momento da análise, com brometo de etídeo (0,02 mg/mL).

Foram analisados, aleatoriamente, em microscópio de epifluorescência Leica, (filtro B – 34: excitação 1 = 420 n - 490n, barreira: l = 520 nM, objetiva de 40X) 100 nucleóides de cada indivíduos exposto aos tratamentos. Os nucleóides foram classificados visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos, em: classe 0 (ausência de dano visível), classe 1 (pequeno dano – cauda menor que uma vez o tamanho do nucleóide), classe 2 (médio dano – cauda com tamanho de uma a duas vezes o tamanho do nucleóide) e classe 3 (grande dano – cauda com tamanho maior que duas vezes o tamanho do nucleóide) (KOBAYASHI et al., 1995). Os escores de cada tratamento foram verificados e submetidos ao teste estatístico não-paramétrico de kruskal-Wallis, para comparação dos resultados entre os tratamentos e o controle negativo, bem como dos tratamentos entre si.

- Alterações ultraestruturais em eritrócitos circulantes

A análise de alterações ultraestruturais das células eritrocitárias dos indivíduos expostos às amostras P, PB1, PB2, B1 e B2 foi realizada segundo o protocolo descrito por Rey-Vásquez e Guerreiro (2007), com algumas modificações.

Foram coletadas, por punção cardíaca, amostras de sangue (cerca de 1mL de cada exemplar) de 5 exemplares de peixes expostos em cada uma das amostras. O sangue foi centrifugado (400 G, 10 min, 4°C), para a obtenção de pellets. Os pellets foram fixados em glutaraldeído 3% em 0,1M de tampão fosfato e acondicionado em Agar 2% (esse procedimento foi adotado para evitar perda de material durante o processamento). Posteriormente, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% em 0,1M de tampão Fosfato (pH 7,4) por 2h. Subseqüentemente, o material foi lavado em água destilada, desidratado em série de álcool (80, 90, 95 e 100%) e acetona (50 e 100%) por 15 minutos e embebido em resina Spurr. O material foi colocado em estufa à 60°C, por um período de 48 horas. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados em ultramicrótomo. As secções foram coletadas em grades de cobre e passaram por contraste com acetato de uranila e citrato de chumbo, durante 45 e 10 minutos, respectivamente. As grades foram observadas ao

Microscópio Eletrônico de Transmissão PHILIPS 100 TEM, onde também foi feita a documentação fotográfica.

4.3.2.c. Sistema teste HepG2

Para a realização dos ensaios com células mantidas em cultura, foram utilizadas células de hepatoma humano - HepG2 ($2n = 46$ cromossomos), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram estocadas em nitrogênio líquido e cultivadas em frascos de cultura de tecido de 25 cm^2 , com meio MEM (EARLE, Cultilab) adicionado de 10 mL de piruvato de sódio 100 mM (Gibco) e 1 mL da solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I./ mL/estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab) para completar o volume de 1 L e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF-Gibco). Os frascos cultivados foram mantidos em atmosfera úmida, a 37°C e com 5% de CO_2 .

- Avaliação do potencial citotóxico do biossurfactante ramnolipídio (Teste do MTT)

O teste do MTT foi desenvolvido com células de HepG2, segundo protocolo descrito por Mosmann (1983), com algumas modificações. Para a realização do teste, as células de HepG2, mantidas em frascos de cultura de 25 cm^2 em atmosfera úmida, a 37°C e com 5% de CO_2 , foram tripsinizadas (0,5%) por 5 minutos. A inativação da tripsina foi feita com a adição do meio MEM. A suspensão celular obtida foi semeada em microplaca de 96 poços, sendo cada poço preenchido com cerca de 2×10^4 células, em 200 μL de meio de cultura completo (meio de cultura + SBF), exceto nos poços referentes ao branco, onde foram adicionados apenas meio de cultura completo (Figura 7). Posteriormente, a microplaca foi incubada, para estabilização, em atmosfera úmida, a 37°C e com 5% de CO_2 , por um período de 24h. Decorrido este tempo, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado e as células foram expostas por 24h às diferentes concentrações do biossurfactante ramnolipídio (0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 1,8 e 2g/L), utilizando meio de cultura completo como meio de diluição. Os tratamentos controle negativo e positivo foram realizados, respectivamente, com meio de cultura MEM e triton X-100 1%. Após a exposição, os tratamentos foram retirados para a adição do corante MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, CAS No. 298-93-1 Sigma) e incubado por 4 horas. Decorrido às 4 horas, o corante foi descartado e adicionado 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO)

em cada poço da microplaca, para a dissolução dos cristais de formazan. Os cristais de formazan resultam da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase presente em células vivas. Imediatamente após a adição do DMSO, as microplacas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro, utilizando filtro de 540nm. Os valores de absorbância obtidos foram comparados com os do controle negativo pelo teste estatístico de Mann-Witney.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	CN	CN	CN	CN	CN	B	CN	CN	CN	CN	B
B	B	CP	CP	CP	CP	CP	B	CP	CP	CP	CP	B
C	B	C1	C1	C1	C1	C1	B	C1	C1	C1	C1	B
D	B	C2	C2	C2	C2	C2	B	C2	C2	C2	C2	B
E	B	C3	C3	C3	C3	C3	B	C3	C3	C3	C3	B
F	B	C4	C4	C4	C4	C4	B	C4	C4	C4	C4	B
G	B	C5	C5	C5	C5	C5	B	C5	C5	C5	C5	B
H	B	C6	C6	C6	C6	C6	B	C6	C6	C6	C6	B

Figura 7. Esquema ilustrativo do desenvolvimento do experimento com o microplaca. **B.** branco; **CN.** Controle negativo; **CP.** Controle positivo; **C1.** 0,5 g/L; **C2.** 0,8 g/L; **C3.** 1g/L; **C4.** 1,5g/L; **C5.** 1,8g/L e **C6.** 2 g/L

- Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico

Células de HepG2 foram utilizadas para a avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do biossurfactante ramnolipídio. As células foram cultivadas em meio MEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal e o frasco contendo as células foi mantido, por 72h (tempo necessário para que as células ocupassem todo o espaço de cultivo do frasco = aproximadamente 10^7 células), a 37°C em estufa de CO₂. Após esse período foi realizado o repique para 30 frascos, onde cada um recebeu aproximadamente $5 \cdot 10^5$ células, quantidade necessária para a realização do experimento. Os frascos foram incubados em atmosfera úmida, a 37°C e com 5% de CO₂, por 24h para estabilização das condições. Esse período corresponde a 1 ciclo de divisão celular e ao tempo necessário para a aderência das células no frasco. Decorrido este tempo, as células foram expostas, por 24h, a 15 mL das amostras P, PB1, PB2, B1, B2 e CA e à concentração de 1g/L do biossurfactante ramnolipídio. O controle negativo foi realizado com o meio de cultura MEM, suplementado com 10% de SBF e como controle positivo com metilmetanosulfonato (MMS, Sigma-Aldrich,

CAS 66-27-3). As amostras foram realizadas em triplicata e, após o período de exposição, foram submetidas ao teste do micronúcleo e ao ensaio do cometa.

- Teste do micronúcleo

Decorrido o tempo de exposição das células aos tratamentos, as mesmas foram lavadas com PBS e incubadas, por 28 horas, em um novo meio de cultura contendo citocalasina B (300 μ L/mL). Após a colheita, as células foram tratadas com solução hipotônica de citrato de sódio 0,01% e fixadas em metanol ácido-acético (3:1 – v/v). As lâminas foram submetidas ao reativo de Schiff por 2 h e Giemsa 5% por 5 minutos sendo, posteriormente, analisadas em microscópio de luz. Foi analisada a incidência de MN em 1000 células binucleadas, com citoplasma intacto, e selecionadas ao acaso, para cada um dos tratamentos realizados. A análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney.

- Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Tice et al. (2000) e Uhl et al. (1999, 2000), com algumas modificações. Após o tempo de exposição aos tratamentos, a suspensão celular foi colhida, transferida para tubos Falcon e centrifugada por 5 minutos a 1500rpm. O sobrenadante foi retirado e a suspensão homogeneizada. Posteriormente, a suspensão foi novamente homogeneizada, com o auxílio de uma seringa de 1mL, e, assim obtidas as células isoladas. Para o prosseguimento do ensaio do cometa, foram realizados testes de viabilidade celular, para todos os tratamentos. Para o teste de viabilidade, foram misturados 20 μ L da suspensão celular de cada tratamento e 20 μ L de Azul de Trypan 0,4%. A mistura foi transferida para câmara de Neubauer, para a contabilização das células viáveis (brancas) e inviáveis (coradas em azul), presentes nos quatro quadrantes da câmara. Após a verificação de que todos os tratamentos apresentassem, no mínimo, 80% de viabilidade celular, foi misturada uma alíquota de 20 μ L de suspensão celular a 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (37°C), em uma concentração de 0,5% e, rapidamente, gotejada sobre lâminas secas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (60°C), diluição 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínula e mantidas a temperatura de 4°C, por 20 minutos. Após a remoção cuidadosa das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada, recém preparada, contendo 89 mL de solução de lise

estoque (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris com pH ajustado para 10 com auxílio de 8 g de NaOH, 890 mL de água destilada), mais 1 mL de triton X-100 e 10 mL de DMSO. As lâminas permaneceram nesta solução por 1 hora, a temperatura de 4°C. Posteriormente, as lâminas foram banhadas, no escuro, 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 8 g de NaOH sólido para 1 L), pH 10 a 6°C, por 1 hora.

As lâminas foram posteriormente transferidas para uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (pH > 13) recém preparada (300 mM de NaOH, 1 mM de EDTA, preparado de uma solução estoque contendo NaOH 10N e 200 mM de EDTA, pH 10), onde permaneceram por 20 minutos antes da eletroforese, para desnaturação do DNA. A corrida de eletroforese foi realizada a 4°C, por 20 minutos, a uma corrente de 39 V e 300 mA (~0,8 V/cm). Decorrido o tempo da corrida de eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em tampão Tris-HCl (pH 7,5), fixadas em etanol absoluto e mantidas a 4°C, até a realização das análises. A coloração foi feita com brometo de etídeo (0,02 mg/mL).

Foram analisados, aleatoriamente, em microscópio de epifluorescência Olympus BX51 (filtro WG 34: excitação 1 = 420n – 490 n, barreira: I = 520nM, objetiva de 40X), 100 nucleóides de cada frasco (3 frascos por tratamento). Os nucleóides foram classificados visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos, em: classe 0 (ausência de dano visível), classe 1 (pequeno dano), classe 2 (médio dano) e classe 3 (grande dano) (KOBAYASHI et al., 1995). Os escores obtidos para cada tratamento foram submetidos ao teste estatístico Mann-Whitney.

Quadro 4. Síntese das metodologias aplicadas em diferentes sistemas-teste, utilizadas para avaliar o potencial tóxico, genotóxico e mutagênico do biossurfactante ramnolipídio, e para avaliar a aplicabilidade do ramnolipídio como agente biorremediador na limpeza de águas contaminadas por petróleo.

Sistema-teste	Metodologias	Tratamentos	Toxicidade	Mutagenicidade	Genotoxicidade
<i>Allium cepa</i>	Teste de germinação	P, PB1, PB2, B1, B2, CA, BIO1 e BIO2	X		
	Aberrações cromossômicas	P, PB1, PB2, B1, B2 e CA,			X
	Teste do Micronúcleo	P, PB1, PB2, B1, B2 e CA,		X	
	Ensaio do cometa em eritrócitos	P, PB1, PB2, B1, B2 e CA			X
	Ensaio do cometa em brânquia	P, PB1, PB2, B1, B2 e CA			X
<i>Oreochromis niloticus</i>	Teste do MN em eritrócitos	P, PB1, PB2, B1, B2 e CA		X	
	Ultra-estrutura em eritrócitos	P, PB1, PB2, B1, B2 e CA	X		
	Teste do MTT	0,5g/L; 0,8g/L; 1g/L (BIO1); 1,5g/L 1,8 g/L e 2g/L (BIO2)	X		
	Ensaio do Cometa	P, PB1, PB2, B1, B2, CA e BIO1			X
HepG2	Teste do micronúcleo	P, PB1, PB2, B1, B2, CA e BIO1		X	

P. (Água + Petróleo); **PB1.** (Água + petróleo + biossurfactante 1 g/L); **PB2** (Água + petróleo + biossurfactante 10 g/L); **CA.** (Água coletada nos tanques de criação de peixe); **B1.** (Água + biossurfactante 1g/L); **B2.** (Água + biossurfactante 10 g/L); **BIO 1.** Concentração de 1 g/L do biossurfactante ramnolipídio; **BIO 2.** Concentração de 2 g/L do biossurfactante ramnolipídio

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões são apresentados, na seqüência, na forma de 4 artigos.

ARTIGO 1:

Rhamnolipid biosurfactant: characterization, toxicity and application.

Fernandes, T. C. C.; Ventura-Camargo, B. C.; Marin-Morales, M. A.

ARTIGO 2:

Biossurfactante ramnolipídio como uma estratégia promissora na remediação de ambientes contaminados por petróleo.

Fernandes, T. C. C.; Lovaglio, R. B.; Contiero, J.; Marin-Morales, M. A.

ARTIGO 3:

Influência do dispersante ramnolipídio na indução de alterações celulares no organismo pelágico *Oreochromis niloticus*.

Fernandes; T. C. C.; Mathias; M. I. C.; Lovaglio; R. B.; Salaroli, R. B.; Contiero, J.; Marin Morales, M. A.

ARTIGO 4:

Ação tóxica, genotóxica e mutagênica do biossurfactante ramnolipídio, observada em testes *in vitro* com células HepG2.

Fernandes, T. C. C.; Lovaglio, R. B.; Contiero, J.; Marin-Morales, M. A.

RHAMNOLIPID BIOSURFACTANT: CHARACTERIZATION, TOXICITY AND APPLICATION.

¹Fernandes, T. C. C.; ¹Ventura-Camargo, B. C.; ¹Marin-Morales, M. A.

¹São Paulo State University, Av. 24 A, 1515, cep: 13506-900, Rio Claro/SP-Brazil

* Corresponding author: Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Av. 24 A, 1515, Bela Vista, CEP: 13506-900, Rio Claro/SP-Brasil, e-mail: mamm@rc.unesp.br, phone-55 (19) 3526-4143, fax: 55 (19) 3526-4136.

Submetido à **Toxicology** ISSN: 0300-483X – ELSEVIER, **Impact Factor**: 3.241

ABSTRACT

This study offers general information about biosurfactants, such as their physicochemical properties, their potential application in several industrial areas and their use advantages, when compared to synthetic surfactants. The focus of this review was given to rhamnolipids, one of the most widely used microbial surfactants. In this paper, rhamnolipid biosurfactant structures and physicochemical properties were described. Emphasis was also placed upon the cellular mechanisms of action, mainly upon the cell membranes; its interference with intracellular Ca^+ levels; its possible action on Ca-ATPase inhibition; as well as its chemostatic and ciliostatic action. In addition, rhamnolipid activities concerning their efficacy as a bioremediation agent for petroleum-derived pollutants, heavy metals and chemicals present in different environmental compartments have also been described. Due to low toxicity and biodegradability of the rhamnolipid biosurfactant, this chemical has advantages and potential to replace synthetic surfactants commonly used for various purposes. Nevertheless, there is a punctual need to better study and evaluate the possible genotoxic and mutagenic activities of this compound on the exposed organisms to it.

Key words: microbial surfactant, heavy metals, chemicals, polycyclic aromatic hydrocarbons, *Pseudomonas aeruginosa*, bioremediation.

1. INTRODUCTION

Biosurfactants are compounds of microbial origin which show surfactant properties, i.e., they reduce superficial and interfacial tension, besides having an emulsifying capacity. These compounds are classified according to both their chemical composition and microbial origin. Biosurfactant-producing organisms are distributed in a number of genera, being bacteria the majority. The main types of biosurfactants include glycolipids, lipolipids and lipoproteins, phospholipids and fatty acids, polymeric and particulate surfactants (Cameotra and Makkar, 1998).

Although many biosurfactants are considered secondary metabolites, some may play essential roles for the survival of microorganisms, since they either facilitate the access to little soluble substrates or enable their transport into the cell (Van Hamme et al., 2006). Some microorganisms excrete biosurfactants into the medium during microbial growth, thus assisting transport and translocation of insoluble substrates through the cell membrane (Bognolo, 1999), while other microorganisms keep biosurfactants associated with cell wall, favoring hydrocarbons penetration into the periplasmic space (Koch et al., 1991). Biosurfactants make little soluble molecules available for microorganisms due to the increase in cell surface hydrophobicity of some bacterial genera and/or due to the increase in solubility of these compounds (Zhang and Miller, 1994; Altahhan et al., 2000).

The greatest advantage of biosurfactants, when compared to synthetic biosurfactants, lies in their structural diversity, low toxicity and biodegradability (Costa, 2006). Another advantage is the fact that they do not derive from petrol, which enables them to be synthesized from renewable substrates (sugars, vegetal oils and glycerol). Since they are highly chemically diverse, they may have several applications (Desai and Banat, 1997), such as pollutant bioremediation in the food, pharmaceutical and cosmetic industries, as well as in the medical field (Costa et al., 2006).

According to a review written by Nitschke and Pastore (2002), the largest market for biosurfactants is the petroleum industry, where they are used in oil production or incorporated in lubricating oil formulations. Other applications include bioremediation and dispersion of oil spills, removal and mobilization of residues in

storage tanks and improved petroleum recovery. Moreover, they can be used to improve oil quality and synthesize plastic (Meira, 2007).

The potential use and application of biosurfactants in the medical field have improved within the last decade. Through antibacterial, antifungal and antiviral activities, these molecules have played an important role in fighting a lot of diseases and as therapeutic agents. Moreover, their action as anti-adherent agents of many pathogens leads to a suggestion of their use as cover agents for medical insert materials, a way of reducing a great number of hospital infections, thus lowering the need for synthetic drugs and chemical agents (Rodrigues et al., 2007).

Despite the advantages presented, biosurfactants are not widely used by industries owing to their high production costs, associated with low productivity and the use of expensive substrates. However, several studies have been carried out in order to reduce production costs using alternative substrates (Banat et al., 2000). The use of alternative substrates such as oil sludge, used oil, sugar-cane molasses, cheese, potato and cassava processing residues are some instances of residues and potential subproducts for biosurfactant production (Abalos et al., 2001; Costa et al., 2006; Haba et al., 2000; Nitschke et al., 2005; Van Hamme et al., 2006; Nitschke and Costa, 2007). The use of agroindustrial and food industry residues, besides being characterized as one important strategy to reduce biosurfactant production costs, contributes to reducing environmental pollution and, consequently, the economic valuation of these products (Costa et al., 2008).

The purpose of this review was to find clues in several studies which helped elucidate the mechanism of action of rhamnolipids in cells and bring the main data on biosurfactant application into bioremediation impacted environments.

2. RHAMNOLIPID BIOSURFACTANT

2.1. Structure and properties

Rhamnolipid biosurfactants belong to the glycolipid class. This type of microbial biosurfactant is made up of carbohydrates connected to long chains of fatty acids (Nitschke et al., 2005). Rhamnolipids are produced by different strains of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* and they are already commercially available on the market (Jeneil Biosurfactant®). The production of rhamnolipids by *P. aeruginosa*

was first described by Jarvis et al. (1949). Currently, nearly seven counterparts have been identified (Abalo et al., 2001), among which Type I (R1) L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate stands out, molecular mass = 504 Da; Type II (R2) L-rhamnosyl- β -L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxidecanoate, molecular mass = 660 Da; Type III (R3), a rhamnose connected to β -hydroxydecanoic acid; and Type IV (R4), two rhamnoses connected to β -hydroxydecanoic acid (Mulligan, 2009) (Figure 1). All rhamnolipids contain one or two L-rhamnose groups connected to one or two 3-hydroxy fatty acids of different length and may be saturated or unsaturated (Costa et al., 2010).

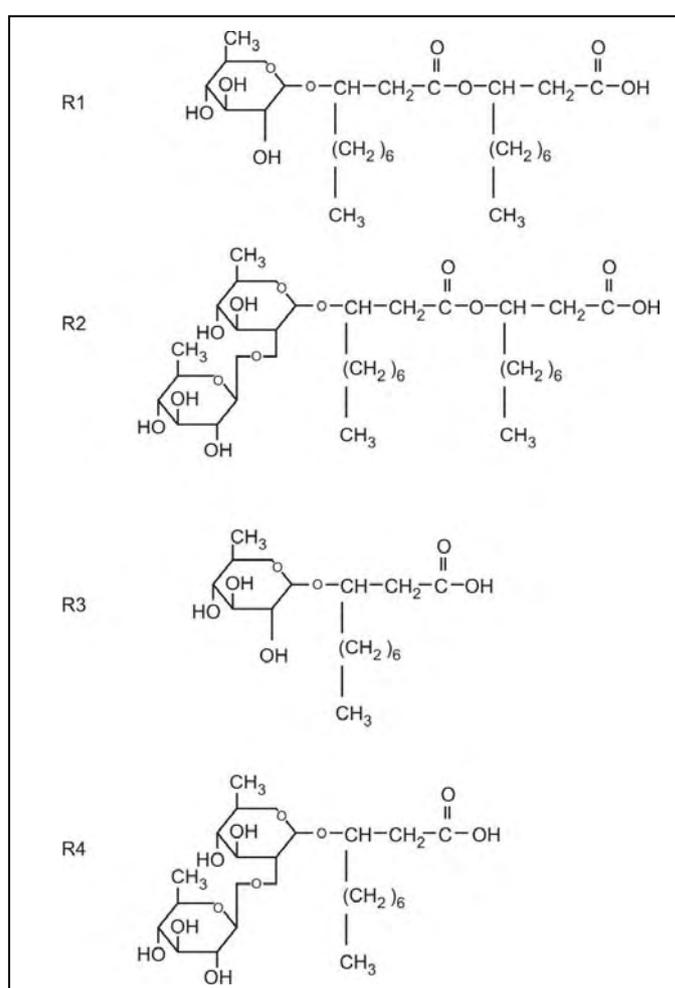


Figure 1. Rhamnolipid structure (Mulligan, 2005).

These biosurfactants may bring superficial tensions down to 29 nm/m and their critical micelle concentration (CMC) may range from 10 to 230 mg/L, depending on their structure (Mulligan, 2009).

Rhamnolipids are not considered the most efficient biosurfactant when it comes to surface tension reduction or the lowest CMC. On the other hand, these surfactants have high emulsifying activity and low antibiotic activity. They are less retained in the soil than chemical surfactants and have a higher production and application potential when compared to other biosurfactants; furthermore, they are less toxic to the environment (Desai and Banat, 1997; Costa et al., 2008). According to Mulligan et al. (2009), another advantage rhamnolipids offer is the wide variety of substrates which may be used for production, including alkanes C11 and C12, succinate, pyruvate, citrate, fructose, glycerol and olive oil, glucose and mannitol.

Due to these characteristics, rhamnolipids are an excellent surfactant alternative for bioremediation (Bordas et al., 2005; Mulligan, 2005, 2009).

2.2. Mechanisms of action of rhamnolipid biosurfactants in the cell

Rhamnolipids are the best known glycolipid biosurfactants. They are among the most studied microbial biosurfactant, since they have excellent surfactant properties and may be produced in high concentrations (Lee et al., 2004; Monteiro et al., 2007; Mulligan, 2009; Krieger et al., 2010).

Rhamnolipids have drawn considerable interest due to their low toxicity rate and biodegradable nature. Among a range of potential industrial applications are the improved petroleum recovery, the facility for well drilling, lubrication, and bioremediation of impacted environments (Banat et al., 2000). Within the last years, biosurfactants have drawn considerable interest owing to their potential use in cosmetic and pharmaceutical products. They also show a wide biologic activity and are potentially used as therapeutic agents. Their main points of action in cells are cell membranes.

Ortiz et al. (2006) studied the interaction of di-rhamnolipid biosurfactant (DiRL), isolated and purified from strain 47T2 of *Pseudomonas aeruginosa*, with conjugated protein phosphatidylcholine, which is important for the membrane structure and, especially for the process of substance transport through the membrane. The authors observed, by means of scanning calorimetry analysis, X-ray diffraction and infrared spectrometry, that DiRL is capable of incorporating among lipid bilayers and affect their structural properties. The data obtained by scanning calorimetry showed that the biosurfactant molecule is interspersed among the

phospholipids, and it may disrupt the structure, thus reducing cooperativity and causing changes in the temperature related to the phase transition. These effects on the thermotropic properties of phosphatidylcholines are more stressed when the phospholipid acyl chain is smaller. The X-ray diffraction showed that DiRL does not affect the macroscopic organization of phosphatidylcholine layers, but it makes interlamellar distance increase. The experiments carried out with infrared clearly show an increase in the phospholipid hydrocarbon chain and a conformational disorder. According to the authors, the interaction observed between DiRL and phosphatidylcholines caused physical disorders, which could affect the membrane function.

According to data reported by Vikström et al. (2010), *P. aeruginosa* brings changes to free calcium levels. A large number of studies provide proofs that the bacteria and their products may affect the Ca^{2+} levels of different kinds of cells. Therefore, pathogens like *Staphylococcus aureus* and *P. aeruginosa* may mobilize Ca^{2+} of intracellular compartments by means of a higher activation in MAPKs, NF- κ B translocation and trigger off IL-8 production in epithelial cells of human airways (Ratner et al., 2001).

Terual et al. (2007) evaluated the action of a mono- and di-rhamnolipid mixture in the calcium ATPase hydrolytic activity of sarcoplasmic reticle. The authors reported that rhamnolipid biosurfactant can cause complete inactivation of calcium ATPase in smaller than 0.1 mM concentrations (smaller than critical micelle concentration).

Hingley et al. (1986) investigated the activity of ciliostatic factors produced by *P. aeruginosa*, an organism that usually chronically infects the airways of patients with cystic fibrosis. In order to carry out the investigation, bacteria of patients with cystic fibrosis were isolated and cultured *in vitro*. The components produced by the bacteria were extracted and identified by chromatography. The authors identified three ciliostatic factors: one rhamnolipid, one compound PIO and one phenazine derivative. After identifying the factors, male rabbit tracheas were dissected and cut into rings. After treatment, they were exposed to concentrations of agents extracted from bacteria. The results showed that 1mg/L of purified rhamnolipid has about 90% of immobile cells and the few active cilia had a decrease of about 40% in the activity.

The rabbit tracheal epithelial cell treated with rhamnolipid presented about 90% of the immobile cells and the mobile cilia had a decrease of about 40% in activity. Reactivation of the cilia was tested, enabling the inhibitor to be removed and ATP to be added. In this case, should there be reactivation of the ciliary movements, it would be a sign that the structures, though immobile, would remain intact. After analyzing electronic transmission microscopy, the authors concluded that cytostatic activity of rhamnolipids results from their nonspecific detergent action, which initially attacks the ciliary membrane and, lastly, the axonemal components, especially dynein arms. The data obtained by Hingley et al. (1986) in rabbits were confirmed in humans, where a decrease in ciliary beat frequency of *in vitro* human epithelium, after being exposed to rhamnolipid, was observed (Kanthakumar et al., 1996; Read et al., 1992).

Kownatzki et al. (1987) observed nearly up to 8 mg/ml of rhamnolipids in phlegm samples from patients with cystic fibrosis infected by *P. aeruginosa*. The authors reported that worsening of the patient's clinical condition was related to the high levels of the substance. Read et al. (1992) reported levels of 65 mg/ml in the lung secretions.

According to Kharazmi et al. (1989), purified rhamnolipids act directly on immunologic cells, inducing a direct chemotactic activity in neutrophils. At low concentrations, these substances also inhibit the phagocytic response of macrophages (McClure and Schiller, 1996). According to Bergmann et al. (1989), rhamnolipids induce histamine release from mastocytes and stimulate production and release of inflammatory mediators serotonin and 12-hydroxyeicosatetraenoic acids of human platelets (KONIG et al., 1992), induce polymorphonuclear (PMN) leukocyte lysis (Jensen et al. 2007; Shryock et al. 1984; Gennip Van et al. 2009), inhibit ciliary function and induce damage to the human bronchial epithelium. These biosurfactants alter ion transport in the respiratory epithelial cells by reducing sodium absorption and unidirectional flow of chloride through the bronchial epithelium (Stutts et al., 1986). More recently, Zulianello et al. (2006) showed that *P. aeruginosa* produce rhamnolipid in order to invade the respiratory epithelium and facilitate its installation in the organism.

Investigation carried out by Millioli et al. (2007) assessed rhamnolipid phytotoxicity on seed germination of the species *Lactuca sativa* (lettuce). The results obtained by the authors indicated that the biosurfactant phytotoxic activity is

concentration dependent, i.e., the higher the concentration tested, the higher were the rates of inhibition in *Lactuca sativa* germination. It is important to point out that the 1 and 1.5% of rhamnolipid concentrations contributed to a 70 and 80% inhibition, respectively, in the germination rate, when compared to test control germination (without biosurfactant).

Studied done by Wang et al. (2005) evaluated the algicidal activity of rhamnolipid biosurfactant on the harmful alga flourishing of the species *Heterosigma akashiwo*, *Gymnodinium sp.* and *Prorocentrum dentatum*. The results indicated that the rhamnolipid concentrations of 0.4-3.0 mg/L strongly inhibit the growth of algae *H. akashiwo* and concentrations higher than 4 mg/L cause lytic activities for the same algae. *Prorocentrum dentatum* had their growth inhibited or suffered lysis when exposed to higher concentrations of rhamnolipid (1.0-10.0 mg/L), whereas the cells of *Gymnodinium sp.* were not repressed with the same treatment. According to the authors, these results indicate that rhamnolipid can potentially be used as an algicide for alga selective control. Morphometric analysis showed cellular alterations caused by rhamnolipid surfactant action. Rhamnolipid 0.4 0.9 and 1.05 mg/L concentrations do not alter cell form. However, algae became totally immobile or had their mobility hampered. On the other hand, 1.35, 1.5 and 1.8 mg/L concentrations did change cell morphology. Previously elliptic cells acquired a round shape despite the fact that all individuals were unable to move right after exposure. The authors state that, although the locomotion capacity of algae was regained 24h later, their growth was clearly suppressed. Ultra-structural analysis showed impressive modifications in the cells of algae submitted to 6 mg/L concentration for 1h, when compared to test control results. The first response occurred in the plasmic membrane, which was partly disintegrated. The absence of membrane facilitated rhamnolipid entrance and it damaged the organelles. The nuclear envelope gradually disintegrated, while the endoplasmic reticle and Golgi apparatus totally disappeared. Damage to the mitochondria and chloroplasts were also observed. Mitochondrial membranes were partly disintegrated, forming a vacuole in the middle of the organelle. In addition, there was crista distortion. The greater damage was done by the higher concentrations where, besides disintegration of membranes, nuclear envelope and organelles, they also caused chromatin condensation and significant increase in lysosomes. An increase in the vacuole diameter was also observed. According to the

authors, the most plausible explanation for the damage caused by the biosurfactant would be due to its amphipathic property. This characteristic would easily make the biosurfactant adhere to the phospholipid surface and destroy the layers, thus damaging the plasmic membrane permeability and facilitating both the entrance of rhamnolipids and other substances, which led to the organelle damage reported. It is known that the energetic state of mitochondria depends on the ultra-structural organization. According to the authors, the damage caused by rhamnolipids might influence the carboxylic acid cycle, thus weakening respiratory activities and blocking glucose metabolism (Wang et al., 2005).

Rodrigues et al. (2007) report that several rhamnolipids present antibacterial and antiphytoviral effects. B rhamnolipids showed antibiotic activity for *C. kikuchii*, *C. destructans*, *C. cucumerinum*, *C. orbiculare*, *M. grisea* and *P. capsici* organisms assessed in *in vitro* growth inhibition assay. However, they did not cause changes to *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *E. carotovora*, *R. solanacearum* and *X. campestris pv vesicatoria* growth. To determine B rhamnolipid effect on zoospores of *P. capsici*, a suspension of zoospores treated in a temporal sequence using a light microscope was analyzed. When the zoospores were incubated in 25 mg/L of B rhamnolipids, most of them became immobile and, one minute after treatment, they were completely lysed. Zoospore lysis started with the exposure of 10 mg/L B rhamnolipids, reaching a maximum level at 25 mg/L. At smaller concentration (5 mg/L), B rhamnolipids did not show lytic effects. Zoospore mobility was strongly diminished in relation to control treatment, though. In this study, lytic effect on *P. capsici* zoospores suggest that the action mode of B rhamnolipids may reside in an integrity alteration and in membrane permeability, since oomycete zoospores do not have typical cell wall; they are enveloped by a plasmatic membrane only. This hypothesis is strongly based on the studies done, once in zoospore cysts that had a cell wall envelope, B rhamnolipids did not cause any lytic activity.

In vitro studies, which evaluated B rhamnolipid efficacy in pepper plant aphid control, showed that with the increase in rhamnolipid concentration, there was an inhibition of the plague caused by the phyllophaga. Treatments with rhamnolipids, provided one day before or little before phytophage incubation in the pepper plants, were more efficient than when inoculation occurred before biosurfactant treatment, which suggests a preventive and not curative action of rhamnolipids.

Another application of rhamnolipids to protect against phytopathogens was evidenced by Abalos et al. (2001). In this study, the authors observed that rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* AT10, from oil residues, showed antifungal activity against *Aspergillus niger* and *Gliocadium vireus* (16µg/ml), *Chaetonium globosum*, *Penicilium crysogenum* and *Aereobasidium pullulans* (32 µg/ml), whereas the phytopathogenic species *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solanii* were inhibited in 18 µg/ml concentrations. An antimicrobial activity was also evidenced against *Serratia marcescens*, *Mycobacterium phlei*, *Arthrobacter oxidans* (16µg/ml) and *Staphylococcus epidermidis* (8 µg/ml).

Varnier et al. (2009) evaluated the possibility of rhamnolipids triggering off immune responses to protect grapevines against the fungus *Botrytis cinerea*, which causes grey mould in these plants. The studies carried out using cell culture and *in vitro* grapevine seedlings, in which Ca⁺ concentration was quantified, and the induction of grapevine cell death was assessed after being exposed to different rhamnolipid concentrations.

Protection tests of grapevine seedlings were also performed, in which they were washed in several rhamnolipid concentrations so that the fungus *Botrytis cinerea* was inoculated afterwards. Before inoculating the fungus, some leaves treated with biosurfactant were collected and then used to extract RNA and isolate chit4c gene, which expresses laminarin and oligogalacturonide proteins related to the plant defense process. The results showed that the 0.005 mg/mL rhamnolipid concentration did not promote cytosolic calcium influx. However, higher than 0.01 mg/mL concentrations led to an increase in cytosolic calcium, with a first peak after 5 minutes. After treatment with the 0.025 rhamnolipid concentration, an induction of 12% cell death of grapevine exposed to biosurfactant was observed, reaching a 100% death rate after exposure to the highest concentration studied (0.05 mg/mL). The lowest concentration did not alter chit4C gene expression level, whereas the 0.01 mg/mL concentration led to an increase 30-fold higher, and the 0.025 mg/mL concentration led to an increase 320-fold as high as the gene expression. Plants previously treated with rhamnolipids did not have the plague symptoms caused by the fungus *Botrytis cinerea* (characterized by leaf darkening); however, when they did have them, they were restricted to small areas, clearly showing that rhamnolipid is capable of protecting grapevine plants against the action of the fungus. The authors

concluded that rhamnolipid is efficient both in the defense stimulus of the plant and in bioremediation processes, as documented by Nitschke et al. (2005). According to Varnier et al. (2009), because of ecological acceptance, resulting from their low toxicity and high biodegradability, rhamnolipids are interestingly potential for agricultural use, being an alternative for reducing or even substituting the pesticides currently used.

Although biosurfactants are potentially suitable for application in the medical field, these molecules might offer risks to humans. *P. aeruginosa* is a bacterium responsible for serious hospital infections, opportunistic infections of immunodepressed people and chronic infections of patients with cystic fibrosis. Thus, rhamnolipids ought to be better investigated on which concerning their effects upon health, before they are used in the medical field. Virulence of a *P. aeruginosa* strain depends on a large number of associate cell and extracellular factors. Cell-to-cell signaling systems control gene expression and allow a coordinate production, dependent on cell density and many extracellular virulence factors. The possible role of cell-to-cell signaling in the pathogen of infections caused by *P. aeruginosa*, and a rationalization to search for cell-to-cell signaling systems in order to develop new therapeutic approaches, were discussed by Van Delden and Iglewski (1998). Rhamnolipid synthesis is regulated by a very complex genetic regulating system, which also controls the different virulence-related characteristics of *P. aeruginosa*. Therefore, studies are still necessary to better understand rhamnolipid action on the organisms.

2.3. Rhamnolipid biosurfactant application in biorremediation of impacted environments

Bioremediation characterizes as a technology which allows recovery of contaminated places by fostering native microorganisms growth or using their products, which are capable of degrading contaminants, thus converting the complex substances into simpler or volatile molecules and, consequently, promoting the degradation of environmentally toxic compounds.

Many studies on biodegradation have been performed with rhamnolipids, since they potentially bioremediate organic contaminants. Shreve et al. (1995) and Zhang et al. (1997) report that a 300 mg/L rhamnolipid concentration increased

octadecane degradation by 20%, producing CO₂ and water (mineralization), whereas the degradation obtained in the control test (without rhamnolipids) was 5%. Adding rhamnolipids in the aqueous medium improves biodegradation of octadecane compounds and several other hydrocarbons such as hexadecane, N-paraffin and phenanthrene and, in soils, hexadecane, tetradecane, pristane, creosote compounds and other compound mixtures. Rhaman et al. (2003) reported n-alkane bioremediation in petroleum sludge containing 87.4% of oil and fats. Ten percent of this sludge contains C8-C11 chain alkanes which were 100% degraded, whereas C12-C21, C22-C31, and C32-C40 chain alkanes were 83-98%, 80-85% and 57-73% degraded, respectively, after 56-day adding a consortium of bacteria, nutrients and rhamnolipids (Maier and Soberonchavez, 2000).

Noorman et al. (2002) studied the effects of rhamnolipids and observed that they were useful when hexadecane biodegradation rate was limited. In small pore-size soils (6nm), hexadecane adhered to the soil and its availability was limited. When adding rhamnolipids, substrate and contaminant were released, intensifying the action of microorganisms.

Vipulanandan and Ren (2000) compared solubilization of naphthalene by rhamnolipids, sodium dodecyl sulfate (SDS) and Triton X-100. The authors observed that within 40 days biosurfactant made naphthalene solubility increase 30-fold, a result inferior to Triton X-100 solubilization potential, but superior to SDS without any biodegradation.

Rhamnolipids have also been used for washing hydrocarbon-contaminated soils, showing a removal 3-fold higher than pure water. This test was carried out in contaminated sand, after Exxon Valdez oil spill, Alaska, USA. A 1% solution of biosurfactant was enough to remove twice as much oil as when only water at temperature ranging from 10° to 80° C was used (Harley et al., 1990). Pastewsky et al. (2006) showed that tetrachlorethylene and dichlorethylene solubilization was more effective in rhamnolipid solutions than Triton X-100® and Rokanol L10®. Because of such results, these authors have come to the conclusion that using this biosurfactant in soil remediation, in which micellar solubilization is dominant, may be interesting. Saponin, escine, lecithin, rhamnolipid biosurfactants and the SDS-based synthetic surfactant were tested for soil oil removal (Urum et al., 2003). The authors concluded

that the SDS, saponin and rhamnolipid solutions removed more than 79% of oil contained in sand. Santa Anna et al. (2007) used rhamnolipids to remediate sandy soils impacted by oil spill. The authors concluded that the biosurfactant action was similar to concentrated commercial biosurfactants. Despite the reports existing in the literature, the use of biosurfactants to wash soils contaminated by oil is still limited (Costa, 2010).

Zhang and Miller (1992) extracted rhamnolipid biosurfactant of culture supernatants from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and investigated its potential for octadecane dispersion. The results showed that lower concentrations of rhamnolipids were found to be more efficient in dispersion. An initial 1.5 mg/L octadecane concentration suffered 20% mineralization after an 84-h exposure to a 300 mg/L rhamnolipid concentration, but only 5% suffered mineralization when the biosurfactant was not present. According to the authors, these results indicate that rhamnolipid may be potentially used to bioremediate petroleum-contaminated places.

For their anionic characteristic, rhamnolipids are also capable of removing metals from the soil (Tan et al., 1994; Herman et al., 1995; Ochoa-Loza, 1998; Mulligan, 2005; Juwarkar et al., 2007). Juwarkar et al. (2007) evaluated the potential of rhamnolipid biosurfactant, produced by the *Pseudomonas aeruginosa* BS2 strain, for removing heavy metals (cadmium and lead) from artificially contaminated soils. The results showed that the di-rhamnolipid removed not only the leachable or available fraction of Cd and Pb, it also removed these metals disposed into the environment in a less available form to leaching.

Juwarkar et al. (2007) carried out experiments using sand columns and assessed the potential of rhamnolipid biosurfactants produced by *P. aeruginosa* strain BS2 for removing metals connected to other substances, when compared to tap water, which only removed the mobile fraction. Contaminated soil washing with tap water revealed that nearly 2.7% of Cd and 98% of Pb present in the soil either had free available shapes or were weakly linked. On the other hand, the washing with rhamnolipids removed 92% of Cd and 88% of Pb 36 hours later. The researchers also noticed that the microbial population in the contaminated soil increased after the metals were removed by the biosurfactant, thus confirming the decrease of metal toxicity to the soil microflora. Therefore, the authors concluded that biosurfactant is

efficient at removing heavy metals from the soil without damaging existing microorganisms.

Banat et al. (2000) investigated the use of rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* ATCC 9027 to remove metals from soils contaminated with cadmium and nickel. They reported that 92% of Cd^{++} was complexed in a 0.5 mmol/L solution of Cd (NO₃)₂ when they used an aqueous solution of rhamnolipids (22 mg/L). Neilson et al. (2003) reported the potential application of rhamnolipid to remove metals from lead-contaminated soils. The authors used a 10 mmol/L solution of rhamnolipids, which promoted the removal of about 15% of lead after ten washes.

Tests carried out by Dahr Azma and Mulligan (2004) showed that rhamnolipids, used in a 2% concentration at room temperature, extracted 28% of copper present in contaminated soils, pointing out that this substance may be characterized as an important bioremediation agent for soils contaminated with heavy metals. According to Mulligan et al. (1999), rhamnolipids are effective to remove hydrocarbons and heavy metals from soil and may be effective to remove contaminant mixtures (hydrocarbons and metals).

Olesja et al. (2010) investigated toxicity and modulating effect upon Cd availability in the DS10-129 mono- and di-rhamnolipid mixture, by using bioluminescent Gram-negative bacteria *Vibrio fischeri* and recombinant bioluminescent *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, and Gram-positive *Bacillus subtilis*. The results showed that rhamnolipids reduced bioluminescence of these bacteria in less than a second of exposure, even in relatively low concentrations (30 min-EC₅₀ 45-167 mg/L). However, 50 mg/L rhamnolipid reduced Cd toxicity for Gram-negative bacteria up to 10-fold (EC₅₀ 30 min the values 0.16 mg/L for *E. coli*, 0.96 mg/L of *P. fluorescens*, and 4.4 mg/L for *V. fischeri*).

The use of biosurfactants has been the subject of studies on pesticide biodegradation. According to Mulligan (2005), biosurfactant efficacy in this process depends on the kind of compound to be biodegraded and the concentrations used in the process.

Singh et al. (2009) studied the effect of a biosurfactant produced by *P. aeruginosa*, isolated from agricultural soil, in biodegradation of organophosphate

chlorpyrifos. According to the authors, adding biosurfactant resulted in 98% degradation of chlorpyrifos, when compared to 84% in the absence of the biosurfactant.

Mata-Sandoval et al. (2000) compared both the capacity of the rhamnolipid mixture in solubilization of trifluralin and atrazine with effects caused by the synthetic surfactant Triton X-100. The authors stated that the rhamnolipids were as efficient as the synthetic biosurfactant, since they equally solubilized all the pesticides. The biosurfactant strongly linked to trifluralin, forming micelles that separated the pesticide from the aqueous phase, thus facilitating the action of microorganisms.

3. CONCLUSION

Rhamnolipid biosurfactants have properties that make agents potentially applicable in several areas, as well as in synthetic agent substitution, once they promote higher or equal efficacy for several processes in which they can be used. However, the fact that rhamnolipids are substances produced by bacteria that are pathogenic to man and their synthesis is related to the same complex as the genetic regulation that controls *P. aeruginosa* virulence, many studies still ought to be carried out so that there is a better understanding of the mechanisms of action of this substance on different organisms. There are still no current studies on the rhamnolipid toxic activity to human cells. Paradoxically, there are a lot of studies that show the substance efficacy for the cosmetic and pharmaceutical industry, agriculture, and others.

The studies compiled in this review report that rhamnolipid biosurfactant is capable of incorporating in the cell membrane among phospholipids and producing changes in the membrane structure, properties and function. It also damages the cytoplasmic organelles and the nuclear envelope, mobilizes the calcium of cell compartments, and there is some evidence of its action on the calcium ATPase inactivation. Rhamnolipids have cytostatic action and is cytosolic to vegetables.

There are no works in the literature that evaluate the genotoxic and mutagenic potential of rhamnolipids. Based on the activity of other mutagenic substances that act on the cell similarly to rhamnolipids, this substance might potentially cause indirect DNA damage; for instance, when it changes the amount of intracellular calcium. Some studies show that the calcium increase in the cell alters the formation

of mitotic spindles and, consequently, damages the genetic material such as chromosome and nuclear aberrations.

Another concern about the use of rhamnolipids is related to the fact that this substance might facilitate the entrance of contaminants into the cell. In that case, contaminated places, if bioremediated by rhamnolipids, might contain toxic compounds that are easily incorporated into the living exposed organisms, since these compounds can easily pass biological membranes. This interaction with the membrane, proved by several authors, may alter natural selectivity of membranes and, therefore, allow or facilitate the entrance of potentially toxic, genotoxic and mutagenic contaminants into the cell. Therefore, the mechanisms of action of rhamnolipids and their synergy with environmental contaminants must be better investigated. In bioremediation processes, several studies have shown rhamnolipid efficacy in degradation and hydrocarbon dispersion. This biosurfactant also promotes the removal of heavy metals from the soil. There are, however, a restricted number of reports on its potential for solubilizing pesticides.

4. ACKNOWLEDGEMENTS

The Programme of Human Resources ANP/FINEP/MCTCTPETRO, PRH-05 at Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil, for the financial support.

5. REFERENCES

- Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M.R., Casals, M., García, F., Manresa A., 2001. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. 17, 1367-1371.
- Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., Maier, R.M., 2000. Rhamnolipid-Induced Removal of Lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on Cell Surface Properties and Interaction with Hydrophobic Substrates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3262-3268.
- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2000. Potential commercial application of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotech.* 53, 495-508.
- Bergmann, U., Scheffer, J., Koller, M., Schonfeld, W., Erbs, G., Muller, F. E., Konig, W., 1989. Induction of inflammatory mediators (histamine and leukotrienes) from rat peritoneal mast cells and human granulocytes by *Pseudomonas aeruginosa* strains from burns patients. *Infect. Immun.* 57, 2187-2195.

Bognolo, G., 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids surf. A, Physicochem. Eng. Asp.* 152, 41- 52.

Bondarenko, O., Rahman, P.K.S.M., Rahman, T.J., Kahru, A., Ivask, A., 2010. Effects of Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 on Luminescent Bacteria: Toxicity and Modulation of Cadmium Bioavailability. *Microbiol. Ecol.* 59, 588-600.

Bordas, F., Lafrance, P., Villemur, R., 2005. Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids. *Environ. Pollut.* 138, 69-76.

Cameotra, S.S., Makkar, R.S., 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotech.* 50, 520-529.

Costa, S.G.A.O., Nitschke, M., Haddad, R., Eberlin, M.N., Contiero, J., 2006. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Proc. Biochem.* 41, 483-488.

Costa, S.G.V.A.O., 2010. Estudo da produção por *Pseudomonas aeruginosa*: rhamnolipídio e polihidroxialcanoatos (PHAs). Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de doutore em Microbiologia Aplicada, Rio Claro-SP.

Costa, S.G.V.A.O., Nitschke, M., Contiero, J., 2008. Fats and oils wastes as substrates for biosurfactant production. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 28, 34-38.

Dahr Azma, B., Mulligan, C.N., 2004. Extraction of copper from mining residues by rhamnolipids. *Pract. Period. Hazard., Toxic, Radioact. Waste Manag.* 8, 166-172.

Desai, J.D., Banat, I. M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 47-64.

Gennip, M.V., Christensen, L.D., Alhede, M., Phipps, R., Jensen, P.Ø., Christophersen, L., Pamp, S.J., Moser, C., Mikkelsen, P.J., Koh, A.Y., Tolker-Nielsen, T., Pier, G.B., Høiby, N., Givskov, M., Bjarnsholt, T., 2009. Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 117, 537-546.

Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M., Manresa, A., 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 379-387.

Herman, D.C., Artiola, J.F., Miller, R.M., 1995. Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2280-2285.

Hingley, S.T., Annette, T., Hastie, F.K., Michael, L., Higgins, G., Weinbaum, T.S., 1986. Effect of Ciliostatic Factors from *Pseudomonas aeruginosa* on Rabbit Respiratory Cilia. *Infect. Immun.* 51, 254-262.

- Jarvis, F.G., Johnson, M.J., 1949. A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Am. Chem. Soc. 71, 4124-4126.
- Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T.B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M., Høiby, N., 2007. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. 153, 329-1338.
- Juwarkar, A.A., Nair, A., Dubey, K.V., Singh, S.K., Devotta, S., 2007. Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. Chemosphere. 68, 1996-2002.
- Kanthakumar, K., Taylor, G.W., Cundell, D.R., Dowling, R.B., Johnson, M., Cole, P.J., Wilson, R., 1996. The effect of bacterial toxins on levels of intracellular adenosine nucleotides and human ciliary beat frequency. Pulm Pharmacol. Ther. 9, 223-230.
- Kharazmi, A., Bibi, Z., Nielsen, H., Høiby, N., Doring, G., 1989. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid on human neutrophil and monocyte function. APMIS : acta pathol. microbiol. immunol. Scand. 97, 1068-1072.
- Koch, A.K., Kappeli, O., Fiechter, A., Reiser, J., 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. J. Bacteriol. 173, 4212-4219.
- König, B., Bergmann, U., König, W., 1992. Induction of inflammatory mediator release (serotonin and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid) from human platelets by *Pseudomonas aeruginosa* glycolipid. Infect. Immun. 60, 3150-3155.
- Kownatzki, R., Tummler, B., Doring, G., 1987. Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. Lancet. 1, 1026-1027.
- Krieger, N., Camilios Neto, D., Mitchell, D.A., 2010. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. In: Ramkrishna Sen. (Org.). Advances in Experimental Medicine and Biology. Biosurfactants. Springer Science Business media, New York, pp. 203-209.
- Lee, B.S., Kim, E.K., 2004. Lipopeptide production from Bacillus sp. GB16 using a novel oxygenation method. Enzyme Microb. Technol. 35, 639-647.
- Maier, R.M., Soberón-Chávez, G., 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipidis: biosynthesis and potential applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 625-633.
- Mata-Sandoval, J.C., Karns, J., Torrents, A., 2000. Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides. Environ. Sci. Technol. 34, 4923-4930.
- Mcclure, C.D., Schiller, N. L., 1992. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on monocyte-derived macrophages. J. Leukoc. Biol. 5, 97-102.

Meira, J.A., 2007. Produção de biossurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

Millioli, V.S., Sérvulo, E.F.C., Sobral, L.G.S., Carvalho, D.D., 2007. Biorremediação de solo contaminado com óleo cru: avaliação da adição de rhamnolipídio quanto à toxicidade e a eficiência de biodegradação. 4^o PDPETRO, Campinas, SP 6.2.387-1, 21-24 de Outubro.

Monteiro, S.A., Sasaki, G.L., De Souza, L.M., Meira, J.A., Araujo, J.M., Mitchell, D.A., Ramos, L.P., Krieger, N., 2007. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. Chem. Phys. Lipids. 147, 1-13.

Mulligan, C.N., 2009. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. Curr. Op. Coll. Int. Sci. 14, 372–378.

Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., 1999. On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contaminated soil. Environ. Prog. 18, 50-54.

Nitschke, M., Costa, S.G.V.A.O., 2007. Biosurfactant in food industry. Trends Food Sci. technol.18, 252 259.

Nitschke, M., Costa, S.G.V.A.O., Haddad, R., Gonçalves, L.A.G., Eberlin, M.N., Contiero, J., 2005. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Biotechnol. Prog. 21, 1562-1566.

Nitschke, M., Pastore, G.M., 2002. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. Quim. Nova. 25, 772-776.

Norman, R.S., Frontera-Suau, R., Morris, P.J., 2002. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide Expression during Crude Oil Degradation. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5096-5103.

Ochoa-Loza, F.J., 1998. Physico-chemical factors affecting rhamnolipid (biosurfactant) application for removal of metal contaminants from soil. Ph.D. dissertation. University of Arizona, Tucson.

Ortiz, A., Teruel, J.A., Espuny, M.J., Marqués, A., Manresa, A. Aranda, F.J., 2006. Effects of dirhamnolipid on the structural properties of phosphatidylcholine membranes. Int. J. Pharm. 325, 99-107.

Pastweski, S., Hallmann, E., Medrzycka, K., 2006. Physicochemical aspects of the surfactants and biosurfactants in soil remediation. Environ. Eng. Sci. 23, 579-588.

Ratner, A.J., Bryan, R., Weber, A., Nguyen, S., Barnes, D., Pitt, A., Gelber, S., Cheung, A., Prince, A., 2001. Cystic fibrosis pathogens activate Ca²⁺-dependent mitogenactivated protein kinase signaling pathways in airway epithelial cells. J. Biol. Chem. 276, 19267-19275.

Read, R.C., Roberts, P., Munro, N., Rutman, A., Hastie, A., Shyrock, T., Hall, R., McDonald-Gibson, W., Lund, V., Taylor, G., 1992. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J. Appl. Physiol.* 72, 2271-2277.

Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J., Oliveira R., 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrobial Chemotherapy.* 57, 609-618.

Shreve, G.S., Inguva, S., Gunnan, S., 1995. Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 4, 331-337.

Shryock, T., Silver, A.S., Baschbach, M.W., Kramer, J.C., 1984. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid on human neutrophil migration. *Curr. Microbiol.* 10, 323-328.

Singh, P.B., Sharma, S., Saini, H.S., Chadha, B.S., 2009. Biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. and its role in aqueous phase partitioning and biodegradation of chlorpyrifos. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 378-383.

Stutts, M.J., Schwab, J.H., Chen, M.G., Knowles, M.R., Boucher, R.C., 1986. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on bronchial epithelial ion transport. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134, 17-21.

Tan, H., Champion, J.T., Artiola, J.F., Brusseau, M.L., Miller, R.M., 1994. Complexation of cadmium by a rhamnolipid biosurfactant. *Environ. Sci. Technol.* 28, 2402-2406.

Teruel P.J.A., Garcia C.S., Ortiz L.A., Aranda M.F.J., 2007. Effects of rhamnolipids on the calcium ATPase activity. *Chem. Phys. Lip.* 149S, S23-S49.

Urum, K., Pekdemir, T., Copur, M., 2003. Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions. *Process Saf. Environ. Prot.* 81, 203-209.

Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2006. Physiological aspects. Part 1. In: A series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 24, 604-620.

Varnier, A.L., Sanchez, L., Vatsa, P., Boudesocque, L., Garcia-Brugger, A., Rabenoelina, F., 2009. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant. Cell. Environ.* 32, 178-93.

Vikström, E., Bui, L., Konradsson, P., Magnusson, K., 2010. Role of calcium signalling and phosphorylations in disruption of the epithelial junctions by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 584-597.

Vipulanandan, C., Ren, X., 2000. Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. *J. Environ. Eng.* 126, 629-634.

Wang, X.L., Li, K.Q., Zhu, C.J., Han, X.R., Deng, N.N., Cheng, H., 2005. Pollution condition of petroleum hydrocarbon pollutant and estimation of its environmental capacities in summer in the Bohai Sea. *Mar. Sci. Bull.* 7, 21-29.

Zhang, Y., Maier, W.J. Miller, R.M., 1997. Effect of rhamnolipids on the dissolution, biodegradation of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2211-2217.

Zhang, Y., Miller, R.M., 1995. Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of *n*-Alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1, 2247-2251.

Zulianello, L., Canard, C., Kohler, T., Caille, D., Lacroix, J.S., Meda, P., 2006. Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 74, 3134-3147.

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO DO
BIOSURFACTANTE RAMNOLIPÍDIO UTILIZANDO *Allium cepa* COMO
ORGANISMO TESTE**

¹Fernandes, T. C. C.; ²Lovaglio, R. B.; ²Contiero, J.; ¹Marin-Morales, M. A.

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

²Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

Vários dispersantes utilizados para remediar áreas impactadas por óleo, apesar de eficientes, têm mostrado um potencial tóxico sobre os organismos e causado danos maiores ao ambiente que aqueles promovidos pelo contaminante. Os ramnolipídios são biossurfactantes produzidos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, bastante eficientes na redução da tensão superficial e interfacial entre a água e óleo, que, por serem considerados de baixa toxicidade ao ambiente, se caracterizam em sérios candidatos na substituição de dispersantes sintéticos usados em limpezas de ambientes impactados por petróleo. No entanto, assim como qualquer surfactante, os ramnolipídios possuem características químicas que os tornam reativos aos componentes da membrana celular dos organismos expostos, principalmente com os lipídios, o que pode promover alterações na estrutura e funcionamento dos envoltórios celulares. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial tóxico, genotóxico e mutagênico do biossurfactante ramnolipídio e a sua possível ação facilitadora no carreamento de compostos presentes no petróleo para o interior da célula, utilizando o sistema teste *Allium cepa*. Para essa avaliação foram preparadas três concentrações do biossurfactante ramnolipídio (1g/L, 2g/L e 10 g/L), extraído de um inóculo da linhagem LBI de *Pseudomonas aeruginosa*. Foram realizadas as simulações de derrame de petróleo cru pesado em água doce. P (água + petróleo); PB1 (água + petróleo + biossurfactante 1 g/L); PB2 (água + petróleo + biossurfactante 10 g/L), além de experimentos com água e biossurfactante na concentração 1 e 10 g/L (B1 e B2, respectivamente). A partir desses experimentos, foram obtidas as amostras de água com os contaminantes da simulação, para serem realizadas as avaliações químicas das amostras e investigada a ação dos compostos presentes sobre as células de diferentes regiões de desenvolvimento da espécie *Allium cepa*. Nossos resultados mostraram que as concentrações 1g/L e 2g/L são tóxicas para o organismo por promoverem a inibição da germinação das sementes de *A. cepa*. No entanto, quando as concentrações 1 g/l e 10 g/l foram associadas ao petróleo durante a simulação verificamos que o ramnolipídio não promoveu danos tóxicos, genotóxicos e mutagênicos adicionais aqueles observados para as células expostas somente as frações solúveis do petróleo, indicando a ausência de efeitos sinérgicos entre o ramnolipídio e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Além disso, nossos resultados comprovaram também que o ramnolipídio, embora possa interagir com os componentes da membrana celular, não facilitou o carreamento de compostos presentes no petróleo para o interior das células, se caracterizando em um bom agente biorremediador na limpeza de ambientes impactados por petróleo e seus derivados.

Palavras chaves: *Allium cepa*, *Pseudomonas aeruginosa*, surfactantes, biorremediação, aberrações cromossômicas, micronúcleo.

1. INTRODUÇÃO

Agentes tenso-ativos, como os surfactantes, são utilizados como uma das diversas estratégias de limpeza de ambientes contaminados por petróleo. Os surfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial de meios líquidos e promover a formação de micro-emulsões em soluções de água e hidrocarbonetos, permitindo a separação das fases e reduzindo a viscosidade de óleos (FIECHTER, 1992; HOLMBERG, 2002; VANCE - HARROP et al., 2003). As características químicas dos surfactantes permitem a sua utilização como um eficiente dispersante no processo de biorremediação de ambientes impactados por hidrocarbonetos. A dispersão do óleo em pequenas partículas facilita a sua retirada do ambiente e a sua degradação por microorganismos (BANAT, 1995; BOGNOLO, 1999; BANAT et al., 2000; MAIER e SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; MAKKAR e CAMEOTRA, 2001; MULLIGAN, 2005). Porém, Gloxhuber (1980) afirma que os surfactantes podem promover alterações estruturais nas mitocôndrias e interferir na fosforilação oxidativa, alterações na permeabilidade da membrana ao potássio e inibir a síntese de DNA.

Segundo Healy et al. (1996), a contaminação ambiental por derrames de óleo, associados à surfactantes sintéticos utilizados na indústria e na limpeza de ambientes atingidos por esses contaminantes, freqüentemente acabam levando a uma maior degradação do ambiente.

O crescimento da preocupação ambiental, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente, estimulou a busca por surfactantes naturais a serem utilizados como uma alternativa contra as contaminações ambientais por produtos sintéticos, classificados, muitas vezes, como contaminantes. Os biosurfactantes oferecem diversas vantagens, quando comparado aos surfactantes sintéticos, como, por exemplo, a sua maior biodegradabilidade (RON e ROSENBERG, 2002; MOHAN et al., 2006); maior diversidade; baixa toxicidade e citotoxicidade; compatibilidade ambiental, o que evita o acúmulo de substâncias exógenas no meio ambiente e maior seletividade e atividade específica em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (FIECHTER, 1992). Porém, apesar de suas vantagens, algumas pesquisas indicam que, assim como os surfactantes sintéticos, os biosurfactantes também podem perturbar a estrutura da bicamada lipídica das membranas celulares

(GRAU et al., 1999; BIGOGNO et al., 2002; WANG et al., 2005), devido ao caráter anfipático de sua molécula.

Vegetais superiores apresentam características que permitem sua utilização, com muita eficiência, no monitoramento de ambientes impactados por poluentes. A espécie *Allium cepa* (Liliaceae, monocotiledônea) tem sido usada por diversos autores na avaliação de contaminantes do solo e da água e permite identificar potenciais tóxicos, genotóxicos e mutagênicos de várias substâncias, assim como o efeito sinérgico entre elas (FISKEJÖ, 1985; RANK et al., 2002; EVSEEVA et al., 2003; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008; FERNANDES et al., 2009; HOSHINA e MARIN-MORALES, 2009; LEME e MARIN-MORALES, 2009; RADIC et al., 2010). A atividade tóxica pode ser observada neste vegetal por meio da mudança na taxa de germinação e no desenvolvimento da planta, assim como por meio da inibição do índice mitótico em regiões meristemáticas. Já as alterações no material genético são observadas pelo potencial de indução de aberrações cromossômicas e nucleares de células de diversas regiões do organismo. O sistema-teste *A. cepa* tem mostrado alta sensibilidade e boa correlação, quando comparado com outros sistemas teste, principalmente com os de mamíferos (CHAUHAN et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2006; BIANCHI, 2008; MAZZEO, 2009).

Os objetivos desse estudo foram avaliar, pelo uso do sistema teste *Allium cepa*, o potencial tóxico, genotóxico e mutagênico do biossurfactante ramnolípido, a sua possível ação facilitadora no carregamento de compostos presentes no petróleo para o interior da célula.

2. Materiais e Métodos

2.1. Produção do biossurfactante ramnolípido

Foi avaliado neste trabalho um biossurfactante conhecido como ramnolípido, cuja estrutura química é de um glicolípido constituído de ácidos graxos ligados a moléculas de ramnose (Figura 1) (NITSCHKE et al., 2005).

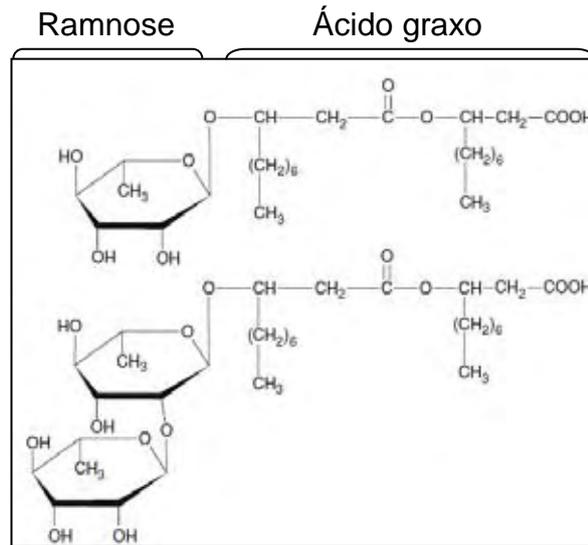


Figura 1. Estrutura química do biossurfactante ramnolipídio.

O ramnolipídio utilizado foi obtido a partir da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, linhagem LBI, isolada de solo contaminado por petróleo (BENINCASA et al., 2002), sendo mantida em Agar nutriente, em tubos criogênicos a -20°C .

Para o preparo do pré-inóculo, o microrganismo foi semeado em meio inclinado, permanecendo neste ambiente por 24 horas à 30°C . Em seguida, para a obtenção de uma suspensão microbiana, foi adicionado ao meio 3 mL de água destilada estéril. Esta suspensão foi padronizada a 610 nm, densidade óptica de $0,65 \pm 0,01$ (aprox. 10^8 CFU/ml). Posteriormente, foram transferidos 4 mL desta solução para frascos de Erlenmeyer, contendo 200 mL de meio mineral (ROBERT et al., 1989). Foi acrescido nestes frascos, como única fonte de carbono do meio, 4 mL de óleo de soja. O frasco com este inóculo permaneceu por 24 horas em shaker a 200 rpm e 30°C .

A produção de ramnolipídios foi feita em frascos de Erlenmeyer (volume de 1 L), contendo 300 mL de meio mineral, 6 mL do inóculo e 6 mL de óleo de soja. Os frascos foram incubados em shaker à 30°C , 200 rpm por um período de 120 horas. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,8. Para realização da extração dos ramnolipídios, o caldo com o produto (biossurfactante) foi centrifugado a 12.000 rpm, durante 20 minutos. O sobrenadante foi separado e acidificado com H_2SO_4 6M para pH 2,0, sendo adicionado, a seguir, um volume equivalente ao do caldo de clorofórmio/metanol (2:1). A mistura foi vigorosamente agitada por 10 minutos e, em seguida, mantida em repouso até a completa separação das fases. A fase orgânica foi removida e a operação se repetiu com a fase aquosa. Para a concentração do

produto, foi utilizado o rotavapor, que promoveu a evaporação dos solventes obtendo um produto com, praticamente, 100% de pureza.

Para a determinação da tensão superficial do ramnolipídio, foi seguido o método do anel de De Nöuy, utilizando tensiômetro Krüss K6. Neste processo, foi utilizada uma concentração de 1 g/L de ramnolipídio, considerada padrão para este produto (COSTA et al., 2006; COSTA et al., 2009 e NITSCHKE et al., 2010). A tensão interfacial do ramnolipídio foi obtida a partir de uma solução contendo 1 g/L do biossurfactante e n-hexadecano, na proporção de 1:1 (10 mL da concentração do biossurfactante e 10 mL de n-hexadecano), utilizando para esta avaliação o tensiômetro Krüss K6. As análises foram realizadas em triplicata.

2.2. Avaliação Ecotoxicológicas

Para a avaliação das atividades tóxicas, genotóxicas e mutagênicas do biossurfactante, quando utilizado como agente biorremediador de águas contaminadas com petróleo, foram realizadas simulações de derrame de óleo cru pesado (proveniente da Bacia de Campos/RJ - Brasil) em água doce. Todas as simulações foram realizadas em recipientes cilíndricos montados com tubos de PVC (Poli Cloreto de Vinila) de 1,20m de comprimento e 150 mm de diâmetro (Figura 2). Estes recipientes receberam um volume equivalente a 20L de água do tanque de criação de peixes e 5 mL de petróleo, criando, assim, uma pluma de óleo de, aproximadamente, 0,2mm ou 200µm de espessura. Uma bomba de circulação, com uma vazão de aproximadamente 480 L/h, foi colocada na base dos tubos, com o intuito de simular a movimentação de um corpo d'água.

Foram processadas, nestes tubos as seguintes simulações: derrame de petróleo (água + petróleo = P); derrame de petróleo biorremediado com biossurfactante ramnolipídio na concentração de 1 g/L (água + petróleo + biossurfactante 1 = PB1); derrame de petróleo biorremediado com biossurfactante ramnolipídio na concentração 10g/L (água + petróleo + biossurfactante 2 = PB2). A proporção de biossurfactante utilizado nas misturas foi de 5% do total de óleo derramado (conforme resolução CONAMA 269, para surfactante sintético). Foram realizados, nas mesmas condições, experimentos com água e biossurfactante (água + biossurfactante 1 g/L = B1; água + biossurfactante 10 g/L = B2). O Controle ambiental foi feito com água do tanque de criação de peixes e o controle negativo com água ultrapura.

Os tubos utilizados nas simulações foram fechados com papel alumínio e expostos a ambiente natural externo, por 16 horas. Esse procedimento foi realizado para garantir a incorporação dos hidrocarbonetos hidrossolúveis à água dos experimentos. Em seguida, os tubos foram expostos a luz solar intensa, por 6 horas, para que os produtos de degradação também fossem incorporados ao solvente.

Posteriormente, foram coletadas, por diferença de densidade, todas as amostras de águas contendo as frações solúveis do petróleo (PB1, PB2 e P) e as amostras de B1, B2 e CN. Com as amostras de água coletadas, foram realizadas os ensaios ecotoxicológicos, as análises qualitativa e quantitativa dos HPA e mensurado o pH de cada uma destas amostras. A análise dos hidrocarbonetos foi realizada pela empresa Analytical Technology Serviços Analíticos e Ambientais Ltda, por meio de cromatografia gasosa (cromatógrafo Thermo, modelo Focus) acoplado a um espectrômetro de massas (Thermo, modelo DSQ). A coluna utilizada para a análise foi VB-5, 30m x 0,25mm x 0,25 μm . A empresa seguiu as normas de análise estabelecidas pela USEPA 8270D.

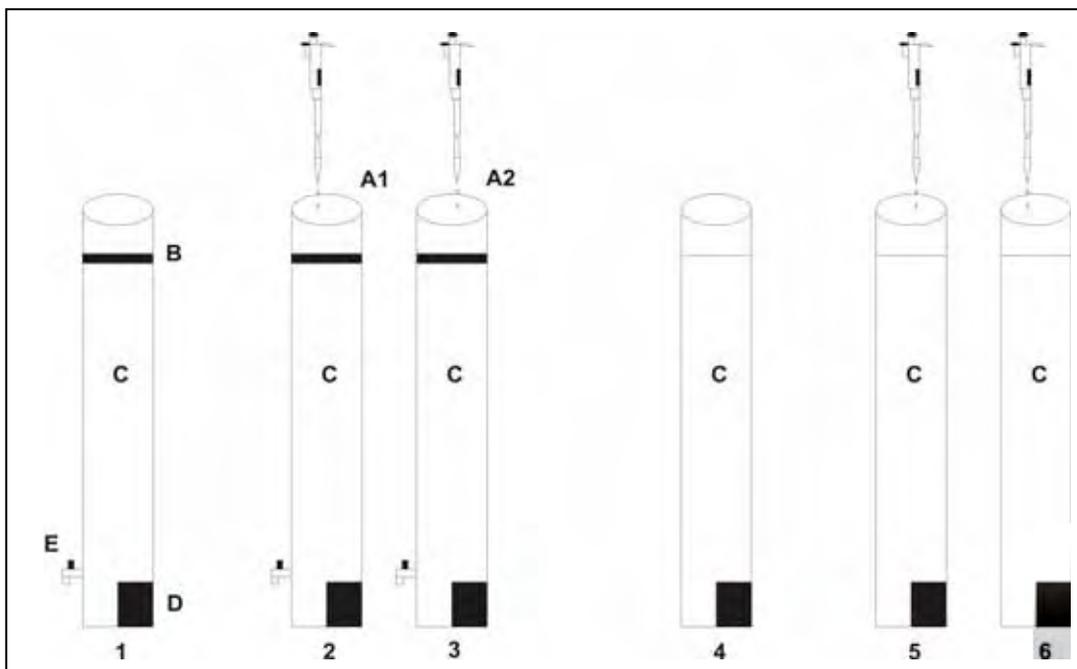


Figura 2. Esquema ilustrativo do experimento **1.** Água + Petróleo (P); **2.** Água + petróleo + biossurfactante 1 g/L (PB1); **3.** Água + petróleo + biossurfactante 10 g/L (PB2); **4.** Água coletada nos tanques de criação de peixe (CA) **5.** Água + biossurfactante 1 g/L (B1); **6.** Água + biossurfactante 10 g/L (B2); **A1 e A2.** Adição nas amostras, por meio de gotejamento realizado com micropipeta, de 0,25 mL de biossurfactante, na concentração 1g/L (A1) e 2 g/L (A2); **B.** Representação da pluma de óleo (200 μm); **C.** 20 L de água obtida nos tanques de criação de peixes, que são abastecidos com água de poço artesiano; **D.** Bomba de circulação de água; **E.** Torneira para promover a vazão para coleta da amostra que contém a fração solúvel do petróleo.

2.3. Organismo teste

O material biológico utilizado neste estudo, para avaliação da toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do biossurfactante ramnolipídio, bem como os efeitos sinérgicos da associação do petróleo com o biossurfactante, foi o organismo *Allium cepa*, variedade baia periforme ($2n = 2x = 16$).

As raízes obtidas nos testes de germinação das sementes de *A. cepa* foram utilizadas nos ensaios de aberrações cromossômicas e de micronúcleos de células de 3 diferentes regiões: região meristemática, região F1 e região embrionária do caule (hipocótilo) (Figura 3).

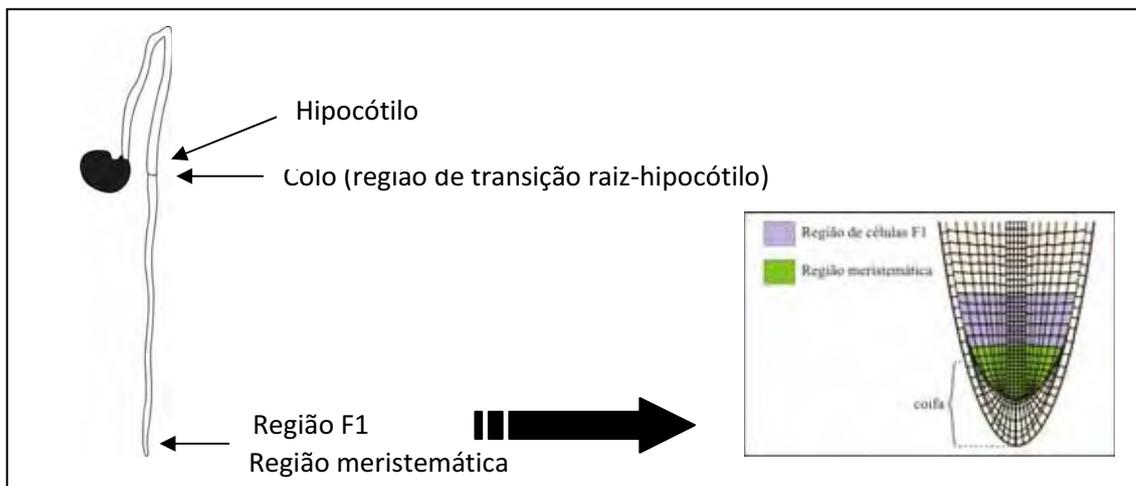


Figura 3. Esquema ilustrativo das regiões da plântula de *A. cepa* utilizada para a avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade das amostras estudadas.

2.4. Avaliação do potencial tóxico, genotóxico e mutagênico

Para avaliação do efeito tóxico, genotóxico e mutagênico das amostras coletadas (P, PB1, PB2, B1, B2 e CA), foram realizadas as análises do índice de germinação, de aberrações cromossômicas e de micronúcleos.

Os testes de germinação foram realizados em triplicata e os de genotoxicidade e mutagenicidade em duplicata. 100 sementes de *A. cepa* foram expostas a 15 mL das amostras P, PB1, PB2, B1, B2, sendo uma placa de Petri para cada tratamento. Todos os testes de germinação ocorreram em condições de BOD. Além dos testes realizados com as amostras obtidas na simulação, também foram avaliadas as concentrações de 1 e 2 g/L do biossurfactante ramnolipídio (BIO1 e BIO2, respectivamente). O controle negativo foi realizado em água ultrapura. Para a avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade também foram realizados 2 testes

controle positivo: controle positivo aneugênico em trifluralina (0,84 mg/L) (CP1) e controle positivo clastogênico em Metil-metanosulfonato - MMS (10 mg/L) (CP2).

Para o teste de germinação, foram contabilizadas as sementes germinadas, após 5 dias de exposição aos tratamentos, cujos valores obtidos foram comparados, estatisticamente, com o teste controle negativo. Após a quantificação do índice de germinação, as raízes, com aproximadamente 2 cm de comprimento, foram coletadas e fixadas em Carnoy (3:1), para posterior uso no preparo das lâminas a serem utilizadas nos testes de genotoxicidade e mutagenidade. As raízes fixadas foram coradas por meio da reação de Feulgen e as três regiões utilizadas nas análises (região meristemática, F1 e hipocótilo) foram seccionadas e preparadas em lâmina pelo método de esmagamento. Foram preparadas 10 lâminas para cada uma das simulações realizadas, sendo analisadas cerca de 500 células, por lâminas, de cada uma das regiões. A análise foi realizada em microscópio de luz, utilizando o aumento de 1000 vezes. A avaliação genotóxica e mutagênica foi feita calculando as freqüências de aberrações cromossômicas e de micronúcleo, respectivamente.

A análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos após a verificação das propriedades tensoativas do biosurfactante ramnolipídio estão demonstrados na tabela 1. Como pode ser visto, a concentração 1 g/L de ramnolipídio foi capaz de diminuir a tensão interfacial da água para um valor menor que 30 (Mn/m) e a tensão interfacial para um valor abaixo de 1 Mn/m.

Tabela 1 – Média observada das propriedades tensoativas de solução de 0,1% de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI.

Propriedades	Ramnolipídio de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI
Tensão superficial (Mn/m)	24.9±0,06
Tensão Interfacial (Mn/m)	0,63±0,06

Dentre as diversas substâncias que compõem o petróleo, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são especialmente perigosos, devido ao caráter carcinogênico e mutagênico que muitos apresentam. A tabela 2 traz os resultados obtidos dos HPAs presentes nas amostras das simulações feitas com petróleo e biossurfactante. Foram avaliados e quantificados os 16 HPAs recomendados pela EPA, por serem considerados, pela agência, como prioritários em avaliações ambientais.

Foi avaliado o pH de todas as amostras obtidas nos ensaios (CA, P, PB1, PB2, B1 e B2), para verificar a possibilidade das substâncias testadas alterar o pH da água do controle ambiental (utilizada em todos os experimentos). Os dados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 4.

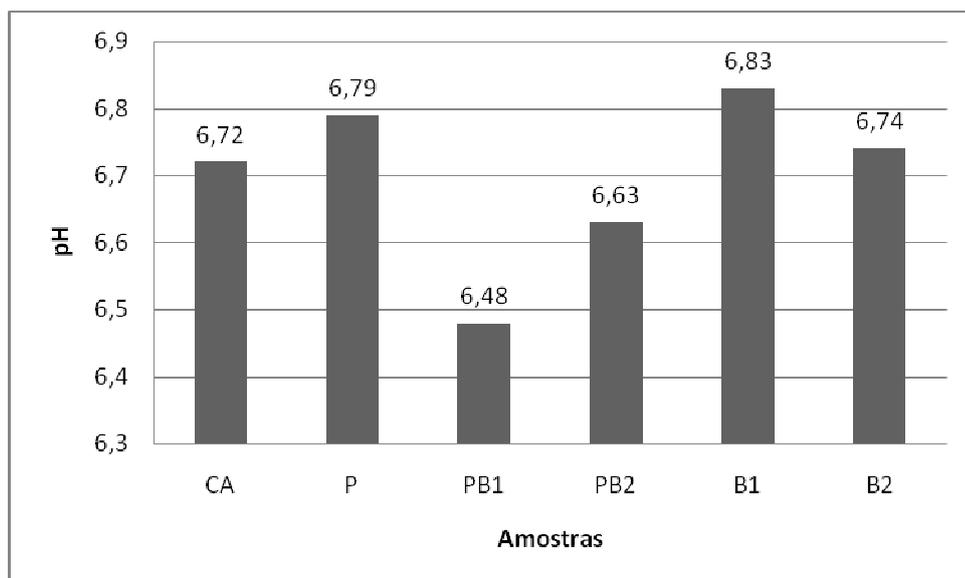


Figura 4. Variação de pH observada nas amostras estudadas.

Os resultados obtidos nos teste de germinação de sementes expostas às amostras de águas derivadas da simulação de derrame de petróleo, com e sem ramnolipídio, mostraram que as frações solúveis do petróleo não inibiram a germinação de sementes de *Allium cepa*. No entanto, os testes realizados somente com o ramnolipídio (concentrações de 1 g/L e 2 g/L) mostraram que o biossurfactante foi tóxico para o organismo estudado, como pode ser observado na figura 5.

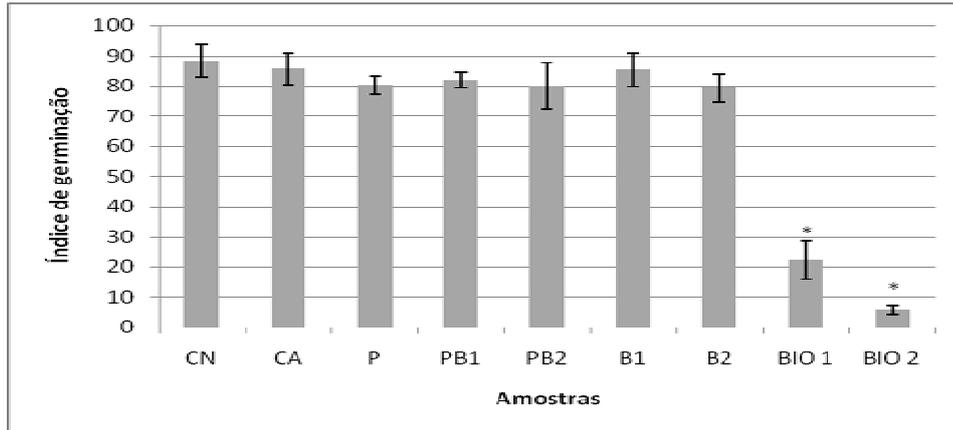


Figura 5. Índice de germinação de sementes de *A. cepa* expostas às diferentes amostras resultantes da simulação de contaminação por petróleo, com e sem biorremediação pelo biossurfactante, e às concentrações de 1 e 2 g/L do ramnolipídio. **CN.** Controle negativo, **CA.** Controle ambiental, **P.** Petróleo+água, **B1.** biossurfactante 1 (1 g/L) e **B2.** biossurfactante 2 (10 g/L), **PB1.** Água + petróleo + biossurfactante 1 g/L, **PB2.** Água + petróleo + biossurfactante 10 g/L, **BIO 1.** 1g/L do ramnolipídio, **BIO 2.** 2 g/L do ramnolipídio. * $p < 0,05$.

A inibição do índice de germinação, observado em BIO 1 (22,3%) e BIO 2 (5,66%), quando comparado ao controle negativo e ao controle ambiental, foi superior a 50%, chegando próximo de 100% em BIO 2.

Tabela 2. Análise quantitativa e qualitativa da presença de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) nas duas simulações realizadas com petróleo e/ou biossurfactante.

COMPOSTO	PCP		CN		P				PB1		PB2		LD (µg/L)	LQ		
	CONCENTRAÇÃO (µg/L)															
	Amostra Unica	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1			Amostra 2									
Naftaleno	837309,00	1,28	0,368	4,01	12	4,41	12,2	4,48	12,6	0,05	0,15					
Acenaftileno	46826,00	ND	ND	ND	ND	ND	0,092	ND	0,084	0,05	0,15					
Acenafteno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,073	ND	0,058	0,05	0,15					
Fluoreno	198241,50	ND	ND	0,58	0,371	1,14	0,491	1,2	0,432	0,05	0,15					
Fenantreno	770695,00	ND	ND	2,57	0,749	5,85	1,12	0,76	0,852	0,05	0,15					
Antraceno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15					
Fluoranteno	31457,50	ND	0,05	0,15												
Pireno	91092,00	ND	ND	ND	ND	ND	0,050	ND	ND	0,05	0,15					
Benzo(a)antraceno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15					
Criseno	37356,50	ND	0,05	0,15												
Benzo(b)fluoranteno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15					
Benzo(k)fluoranteno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15					
Benzo(a)pireno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15					
Indeno(1,2,3-cd)pireno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15					
Dibenz(a,h)antraceno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15					
Benzo(g,h,i)perileno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15					

PCP. Petróleo cru pesado; **CN.** Controle negativo; **P** Petróleo + água; **PB1.** Água + petróleo + biossurfactante 1g/L; **PB2.** Água + petróleo + biossurfactante 10g/L; **ND.** Não detectado; **LD.** Limite de detecção; **LQ.** Limite de quantificação.

Para avaliar o possível efeito genotóxico das amostras P, PB1, PB2, B1, B2 e CA, foram utilizados parâmetros celulares relacionados ao desempenho da atividade cromossômica durante o processo de divisão celular mitótica, como a frequência de aberrações cromossômicas (perdas e pontes cromossômicas, c-metáfases, anáfases multipolares e poliploidias) em células das regiões meristemáticas e do hipocótilo. A avaliação do potencial mutagênico foi feita pela análise da indução de micronúcleos em células meristemática, células F1 e células do hipocótilo de *A. cepa*. As concentrações BIO1 e BIO2, devido ao baixo índice de germinação e inibição do índice mitótico, não puderam ser avaliadas quanto a esse parâmetro. Os resultados obtidos nessas análises estão expostos na tabela 3 e figuras 6, 7 e 8.

Tabela 3. Frequência de aberrações cromossômicas observadas em células das regiões meristemáticas e do hipocótilo após exposição às amostras estudadas.

	CN	CA	CP1	CP2	P	PB1	PB2	B1	B2
CM	0,1±0,31	0,25±0,44	0,7±0,8	23,7±12,38*	0,30±0,57	0,15±0,37	0,1±0,31	0,05±0,22	0,15±0,37
CH	0,15±0,37	0,2±0,52	0,45±0,51	24,1±12*	0,3±0,92	0,2±0,41	0,2±0,52	0,05±0,22	0,25±0,55

CM. células meristemáticas, **CH.** Células do hipocótilo. **CN.** Controle negativo, **CA.** Controle ambiental, **CP1.** Controle positivo 1 (trifluralina), **CP2.** Controle positivo 2 (metilmetano sulfonato), **P.** Petróleo + água, **PB1.** Água + petróleo + biossurfactante 1 g/L, **PB2.** Água + petróleo + biossurfactante 10g/L, **B1.** biossurfactante 1 (1 g/L) e **B2.** biossurfactante 2 (2 g/L).

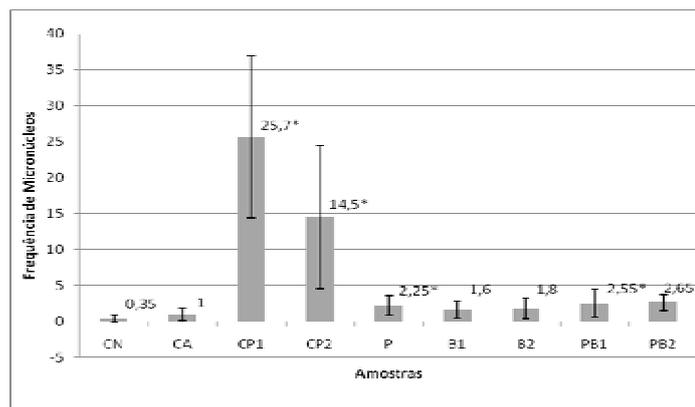


Figura 6. Frequência de micronúcleos observados em células do hipocótilo, após exposição às amostras estudadas. **CN.** Controle negativo, **CA.** Controle ambiental, **CP1.** Controle positivo 1 (trifluralina), **CP2.** Controle positivo 2 (metilmetano sulfonato), **P.** Petróleo+água, **B1.** biossurfactante 1 (1 g/L) e **B2.** biossurfactante 2 (10 g/L), **PB1.** Água + petróleo + biossurfactante 1 g/L, **PB2.** Água + petróleo + biossurfactante 10 g/L. * p<0,05.

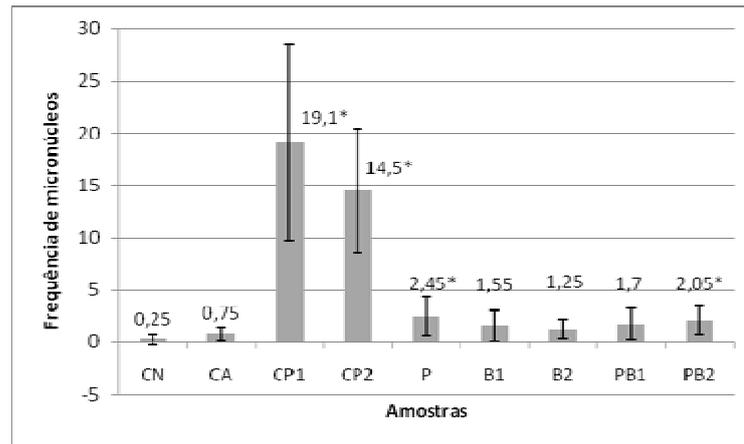


Figura 7. Frequência de micronúcleos observados em células da região F1, após exposição às amostras estudadas. **CN.** Controle negativo, **CA.** Controle ambiental, **CP1.** Controle positivo 1 (trifluralina), **CP2.** Controle positivo 2 (metilmetano sulfonato), **P.** Petróleo+água, **B1.** biossurfactante 1 (1 g/L) e **B2.** biossurfactante 2 (10 g/L), **PB1.** Água + petróleo + biossurfactante 1 g/L, **PB2.** Água + petróleo + biossurfactante 10 g/L. * $p < 0,05$.

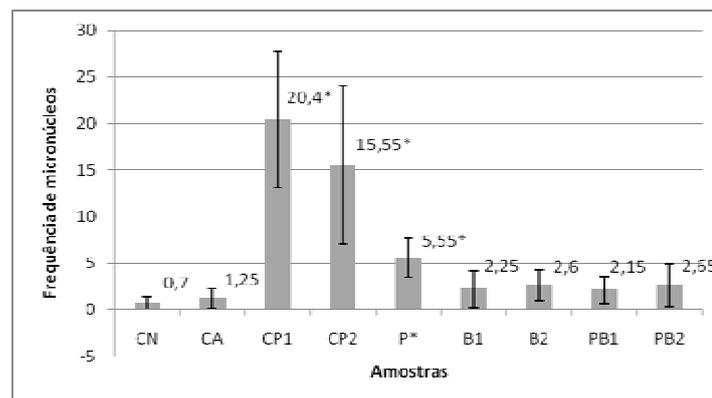


Figura 8. Frequência de micronúcleos observados em células da região meristemática da raiz, após exposição às amostras estudadas. **CN.** Controle negativo, **CA.** Controle ambiental, **CP1.** Controle positivo 1 (trifluralina), **CP2.** Controle positivo 2 (metilmetano sulfonato), **P.** Petróleo+água, **B1.** biossurfactante 1 (1 g/L) e **B2.** biossurfactante 2 (10 g/L), **PB1.** Água + petróleo + biossurfactante 1 g/L, **PB2.** Água + petróleo + biossurfactante 10 g/L. * $p < 0,05$.

Como pode ser visto na tabela 3, as amostras estudadas não induziram aberrações cromossômicas, em níveis estatisticamente significativos, nas células da região meristemática da raiz e nas células do hipocótilo. As figuras 6, 7 e 8 representam o potencial mutagênico das amostras P e PB2 para as células da região F1; P, PB1 e PB2, para as células da região do hipocótilo; e P para região meristemática da raiz. Os resultados também mostraram que a presença do biossurfactante nas amostras que contém a fração solúvel do petróleo não promoveu aumento da atividade mutagênica.

4. DISCUSSÃO

O biossurfactante ramnolipídio, pertencente à classe dos glicolipídios, é um surfactante microbiano constituído de carboidratos ligados a longas cadeias de ácidos graxos (NITSCHKE et al., 2005). Os ramnolipídios são produzidos por diversas linhagens da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e já estão comercialmente disponíveis no mercado (Jeneil Biossurfactante®).

Segundo Mercadé e Manresa (1994), para uma molécula ser considerada um bom agente surfactante ela deve reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para valores menores de 30 mN/m e a tensão interfacial para valores em torno de 1,0 mN/m. O ramnolipídio produzido em nossos estudos apresentou excelentes propriedades tensoativas, podendo ser aplicado em processos de biorremediação e dispersão de hidrocarbonetos, uma vez que nossos resultados mostraram que 1g/L de ramnolipídio apresentou uma tensão superficial da água de 24,9 mN/m e a diminuição da tensão interfacial do n-hexadecano de 41,8 para 0,63 mN/m.

A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos naturais dá-se diretamente devido a seus efeitos sobre a fisiologia das diversas espécies. O efeito indireto do pH também é muito importante, pois, em determinadas condições, pode contribuir para a precipitação de elementos químicos tóxicos ou alterar a solubilidade dos nutrientes (CETESB, 1999).

Segundo Lovaglio (2007), valores de pH entre 5-10 não interferem nas propriedades do biossurfactante ramnolipídio, porém, concentrações menores que 5 podem promover a precipitação do biossurfactante e o aumento da tensão superficial, o que ocasionaria uma diminuição na eficiência da substância em processos de biorremediação. Nossos resultados mostraram que o petróleo não alterou o pH da água usada para a preparação das amostras, o que certifica a possibilidade de uso do biossurfactante em processos de descontaminação promovida por este tipo de poluente. Neste caso, o biossurfactante formaria micelas, que facilitariam a dispersão e degradação microbiana do óleo. Nossos resultados também indicaram que o biossurfactante não alterou o pH da água.

O petróleo é uma mistura complexa, constituída de gases e óleos de hidrocarbonetos, além de água salgada. Dentre os compostos que constituem o óleo cru, estão os HPAs, poluentes orgânicos de grande persistência ambiental (POP) (SOBREIRA, 2004). Muitos desses HPAs são considerados potencialmente

carcinogênicos, mutagênicos e inibidores de crescimento (BOGNOLO, 1999; COSTA, 2001). Porém, Netto et al.(2000) afirma que os HPAs não são mutagênicos diretos e necessitam sofrer ativação metabólica preliminar para se tornarem capazes de reagir com o DNA e outras macromoléculas.

A biotransformação caracteriza-se em alterações estruturais ou químicas que as substâncias sofrem no organismo, geralmente associadas a processos enzimáticos, que leva à formação de derivados mais polares e mais hidrossolúveis. As substâncias que possuem grupos funcionais hidrofílicos sofrem conjugação direta, sendo seus produtos mais rapidamente excretados. No entanto, os compostos lipossolúveis, como os HPAs, que são pouco polares, necessitam de reações pré-sintéticas como condição para posterior conjugação. A biotransformação dos HPAs, então, envolve uma série de enzimas que catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise, bem como as que catalisam reações de conjugação, que estão presentes em todos os tecidos biológicos (MUTTI e BERGAMASCHI, 1996).

Em mamíferos, os HPAs são metabolizadas por 2 grupos de enzimas: as enzimas de fase I, que geralmente modificam a estrutura química da substância, mediante adição de um grupo funcional (-OH, -NH₂, -SH, ou -COOH), o que resulta em um pequeno aumento de hidrofiliidade e as enzimas de biotransformação de fase II, que são catalisadas por uma conjugação de enzimas, cujos produtos são solúveis em água e podem ser excretados pelo corpo (MARIN-MORALES et al, 2009). Segundo Shimabukuro, et al. (1982), em plantas, foi proposta uma reação adicional, denominada de fase III, chamada também de conjugação secundária, para distinguir-la da primeira conjugação de fase II. Nesta fase, os produtos são insolúveis em água, geralmente inativos e são depositados em compartimentos específicos da célula ou incorporados em uma estrutura celular.

A espécie *A. cepa* é capaz de metabolizar pró-mutágenos (VELEMÍNSKÝ e GICHNER, 1988) e tem sido utilizada como indicador de genotoxicidade para diversos contaminantes orgânicos (FISKEJÖ, 1985; RANK et al., 2002; EVSEEVA et al., 2003; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008; FERNANDES et al., 2009; HOSHINA e MARIN-MORALES, 2009; LEME e MARIN-MORALES, 2009; RADIC et al., 2010). Porém, segundo Uhl et al. (2003), a espécie

A. cepa não responde à atividade genotóxica de HPAs, devido a sua menor reatividade aos produtos de biotransformação dos hidrocarbonetos. Velemínský e Gichner (1988), afirmam que, apesar do teste de aberrações cromossômicas em *A. cepa* ser bastante eficiente na resposta da genotoxicidade de outros pró-mutágenos como benzidine, aflatoxinas, estireno, piroalizidinas etanol, este *end point* parece não ser indicado para análise da genotoxicidade de HPAs. Porém Leme e Marin-Morales (2008) mostraram que este organismo teste foi eficiente na identificação de genotoxicidade e mutagenicidade de águas de um rio impactado por derrame de petróleo bruto

Dos 16 HPAs indicados como prioritários para avaliação em contaminações ambientais pela USEPA (1984), apenas seis deles foram encontrados nas nossas amostras: naftaleno, fluoreno, fenantreno, acenafteno, acenaftileno e o pireno. Dentre os HPAs presentes nas amostras, o naftaleno, fluoreno e fenantreno foram detectados em todas as simulações realizadas com petróleo (P, PB1 e PB2), sendo que os mais altos índices foram registrados para o naftaleno.

O Naftaleno é considerado um dos poluentes que mais contribuem para a toxicidade total de amostras de sedimentos e rejeitos líquidos (ELJARRAT e BARCELÓ, 2003). Esse HPA tem baixa solubilidade em água ($31,7 \text{ mg/L}^{-1}$) e sublima facilmente em temperatura ambiental. Existem comprovações claras de que o naftaleno passa pelo metabolismo enzimático oxidativo do citocromo P450, resultando na produção de metabólitos reativos que induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (CHICHESTER et al., 1994; STOHS et al., 2002). Segundo Djomo et al. (1995), o naftaleno é capaz de induzir catarata em coelhos e dano bronquiolar em camundongos, pela necrose do epitélio dos bronquíolos, maior sítio de atividade das enzimas monoxigenases citocromo P450.

Nossos resultados indicaram uma resposta negativa, quanto aos efeitos genotóxicos do petróleo cru pesado, pois as freqüências de aberrações cromossômicas, tanto nas células da região meristemática da raiz quanto nas células da região do hipocótilo, não foram estatisticamente significativas, quando comparadas aos resultados do controle. Esses dados parecem estar mais relacionados à ausência de HPAs nas frações solúveis das amostras do que a ausência de reatividade dos mesmos sobre o organismo *A. cepa*. Considerando que o naftaleno foi o HPA mais encontrado nas análises químicas e que este composto é altamente volátil, entendemos que a baixa taxa genotóxica foi decorrente da

completa sublimação do produto, durante o processo de germinação. Esta explicação também pode ser fundamentada pelas respostas mutagênicas registradas em todos os ensaios de micronúcleos realizados com as células de *A. cepa*. As células portadoras de MN são células que sofreram alterações cromossômicas durante o processo de divisão e que mantiveram a alteração, nas gerações celulares subseqüentes, na forma de uma pequena estrutura circular semelhante, em composição, ao núcleo principal. Assim, entendemos que no início do processo de germinação, houve uma ação do naftaleno, antes que este sublimasse por completo. Esta ação mutagênica pode ser atribuída aos metabólitos formados no processo de biotransformação, que induziu a formação de ROS, altamente reativas com a molécula de DNA. Estes resultados corroboram dados de Leme e Marin-Morales (2008) que encontraram altos índices de MN decorrentes da ação de hidrocarbonetos presentes em amostras de água contaminadas com petróleo, comprovando a fixação das alterações ocorrida durante o processo de divisão celular, que precedeu a formação de células micronucleadas. Esta resposta evidencia a ação dos HPAs sobre o organismo teste *A. cepa*, contrariando os dados de Uhl et al. (2003) e Velemínský e Gichner (1987).

O fenantreno é um HPA pertencente à classe dos compostos semi-voláteis, considerado, assim como o naftaleno, um poluente prioritário devido a sua toxicidade, persistência e predominância no meio ambiente (USEPA, 1984). Dentre os HPAs, o antraceno e o fenantreno são os menos reativos (COSTA, 2001). Porém, segundo Djomo et al. (1995), o fenantreno é capaz de induzir síntese não programada de DNA ou micronúcleo em células de medula óssea. Estes autores citam ainda que foi detectada, em salamandras, uma ação mutagênica para este HPA. O fenantreno demonstrou ser mais tóxico que os HPAs benzo[a]pireno, naftaleno e antraceno, o que pode mascarar a sua possível atividade genotóxica (DJOMO et al., 1995). A ausência de genotoxicidade nas nossas amostras, obtidas das simulações realizadas com petróleo e biossurfactante, pode também ser explicada pela baixa concentração de fenantreno encontrada e pela semivolatilidade do composto.

Fluoreno é designado como um poluente tóxico, segundo a Lei Federal Norte-Americana 307 (CLEAN WATER ACT, 1987), e está sujeito a limitações nos efluentes daquele país. No entanto, Irwin (1997) infere que é raramente relatada toxicidade aguda para seres humanos, peixes, ou animais selvagens, quando

expostos a baixos níveis de fluoreno. O autor também afirma que, dados da literatura, que o fluoreno não é genotóxico para bactérias. Os nossos dados obtidos com o organismo teste *A. cepa*, corroboram essa ação não genotóxica do fluoreno.

Os dados registrados para mutagenicidade com *A. cepa* (indução de MN) mostraram que o ramnolipídio testado não interferiu na ação mutagênica do petróleo, mostrando não haver qualquer efeito sinérgico entre o biossurfactante e os HPAs presentes no óleo cru pesado utilizado nas simulações realizadas nesta avaliação.

Quanto aos resultados do índice de germinação, verificamos que as amostras P, PB1, PB2, B1 e B2 não são tóxicas para *A. cepa*. No entanto, quando foram testadas, somente as concentrações 1 g/L e 2 g/L do biossurfactante ramnolipídio, foi observado que este composto promove uma inibição no índice de germinação estatisticamente significativo, quando comparado aos resultados do controle negativo. Nossos resultados parecem corroborar com Millioli et al. (2007), onde os autores avaliaram a fitotoxicidade do ramnolipídio sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) e observaram que a atividade fitotóxica do biossurfactante é concentração dependente, ou seja, quanto maior a concentração testada maior o índice de inibição de germinação. Os autores destacam que as concentrações de 1 e 1,5% de ramnolipídio contribuíram para que houvesse uma inibição de 70 e 80 % , respectivamente, no índice de germinação, quando comparados à germinação do controle (sem o biossurfactante).

Segundo Wang et al. (2005), o ramnolipídio também é capaz de promover um efeito inibitório no crescimento de algas, devido a uma forte atividade lítica da substância sobre as células. Os autores observaram que a lise na célula inicia-se com um desarranjo da membrana plasmática, seguida da desintegração das endomembranas celulares, efeito este irreversível para as células. Estas características citotóxicas do biossurfactante, descritas pelos autores acima, podem ser as responsáveis pela ação inibitória registrada em nossos ensaios de germinação, realizados com sementes de *A. cepa*.

5. CONCLUSÃO

Concluimos, nesse estudo, que o biossurfactante ramnolipídio, produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* LBI, tem potencial para ser utilizado em processos de biorremediação de águas contaminadas por petróleo.

Este biossurfactante apresentou valores de tensão superficial e interfacial apropriadas para a ação tensoativa necessária para promoção de dispersão e degradação do petróleo por microrganismos.

Nossos resultados mostraram que o biossurfactante, usados em simulações de derrame de petróleo, nas duas concentrações testadas (1 e 10 g/L), não alterou as atividades tóxicas, genotóxicas e mutagênicas das frações solúveis do petróleo, presentes nas amostras de águas, indicando a ausência de efeitos sinérgicos entre o ramnolipídio e os HPAs.

Nossos resultados comprovaram também que o ramnolipídio, embora possa interagir com os componentes da membrana celular, não facilita o carreamento de compostos presentes no petróleo para o interior das células.

O petróleo e o biossurfactante não alteraram as condições físicas de pH da água utilizada nas simulações, o que indica a possibilidade da utilização de biossurfactantes na descontaminação de ambientes impactados por este produto químico. Somado a isso, como não houve alteração do pH, quando o ramnolipídio foi incorporado a mistura petróleo-água, podemos concluir que o biossurfactante ramnolipídio, produzido pela bactéria *P. aeruginosa* LBI, é um eficiente agente dispersante e biorremediador de ambientes contaminados por HPAs.

As atividades mutagênicas, observadas nos testes de MN, realizados com células meristemáticas, F1 e do hipocótilo, provavelmente ocorreram pela geração de espécies reativas de oxigênio, produzidas pelos produtos de biotransformação do naftaleno.

Pelos testes realizados com o biossurfactante, o ramnolipídio não apresenta ação genotóxica e nem mutagênica para o organismo teste *A cepa*.

Concluimos que a utilização do ramnolipídio em biorremediação de águas impactadas por petróleo pode se caracterizar em uma alternativa biotecnológica indicada pela sua eficiência, pela baixa toxicidade e por substituir produtos sintéticos, que geralmente promovem impactos ambientais adicionais à própria contaminação.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Recursos Humanos ANP/FINEP/MCT-CTPETRO, PRH-05, Universidade Estadual Paulista (UNESP)-Rio Claro pelo suporte financeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhance oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, Heidelberg, v. 53, p. 495-508, 2000.

BENINCASA, M., CONTIERO, J., MANRESA, M.A. AND MORAES, I.O., Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283, 2002.

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

BIGOGNO, C.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Lipid and fatty acid composition of green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. **Phytochemistry**, v. 60, p. 497-503, 2002.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41- 52, 1999.

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

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**, São Paulo, 391 p., 1999.

CHICHESTER, C. H.; BUCKPITT, A. R.; CHANG, A.; PLOPPER, C. G. Metabolism and cytotoxicity of naphthalene and its metabolites in isolated murine Clara cells. **Molecular Pharmacology**, v. 45, p. 664-672, 1994.

COSTA, S. G. A. O.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; DÉZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1063-1072, 2009.

COSTA, S. G. A. O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN M. N. CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.

CWA - **Water Quality Act** of 1987 Public Law 100-4 USA. 1987.

DJOMO, J. E.; DAUTA, A.; FERRIER, V.; NARBONNE, J. F.; MONKIEDJE, A.; NJINE, T.; GARRIGUES, P. Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus*. **Water Research**, v. 38, p. 1817-1821, 2004.

ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. priority lists for persistent organic pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 655-665, 2003.

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

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

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 208 - 217, 1992.

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

GRAU, A.; GOMEZ FERNANDEZ, J. C.; PEYPOUX, F.; ORTIZ, A. A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1418, p. 307–319, 1999.

HEALY, M. G., DEVINE, C. M., MURPHY, R. Microbial production of biosurfactants. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 18, p. 41-57, 1996.

HOLMBERG, K. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**, v. 1. John Wiley, New York. 2002.

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.

IRWIN, R. J. **PAHs Entry**. National Park Service, Water Operations Branch, 176 p. 1997.

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

LOVAGLIO, R. B. **Produção de ramnolipídios em biorreator por *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. 2007. 106f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

MAIER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, D G. *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.

MAKKAR, R. S. CAMEOTRA, S. S. Enhanced biosurfactant production by *Bacillus subtilis* at thermophilic conditions by foam fractionation. **Journal Surfactants Detergents**, v. 4, p. 355-357, 2001.

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

MAZZEO, D. E. C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero.** 2009. 144f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A., The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, p. 61-64, 1994.

MILLIOLI, V. S.; SÉRVULO, E. F. C.; SOBRAL, L. G. S.; CARVALHO D. D. **Biorremediação de solo contaminado com óleo cru: avaliação da adição de rhamnolipídio quanto à toxicidade e a eficiência de biodegradação.** 4º PDPETRO, Campinas, SP 6.2.387-1, 21-24 de Outubro, 2007.

MOHAN, P. K.; NAKHLA, G.; YANFUL, E. K. Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. **Water Research**, v. 40, p. 533-540, 2006.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-98, 2005.

MUTTI, A.; BERGAMASCHI, E. In: **Idrocarburi policicliciaromatici negli ambienti de vita e di lavoro: esposizione ed effetti**; Apostoli, P.; Minoia, C.; Alessio, L., Eds.; ATTI, Gargnano, p. 213, 1996.

NETTO, A. D.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; BAREK A. S. O. J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, 756-773, 2000.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. A. O.; CONTIERO, J. Structure and applications of a rhamnolipids surfactant produced in soybean oil waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 2066–2074, 2010.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L. A. G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 21, p.1562-1566, 2005.

RADIĆ, S.; STIPANIČ, D.; VUJČIČ, V.; RAJČIČ, M. M.; ŠRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 1228-1233, 2010.

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

ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; BOSH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v.1, p.871-874, 1989.

RON, E.; ROSENBER, G. E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnol**, v.13, p. 249-252, 2002.

SHIMABUKURO, R. H.; LAMOUREUX, G. I.; FREAR, D. S. **Pesticide metabolism in plants reactions and mechanisms**. In: Biodegradation Pesticide, Ed. Matsumura F.; C. R. K. Murti. Plenum Press, New York, pp. 21-66, 1982.

SOBREIRA, T. P. M. **Análise, sob o ponto de vista ambiental, do plano de contingências da Transpetro – Petrobrás transporte S.A., no porto de Paranaguá, Paraná**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2004.

STOHS, S. J.; OHIA, S.; BAGCHI, D. Naphtalene toxicity and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 180, p. 97-105, 2002.

UHL, M.; PLEWA, M.J.; MAJER, B.J.; KNASMÜLLER, S. **Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays**. In: MALUSZYNSKA, J.; PLEWA, M. (Org.). Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and human Health: a course manual. p. 11-30, 2003.

USEPA. US-Environmental Protection Agency. **Health effects assessment for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)**. EPA/549-1-86-013, Cincinnati, OH, 1984.

VANCE - HARROP, M. H.; DE GUSMAO, N. B.; DE CAMPOS-TAKAKI, G. M. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 120-123, 2003.

VELEMÍNSKÝ, J.; GICHNER, T. Mutagenic activity of promutagens in plants: indirect evidence of their activation. **Mutation Research**, v. 197, p. 221-42, 1988.

WANG, X.; LI, K.Q., ZHU, C.J., HAN, X.R., DENG, N.N., CHENG, H. Pollution condition of petroleum hydrocarbon pollutant and estimation of its environmental capacities in summer in the Bohai Sea. **Marine Science Bulletin**, v. 7, 21-29, 2005.

INFLUÊNCIA DO DISPERSANTE RAMNOLIPÍDIO NA INDUÇÃO DE ALTERAÇÕES CELULARES EM *Oreochromis niloticus*.

¹Fernandes; T. C. C.; ¹Mathias; M. I. C.; ²Lovaglio; R. B.; ³Salaroli, R. B.; ²Contiero, J.; Marin Morales¹, M. A.

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

²Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

³Departamento de Fitopatologia e Nematologia, Núcleo de Apoio a Pesquisa-NAP/MEPA, Universidade de São Paulo - ESALQ/USP, Piracicaba, SP/Brasil

RESUMO

O ramnolipídio é um biossurfactante da classe dos glicolipídios, produzido por diversas linhagens da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Devido a suas características físico-químicas, é um excelente tensoativo para ser aplicado em programas de biorremediação. Essa substância auxilia na descontaminação de ambientes poluídos por hidrocarbonetos, pois promove a dispersão desses poluentes em pequenas gotas, facilitando a sua retirada do ambiente e a sua degradação por microorganismos. Porém, os ramnolipídios podem interagir com os componentes da membrana celulares, promovendo alterações na sua permeabilidade seletiva, levando a conseqüentes comprometimentos citoplasmáticos. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial tóxico, genotóxico e mutagênico do biossurfactante ramnolipídio, produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* LBI, quando utilizado como agente biorremediador no processo de limpeza de águas superficiais contaminadas por petróleo, por meio de ensaios toxicológicos realizados com o organismo *Oreochromis niloticus*. Neste trabalho foram realizadas simulações de contaminação de petróleo biorremediadas com duas concentrações de ramnolipídio (1 g/L e 10 g/L), como segue: P (água + petróleo); PB1 (água + petróleo + biossurfactante 1 g/L); PB2 (água + petróleo + biossurfactante 10 g/L). Também foram realizados, nas mesmas condições, experimentos com água e biossurfactante 1 g/L (B1) e 10g/L (B2). Após a obtenção de amostras de água derivadas das simulações, foram realizadas, além de análises químicas, para avaliação de pH e da presença de HPAs, análises ecotoxicológicas (tóxicas, genotóxicas e mutagênicas) para a verificação dos efeitos deste composto sobre as estruturas celulares e sobre o DNA de *O. niloticus*. Nossos resultados mostraram que as concentrações testadas do ramnolipídio apresentam pequena atividade tóxica, observada pela indução da formação de vacúolos citoplasmáticos e retração nuclear. No entanto, as concentrações testadas não promoveram qualquer ação mutagênica ou genotóxica às células do organismo teste estudado.

Palavras-chave: biossurfactante, micronúcleo, ultraestrutura, ensaio do cometa, petróleo.

1. INTRODUÇÃO

O ambiente aquático vem recebendo impactos severos derivados de atividades antropogênicas, cujos xenobióticos podem apresentar, além de ação tóxica, propriedades mutagênicas. Dentre os compostos mais impactantes para o ambiente estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) que, por suas propriedades físico-químicas e distribuição ambiental, se caracterizam em um perigo iminente para os organismos vivos e, conseqüentemente, para a espécie humana.

Os efeitos nocivos dos HPAs são resultantes de diferentes biotransformações oxidativas que estes compostos sofrem nos organismos. Ahmad et al. (2006) afirmam que os metabólitos produzidos nas biotransformações tendem a reagir com o DNA, transformando-se em potentes substâncias mutagênicas e ou carcinogênicas. Segundo Albers (1995), mamíferos, aves, peixes e vários macroinvertebrados são capazes de metabolizar os hidrocarbonetos ingeridos e, portanto, estão expostos à ação de seus produtos de transformação. Muitos estudos realizados em ambientes aquáticos impactados com HPAs, como, por exemplo, em locais de vazamento de óleo, confirmaram a genotoxicidade dos metabólitos dos HPAs, para diversas espécies aquáticas (GRAVATO e SANTOS, 2003; BROWN e STEINERT, 2003; TELES et al., 2003; FRENZILLI et al., 2004).

Os surfactantes são compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais (DESAI e BANAT, 1997), sendo muito utilizados na indústria de petróleo. A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente, levaram à procura por surfactantes naturais como alternativas aos produtos existentes. Muitos compostos com propriedades tenso-ativas são sintetizados por vários organismos vivos, como plantas (saponinas), microrganismos (glicolipídios) e até mesmo o homem (sais biliares), sendo considerados surfactantes naturais (BOGNOLO, 1999).

Os compostos de origem microbiana, que exibem propriedades surfactantes, são denominados de biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. (CAMEOTRA E MAKKAR, 1998). Os biossurfactantes apresentam seu maior potencial de aplicação na biorremediação de contaminantes ambientais lipofílicos, especificamente na limpeza de derramamentos de petróleo

(MULLIGAN, 2009; KRIEGER et al., 2010). Essas substâncias auxiliam na descontaminação de ambientes poluídos por resíduos de hidrocarbonetos, por meio da dispersão desses em pequenas gotas, facilitando sua retirada do ambiente e a sua degradação por microorganismos (BANAT, 1995; BOGNOLO, 1999; BANAT et al., 2000; MAIER e SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; MAKKAR e CAMEOTRA, 2001; MULLIGAN, 2005).

Muitos testes biológicos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de estimar as reações dos organismos vivos à contaminação ambiental, além de possibilitar a avaliação de efeitos sinérgicos de vários poluentes presentes no ambiente (ROOS et al., 2004; FERETTI et al., 2008).

A avaliação de alterações na morfologia da célula ou em seus componentes estruturais pode trazer informações importantes quanto à ação tóxica de poluentes. O teste do micronúcleo e o ensaio do cometa são importantes ferramentas utilizadas para avaliar danos no material genético de organismos expostos a substâncias químicas com potencialidade genotóxica e mutagênica, sendo esses testes aplicados, com sucesso, em espécies peixes (CARITÁ, 2010).

Muitas espécies de peixes são usadas como sentinelas em avaliações da qualidade da água, por fornecerem diversos parâmetros indicativos dos efeitos biológicos dos poluentes (RAMSDORF, 2007; RIVERO et al., 2008). A espécie *Oreochromis niloticus*, popularmente conhecida como tilápia do Nilo, é um peixe muito utilizado em monitoramento ambiental, por vários autores (AL-SABTI e METCALFE, 1995, GRISÓLIA e CORDEIRO, 2000; BOMBAIL et al. 2001; GRISÓLIA et al., 2005; SOUZA e FONTANETTI, 2006), por responder rapidamente a ação de agentes promotores de danos biológicos.

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial tóxico, genotóxico e mutagênico do biosurfactante ramnolipídio produzido a partir da linhagem LBI da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, quando utilizado como agente biorremediador no processo de limpeza de águas superficiais contaminadas por petróleo, por meio de ensaios ecotoxicológicos realizados com o organismo teste *Oreochromis niloticus*.

2. MATERIAI E MÉTODOS

2.1. Produção do biosurfactante ramnolípido

Foi avaliado neste trabalho um biossurfactante conhecido como ramnolipídio, cuja estrutura química é de um glicolípídios constituído de ácidos graxos ligados a moléculas de ramnose (Figura 1) (NITSCHKE et al., 2005).

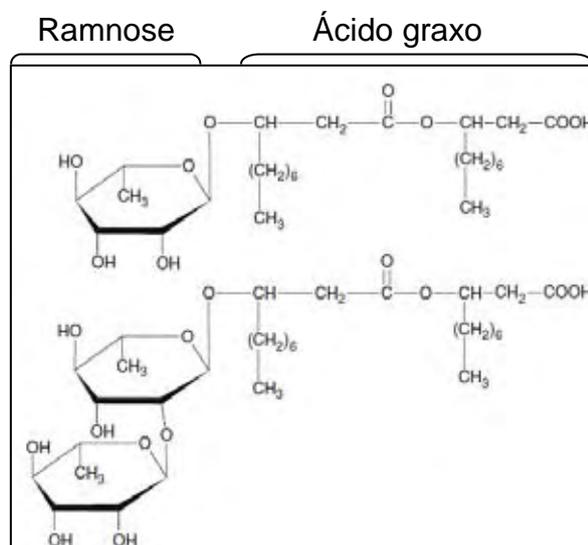


Figura 1. Estrutura química do biossurfactante ramnolipídio.

O ramnolipídio utilizado foi obtido a partir da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, linhagem LBI, isolada de solo contaminado por petróleo (BENINCASA et al., 2002), sendo mantida em agar nutriente, em tubos criogênicos a -20°C.

Para o preparo do pré-inóculo, o microrganismo foi semeado em meio inclinado, permanecendo neste ambiente por 24 horas à 30°C. Em seguida, para a obtenção de uma suspensão microbiana, foi adicionado ao meio 3 mL de água destilada estéril. Esta suspensão foi padronizada a 610 nm, densidade óptica de $0,65 \pm 0,01$ (aprox. 10^8 CFU/ml). Posteriormente, foram transferidos 4 mL desta solução para frascos de Erlenmeyer, contendo 200 mL de meio mineral (ROBERT et al., 1989). Foi acrescido nestes frascos, como única fonte de carbono do meio, 4 mL de óleo de soja. O frasco com este inóculo permaneceu por 24 horas em shaker a 200 rpm e 30°C.

A produção de ramnolipídios foi feita em frascos de Erlenmeyer (volume de 1 L), contendo 300 mL de meio mineral, 6 mL do inóculo e 6 mL de óleo de soja. Os frascos foram incubados em shaker à 30°C, 200 rpm por um período de 120 horas. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,8. Para realização da extração dos ramnolipídios, o caldo com o produto (biossurfactante) foi centrifugado a 12.000 rpm, durante 20 minutos. O sobrenadante foi separado e acidificado com H₂SO₄ 6M para

pH 2,0, sendo adicionado, a seguir um volume, equivalente ao do caldo, de clorofórmio/metanol (2:1). A mistura foi vigorosamente agitada por 10 minutos e, em seguida, mantida em repouso até a completa separação das fases. A fase orgânica foi removida e a operação se repetiu com a fase aquosa. Para a concentração do produto, foi utilizado o rotavapor, que promoveu a evaporação dos solventes.

Para a determinação da tensão superficial do ramnolipídio produzido, foi seguido o método do anel de De Nöuy, utilizando tensiômetro Krüss K6. Neste processo, foi utilizada uma concentração de 1g/L de ramnolipídio, considerada padrão para este produto (COSTA et al., 2006; COSTA et al., 2009 e NITSCHKE et al., 2010). A tensão interfacial do ramnolipídio foi obtida a partir de uma solução contendo 1 g/L do biossurfactante e n-hexadecano, na proporção de 1:1 (10 mL da concentração do biossurfactante e 10 mL de n-hexadecano), utilizando para esta avaliação o tensiômetro Krüss K6. As análises foram realizadas em triplicata.

2.2. Avaliação Ecotoxicológicas

Para a avaliação das atividades tóxicas, genotóxicas e mutagênicas do biossurfactante, quando utilizado como agente biorremediador de águas contaminadas com petróleo, foram realizadas simulações de derrame de óleo cru pesado (proveniente da Bacia de Campos/RJ - Brasil) em água doce. Todas as simulações foram realizadas em recipientes cilíndricos montados com tubos de PVC (Poli Cloreto de Vinila) de 1,20 m de comprimento e 150 mm de diâmetro (Figura 2). Estes recipientes receberam um volume equivalente a 20L de água do tanque de criação de peixes e 5 mL de petróleo, criando, assim, uma pluma de óleo de, aproximadamente, 0,2mm ou 200µm de espessura. Uma bomba de circulação, com uma vazão de aproximadamente 480 L/h, foi colocada na base dos tubos, com o intuito de simular a movimentação de um corpo d'água.

Foram simuladas, nestes tubos, as seguintes situações: derrame de petróleo (água + petróleo = P); derrame de petróleo biorremediado com biossurfactante ramnolipídio na concentração de 1g/L (água + petróleo + biossurfactante 1 = PB1); derrame de petróleo biorremediado com biossurfactante ramnolipídio na concentração 10g/L (água + petróleo + biossurfactante 2 = PB2). A proporção de biossurfactante utilizado nas misturas foi de 5% do total de óleo derramado (conforme resolução CONAMA 269, para surfactante sintético). Foram realizados, nas mesmas condições, experimentos com água e biossurfactante (água +

biossurfactante 1g/L = B1; água + biossurfactante 10g/L = B2). O Controle negativo foi feito com água do tanque de criação de peixes.

Os tubos utilizados nas simulações foram fechados com papel alumínio e expostos a ambiente natural externo, por 16 horas. Esse procedimento foi realizado para garantir a incorporação dos hidrocarbonetos hidrossolúveis à água dos experimentos. Em seguida, os tubos foram expostos a luz solar intensa, por 6 horas, para que os produtos de degradação também fossem incorporados ao solvente.

Posteriormente, foram coletadas, por diferença de densidade, todas as amostras de águas contendo as frações solúveis do petróleo (PB1, PB2 e P) e as amostras de B1, B2 e CN. Com as amostras de água coletadas, foram realizadas os ensaios ecotoxicológicos, as análises qualitativa e quantitativa dos HPA e mensurado o pH de cada uma destas amostras. A análise dos hidrocarbonetos foi realizada pela empresa Analytical Technology Serviços Analíticos e Ambientais Ltda, por meio de cromatografia gasosa (cromatógrafo Thermo, modelo Focus) acoplado a um espectrômetro de massas (Thermo, modelo DSQ). A coluna utilizada para a análise foi VB-5, 30m x 0,25mm x 0,25 μ m. A empresa seguiu as normas de análise estabelecidas pela USEPA 8270D.

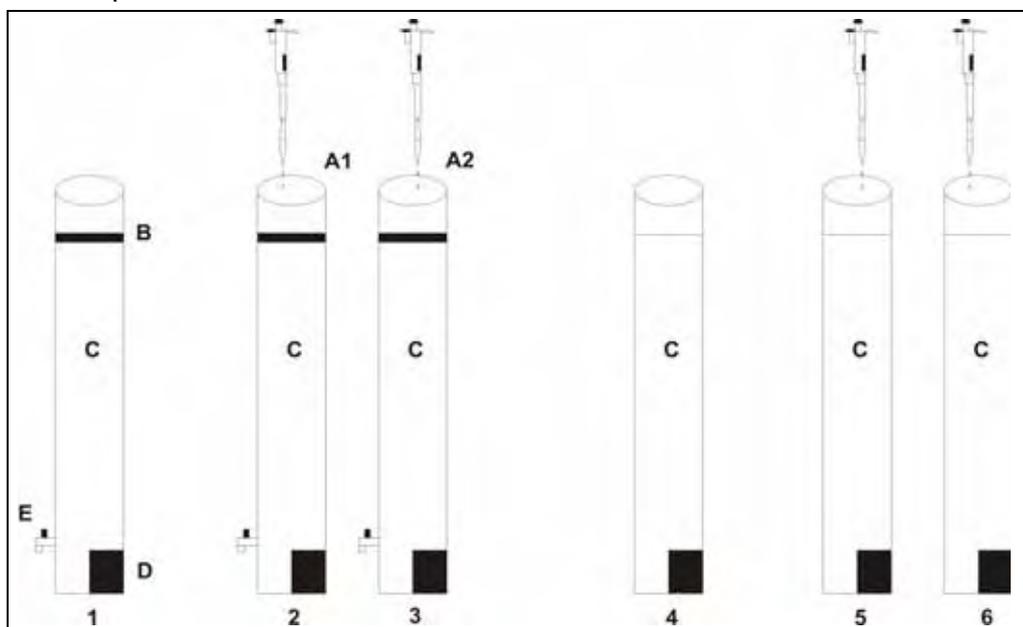


Figura 2. Esquema ilustrativo do experimento **1.** Água + Petróleo (P); **2.** Água + petróleo + biossurfactante 1 g/L (PB1); **3.** Água + petróleo + biossurfactante 10 g/L (PB2); **4.** Água coletada nos tanques de criação de peixe (CA) **5.** Água + biossurfactante 1 g/L (B1); **6.** Água + biossurfactante 10 g/L (B2); **A1 e A2.** Adição nas amostras, por meio de gotejamento realizado com micropipeta, de 0,25 mL de biossurfactante, na concentração 1 g/L (A1) e 2 g/L (A2); **B.** Representação da pluma de óleo (200 μ m); **C.** 20 L de água obtida nos tanques de criação de peixes, que são abastecidos com água de poço artesiano; **D.** Bomba de circulação de água; **E.** Torneira para promover a vazão para coleta da amostra que contém a fração solúvel do petróleo.

Para a avaliação do potencial tóxico, genotóxico e mutagênico das amostras P, PB1, PB2, B1 e B2, foi utilizado o organismo teste *Oreochromis niloticus* (Periformes, Cichlidae), popularmente conhecido como tilápia do Nilo. Os peixes foram obtidos no tanque de criação da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus de Rio Claro-SP, que são mantidos com água de poço artesiano e sistema de aeração e filtragem.

Para a realização dos testes, os espécimes foram transferidos do tanque de criação para aquários com capacidade de 50 L, onde foram aclimatados por 7 dias, sob aeração e à temperatura de 23°C. Após o período de aclimação, foram montados em aquários com capacidade de 50 L 7 grupos experimentais (P, PB1, PB2, B1 e B2, CN e controle positivo-CP), onde, para cada tratamento, foram expostos 6 exemplares, por um período de 96h. Todos os indivíduos, antes de serem tratados, foram pesados (média – 15 g) e medidos (média–10 cm). O controle positivo foi realizado injetando, intraperitonealmente, em cada espécime, 3 mL de ciclofosfamida/50 g de massa corpórea (concentração de 0,04 mg/g). Após 96h de exposição aos tratamentos, foram coletadas amostras de sangue de todos os indivíduos, por meio de punção cardíaca, utilizando, para este procedimento, seringas previamente heparinizadas. Após a coleta das amostras de sangue, os animais foram sacrificados por rompimento medular e retirado os arcos branquiais, para o preparo da suspensão de células branquiais.

2.1. Ensaio do cometa com sangue periférico

O ensaio foi realizado segundo metodologia descrita por Singh et al. (1988), com algumas modificações. Foram coletadas, por punção cardíaca, amostras de sangue (3 µL) de todos os peixes expostos. O sangue foi diluído em 1000 µL de solução fisiológica de vertebrados. Posteriormente, 10 µL desta suspensão celular foram adicionados a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C e gotejado sobre uma lâmina previamente preparada com uma fina camada de agarose de ponto de fusão a 60°C. As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas por 20 minutos a 5°C. As lamínulas foram retiradas e as lâminas foram incubadas em uma solução de lise (1 mL triton X-100, 10mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 - solução de lise estoque: NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10mM, ~ 8,0 g de NaOH sólido para 1 L), em temperatura de

aproximadamente 5°C, por, no mínimo, uma hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese, contendo tampão (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, pH 12,1) à 5°C, onde permaneceram por 20 minutos, para que houvesse o relaxamento do DNA. Na seqüência, foi realizada a eletroforese em corrente de 49V e 300 mA por 20 minutos. Após a corrida, as lâminas foram neutralizadas em tampão (Tris 0,4 M-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, secas a temperatura ambiente e fixadas em etanol 100% por dez minutos. A coloração foi feita no momento da análise com brometo de etídeo (0,02 mg/mL).

Foram analisados, aleatoriamente, em microscópio de fluorescência (Epifluorescência Leica, filtro B – 34: excitação 1 = 420 n – 490 n, barreira: I = 520 nM, objetiva de 40X), 100 nucleóides de cada indivíduos exposto. Os nucleóides foram classificados visualmente, segundo a classificação de Kobayashi et al. (1995), de acordo com a migração dos fragmentos, em: classe 0 (ausência de dano visível), classe 1 (pequeno dano), classe 2 (médio dano) e classe 3 (grande). Os escores de cada tratamento foram verificados e submetidos ao teste estatístico não-paramétrico de kruskal-Wallis, para comparação dos resultados entre os tratamentos e o controle negativo, bem como dos tratamentos entre si.

2.2. Teste do micronúcleo com eritrócitos circulantes

Para o ensaio do micronúcleo, amostras de sangue coletadas dos indivíduos tratados foram utilizadas para a preparação das lâminas, pelo método do esfregaço (extensões sanguíneas), sendo descartada a primeira gota da seringa, para evitar a contaminação do material. As lâminas foram fixadas em etanol 100%, por dez minutos, e, depois de 24h, submetidas à hidrólise ácida em HCl 1 N a 60°C, por 11 minutos. Imediatamente após a hidrólise, as lâminas foram submetidas ao reativo de Schiff, por duas horas. Após a coloração, foi analisado um total de 6000 eritrócitos por tratamento, sendo 1000 células por indivíduo, nas quais foi quantificada a freqüência de eritrócitos portadores de micronúcleos. Os resultados obtidos foram comparados com o controle negativo e analisados, estatisticamente, pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

2.3. Ensaio do cometa com células de brânquias

Transcorridas às 96h de exposição dos peixes aos tratamentos e após a retirada do sangue periférico, as brânquias foram removidas dos exemplares. Os filamentos branquiais foram separados e limpos em solução salina, com o auxílio de um pincel, para a retirada da maior quantidade possível de sangue extravasado durante o processo de retirada das mesmas. Em seguida, o arco branquial foi cortado e descartado. Os filamentos branquiais foram então armazenados em 700µL de solução salina de peixe e mantidos em gelo, até o momento da preparação da suspensão celular. A metodologia foi baseada no protocolo descrito por Kilemade et al. (2004). Para o preparo da suspensão, os filamentos foram picotados com o auxílio de uma lâmina metálica e o macerado resultante foi colocado em um tubo de microcentrífuga. Para dissociação das células, foram adicionados ao macerado 200 µL de tripsina a 0,25% (0,125 g de tripsina em pó + 50 mL de solução salina + 0,5 mL de EDTA 0,5M), seguido de homogeneização manual por inversão periódica. Após 15 minutos, foram acrescentados ao mesmo tubo 200 µL de soro bovino fetal, sendo este preparado novamente homogeneizado. Transcorridos 15 minutos, o homogeneizado foi coletado, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e filtrado, para a obtenção da suspensão celular branquial. Posteriormente, 15 µL desta suspensão celular foram adicionados a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C e gotejado sobre uma lâmina previamente preparada, contendo uma fina camada de agarose de ponto de fusão a 60°C. As lâminas foram cobertas com lamínula e mantidas por 20 minutos a 5°C, para solidificação da agarose. As lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em uma solução de lise (1 mL triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 - solução de lise estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100 mM, Tris 10mM, ~8,0 g de NaOH sólido para 1L), em temperatura de aproximadamente 5°C, por, no mínimo, uma hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese, contendo tampão (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, pH 12,1) à 5°C, onde permaneceram por 30 minutos, para que houvesse o relaxamento do DNA. Na seqüência, foi realizada a eletroforese em corrente de 49 V e 300 mA por 20 minutos. Após a corrida de eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em tampão (Tris 0,4M-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, secas a temperatura ambiente e fixadas em etanol 100% por dez

minutos. A coloração foi feita no momento da análise com brometo de etídeo (0,02mg/mL).

Foram analisados, aleatoriamente, em microscópio de fluorescência (Epifluorescência Leica, filtro B – 34: excitação 1=420n - 490n, barreira: l=520nM, objetiva de 40X), 50 nucleóides de cada indivíduos exposto. Os nucleóides foram classificados visualmente, segundo a classificação de Kobayashi et al. (1995), de acordo com a migração dos fragmentos, em: classe 0 (ausência de dano visível), classe 1 (pequeno dano de), classe 2 (médio dano) e classe 3 (grande dano). Os escores de cada tratamento foram verificados e submetidos ao teste estatístico não-paramétrico de kruskal-Wallis, para comparação dos resultados entre os tratamentos e o controle negativo, bem como dos tratamentos entre si.

2.4. Alterações ultraestruturais em eritrócitos circulantes

Para a análise de alterações ultraestruturais, das células eritrocitárias dos indivíduos expostos às amostras P, PB1, PB2, B1 e B2, foi adotado o protocolo descrito por Rey-Vásquez e Guerreiro (2007), com algumas modificações.

Amostras de sangue de 5 exemplares, de cada um dos tratamentos (cerca de 1mL de cada exemplar), foram coletadas por punção cardíaca e submetidas a centrifugação (400G, 10 min, 4°C), para a obtenção dos pellets. Posteriormente, o material foi fixado em glutaraldeído 3% em 0,1M de tampão fosfato e acondicionado em Agar 2% (para evitar perda de material durante o processamento), pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% em 0,1M de tampão fosfato (pH 7,4) por 2h. Subseqüentemente, o material foi lavado em água destilada, desidratado em séries de álcool (80, 90, 95 e 100%) e acetona (50 e 100%), por 15 minutos em cada uma das concentrações, e embebido em resina Spurr. O material foi colocado em estufa à 60°C por um período de 48 horas. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados em ultramicrótomo. As secções foram feitas com 70 nm de espessura, coletadas em grades de cobre, para passar por contraste com acetato de uranila e citrato de chumbo por 15 minutos cada. As grades foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão PHILIPS 100 TEM, onde também foram feitas as documentações fotográficas.

3. RESULTADOS

A avaliação das propriedades tensoativas da solução de 0,1% (1g/L) de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI mostrou que a média da tensão superficial foi de $24.9 \pm 0,06$ Mn/m e da tensão interfacial $0,63 \pm 0,06$ Mn/m.

Quanto a análise de pH realizadas com todas as amostras estudadas verificamos que não houve grande variação estatisticamente significativa (Figura 4). Esta avaliação foi feita para se estimar a possibilidade das substâncias testadas (petróleo e biossurfactante) alterarem o pH da água usada no preparo da simulações.

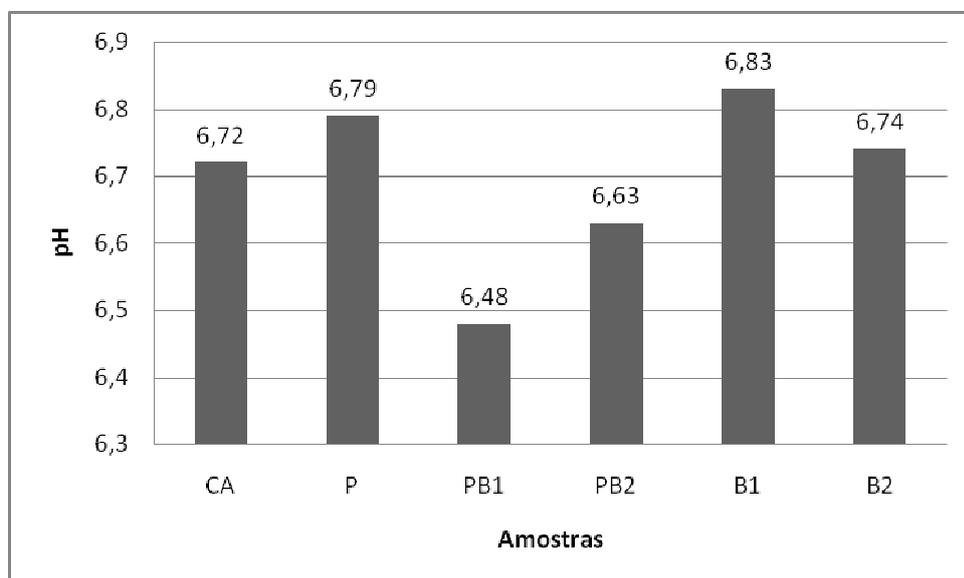


Figura 4. Variação de pH observada nas amostras das simulações estudadas.

Foram realizadas análises qualitativa e quantitativa dos HPAs presentes nas amostras de águas dos ensaios realizados neste trabalho, segundo recomendação da USEPA (1984) (Tabela 1).

Foi avaliado o potencial tóxico das amostras, por meio de análise de alterações da morfologia de eritrócitos circulantes, sob microscopia eletrônica de transmissão. Nossos resultados mostraram que a amostra P foi capaz de induzir tanto a formação de vacúolos no citoplasma como micronúcleos, além de promover a condensação da cromatina, com conseqüente retração nuclear e fragmentação do núcleo. A amostra PB1 induziu a formação de células binucleadas e alterações na forma do núcleo celular, como, por exemplo, a sua constrição, alteração esta provavelmente precedente ao aparecimento de célula binucleada. Na amostra PB2,

foram observadas alterações como retração nuclear, heterocromatinização e presença de vacúolos com diâmetro maior que os observados nas amostras anteriores (P e PB1). A simulação B1 mostrou um potencial de induzir vacúolos de diferentes tamanhos e em grande quantidade, além de micronúcleos grandes. B2 induziu vacúolos grandes e retração do núcleo (Figura 5).

Para avaliar o potencial mutagênico das amostras estudadas, foi utilizado o teste de micronúcleo em eritrócitos circulantes de *O. niloticus*. A figura 6 representa os resultados obtidos neste teste, onde foi observado que as águas contaminadas com petróleo (P) induziram freqüências estatisticamente significativas de micronúcleos, em relação ao controle negativo, enquanto que as amostras biorremediadas não.

Tabela 1. Análise quantitativa e qualitativa da presença de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) nas duas simulações realizadas com petróleo e/ou biossurfactante.

COMPOSTO	PCP		CN		P						PB1		PB2		LD (µg/L)	LQ		
	CONCENTRAÇÃO (µg/L)																	
	Amostra Única	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1			Amostra 2											
Naftaleno	837309,00	1,28	0,368	4,01	12	4,41	12,2	4,48	12,6	0,05	0,15							
Acenaftileno	46826,00	ND	ND	ND	ND	ND	0,092	ND	0,084	0,05	0,15							
Acenafteno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,073	ND	0,058	0,05	0,15							
Fluoreno	198241,50	ND	ND	0,58	0,371	1,14	0,491	1,2	0,432	0,05	0,15							
Fenantreno	770695,00	ND	ND	2,57	0,749	5,85	1,12	0,76	0,852	0,05	0,15							
Antraceno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15							
Fluoranteno	31457,50	ND	0,05	0,15														
Pireno	91092,00	ND	ND	ND	ND	ND	0,050	ND	ND	0,05	0,15							
Benzo(a)antraceno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15							
Criseno	37356,50	ND	0,05	0,15														
Benzo(b)fluoranteno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15							
Benzo(k)fluoranteno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15							
Benzo(a)pireno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15							
Indeno(1,2,3-cd)pireno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15							
Dibenz(a,h)antraceno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15							
Benzo(g,h,i)perileno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15							

PCP. Petróleo cru pesado; **CN.** Controle negativo; **P.** Petróleo + água; **PB1.** Água + petróleo + biossurfactante 1g/L; **PB2.** Água + petróleo + biossurfactante 10 g/L; **ND.** Não detectado; **LD.** Limite de detecção; **LQ.** Limite de quantificação.

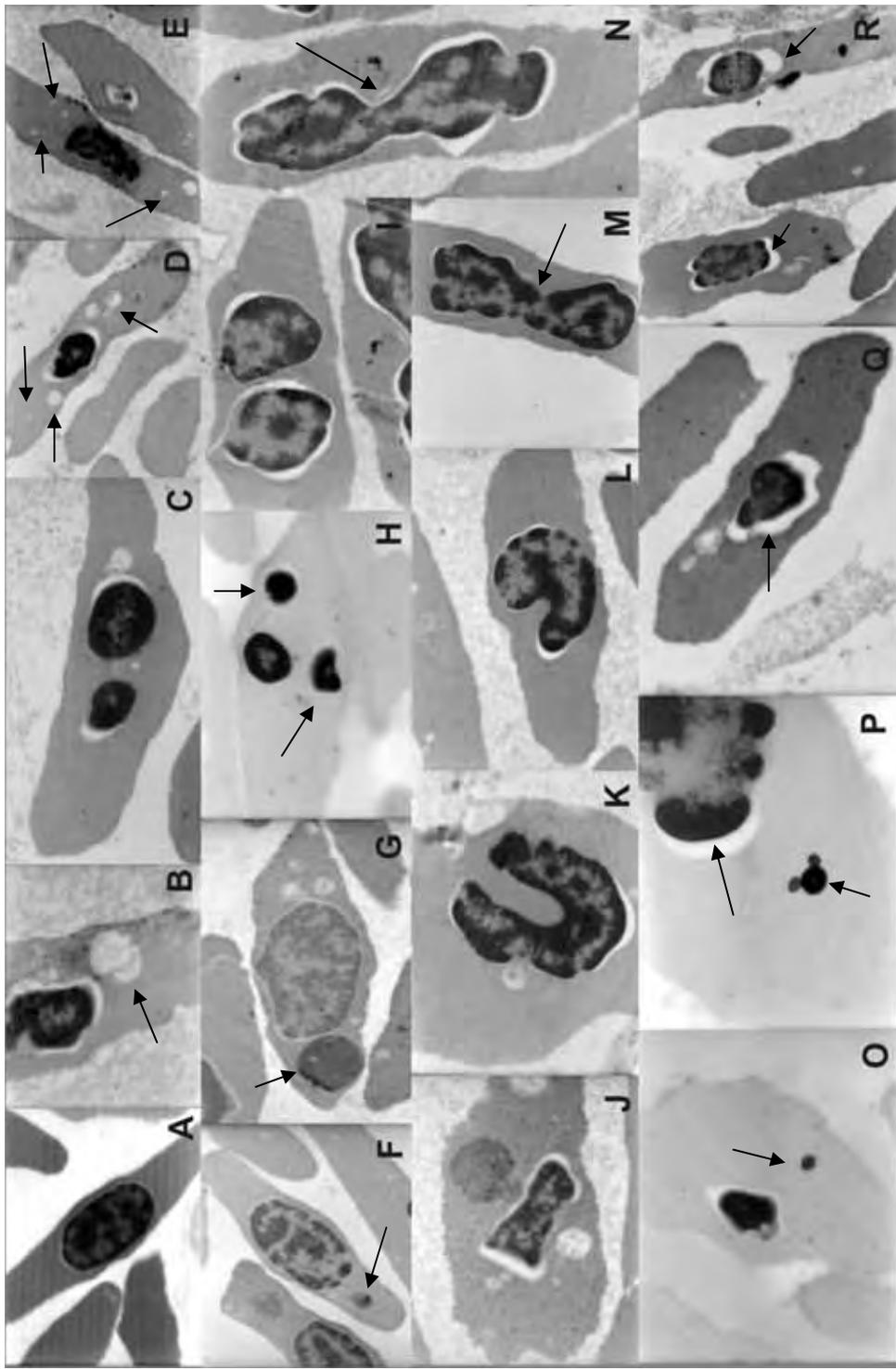


Figura 5. Alterações morfológicas observadas em eritrócitos circulantes de *Oreochromis niloticus*, após exposição dos indivíduos às amostras obtidas das simulações. **A.** eritrócito normal (CN); **B.** Vacúolo citoplasmático de grande diâmetro (amostra B2); **C.** Pequenos vacúolos citoplasmáticos (amostras P, PB1 e PB2). **D.** Vacúolos pequenos em diâmetro e em maior número no citoplasma (amostra PB1); **E.** Vacúolos em grande quantidade e de diferentes diâmetros (amostras PB1, PB2, B1 e B2); **F.** Eritrócito micronucleado (amostra P); **G.** Célula com micronúcleo de grande diâmetro (amostra PB2); **H.** Eritrócito com fragmentação nuclear (amostra P); **I.** Célula binucleada (amostras PB1 e PB2); **J.** Eritrócito com alteração na morfologia do núcleo (amostras PB2 e B2); **K** e **L.** Eritrócitos exibindo núcleo em ferradura (amostras PB2 e B2); **M** e **N.** Eritrócitos com constrição nuclear (amostras PB1 e PB2); **O** e **P.** Eritrócitos com núcleos heteropícnóticos se fragmentando (amostra P); **Q** e **R.** Eritrócitos com retração nuclear (amostra P).

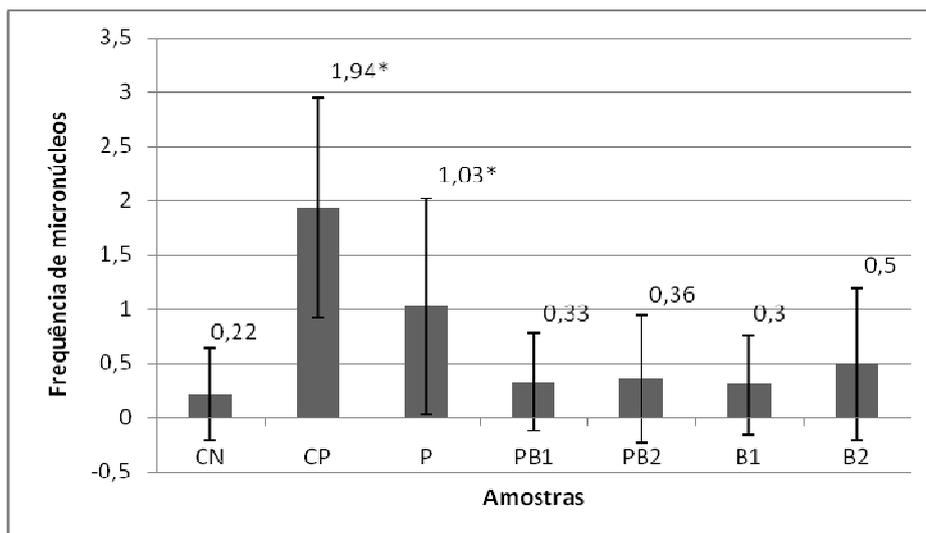


Figura 6. Frequência de micronúcleo induzida em eritrócitos circulantes de *O. niloticus* exposto às amostras de água contaminadas com petróleo (P); biorremediadas com biossurfactante (PB1 e PB2); e somente com o biossurfactante nas concentrações 1 e 10 g/l (B1 e B2, respectivamente).

O potencial genotóxico de P, PB1, PB2, B1 e B2 foi avaliado por meio do ensaio do cometa, realizado em dois tipos celulares (sangue periférico e células branquiais) do organismo teste *O. niloticus*, após 96h de exposição dos peixes às amostras. Os danos no DNA foram evidenciados pelo comprimento e distribuição dos fragmentos arrastados durante eletroforese.

Na tabela 3 estão representados os dados referentes ao ensaio do cometa, realizado com sangue periférico. Nossos resultados mostraram que a amostra P promoveu danos significativos ao DNA, identificado pelo alto valor do escore obtido. Avaliações realizadas com células de brânquia mostram que além da amostra P, as amostras PB1 e PB2 também apresentaram potencial genotóxico (tabela 4). A figura 7 traz os resultados comparativos de genotoxicidade das amostras estudadas, feitas entre os valores dos escores obtidos com células de branquias e sangue periférico.

Tabela 3 . Classificação de danos promovidos no DNA de células de sangue periférico de *Oreochromis niloticus* expostos por 96h às amostras estudadas.

Amostras	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore
CN	79	15	5	1	28
	85	11	3	1	20
	77	13	7	3	36
	80	16	3	3	31
	87	9	2	2	19
	91	5	2	2	15
Média/DP	83,17±5,38	11,5±4,08	3,67±1,97	2±0,89	24,83±8,08
CP	13	27	32	28	175
	8	26	37	29	187
	17	20	27	36	182
	13	19	17	51	206
	21	17	29	33	174
	9	27	35	29	174
Média/DP	13,5±4,88	22,67±4,5	29,5±7,15	34,33±8,71	183±12,42*
P	38	25	13	24	123
	43	10	23	24	128
	42	27	13	18	107
	39	26	10	25	121
	42	15	21	22	123
	43	13	19	25	116
Média/DP	41,17±2,14	19,33±7,5	16,5±5,2	23±2,68	119,67±7,31*
PB1	80	17	2	1	24
	91	8	0	1	11
	88	9	2	1	16
	83	11	3	3	26
	79	18	1	2	26
	81	12	4	3	29
Média/DP	83,67±4,8	12,5±4,13	2±1,41	1,83±0,98	22±6,95
PB2	86	8	4	2	22
	83	11	2	4	27
	76	11	5	5	25
	87	12	0	1	15
	79	9	8	4	37
	77	12	6	5	39
Média/DP	81,33±4,67	10,5±1,64	4,17±2,85	3,5±1,64	27,5±9,11
B1	78	17	0	5	23
	87	7	5	1	20
	81	11	5	3	30
	85	10	3	2	26
	80	10	9	1	31
	82	11	6	3	32
Média/DP	82,17±3,31	11±3,28	4,67±3,01	2,5±1,51	27±4,81
B2	83	14	2	1	21
	76	18	5	1	31
	79	13	5	3	32
	80	16	2	2	26
	85	9	3	3	24
	79	15	4	2	29
Média/DP	80,33±3,2	14,17±3,06	3,5±1,37	2±0,89	27,17±4,26

CN. Controle negativo; P. Petróleo+água; PB1. Água + petróleo + biossurfactante 1g/L; PB2. Água + petróleo + biossurfactante 10g/L; B1. Biossurfactante 1g/L + água; B2. Biossurfactante 10g/L + água; DP. Desvio padrão; * p<0,05.

Tabela 4. Classificação de danos promovidos no DNA de células de brânquia de *Oreochromis niloticus* expostos por 96h às amostras estudadas.

Amostras	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Score
CN	33	10	5	2	26
	41	7	2	0	11
	37	9	3	1	18
	27	12	8	3	37
	32	8	7	3	36
	31	12	5	2	28
Média/DP	33,5±4,88	9,66±2,06	5±2,28	1,83±1,17	26±10,14
CP	8	10	15	17	86
	6	15	20	18	100
	6	12	12	20	96
	4	10	22	14	96
	10	6	14	20	94
	5	7	10	28	111
Média/DP	6,5±2,17	10±3,28	15,5±4,63	19,5±4,72	97,17±8,21*
P	8	12	15	15	87
	6	12	13	19	95
	5	8	15	22	104
	5	11	16	18	97
	10	9	14	17	88
	6	13	11	20	85
Média/DP	6,66±1,96	10,83±1,94	14±1,79	18,5±2,43	92,66±7,28*
PB1	10	11	17	12	78
	12	9	16	13	80
	8	7	11	24	101
	8	7	13	22	89
	11	5	10	24	87
	11	10	8	21	89
Média/DP	10±1,67	8,17±2,23	12,5±3,51	19,33±5,43	87,33±8,16*
PB2	6	8	18	18	98
	10	8	14	18	99
	4	13	16	17	97
	8	12	13	17	89
	7	8	13	22	100
	6	17	10	17	88
Média/DP	6,83±2,04	11±3,68	14±2,75	18,17±1,94	95,17±5,27*
B1	39	8	2	1	15
	41	4	3	2	16
	38	5	5	2	21
	33	9	8	0	25
	40	6	3	1	15
	44	5	0	1	8
Média/DP	39,17±3,65	6,17±1,94	3,5±2,74	1,17±0,75	16,67±5,82
B2	30	10	5	5	35
	31	8	6	5	35
	42	5	2	1	12
	35	7	6	2	25
	37	6	5	1	19
	39	8	3	0	22
Média/DP	35,67±4,63	7,33±1,75	4,5±1,64	2,33±2,16	24,7±9,09

CN. Controle negativo; P. Petróleo + água; PB1. Água + petróleo + biossurfactante 1g/L; PB2. Água + petróleo + biossurfactante 10g/L; B1. Biossurfactante 1g/L + água; B2. Biossurfactante 10g/L + água; DP. Desvio padrão; * p<0,05.

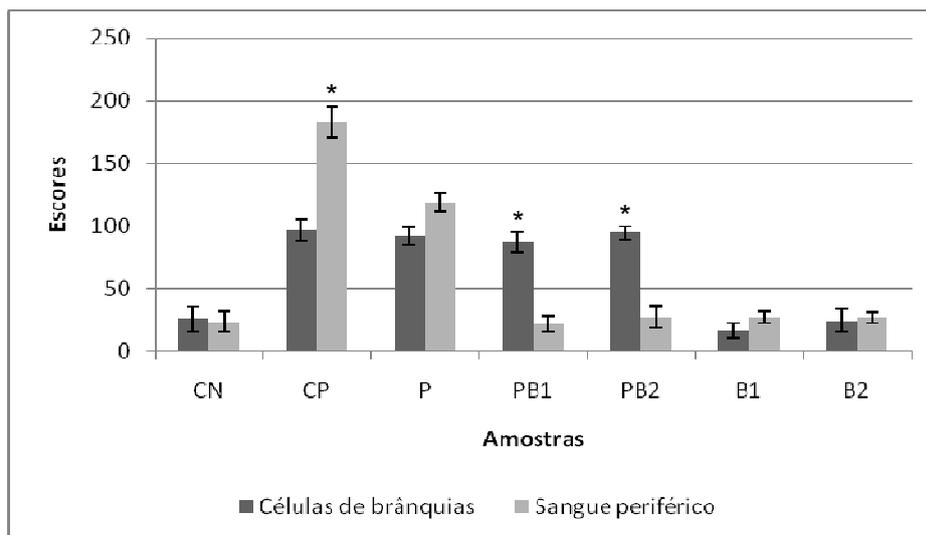


Figura 7. Comparação das médias dos escores obtidos no ensaio do cometa, realizado com células branquiais e células de sangue periférico.

4. DISCUSSÃO

Toneladas de petróleo bruto e óleo refinado entram no ambiente a cada ano como resultado de ação antropogênica e, para reduzir os impactos causados por esta contaminação, têm sido aplicadas várias estratégias de remediação, dentre elas o uso de surfactantes. Uma estratégia aparentemente promissora na descontaminação de derivados de petróleo é a aplicação de surfactante obtidos por meio de microrganismos, substâncias estas denominadas de biossurfactantes. Segundo Nitschke e Pastore (2002), o maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde, dentre muitas aplicações, incluem-se a biorremediação e a dispersão de óleos presentes em águas ou solo contaminados por óleo e seus derivados.

O biossurfactante ramnolipídios vem sendo estudado, principalmente, quanto à sua possibilidade de uso em processos de biodegradação de compostos orgânicos (MULLIGAN et al., 2005 e 2009). Porém, segundo Hingley et al. (1986), é necessário uma atenção especial para efeitos que estes compostos possam ter sobre os organismos expostos, devido ao seu reconhecido potencial de alterar as propriedades da superfície celular.

Segundo Mercadé e Manresa (1994), para que uma molécula seja considerada um bom agente surfactante, ela deve reduzir a tensão superficial da

água de 72 mN/m para valores menores de 30 mN/m e a tensão interfacial para valores em torno de 1,0 mN/m.

O ramnolípido utilizado em nosso estudo foi obtido de cultura da cepa *Pseudomonas aeruginosa* LBI. O produto apresentou excelentes propriedades tensoativas, considerado indicado para ser aplicado em processos de biorremediação e dispersão de poluentes, uma vez que nossos resultados mostraram que a concentração de 1g/L de ramnolípido foi capaz de promover uma diminuição da tensão superficial da água para 24,9 mN/m e da interfacial contra n-hexadecano de 41,8 para 0,63 mN/m.

A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos naturais dá-se diretamente devido a seus efeitos sobre a fisiologia das diversas espécies da biota local. Também é muito importante estimar os efeitos indiretos do pH, pois é sabido que determinadas condições de pH podem contribuir para a precipitação de elementos químicos tóxicos ou ainda alterar a solubilidade de nutrientes (CETESB, 2010).

Segundo Lovaglio (2007), valores de pH entre 5-10 não interferem nas propriedades do biossurfactante ramnolípido. No entanto, um pH menor que 5 pode promover a precipitação do biossurfactante e o aumento da tensão superficial, o que ocasionaria uma diminuição na eficiência da substância em processos de biorremediação. Nossos resultados mostraram que as amostras de água contaminada com petróleo (P) não tiveram seu pH alterado pelo óleo, não havendo, assim, o comprometimento na formação de micelas, uma vez que o valor de pH obtido foi próximo da neutralidade (6,8). Nossos resultados também indicaram que as amostras preparadas com água e biossurfactante (B1 e B2) não tiveram o pH alterado, quando comparado com o CN.

Dos 16 HPAs indicados como prioritários para avaliação de amostras ambientais pela USEPA (1984), apenas seis deles foram encontrados nas nossas amostras. Foram identificados os HPAs naftaleno, fluoreno e fenantreno em P, PB1 e PB2, em ambas as simulações realizadas. O acenafteno e o acenaftileno foram identificados em PB1 e PB2, em apenas uma das simulações; e o pireno apenas em PB1, em uma das simulações. Dentre os HPAs presentes nas amostras, o naftaleno, fluoreno e fenantreno apareceram em maior quantidade, em todas as amostras avaliadas.

O Naftaleno é considerado um dos poluentes que mais contribuem para a toxicidade total de amostras de sedimentos e rejeitos líquidos, sendo enquadrado, pela USEPA (1984), na lista prioritária de contaminantes orgânicos persistentes (ELJARRAT e BARCELÓ, 2003). Esse HPA é dicíclico, sua solubilidade em água é muito baixa ($31,7 \text{ mg/L}^{-1}$) e sublima facilmente em temperatura ambiente. Existem comprovações claras de que o naftaleno passa pelo metabolismo enzimático oxidativo do citocromo P450, resultando na produção de metabólitos reativos que induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (CHICHESTER et al., 1994; STOHS et al., 2002). Segundo Djomo et al. (1995) o naftaleno é capaz de induzir catarata em coelhos e dano bronquiolar em camundongos decorrente de interferência na atividade das enzimas monoxigenases citocromo P450.

O Fenantreno é um HPA pertencente à classe dos compostos semi-voláteis, considerado, assim como o naftaleno, um poluente prioritário, devido a sua toxicidade, persistência e predominância no meio ambiente (USEPA, 1984). Dentre os HPA, o antraceno e o fenantreno são os menos reativos e, se ingeridos, são facilmente absorvidos no intestino e transformados em fenóis, di-hidroxi-dióis e ácidos mercaptúricos (COSTA, 2001). De acordo com Moody et al. (2001), o fenantreno não oferece risco ao homem como os HPA de maior peso molecular, porém podem ser tóxicos para peixes e algas.

Não são definidos pela EPA limites máximos, para água doce, de naftaleno, fluoreno e fenantreno. Porém, o fluoreno é designado como um poluente tóxico pela lei federal norte-americana, "Água Limpa", estando sujeito, nos EUA, a limitações de lançamento nos efluentes (366, 40 CFR 401.15 - 7/1/87). No entanto, Irwin (1997) infere que a toxicidade aguda para baixos níveis de fluoreno é raramente relatada para a espécie humana, peixes ou animais selvagens. O autor também afirma que, segundo pesquisas, o fluoreno não é genotóxico para bactérias.

Independentemente da via utilizada, um composto químico tem que atravessar várias membranas celulares, até atingir o seu local alvo e produzir seu efeito nocivo ao organismo (PEDROZO et al., 2002). Desta maneira, membranas biológicas são caracterizadas como barreiras entre a célula e o meio ambiente, regulando a passagem de agentes tóxicos do exterior para o interior celular. O ramnolipídio é um composto capaz de se intercalar na membrana celular, mais especificamente entre os fosfolipídios, e promover alterações tanto na estrutura, como nas propriedades e funções desta organela celular (ORTIZ et al., 2006). O

biossurfactante também promove danos nas estruturas citoplasmáticas e no envoltório nuclear (WANG et al., 2005) e mobiliza cálcio dos compartimentos celulares (VIKSTRÖM et al., 2010), havendo alguma evidência de sua ação na inativação de cálcio ATPase (TERUAL et al., 2007).

Quanto à ação tóxica do ramnolipídio utilizado como agente biorremediador, observamos, por meio de análises realizadas em microscópio eletrônico de transmissão, que este agente químico foi capaz de promover algumas alterações na morfologia das células eritrocitárias de *O. niloticus*, após exposição dos peixes às amostras P, PB1, PB2, B1 e B2. Segundo Adhikari et al. (2004), os parâmetros histo-fisiológicos, obtidos com células sanguíneas, são considerados importantes indicadores do funcionamento do organismo como um todo e, conseqüentemente, se caracterizam em um importante agente diagnóstico das condições estruturais e funcionais de peixe exposto a determinado contaminante ambiental.

Foi observado neste estudo, que todas as amostras de água testada induziram alterações na morfologia do núcleo celular, bem como formação de vacúolos citoplasmáticos nas células eritrocitárias dos indivíduos expostos. Porém, a amostra de P induziu também heterocromatinização do material genético e fragmentação nuclear, características essas bastante relacionadas com processo de morte celular. Os HPAs fenantreno e naftaleno, encontrados em nossas amostras, bem como os seus metabólitos, induzem, segundo Chichester et al. (1994) e Stohs et al. (2002), a formação de espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela indução de morte celular. O fenantreno, em sua via metabólica, se transforma em 9,10 fenantrenequinona que, como outras quinonas, são muito tóxicas (DJOMO et al, 1995). Já a produção dos metabólitos reativos do naftaleno pode levar à depleção da glutatona e, conseqüentemente, promover estresse oxidativo (STOHS et al., 2002). A diminuição da glutatona pode reduzir a capacidade da célula destruir os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio. Assim, a glutatona-S-transferase e suas enzimas associadas exercem papel protetor fundamental dentro da célula. De fato, a conjugação da glutatona com xenobióticos, seja espontânea ou catalisada pela glutatona-S-transferase, diminui a ação de xenobióticos e torna essas moléculas mais solúveis, portanto, mais facilmente eliminadas do organismo (JESUS e CARVALHO, 2008).

Dentre as alterações morfológicas encontradas nos núcleos das células sanguíneas dos peixes expostos às amostras PB1 e PB2, foi observada constrição nuclear, indicativo de uma conseqüente formação futura de células binucleadas.

Nossos resultados estão de acordo com os dados obtido por Wang et al. (2005), onde os autores também observaram o aparecimento de vacúolos em células de algas unicelulares expostas ao ramnolipídio. Segundo os autores, a formação e o aumento no diâmetro dos vacúolos nas algas das espécies *Heterosigma akashiwo*, *Gymnodinium sp.* e *Prorocentrum dentatum* sugerem que os danos causados pelo biossurfactante estariam relacionados com a sua propriedade anfipática, que permite a adesão da substância aos fosfolipídios da superfície da membrana. Esta interação levaria a alterações na permeabilidade da membrana, facilitando a entrada do ramnolipídio como também de outras substâncias para o interior das células. Uma vez no interior da célula, o biossurfactante age nas membranas das organelas, produzindo a desintegração dessas estruturas. Wang et al. (2002) também observou a atuação do ramnolipídio, junto ao envoltório nuclear, o que justificaria a alteração na morfologia do núcleo observada em nosso estudo, para as simulações PB2 e B2, que receberam a concentração mais alta testada do biossurfactante (10g/L). Nestas simulações, foi observada uma intensa retração nuclear, caracterizada pela presença de um espaço entre o citoplasma e o núcleo. Ortiz et al. (2006), ao estudar a interação do biossurfactante di-ramnolipídio (DiRL), isolado e purificado a partir da cepa 47T2 de *Pseudomonas aeruginosa*, verificaram que o DiRL é capaz de se incorporar às fosfatidilcolinas das bicamadas lipídicas e afetar as propriedades estruturais da membrana, promovendo mudanças na temperatura, relacionada à transição de fases. Apesar do DiRL não promover alteração macroscópica na bicamada, os autores verificaram um aumento da distância interlamelar, que promove uma perturbação física conformacional na membrana, que afeta a sua função. Segundo Alberts et al. (2002), 28% do folheto externo e 27% do folheto interno da membrana é composto por fosfatidilcolina. A partir dessas informações, entendemos que o processo de heterocromatinização nuclear (que promove uma diminuição do tamanho do núcleo), associado à atividade do biossurfactante sob as fosfatidilcolinas, promove a separação entre as bicamadas dos folhetos internos e externos das membranas do envoltório nuclear, aumentando, assim, a distância aparente entre elas. O resultado é um espaço de tamanho

significativo entre o domínio nuclear e o citoplasma da célula exposta ao biossurfactante.

Pelos estudos realizados por MacCoull et al. (1999), as naftoquinonas são produtos de transformação do naftaleno que produzem espécies reativas de oxigênio (ERO), como superóxido (O_2^-) e o radical OH^- , que reage com compostos eletrofílicos das células, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Os autores observaram que a 1,2 naftoquinona reage com a base guanina, tendo como produto da reação a 7 (1,2 naftoquinona 4 il) guanina. O carbono da posição 4 do 1,2 naftoquinona reage com o nitrogênio 7 da guanina, promovendo danos na molécula de DNA, resultando em quebras simples e duplas.

Apesar de vários ensaios com diversos organismos como insetos, bactérias e células de mamífero terem apresentado resultados negativos para o fenantreno, quanto à mutagenicidade, a International Agency for Research on Cancer (IARC, 1986) classifica o fenantreno como mutagênico.

Em nosso estudo, observamos que as amostras P, PB1 e PB2 apresentaram ação genotóxica para as células de brânquias de *O. niloticus* e que a amostra P foi única genotóxica para eritrócitos circulantes. Esse potencial, provavelmente, deve estar relacionado à presença de fenantreno e naftaleno e não a presença do biossurfactante ramnolipídio. Esta inferência tem por base os testes realizados com amostras de simulações feitas somente com biossurfactantes, que não mostraram qualquer efeito do produto sobre as células de peixe analisadas. Como pode ser observado, as células de brânquia foram mais sensíveis que os eritrócitos circulantes na avaliação de genotoxicidade, caracterizando-se em um biomarcador mais eficiente para este tipo de avaliação de contaminação ambiental. Segundo Sandbacka et al. (2000), as brânquias de peixes são os primeiros alvos dos surfactantes e de outras substâncias tóxicas presentes na água, pois apresentam uma superfície relativamente grande e recoberta por um epitélio fino. Assim, o epitélio branquial torna-se um candidato a modelo *in vivo* para a avaliação da toxicologia aquática.

Ainda que os resultados de microscopia eletrônica de transmissão tenham mostrado uma indução de micronúcleos em eritrócitos, para todas as amostras estudadas, a análise quantitativa dessas alterações, realizada pelo teste do micronúcleo convencional, mostrou indução significativa apenas para a amostra P. Apesar de Yin et al. (2007) afirmarem que tanto o fenantreno como o naftaleno,

quando metabolizados, são capazes de formar compostos reativos (ROS) que agridem o DNA, estudos sobre o potencial mutagênico do naftaleno e do fenantreno, realizados por Djomo et al., (1995), mostraram que a o naftaleno foi capaz de induzir a formação de micronúcleos, provavelmente devido a ação de seus metabólitos, enquanto que o fenantreno não mostrou resultados positivos, quanto à indução dessa alteração nuclear. Ainda segundo Djomo et al. (1995), a característica tóxica do fenantreno tende a mascarar sua atividade mutagênica. Pelas citações de Djomo et al. (1995) e pelos resultados obtidos neste trabalho, podemos inferir que, possivelmente, os resultados verificados em P estejam relacionados com a atividade do naftaleno presentes na amostra.

Os resultados aqui apresentados podem servir como importantes informações sobre a toxicidade e o uso adequado do biossurfactante ramnolipídio. Foi observado neste estudo que simulações de biorremediações que usaram as soluções de 1 e 10 g/L deste produto não induziram alterações genotóxicas e mutagênicas significativas em peixes, conferindo em vantagem para uso em programa de descontaminação de ambientes impactados. Como os resultados obtidos para as duas concentrações testadas foram igualmente eficientes, sugere-se que seja feito o uso da concentração de 1 g/L, por caracterizar-se em uma ação mais viável economicamente e por minimizar os riscos de introdução de xenobióticos no ambiente. Caso a quantificação do produto a ser usado na biorremediação seja superestimada, não decorrerá em problemas para a ictiofauna local, pois o composto, nesta concentração, não se mostrou genotóxico.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Recursos Humanos ANP/FINEP/MCT-CTPETRO, PRH-05, Universidade Estadual Paulista (UNESP)-Rio Claro pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). **Chemosphere**, v. 65, p. 952-962, 2006.

ALBERS, P. H. **Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons.** In: Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A.; Cairns, J (Eds.). Handbook of ecotoxicology. Boca Raton : Lewis publishers, p.330-355, 1995.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell.** Garland Publishing Inc., New York, 1294p., 2002.

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

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhance oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technol**, v. 51, p. 1-12, 1995.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BENINCASA, M., CONTIERO, J., MANRESA, M.A. AND MORAES, I.O., Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the carbon source, **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283, 2002.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41- 52, 1999.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v.44, p. 383-392, 2001.

BROWN, J.S.; STEINERT, S.A. DNA damage and biliary PAH metabolites in flatfish from Southern California and harbors and the Channel Islands. **Ecological Indicators**, v. 3, p. 263-274, 2003.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.

CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de água de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes-SP**. 2010. 188f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**, São Paulo, 391 p. 1999.

CHICHESTER, C. H.; BUCKPITT, A. R.; CHANG, A.; PLOPPER, C. G. Metabolism and cytotoxicity of naphthalene and its metabolites in isolated murine Clara cells. **Molecular Pharmacology**, v. 45, p. 664-672, 1994.

COSTA, S. G. A. O.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; DÉZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1063-1072, 2009.

COSTA, S. G. A. O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN M. N. CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils, **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DJOMO, J. E.; DAUTA, A.; FERRIER, V.; NARBONNE, J. F.; MONKIEDJE, A.; NJINE, T.; GARRIGUES, P. Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus*. **Water Research**, v. 38, p. 1817-1821, 2004.

ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Priority lists for persistent organic pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples. **Trend in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 655-665, 2003.

FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; DEL BRAGA, I.; NIGRO, M.; FÖRLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. DNA damage in eelpout (*Zoarce viviparous*) from Göteborg harbor. **Mutation Research**, v. 552, p. 187-195, 2004.

GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. Genotoxicity biomarkers association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.55, p.352-358, 2003.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. 1ª ed. Brasília: ULBRA, 2005. 394p.

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

HINGLEY, S. T.; ANNETTE, T.; HASTIE, F. K.; MICHAEL L.; HIGGINS, G.; WEINBAUM, T. S. Effect of Ciliostatic Factors from *Pseudomonas aeruginosa* on Rabbit Respiratory Cilia. **Infection and Immunity**, v. 51, p. 254-262, 1986.

IARC. **Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**, v. 41, Some Halogenated and Pesticide Exposures, Lyon, pp. 149–160, 1986.

IRWIN, R. J. **PAHs Entry**. National Park Service, Water Operations Branch, p. 176, 1997.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p. 680-693, 2008.

KILEMADE, M.; HARTL, M. G. J.; SHEEHAN, D.; VAN PELT, F. N. A. M.; O'BRIEN, N. M.; O'HALLORAN, J. An assessment of the pollutant status of surficial sediment in Cork Harbour in the South East of Ireland with particular reference to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 1084-1096, 2004.

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

KRIEGER, N; CAMILIOS NETO, D; MITCHELL DA. **Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation**. In: Ramkrishna Sen. (Org.). Advances in Experimental Medicine and Biology. Biosurfactants. New York: Springer Science+Business media, LCC, Landes Bioscience, v. 672, p. 203-209, 2010.

LOVAGLIO, R. B. Produção de ramnolipídios em biorreator por *Pseudomonas aeruginosa* LBI. 2007. 106f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

MACCOULL, K.D.; RINDGEN, D.; BLAIR, I. A.; PENNING, T. M. Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N7-guanine adducts. **Chemical Research in Toxicology**, v. 12, p. 237-246, 1999.

MAIER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, D G. *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids: biosynthesis and potential applications, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Enhanced biosurfactant production by *Bacillus subtilis* at thermophilic conditions by foam fractionation. **Journal Surfactants Detergents**, v. 4, p. 355-357, 2001.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A., The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, p. 61-64, 1994.

MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; DOERGE, D. R.; CERNIGLIA, C. E. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspension of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1476, 2001.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-98, 2005.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, p. 372-378, 2009.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. A. O.; CONTIERO, J. Structure and applications of a rhamnolipids surfactant produced in soybean oil waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 2066–2074, 2010.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L. A. G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 21, p.1562-1566, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

ORTIZ, A.; TERUEL, J. A.; ESPUNY, M. J.; MARQUÉS, A.; MANRESA, A. ARANDA, F. J., Effects of dirhamnolipid on the structural properties of phosphatidylcholine membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 99-107, 2006.

PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SCHENEIDER, M.R.; LINHARES, M. M. Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo. **Série Cadernos de Referência Ambiental**, v.12. Salvador, Brasil, 2002.

RAMSDORF, W. A. **Utilização de duas espécies de *astyanax* (*astyanax sp b* e *a. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico**

(Fazenda Cangüiri – UFPR) Dissertação de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

REY-VÁZQUEZ, G.; GUERRERO, G. A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes) **Tissue and Cell**, v. 39, p. 151-160, 2007.

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

ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; BOSH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v.1, p.871-874, 1989.

SANDBACKA, M.; CHRISTIANSON, I.; ISOMAA, B. The acute toxicity of surfactants on fish cells daphnia magna and fish a comparative study. **Toxicology In Vitro**, v. 14, p. 61-68, 2000.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 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. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, p. 87-93, 2006.

STOHS, S. J.; OHIA, S.; BAGCHI, D. Naphtalene toxicity and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 180, p. 97-105, 2002.

TELES, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Anguilla anguilla L. ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and

endocrine responses to naphthalene and ① naphthoflavone. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, p. 98-107, 2003.

USEPA - US Environmental Protection Agency, 1984. **Health effects assessment for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)**. EPA/549-1-86-013.

VIKSTRÖM, E.; BUI, L.; KONRADSSON, P.; MAGNUSSON, K. Role of calcium signalling and phosphorylations in disruption of the epithelial junctions by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, p. 584-597, 2010.

WANG, X.; LI, K.Q., ZHU, C.J., HAN, X.R., DENG, N.N., CHENG, H. Pollution condition of petroleum hydrocarbon pollutant and estimation of its environmental capacities in summer in the Bohai Sea. **Marine Science Bulletin**, v. 7, 21-29, 2005.

YIN, Y.; JIA, H.; SUN, Y.; YU, H.; WANG, X.; WU, J.; XUE, Y. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. Comparative. **Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, p. 288-293, 2007.

AÇÃO TÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO BIOSURFACTANTE RAMNOLIPÍDIO, OBSERVADA EM TESTES *IN VITRO* COM CÉLULAS HEPG2.

¹Fernandes, T. C. C.; ²Lovaglio, R. B.; ²Contiero, J.; ¹Marin-Morales, M. A.

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

²Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

Os biossurfactantes são substâncias produzidas por microorganismos e sua maior vantagem, quando comparados aos surfactantes sintéticos, reside na sua diversidade estrutural, baixa toxicidade e biodegradabilidade. Esses compostos são agentes tensoativos que agem como detergente, emulsificante, espumante, espessante e dispersante, tornando-os um produto químico de grande versatilidade em suas aplicações. No entanto, não há trabalhos na literatura que tenham avaliado a ação dessas substâncias sob o material genético de organismos expostos a eles ou o seu efeito sinérgico, quando introduzido no ambiente. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial citotóxico de diversas concentrações do biossurfactante ramnolipídio, assim como avaliar sua atividade genotóxica e mutagênica sob células humanas (HepG2) expostas às amostras de água contaminada por petróleo e biorremediadas com o ramnolipídio. A investigação da citotoxicidade do ramnolipídio foi realizada pelo teste do MTT onde foram testadas as concentrações 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 1,8; 2 g/L do biossurfactante. Foi observado que a concentração de 1 g/L, assim como as concentrações menores do ramnolipídio não são tóxicas para as células de HepG2 e que as concentrações 1,5, 1,8 e 2 g/L levaram a uma significativa indução de morte das células expostas. Para avaliar a atividade genotóxica e mutagênica do biossurfactante ramnolipídio, quando utilizado como agente biorremediador de águas impactadas por petróleo, foi realizada uma simulação de um derrame de petróleo cru pesado e utilizada as concentrações 1 e 10 g/L do ramnolipídio. Foram testadas as simulações P (água + petróleo); PB1 (água + petróleo + biossurfactante 1g/L); PB2 (água + petróleo + biossurfactante 10g/L) e experimentos com água e biossurfactante 1g/L (B1) e 10 g/L (B2). Também foi avaliado o potencial genotóxico e mutagênico da concentração de 1 g/L do biossurfactante ramnolipídio (BIO1). Após a obtenção das amostras, foram avaliadas as características químicas, quanto ao pH e à presença de HPAs, e realizadas análises ecotoxicológicas para a verificação da ação genotóxica e mutagênica dos compostos presentes nas águas derivadas da simulação. Nossos resultados mostraram que a concentração 1 g/L do biossurfactante foi mutagênica para células humanas e que as duas concentrações utilizadas para biorremediação foram capazes de promover efeito sinérgico com o petróleo, promovendo um aumento de danos celulares em células humanas. Assim, sugerimos que este produto seja usado com cautela para fins terapêuticos e que sua utilização como agente biorremediador de águas impactadas por petróleo pode vir a promover efeitos indesejados para mamífero.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, micronúcleo, ensaio do cometa, teste do MTT.

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são compostos produzidos por microrganismos e que têm recebido crescente interesse nas últimas décadas pelas vantagens que possuem sobre os surfactantes sintéticos, tais como biodegradabilidade (RON e ROSENBERG, 2002; MOHAN et al., 2006), baixa toxicidade, produção a partir de fontes renováveis, funcionalidade sob condições extremas de pH e temperatura, estabilidade, entre outros (FIECHTER, 1992).

Os biossurfactantes são produzidos, principalmente, pelo crescimento aeróbio de microrganismos em meio aquoso, a partir de fontes de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou de uma mistura desses compostos. Os biossurfactantes excretados no meio de cultura, durante o crescimento microbiano, auxiliam o transporte e a translocação de substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999). Quando os microrganismos mantêm os biossurfactantes adsorvido à suas paredes celulares, o composto facilita a penetração de hidrocarbonetos no espaço periplasmático do próprio microrganismo produtor (KOCH et al., 1991).

Os biossurfactantes vêm tendo um uso crescente na medicina, por apresentarem eficientes atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais, quando comparados a drogas sintéticas e agentes químicos em geral. Tais características destacam os biossurfactantes como substâncias de grande importância no combate de muitas doenças e como agentes terapêuticos. Além disso, sua ação como agente antiaderente de muitos patógenos leva a uma indicação de uso como agente de cobertura para materiais de inserção médica, permitindo uma redução de um grande número de infecções hospitalares (RODRIGUES et al., 2007).

O biossurfactante ramnolipídio é um surfactante natural, aniônico, produzido por *Pseudomonas aeruginosa* e pertencente à classe dos biossurfactantes mais promissores para aplicação em diferentes ramos industriais (LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL, 2009; BENINCASA et al., 2004). No entanto, seu maior potencial de aplicação está direcionado à indústria petrolífera, principalmente na limpeza de tanques e em biorremediação de ecossistemas aquáticos impactados com hidrocarbonetos de petróleo (COLLA e COSTA, 2003).

Muitos testes biológicos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de se avaliar as reações dos organismos vivos à contaminação ambiental, bem como de se estimar os possíveis efeitos sinérgicos de poluentes presentes no meio ambiente (ROOS et al., 2004; FERETTI et al., 2008). Segundo Morales (2008), o uso de células de mamíferos mantidas em cultura tem se mostrado uma alternativa segura e eficiente para ser aplicada em diversos ensaios de toxicidade, pela sua facilidade de manipulação e observação de parâmetros microscópicos, bioquímicos e moleculares. O modelo *in vitro* ganhou, nos últimos anos, uma ampla aceitação na investigação toxicológica, por proporcionar ferramentas avançadas, protocolos confiáveis e possuir diferentes aplicações, desde estudos de morte celular até a toxigenômica (MAZZEO, 2009). O uso de cultura de células também apresenta vantagens aos sistemas testes *in vivo*, por não esbarrar em questões éticas da ciência.

As células HepG2 foram isoladas, em 1979, de hepatoblastoma primário. Essa linhagem apresenta morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmáticas, características das células normais do fígado humano (KNASMULLER et al., 1998). Essas células conservam as atividades das enzimas de fase I, tais como as do P450 CYP1A1, CYP1A2, CYP2B e CYP2E1, como também as enzimas da fase II, incluindo glutathione-S-transferases, sulfotransferases, N-acetiltransferases e glucuronosiltransferases. Estas enzimas estão envolvidas no metabolismo de carcinógenos, tendo importante função na ativação e detoxificação de compostos reativos ao DNA (UHL et al., 1999; MAJER et al., 2004). Portanto, os ensaios com células de HepG2 são considerados mais adequados para avaliação de danos causados por mutágenos do que testes *in vitro* realizados com bactérias ou com células de mamíferos que necessitam de adição de misturas de ativação exógena, para mimetizar o metabolismo de compostos de ação indireta (UHL et al., 2000; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

A linhagem de células HepG2 têm sido utilizada em muitos estudos de genotoxicidade, cujos protocolos foram desenvolvidos, com sucesso, para testes que usam vários *end points*, como aberrações cromossômicas, troca entre cromátides irmãs, micronúcleo e mutações gênicas, pela possibilidade de mensuração direta do composto estudado (NATARAJAN e DARROUDI, 1991; KANASMULLER et al., 1998; UHL et al., 1999). A importância do uso destes

endpoints esta no fato deles serem capazes de detectar, no interior das células, os efeitos que os metabólicos formados têm sobre a molécula de DNA.

Desta maneira, o objetivo desse estudo foi avaliar a ação tóxica do biossurfactante ramnolípido bem como seu potencial genotóxico e mutagênico, quando utilizado como agente biorremediador de ambientes aquáticos impactados com petróleo, utilizando cultura de células de hepatoma humano (HepG2) como sistema teste.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção do biossurfactante ramnolípido

Foi avaliado neste trabalho um biossurfactante conhecido como ramnolípido, cuja estrutura química é de um glicolípídios constituído de ácidos graxos ligados a moléculas de ramnose (Figura 1) (NITSCHKE et al., 2005).

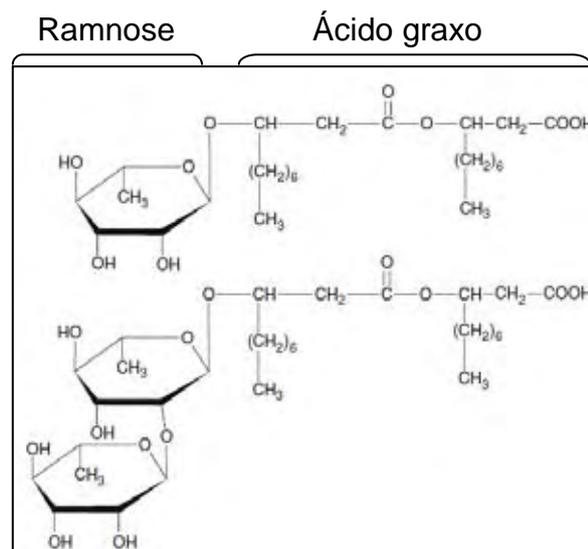


Figura 1. Estrutura química do biossurfactante ramnolípido.

O ramnolípido utilizado foi obtido a partir da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, linhagem LBI, isolada de solo contaminado por petróleo (BENINCASA et al., 2002), sendo mantida em agar nutriente, em tubos criogênicos a -20°C .

Para o preparo do pré-inóculo, o microrganismo foi semeado em meio inclinado, permanecendo neste ambiente por 24 horas à 30°C . Em seguida, para a obtenção de uma suspensão microbiana, foi adicionado ao meio 3 mL de água destilada estéril. Esta suspensão foi padronizada a 610 nm, densidade óptica de $0,65 \pm 0,01$ (aprox. 10^8 CFU/ml). (unidade formadora de colônia). Posteriormente, foram transferidos 4 mL desta solução para frascos de Erlenmeyer, contendo 200

mL de meio mineral (ROBERT et al., 1989). Foi acrescido nestes frascos, como única fonte de carbono do meio, 4 mL de óleo de soja. O frasco com este inóculo permaneceu por 24 horas em shaker a 200 rpm e 30°C.

A produção de ramnolipídios foi feita em frascos de Erlenmeyer (volume de 1 L), contendo 300 mL de meio mineral, 6 mL do inóculo e 6 mL de óleo de soja. Os frascos foram incubados em shaker à 30°C, 200 rpm por um período de 120 horas. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,8. Para realização da extração dos ramnolipídios, o caldo com o produto (biossurfactante) foi centrifugado a 12.000 rpm, durante 20 minutos. O sobrenadante foi separado e acidificado com H₂SO₄ 6M para pH 2,0, sendo adicionado, a seguir, um volume equivalente ao do caldo de clorofórmio/metanol (2:1). A mistura foi vigorosamente agitada por 10 minutos e, em seguida, mantida em repouso até a completa separação das fases. A fase orgânica foi removida e a operação se repetiu com a fase aquosa. Para a concentração do produto, foi utilizado o rotavapor, que promoveu a evaporação dos solventes.

Para a determinação da tensão superficial do ramnolipídio, foi seguido o método do anel de De Nöuy, utilizando tensiômetro Krüss K6. Neste processo, foi utilizada uma concentração de 1g/L de ramnolipídio, considerada padrão para este produto (COSTA et al., 2006; COSTA et al., 2009 e NITSCHKE et al., 2010). A tensão interfacial do ramnolipídio foi obtida a partir de uma solução contendo 1 g/L do biossurfactante e n-hexadecano, na proporção de 1:1 (10 mL da concentração do biossurfactante e 10 mL de n-hexadecano), utilizando para esta avaliação o tensiômetro Krüss K6. As análises foram realizadas em triplicata.

2.2. Sistema teste *in vitro*

Para a realização dos ensaios com células mantidas em cultura, foram utilizadas células de hepatoma humano - HepG2 (2n=46 cromossomos), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram estocadas em nitrogênio líquido e cultivadas em frascos de cultura de tecido de 25 cm², com meio MEM (EARLE, Cultilab) adicionado de 10 mL de piruvato de sódio 100 mM (Gibco) e 1mL da solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I/ mL/estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab) para completar o volume de 1 L e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF-Gibco). Os frascos cultivados foram mantidos em atmosfera úmida, a 37°C e com 5% de CO₂.

2.2.1. Avaliação do potencial citotóxico do biossurfactante ramnolipídio

A avaliação do potencial citotóxico do biossurfactante, realizado com células de HepG2, foi feito por meio do teste do MTT, seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983), com algumas modificações. Para a realização do teste, as células foram mantidas em frascos de cultura, em atmosfera úmida, a 37°C e com 5% de CO₂. Na seqüência, as células foram tripsinizadas (0,5%), por 5 minutos, com conseguinte inativação da enzima. A suspensão celular obtida foi utilizada para a confecção das microplacas de 96 poços, nas quais foram semeadas 2x10⁴ células por poço, em 200 µL de meio de cultura completo (meio de MEM + SBF), exceto nos poços referentes ao branco, onde foram adicionados apenas meio de cultura completo. Posteriormente, a microplaca foi incubada em atmosfera úmida, a 37°C e com 5% de CO₂, por um período de 24h, para estabilização das células. Decorrido este tempo, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado e as células foram expostas, por 24h, às diferentes concentrações do biossurfactante ramnolipídio (0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 1,8 e 2 g/L), utilizando meio de cultura completo como meio de diluição. Os tratamentos controle negativo e positivo foram realizados com meio de cultura MEM e triton X-100 1%, respectivamente. Após a exposição, os tratamentos foram retirados dos poços e adicionado nestes o corante MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, CAS No. 298-93-1 Sigma). A microplaca foi, então, incubada por mais 4 horas. Após as 4 horas, o corante foi descartado e adicionado, em cada poço da microplaca, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), para a dissolução dos cristais de formazan, que são resultantes da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase presente em células vivas. Imediatamente após a adição do DMSO, a microplaca foi submetida à leitura em espectrofotômetro, utilizando filtro de 540 nm. Os valores de absorbância obtidos foram comparados, estatisticamente, com os resultados do controle negativo, pelo teste de Mann-Whitney.

2.3. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do biossurfactante ramnolipídio, quando utilizado na biorremediação de águas contaminados por petróleo.

2.3.1. Simulação de derrame de petróleo cru pesado

Para a avaliação das atividades genotóxicas e mutagênicas do biossurfactante, quando utilizado como agente biorremediador de águas contaminadas com petróleo, foram realizadas simulações de derrame de óleo cru pesado (proveniente da Bacia de Campos/RJ - Brasil) em água doce. Todas as simulações foram realizadas em recipientes cilíndricos montados com tubos de PVC (Poli Cloreto de Vinila) de 1,20 m de comprimento e 150 mm de diâmetro (Figura 2). Estes recipientes receberam um volume equivalente a 20L de água do tanque de criação de peixes e 5 mL de petróleo, criando, assim, uma pluma de óleo de, aproximadamente, 0,2 mm ou 200 μ m de espessura. Uma bomba de circulação, com uma vazão de aproximadamente 480 L/h, foi colocada na base dos tubos, com o intuito de simular a movimentação de um corpo d'água.

Foram simuladas, nestes tubos, as seguintes situações: derrame de petróleo (água + petróleo = P); derrame de petróleo biorremediado com biossurfactante ramnolipídio na concentração de 1 g/L (água + petróleo + biossurfactante 1 = PB1); derrame de petróleo biorremediado com biossurfactante ramnolipídio na concentração 10 g/L (água + petróleo + biossurfactante 2 = PB2). A proporção de biossurfactante utilizado nas misturas foi de 5% do total de óleo derramado (conforme resolução CONAMA 269, para surfactante sintético). Foram realizados, nas mesmas condições, experimentos com água e biossurfactante (água + biossurfactante 1 g/L = B1; água + biossurfactante 10 g/L = B2) e à concentração de 1g/L do biossurfactante ramnolipídio (BIO1). O Controle ambiental foi feito com água do tanque de criação de peixes.

Os tubos utilizados na simulação foram fechados com papel alumínio e expostos a ambiente natural externo, por 16 horas. Esse procedimento foi realizado para garantir a incorporação dos hidrocarbonetos hidrossolúveis à água dos experimentos. Em seguida, os tubos foram expostos a luz solar intensa, por 6 horas, para que os produtos de degradação também fossem incorporados ao solvente.

Posteriormente, foram coletadas, por diferença de densidade, todas as amostras de águas contendo as frações solúveis do petróleo (PB1, PB2 e P) e as amostras de B1, B2 e CN. Com as amostras de água coletadas, foram realizadas os ensaios ecotoxicológicos, as análises qualitativa e quantitativa dos HPA e mensurado o pH de cada uma destas amostras. A análise dos hidrocarbonetos foi realizada pela empresa Analytical Technology Serviços Analíticos e Ambientais Ltda, por meio de cromatografia gasosa (cromatógrafo Thermo, modelo Focus) acoplado a um

espectrômetro de massas (Thermo, modelo DSQ). A coluna utilizada para a análise foi VB-5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m. A empresa seguiu as normas de análise estabelecidas pela USEPA 8270D.

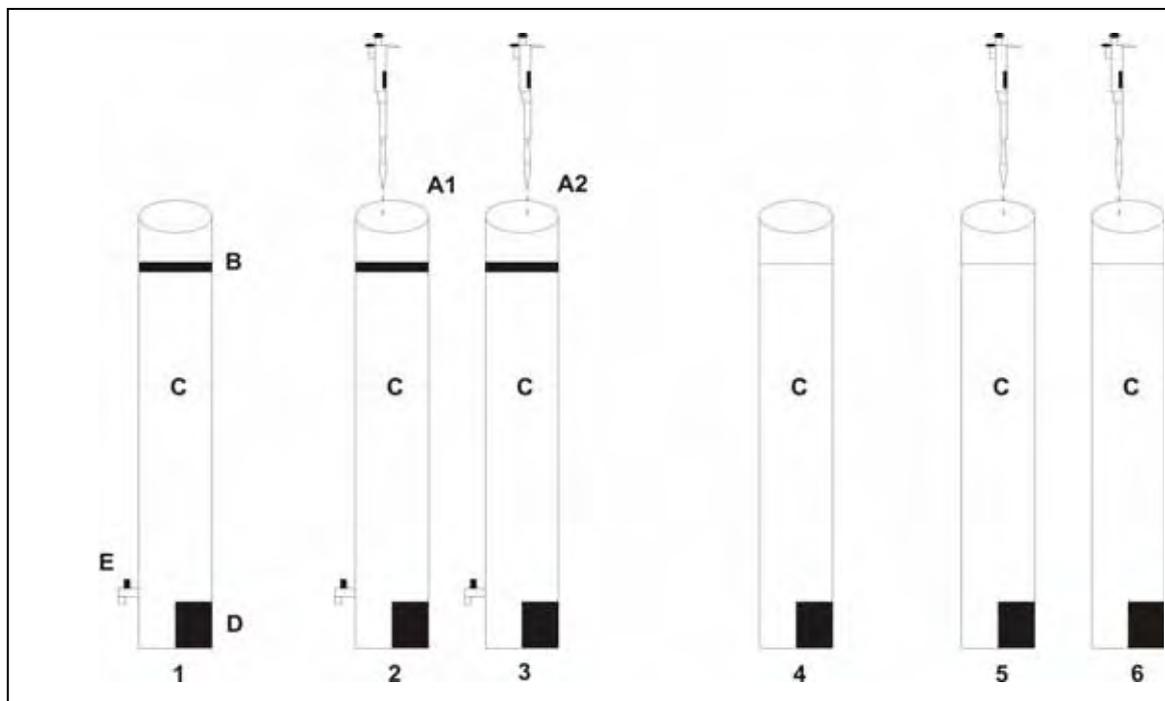


Figura 2. Esquema ilustrativo do experimento **1.** Água + Petróleo (P); **2.** Água + petróleo + biossurfactante 1 g/L (PB1); **3.** Água + petróleo + biossurfactante 10g/L (PB2); **4.** Água coletada nos tanques de criação de peixe (CA) **5.** Água + biossurfactante 1g/L (B1); **6.** Água + biossurfactante 10 g/L (B2); **A1 e A2.** Adição nas amostras, por meio de gotejamento realizado com micropipeta, de 0,25mL de biossurfactante, na concentração 1 g/L (A1) e 2 g/L (A2); **B.** Representação da pluma de óleo (200 μ m); **C.** 20 L de água obtida nos tanques de criação de peixes, que são abastecidos com água de poço artesiano; **D.** Bomba de circulação de água; **E.** Torneira para promover a vazão para coleta da amostra que contém a fração solúvel do petróleo.

A realização dos ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade do biossurfactante ramnolipídio, se deu pela exposição de cultura de célula HepG2 em meio MEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal. O frasco foi mantido a 37°C em estufa de CO², por 72h, tempo este necessário para que houvesse uma multiplicação celular suficiente para a total ocupação do espaço de cultivo do frasco (aproximadamente 10⁷ células). Após esse período, foi realizado o repique para 30 frascos, onde cada um recebeu aproximadamente 5.10⁵ células, quantidade necessária para a realização dos experimentos. Os frascos foram incubados em atmosfera úmida, a 37°C e com 5% de CO₂, por 24h. Esse período corresponde ao tempo necessário para a realização de um ciclo celular e a aderência das células no frasco. Decorrido este tempo, as células foram expostas, por 24h, a 15 mL de cada

uma das amostras (P, PB1, PB2, B1, B2 e CA) e a concentração de 1g/L do ramnolípido, devidamente filtradas em membrana (Millipore) com poros de 0,22 µm. Como controle negativo, foi utilizado apenas meio de cultura MEM, suplementado com 10% de SBF. O controle positivo foi realizado com metilmetanosulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3). As amostras foram realizadas em triplicata e, após o período de exposição, foram submetidas ao teste do micronúcleo e ao ensaio do cometa.

2.3.2. Teste do micronúcleo

Decorrido o tempo de exposição das células aos tratamentos, as mesmas foram lavadas com PBS e incubadas, por mais 28 horas, em um novo meio de cultura contendo citocalasina B (300 µL/mL). Após a colheita, as células foram tratadas com solução hipotônica de citrato de sódio 0,01% e fixadas em metanol ácido-acético (3:1 – v/v). As lâminas foram hidrolisadas em HCl 1N, 60° C, por 8 minutos e submetidas ao reativo de Schiff (2 h em ambiente escuro) e em Giemsa 5% (5 minutos), sendo, posteriormente, analisadas em microscopia de luz. Foi analisada a incidência de micronúcleo em 1000 células binucleadas com citoplasma intacto, selecionadas ao acaso. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney.

2.3.3. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Tice et al. (2000) e Uhl et al. (1999, 2000), com algumas modificações. Após o tempo de exposição aos tratamentos, a suspensão celular foi colhida, transferida para tubos Falcon e centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi retirado e a suspensão homogeneizada com pipeta Pasteur. Para a obtenção de células isoladas, a suspensão celular foi novamente homogeneizada com o auxílio de uma seringa de 1 mL. Para o prosseguimento do ensaio do cometa, foram realizados testes de viabilidade celular para todos os tratamentos. Para isto, 20 µL da suspensão celular, de cada tratamento, foram misturados com 20 µL de Azul de Trypan 0,4% e transferidos para câmara de Neubauer. Foram contabilizadas as células viáveis (brancas) e inviáveis (coradas em azul), presentes nos quatro quadrantes da câmara.

Após a verificação da viabilidade de 80% das células, foi misturada uma alíquota de 20 µL de suspensão celular com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5% - 37°C) e, rapidamente, gotejada sobre lâminas secas, previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (1,5% - 60°C). As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a temperatura de 4°C, por 20 minutos. Após a remoção cuidadosa das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada, recém preparada, contendo 89 mL de solução de lise estoque (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris com pH ajustado para 10 com auxílio de 8 g de NaOH, 890 mL de água destilada), mais 1 mL de triton X-100 e 10 mL de DMSO, onde permaneceram por 1 hora, a temperatura de 4°C. 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, em ambiente escuro, a 6°C, por 1 hora.

As lâminas foram posteriormente transferidas para uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (pH > 13) recém preparada (300 mM de NaOH, 1 mM de EDTA, preparado de uma solução estoque contendo NaOH 10N e 200 mM de EDTA, pH 10), onde permaneceram por 20 minutos antes da eletroforese, para desnaturação do DNA. A corrida foi realizada a 4°C, por 20 minutos, em uma corrente de 39 V e 300 mA (~0,8 V/cm). Após a corrida, as lâminas foram neutralizadas em tampão Tris-HCl (pH 7,5), fixadas em etanol absoluto e mantidas a 4°C, até a realização das análises. A coloração foi feita com brometo de etídeo (0,02mg/mL).

Foram analisados, aleatoriamente, em microscópio de Epifluorescência (Olympus BX51, filtro WG 34: excitação 1 = 420 n – 490 n, barreira: I = 520nM, objetiva de 40X), 100 nucleóides de cada frasco (3 frascos por tratamento). Os nucleóides foram classificados visualmente, segundo a classificação de Kobayashi et al. (1995), de acordo com a migração dos fragmentos, em: classe 0 (ausência de dano visível), classe 1 (pequeno dano), classe 2 (médio dano) e classe 3 (grande dano). Os escores de cada tratamento foram verificados e submetidos ao teste estatístico de Mann-Whitney.

3. RESULTADOS

3.1. Análise quantitativa e qualitativa de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Dentre as diversas substâncias que compõem o petróleo, os HPAs são as que causam maior preocupação, devido ao conhecido caráter carcinogênico e mutagênico que muitos deles apresentam. Neste estudo foram investigados 16 HPAs, reconhecidos pela EPA como prioritários, onde apenas seis deles foram identificados. A tabela 1 traz os resultados qualitativos e quantitativos dos hidrocarbonetos presentes nas amostras P, PB1 e PB2.

Tabela 1. Análise quantitativa e qualitativa de HPA presentes nas amostras P, PB1 e PB2.

COMPOSTO	PCP	CN	P	PB1	PB2	LD	LQ
	CONCENTRAÇÃO (µg/L)						
Naftaleno	837309,00	ND	12	12,2	12,6	0,05	0,15
Acenaftileno	46826,00	ND	ND	0,092	0,084	0,05	0,15
Acenafteno	ND	ND	ND	0,073	0,058	0,05	0,15
Fluoreno	198241,50	ND	0,371	0,491	0,432	0,05	0,15
Fenantreno	770695,00	ND	0,749	1,12	0,852	0,05	0,15
Antraceno	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15
Fluoranteno	31457,50	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15
Pireno	91092,00	ND	ND	0,050	ND	0,05	0,15
Benzo(a)antraceno	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15
Criseno	37356,50	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15
Benzo(b)fluoranteno	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15
Benzo(k)fluoranteno	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15
Benzo(a)pireno	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15
Indeno(1,2,3-cd)pireno	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15
Dibenz(a,h)antraceno	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15
Benzo(g,h,i)perileno	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	0,15

PCP. Petróleo cru pesado; CN. Controle negativo; P Petróleo+água; PB1. Água + petróleo + biossurfactante 1 g/L; PB2. Água + petróleo + biossurfactante 10 g/L; ND. Não detectado; LD. Limite de detecção; LQ. Limite de quantificação.

3.2. Avaliação do potencial citotóxico

Os resultados obtidos por meio do teste do MTT mostraram que a concentração de 1g/L, assim como as concentrações menores, não são tóxicas para

as células de HepG2. No entanto, as concentrações 1,5, 1,8 e 2 g/L de ramnolipídio levaram a uma significativa indução de morte das células expostas, como pode ser visto na figura 3, onde também é possível verificar os menores valores de absorbância para essas concentrações.

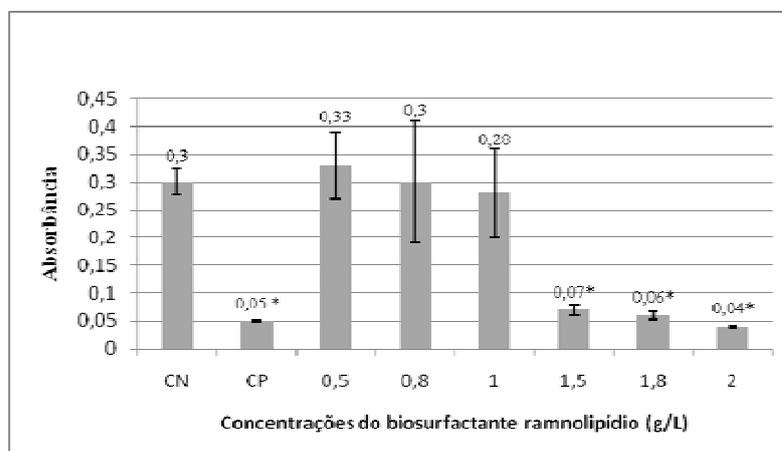


Figura 3. Valores de absorbância, obtidos após a leitura da microplaca de células de HepG2 expostas às concentrações testadas do biossurfactante ramnolipídio.

3.3. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico

3.3.1. Teste do micronúcleo

A avaliação do potencial mutagênico das amostras estudadas foi feita pela quantificação da presença de micronúcleos em células HepG2. A figura 4 mostra que as águas contaminadas com petróleo, com ou sem a presença das concentrações 1 e 10 g/L de ramnolipídio (P, PB1 e PB2, respectivamente), são capazes de induzir freqüências estatisticamente significativas, quando comparadas ao controle negativo. Além disso, o aumento na freqüência de micronúcleos em PB1 e PB2 foi estatisticamente significativo, quando comparados com o tratamento P. As amostras B1 e B2 e a concentração 1 g/L do biossurfactante (BIO1) também mostraram ter potencial mutagênico.

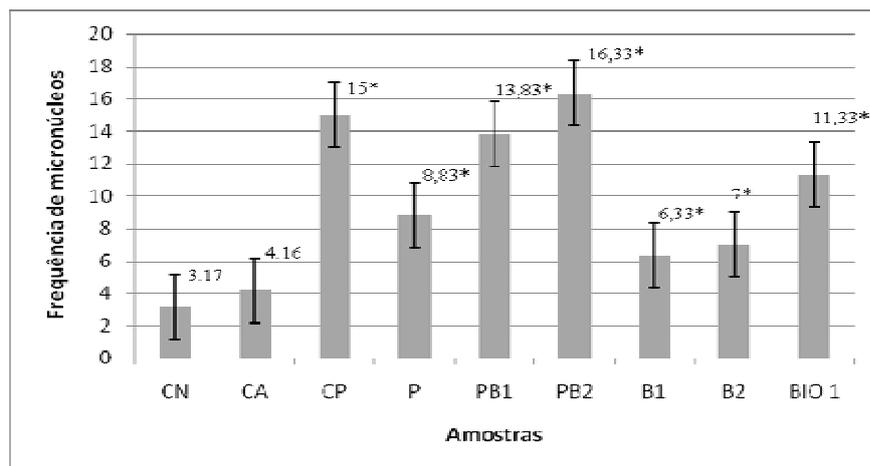


Figura 4. Frequência de micronúcleos observada em células HepG2 binucleadas, após exposição às amostras P, PB1, PB2, B1, B2, CA e BIO 1.

3.3.2. Ensaio do Cometa

Pelos resultados obtidos com a aplicação da técnica do cometa, foi possível observar a ação genotóxica das amostras estudadas. As amostras P, PB1 e PB2 exibiram os maiores potenciais genotóxicos, identificados pelos altos valores de escores, que se mostraram estatisticamente significativos, quando comparados com o controle negativo (Tabela 6).

Tabela 6. Classificação de danos promovidos no DNA de células de HepG2 expostas às amostras estudadas.

Amostras	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore
CN	89	3	3	5	24
	91	8	1	0	10
	88	7	4	1	18
	82	12	3	3	27
	82	7	8	3	32
	88	9	2	1	16
Média/DP	86,67±3,78	7,67±2,94	3,5±2,43	2,17±1,83	21,17±8,01
CA	87	11	2	0	15
	87	12	1	0	14
	84	13	3	0	19
	84	15	1	0	17
	86	13	0	1	16
	78	19	3	0	25
Média/DP	84,33±3,38	13,83±2,86	1,67±1,21	0,17±0,41	17,17±3,98
CP	1	1	3	95	292
	1	0	2	97	295
	0	1	3	96	295
	1	0	4	95	293
	0	0	4	96	296
	0	1	2	97	296

Média/DP	0,5±0,55	0,5±0,55	3±0,89	96±0,89	294,5±1,64*
	74	11	8	7	48
	71	8	11	10	60
P	69	11	8	12	63
	73	10	5	12	56
	70	13	10	7	54
	65	9	12	14	75
MÉDIA/DP	70,33±3,2	10,33±1,75	9±2,53	10,33±2,87	59,33±9,24*
	72	6	21	1	51
	73	13	12	2	43
PB1	73	11	16	0	43
	74	16	9	1	37
	71	12	16	1	47
	76	13	9	2	37
Média/DP	73,17±1,72	11,83±3,31	13,83±4,71	1,17±0,75	43±5,51*
	73	7	18	2	49
	68	18	14	0	46
PB2	70	12	16	2	50
	72	11	15	2	47
	65	9	22	4	65
	73	12	13	2	44
Média/DP	70,17±3,19	11,5±3,73	16,33±3,27	2±1,26	50,17±7,57*
	89	10	0	1	13
	87	6	4	3	23
B1	92	8	0	0	8
	88	12	0	0	12
	78	15	6	1	30
	83	9	7	1	26
Média/DP	86,17±4,95	10±3,16	2,83±3,25	1±1,09	18,67±8,84
	74	8	12	6	50
	78	6	11	2	34
B2	74	11	9	3	38
	73	10	10	2	36
	92	1	6	1	16
	81	12	5	2	28
Média/DP	78,67±7,2	8±4,04	8,83±2,78	2,67±1,75	33,66±11,27
	84	11	3	2	23
	91	6	2	1	13
BIO 1	77	17	6	0	29
	66	21	10	3	50
	60	33	5	2	49
	70	26	4	0	34
Média/DP	74,67±11,59	19±9,86	5±2,83	1,33±1,21	33±14,57

CN. Controle negativo; **CA.** Controle ambiental; **P.** Petróleo + água; **PB1.** Água + petróleo + biossurfactante 1 g/L; **PB2.** Água + petróleo + biossurfactante 10 g/L; **B1.** Biossurfactante 1 g/L + água; **B2.** Biossurfactante 10 g/L + água; **BIO 1.** Biossurfactante ramnolípido 1 g/L; **DP.** Desvio padrão. *p<0,05.

4. DISCUSSÃO

Os acidentes com derrame de óleo se tornaram freqüentes e têm causado muitos problemas ecológicos e sociais. Devido à capacidade dos biossurfactantes emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água, o que promove um aumento da degradação destes compostos no ambiente, essas substâncias tem chamado a atenção como uma possível estratégia na biorremediação de águas impactadas por petróleo. Porém, existe ainda uma preocupação quanto ao seu uso, não somente como agente dispersor, mas também em outras atividades humanas, como a sua utilização na indústria cosmética e na área da saúde, pelo seu potencial de ação nas membranas celulares.

Ortiz et al. (2006) estudaram a interação do biossurfactante di-ramnolipídio (DiRL), isolado e purificado a partir da cepa 47T2 de *Pseudomonas aeruginosa*, com a fosfatidilcolina da membrana celular. Os autores verificaram que o DiRL é capaz de se incorporar entre os fosfolipídios das bicamadas lipídicas e afetar as propriedades estruturais da membrana, promovendo mudanças na sua temperatura, levando à transição de fases. Apesar do DiRL não alterar a organização macroscópica da bicamada, ele aumenta a distância interlamelar, promovendo uma desordem conformacional, dada por perturbações físicas da membrana, o que poderia afetar a sua função.

Nossas análises mostraram que o ramnolipídio, produzido pela cepa LBI da bactéria *P. aeruginosa*, concentrações 1,5; 1,8 e 2 g/L, promoveu a morte de células da cultura HepG2. Esses resultados corroboram os dados de Wang et al. (2005), que citam que o biossurfactante ramnolipídio teve efeito inibitório no crescimento de algas, pela sua forte atividade lítica, como consequência direta da interação da molécula de ramnolipídio com os fosfolipídios da membrana, o que levou a alterações das propriedades da bicamada.

O teste de citotoxicidade do MTT mostrou valores de absorbância, para essas concentrações, estatisticamente significativos quando comparados com o controle negativo, indicando baixa atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, devido à morte celular ou a drásticas alterações nas funções dessa organela. Os trabalhos de Wang et al. (2005) reportam que o biossurfactante, além de ter interferido na estrutura da bicamada fosfolipídica da membrana plasmática das algas da espécie *Heterosigma akashiwo*, também promoveu alterações na membrana mitocondrial e a destruição de outras organelas citoplasmáticas, como o complexo

de Golgi, retículo endoplasmático e envoltório nuclear. Segundo os autores, a alteração inicial na estrutura da membrana plasmática afeta a sua permeabilidade e facilita a entrada do próprio biossurfactante, bem como de outras substâncias, promovendo, dessa maneira, maiores danos no interior celular. Estudos realizados por Stipcevic (2005) também mostraram o efeito citotóxico do ramnolipídio para células de fibroblastos e queratinócitos mantidos em cultura. Os autores mostraram que determinadas concentrações do di-ramnolipídio BAC-3 (1 mg/mL e 500 µg/mL) podem promover a destruição de membranas celulares e de estruturas citoplasmáticas, sugerindo um processo celular necrótico.

O petróleo é uma mistura complexa constituída, principalmente, por HPAs, cujas moléculas são formadas por múltiplos anéis aromáticos e, por isso, apresentam resistência à biodegradação microbiológica, o que os tornam persistentes no ambiente. Os surfactantes, por promoverem a dissociação do óleo em pequenas gotas, aumentam a superfície de contato entre o óleo e os microorganismos, facilitando a degradação destes compostos hidrofóbicos, caracterizando-se em agentes com grande potencial remediador.

Os principais HPA encontrados nas frações solúveis do petróleo derivadas das simulações P, PB1 e PB2, realizadas neste trabalho, foram o naftaleno, o fenantreno e o fluoreno. Esses compostos foram encontrados tanto nas amostras das simulações realizadas com as duas concentrações de ramnolipídio (PB1 e PB2) quanto na amostra realizada somente com o petróleo (P).

Nossos resultados indicaram que as frações solúveis das simulações realizadas tanto com o petróleo (P) como com os simulados de biorremediação (PB1 e PB2) apresentaram uma freqüência de micronúcleos estatisticamente significativa, em relação ao controle negativo. Contudo, os valores de micronúcleo registrados para as amostras PB1 e PB2 foram, significativamente, superiores aos valores obtidos em P, sugerindo que as concentrações aqui do ramnolipídio foram capazes de promover danos maiores que aqueles já promovidos pelos componentes do petróleo.

A ação genotóxica e mutagênica, detectada em P, PB1 e PB2, provavelmente, estão relacionadas à ação do fenantreno e naftaleno presente nas amostras. O fenantreno e o naftaleno, quando metabolizados, são capazes de formar compostos reativos de oxigênio que agredem o DNA. Segundo Djomo et al. (1995), o fenantreno, em sua via metabólica, se transforma em 9,10

fenantrenoquinona que, como outras quinonas, são muito tóxicas. Apesar de vários ensaios realizados com diversos organismos como insetos, bactérias e células de mamífero terem apresentado resultados negativos quanto a mutagenicidade, a International Agency for Research on Cancer (IARC, 1986) classifica o fenantreno como mutagênico.

O naftaleno, segundo Nutter et al. (1992), Öllinger e Brunk, (1993), Silva et al. (2003) e Cojocel et al. (2006), é transformado pela P-450 em naftoquinonas, que são responsáveis por danos no citocromo, levando ao aparecimento de micronúcleos. As naftoquinonas também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) como superóxido (O₂⁻) e radical OH⁻, que reagem com compostos eletrofílicos das células, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Para melhor avaliar a capacidade dos HPAs reagirem com o DNA, MacCoull et al. (1999) purificaram e caracterizaram a reação entre 1,2 – naftoquinona e a base guanina. Os autores afirmam que o carbono da posição 4 do 1,2 naftoquinona reage com o nitrogênio 7 da guanina, resultando em 7- (1,2 – naftoquinona – 4 – il) – guanina. Segundo o autor, reações dessa natureza promovem danos na molécula de DNA, resultando em quebras simples e duplas.

Apesar do fluoreno também ter sido detectado nas amostras, esse composto, segundo Irwin (1997), apresenta baixa toxicidade para seres humanos, peixes, ou animais selvagens e não apresenta atividade genotóxica para bactérias.

Os resultados observados no teste do micronúcleo e no ensaio do cometa para as amostras B1, B2 e BIO1 nos dão um indicativo de atividade aneugênica do biossurfactante ramnolipídio. Esta atividade pode ser reconhecida pelos resultados não significativos observados para danos no DNA, no ensaio do cometa, e a presença significativa de micronúcleos nas células HepG2. Esta atividade aneugênica pode ser explicada pela ação que o ramnolipídio exerce sobre a membrana celular. Segundo dados relatados por Vikström et al. (2010), produtos da atividade da *P. aeruginosa* promoveram mudanças nos níveis de cálcio intracelular livre. Terual et al. (2007) avaliaram a ação de uma mistura de mono e di-ramnolipídio na atividade hidrolítica da cálcio ATPase de retículo sarcoplasmático. Esses autores relataram que o biossurfactante ramnolipídio foi capaz de promover uma completa inativação da cálcio ATPase, quando testados em concentração inferiores a 0,1 Mm. Considerando que a inativação da proteína cálcio ATPase levaria a um aumento do cálcio citoplasmático e que é necessário um baixo nível de cálcio para que a

polimerização dos microtúbulos ocorra, concluímos então que o ramnolipídio aqui testado pode ter comprometido a formação dos fusos mitóticos, devido aos elevados níveis desse íon na célula, descrito por Hepler (1992). Este efeito explicaria a formação de micronúcleo observada, mesmo com resultados negativos de genotoxicidade evidenciada pelo ensaio do cometa. Segundo Fernandes et al. (2009), distúrbios no fuso podem levar a formação de anormalidades cromossômicas como perdas cromossômicas e poliploidias, alterações estas que originam micronúcleos. Desta maneira, os nossos resultados sugerem que o biossurfactante ramnolipídio tem uma possível ação aneugênica, por promover alterações no DNA, decorrentes de ação citoplasmática e não diretamente sobre o material genético.

Concluímos neste trabalho que concentrações maiores que 1 g/L do biossurfactante ramnolipídio são tóxicas e concentrações menores que essa são capazes de alterar o material genético de células humanas. Assim, sugerimos que o uso terapêutico deste produto seja feito com cautela. Quanto à utilização do ramnolipídio como agente biorremediador na limpeza de ambientes impactados por petróleo, salientamos que o efeito sinérgico desse poluente com o biossurfactante promoveu, nas células humanas, danos mais severos que aqueles observados pelo impacto promovido pelo próprio petróleo, servindo de alerta para uma possível ação indesejada sobre os mamíferos expostos a essa substância no ambiente.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Recursos Humanos ANP/FINEP/MCT-CTPETRO, PRH-05, Universidade Estadual Paulista (UNESP)-Rio Claro pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283, 2002.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41- 52, 1999.

COJOCEL, C.; NOVOTY, L.; VALCHALKOVA, A. Mutagenic and carcinogenic potential of menadione. **Neoplasma**, v. 53, p. 316-323, 2006.

COLLA, L. M; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, v.13, p. 85-103, 2003.

COSTA, S. G. A. O.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; DÉZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1063-1072, 2009.

COSTA, S. G. A. O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN M. N. CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.

DJOMO, J. E.; FERRIER, V.; GAUTHIER, L.; ZOLL-MOREUX, C.; MARTY, J. Amphibian minucrocleus test in vitro evaluation of the genotoxicity of some major polycyclic aromatic hydrocarbons found in a crude oil. **Mutagenesis**, v. 10, p. 223-226, 1995.

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

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.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends Biotechnology**, v. 10, p. 208–217, 1992.

HEPLER, P. K. Calcium and mitosis. **International Review of Cytology**, v. 138, p. 239-268, 1992.

IARC. **Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**, v. 41, Some Halogenated and Pesticide Exposures, Lyon, pp. 149–160, 1986.

IRWIN, R. J. **PAHs Entry**. National Park Service, Water Operations Branch, 176 p. 1997.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v. 402, p. 185-202, 1998.

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

KOCH, A. K.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal Bacteriology**, v. 173, p. 4212-4219, 1991.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids, **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, p. 255–261, 2009.

MACCOULL, K .D.; RINDGEN, D.; BLAIR, I. A.; PENNING, T. M. Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon *o*-quinone depurinating N7-guanine adducts. **Chemical Research in Toxicology**, v. 12, p. 237-246, 1999.

MAJER, B. J.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; DARROUDI, F.; LAKY, B.; WIT K.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in

human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. **Mutation Research**, v. 551, p. 153-166, 2004.

MAZZEO, D. E. C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero.** 2009. 144f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

MOHAN, P. K.; NAKHLA, G.; YANFUL, E. K. Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. **Water Research**, v. 40, 533-540, 2006.

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

NATARAJAN, A. T.; DARROUDI F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v. 6, p. 399-403, 1991.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. A. O.; CONTIERO, J. Structure and applications of a rhamnolipids surfactant produced in soybean oil waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 2066-2074, 2010.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L. A. G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 21, p.1562-1566, 2005.

NUTTER, L. M.; NGO, E. O.; FISHER, G. R.; GUTIERREZ, P. L. DNA strand scission and free radical production in Menadione treated cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 2474-2479, 1992.

OLLINGER, K.; BRUNK, U. Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, p.565-574, 1994.

ORTIZ, A.; TERUEL, J. A.; ESPUNY, M. J.; MARQUÉS, A.; MANRESA, A. ARANDA, F. J., Effects of dirhamnolipid on the structural properties of phosphatidylcholine membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 99-107, 2006.

ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; BOSH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v.1, p.871-874, 1989.

RODRIGUES, L.; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 609-618. 2006.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. **Biosurfactants and oil bioremediation**. In: Current Opinion in Biotechnology. Editora Elsevier, v. 13., p. 249–252, 2002.

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

STIPCEVIC, T.; PILJAC, T.; ISSEROFF, R. R. Di-rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* displays differential effects on human keratinocyte and fibroblast cultures. **Journal Dermatological Science**, v. 40, p. 141-143, 2005.

TERUEL, P. J. A.; GARCIA, C. S.; ORTIZ, L. A.; ARANDA, M. F. J. Effects of rhamnolipids on the calcium ATPase activity. **Chemistry and Physics of Lipides**, v. 149S, p. S23-S49, 2007.

UHL, M.; HELMA C.; KNASMÜLLER, Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 468, p. 213-225, 2000.

UHL, M.; HELMA C.; KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay with human-derived hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 441, p. 215-224, 1999.

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

VIKSTRÖM, E.; BUI, L.; KONRADSSON, P.; MAGNUSSON, K. Role of calcium signalling and phosphorylations in disruption of the epithelial junctions by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, p. 584-597, 2010.

WANG, X.; GONG, L. LIANG, S. HAN, X.; ZHU, C.; LI, Y. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Harmful Algae**, v. 4, p. 433-443, 2005.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por processos naturais que degradem, eficientemente, os resíduos tóxicos lançados no ambiente tem se caracterizado, nos últimos anos, em uma preocupação constante. Este trabalho procurou avaliar os efeitos tóxicos genotóxicos e mutagênicos do biossurfactante ramnolipídio, uma substância naturalmente produzida pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, comumente encontrada em diversos ambientes. Essa substância, que vem sendo estudada, há algum tempo, parece ser menos agressiva que os surfactantes sintéticos e tão eficientes quanto.

Os resultados obtidos nessa tese confirmaram os dados descritos na literatura sobre a eficiência utilização da concentração 1 g/L em processos de biorremediação, devido às suas excelentes características tensoativas;

Pelos estudos realizados com o organismo teste vegetal *Allium cepa*, o ramnolipídio estudado não alterou as atividades tóxicas, genotóxicas e mutagênicas das frações solúveis do petróleo (HPAs), presentes nas amostras de águas de simulações de ambiente remediado com este composto, indicando a ausência de efeitos sinérgicos entre o biossurfactante e os HPAs;

O biossurfactante estudado não facilitou o carreamento de compostos presentes no petróleo para o interior das células de *A. cepa*;

O ramnolipídio não alterou as condições físicas das águas impactadas por petróleo, se caracterizando em um eficiente dispersor de óleo em águas superficiais e composto promissor para programas de biorremediação de ambientes impactados com petróleo e seus derivados;

Ensaio realizados com a espécie *Oreochromis niloticus* mostraram que o ramnolipídio apresenta baixa atividade tóxica para esta espécie sentinela, observada pela indução de vacúolos citoplasmáticos e retração nuclear;

A retração nuclear promovida pelo ramnolipídio é decorrente da sua ação intercalante entre a bicamada lipídica da membrana celular, especificamente junto ao fosfolipídio fosfatidilcolina;

O ramnolipídio estudado não apresentou efeito genotóxico nem mutagênico para a espécie *O. nilóticos*, indicando ser um bom agente remediador de ambientes aquáticos impactados por derivados de petróleo;

Devido à característica das alterações observadas nos ensaios realizados com o ramnolipídio, sobre células humanas, foi possível classificar o composto da síntese bacteriana como uma substância aneugênica, pois sua ação se dá sobre as membranas celulares e, conseqüentemente, nas organelas celulares, tendo conseqüência indireta no DNA;

Uma vez que os resultados obtidos nesse estudo mostraram uma maior sensibilidade das células humanas para a substância testada, sugerimos cautela quanto ao uso do ramnolipídio na área terapêutica;

Devido aos resultados satisfatórios obtidos com peixes e vegetais, podemos concluir que o biossurfactante ramnolipídio estudado neste trabalho se caracteriza em um agente interessante para ser usado em processos de limpeza de ambientes impactados por petróleo, e, portanto, em um bom substituto para surfactantes sintéticos usados em programas de biorremediação, pois, certamente, não promoverá comprometimentos aos organismos pertencentes a esses grupos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, 2002.

ALBERTS, P. H. **Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons**. In: Handbook of ecotoxicology 2nd Ed. Boca Raton, Florida: cap. 14, p. 341-371, 2002.

ALI, D.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, S; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B., LAKRA, W.S. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 650-656, 2009.

AL-SABTI, K. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. **Cytobios**, v. 47, p. 147-154, 1986.

AL-SABTI, K. Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. **Mutation Research**, v. 320, p.157-163, 1994.

AL-SABTI, K.; FRANKO, M.; ANDRIJANI, B.; KNEZ, S.; STEGNAR, P. Chromium induced micronuclei in fish. **Journal Applied Toxicology**, v. 14, p. 333-336, 1994.

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

AL-TAHHAN, R. A.; SANDRIN, T. R.; BODOUR A. A.; MAIER, R. M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3262-3268, 2000.

API - American Petroleum Institute Publication 4435. **Oil spill cleanup: options for minimizing adverse ecological impacts**, 580 p., 1985.

ANASTÁCIO, P. M.; HOLTEN-LÜTZHOFT H. C.; HALLING-SORENSEN, B.; MARQUES, J. C. Surfactant (Genapol OX-80), toxicity to *Selenastrum capricornutum*. **Chemosphere**, v. 40, p. 835-838, 2000.

ATEEQ, B.; ADUL FARRAH, M.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2-4-D and butachlor evaluated by *Allium rot tip* test. **Mutation Research**, v. 514, p. 05-113, 2002.

ATLAS, R. M. Microbial hydrocarbon degradation: bioremediation of oil spills. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 52, p. 149-156, 1991.

BAHARI, I. B.; NOOR, F. M.; DAUD, N. M. Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*. **Mutation Research**, v. 313, p. 1-5, 1994.

BAINY, A. C. D.; SAITO, E.; CARVALHO, P. S. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v. 34, p.151-162, 1996.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhance oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

BARŠIENĖ, J.; DEDONYTĖ, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKĖNAITĖ, L.; ANDERSEN, O.K. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquatic Toxicology**, v. 78S, p. S99–S104, 2006.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283, 2002.

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

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41- 52, 1999.

BRASIL, Lei 9.966 de 28 de Abril de 2000. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 28 abril. 2000. Ed. Extra. Brasil, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 269 de 14 de Setembro de 2000. Acessível em http://www.pgr.mpf.gov.br/pgr/4camara/grupos_trabalho/residuos/residuos_solidos/269_2000.

BROWN, M. J. Biosurfactants for cosmetic applications. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 13, p. 61-64, 1991.

BRUSICK, D. J. Implications of treatment-condition-induced genotoxicity for chemical screening and data interpretation. **Mutation Research**, v. 189, p. 1-6, 1987.

CAIRNS Jr, J.; PRATT, J. R. A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D.M.; RESH, V.H. (Org.) **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: CHAPMAN and HALL, 1993. p. 10-27.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.

CANTAGALLO, C.; MILANELLI, J. C. C.; DIAS-BRITO, D. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 2, p. 1-12, 2007.

CARDOZO, T. A.; ROSA, D. P.; FEIDEN, I. R.; ROCHA, J. A. V.; D'AVILA DE OLIVEIRA, N. C.; 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.

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

CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de água de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes-SP**. 2010. 188f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

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

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

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

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S.H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research**, v. 655, p. 41-46, 2008.

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

CEDRE (Centre of Documentation, Research And Experimentation On Accidental Water Pollution): <http://www.cedre.fr>, "Discharge at sea" section. Aerial Observation of Oil Pollution at Sea Operational Guide Published: July 2004.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). **Derrames de Óleo no Mar e os Ecossistemas Costeiros**. São Paulo. Apostila de Curso. 2002.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). **Áreas contaminadas do Estado de São Paulo**. CETESB, 2004, São Paulo. Disponível em: [HTTP://www.cetesb.sp.gov.br/solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp). Acesso em: janeiro/2009.

CETESB, 2010. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo-Secretaria de Estado do Meio Ambiente. **Síntese dos principais acidentes atendidos pela CETESB**. http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/dutos/principais_acidentes.asp Acesso em janeiro/2010.

CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P.N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, p. 181-189, 1999.

COLE, M. G. **Assessment and Remediation of Petroleum Contaminated Sites**. Lewis Publishers. 360 pp. 1994.

COSTA, C. A. S.; SOUZA, P. P. C. **Testes de citotoxicidade em culturas de células.** In: Estrela C. Metodologia científica. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005. p. 213-30.

COSTA, S. G. A. O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN M. N. CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.

CUNHA, A. L. M. C. **Desenvolvimento e validação de método fosforimétrico em substrato de celulose para determinação de pireno e criseno.** Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio. Rio de Janeiro, 05 de março de 2007.

DE LEMOS, C. T.; TERRA, N. R. **Poluição: Causas, efeitos e controle.** In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Ed.) Genética Toxicológica. Porto Alegre: ALCANCE, p. 119-137, 2003.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DIEKMANN, M.; WALDMANN, P.; SCHNURSTEIN, A.; GRUMMT, T.; BRAUNBECK, T.; NAGEL, R. On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 27-37, 2004.

EDWARDS, K. R. LEPO J. E. LEWIS, M. A. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 1309-1316, 2003.

EPSTEIN, N.; BAK, R. P. M.; RINKEVICH, B. Toxicity of Third Generation Dispersants and Dispersed Egyptian Crude Oil on Red Sea Coral Larvae. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, p. 497-503, 2000.

EWA, L. K. M.; ANNA, M.; JOANNA, K. Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic surfactants. **Chemosphere**, v. 58, p. 1249-1253, 2005.

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.

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

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

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 208 - 217, 1992.

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

GABELOVA, A.; VALOVICOVA, Z.; HORVATHOVA, E.; SLAMENOVA, D., BINKOVA, B.; FARMER, P. **Genotoxicity of air pollution mixtures *in vitro***. From Hazard to Risk. Thirty Third Annual EEMS Meeting, Aberdeen, UK, 2003.

GETTER, C. D.; CINTRON, G.; DICKS, B.; LEWIS, R. R. **The Recovery and Restoration of Salt Marshes and Mangroves Following an Oil Spill**. p. 65-113. In: CAIRNS, J. R. J.; BULKEMA JR, A. L. Restoration of habitats impacted by oil spills. Butterworth Publishers, Toronto, 182 p. 1984.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental Mutagens. **Mutation Research**, v. 310 175-185, 1994.

GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.55, p.352-358, 2003.

GREEK, B. F. Detergent industry ponders product for new decade. **Chemical and Engineering News**, v. 68, p. 37-38, 1990.

GREEK, B. F. Sales of detergents growing despite recession. **Chemical and Engineering News**, v. 69, p. 25-52, 1991.

GUECHEVA, T. N.; HENRIQUES, J. A. P. **Metabolismo de xenobióticos citocromo P-450**. In: Silva J., Erdtmann B., Henriques J. A. P. (Eds.). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003, p. 225-243.

GUNDLACH, E. R.; M. HAYES, Classification of coastal environments in terms of potential vulnerability to oil spill damage. **Marine Technology Society Journal**, v. 12, p. 18-27, 1978.

HAMME, J. D. V.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 604-620, 2006.

HOLMBERG, K. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. John Wiley, New York, v. 1, 2002.

IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatório - Acidentes ambientais registrados pelo IBAMA**. www.ibama.gov.br
Acesso: outubro/2010.

IPCS (International Programme on Chemical Safety) **Environmental Health Criteria 200: Copper**. World Health Organization. International Petroleum Industry Environmental, 1998.

IPECA (International Petroleum Industry Environmental Conservation Association) 2000. **Biological Impacts of Oil Pollution: Sedimentary Shores**. v. 9. Acessível em <http://www.ipieca.org>.

IPIECA (International Petroleum Industry Environmental Conservation Association). 1992. **Biological Impacts of Oil Spill Pollution: Coral Reefs**. v. 3. Acessível em <http://www.ipieca.org>.

IRWIN, R. J. **PAHs Entry**. National Park Service, Water Operations Branch, 176 p. 1997.

ISHIGAMI, Y.; GAMA, Y.; NAGAHARA, H.; MOTOMIYA, T.; YAMAGUCHI, M. Liposome containing rhamnolipids. **Japanese Patent Kokai**, v. 29, p. 63-182, 1988.

ITOPF (International Tanker Owners Pollution Federation) 2001. Apresenta: informações, publicações, conselhos e assistência técnica com relação a respostas a poluição por vazamentos de óleo. Acessível em <http://www.itopf.com>. Acesso em 2006.

JACOBUCCI, D. F. C. **Estudo da influência de biossurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p. 680-693, 2008.

JIN, X. , CHEN, Q. TANG, S. ZOU, J. CHEN, K. ZHANG T.; XIAO X. Investigation of quinocetone-induced genotoxicity in HepG2 cells using the comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and RAPD analysis. **Toxicology in Vitro**, v, 1209-1214, 2009.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science**, v. 77, p. 116-126, 1999.

KATSUMITI A. K. F. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do impacto do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce**. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular. Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, 2006.

KENNISH, M. J. **Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution**. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 544 p. 1996.

KILEMADE, M. F.; HARTL, M. G. J.; SHEEHAN, D.; MOTHERSILL, C.; VAN PELT, F. N. A. M.; O'HALLORAN, J.; O'BRIEN, N. M. Genotoxicity of field-collected intertidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the Comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.44, p. 56-64, 2004.

KINGSTON, P. F. Long-term environmental impact of oil spills. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 7, p. 53-61, 2002.

KLIGERMAN A. D. Fishes as biological detectors of the effects genotoxic agents. In: HEDDLE J. A. (ed). **Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology**, Academic Press, p. 435-456, 1982.

KNASMÜLLER, S., PARZEFALL, W., SANYAL, R., ECKER, S., SCHWAB, C., UHL, M., MERSCH-SUNDERMANN, V., WILLIAMSON, G., HIETSCH, G., LANGER, T., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, 402, p. 185-202, 1998.

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

KNASMULLER, s.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDEMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v. 402, p. 185-202, 1998.

KOCH, A. K.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 4212-4219, 1991.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C.; STECHEY, D.; WOOD, J. The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. **J Am Oil Chem Soc** v. 61, 1735-1743, 1984.

LANDIS, W. G.; YU, M-H. **Environmental Toxicology**. 2nd ed. USA: Lewis Publishers, 1998.

LANG, S.; PHILP, J. C. Surface-active lipids in Rhodococci. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 74, p. 59-70, 1998.

LANG, S.; WAGNER, F. **Em Biosurfactants: production, properties, applications**. Kosaric, N., ed.; Marcel Decker: New York, cap. 8, 1993.

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

LEME, D. M. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de águas e sedimentos do rio Guaecá, São Sebastião – SP, após impacto de vazamento de oleoduto da região**. 2009 173p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2009.

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

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.

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

LIN, S-C. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.

LOCCI, P.; LILLI, C.; MARINUCCI, L.; CALVITTI, M.; BELCASTRO, S.; BELLOCCHIO, S.; STAFFOLANI, N.; GUERRA, M.; BECCHETTI, E. *In vitro* cytotoxic effects of orthodontic appliances. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 53, p. 560-570, 2000.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, p. 255–261, 2009.

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

MAIER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.

MAJER, B. J. MERSCH-SUNDERMANN, V. DARROUDI, F. LAKY, B. WIT K. KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. **Mutation Research**, v. 551, p. 153-166, 2004.

MAKKAR, R. S. CAMEOTRA, S. S. Enhanced biosurfactant production by *Bacillus subtilis* at thermophilic conditions by foam fractionation. **Journal Surfactants Detergents**, v. 4, p. 355-357, 2001.

MAKKAR, R. S.; CANEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MALABARBA, L. R.; PEREIRA, E. H. L.; SILVA, J. F. P.; BRUSCHI Jr., W.; FLORES-LOPES, F. Avaliação da qualidade da água através da frequência de anomalias morfológicas em peixes. Estudo de caso do lago Guaíba, Rio Grande do Sul. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS - Série Zoologia**, Porto Alegre, v.17, p. 97-128, 2004.

MANIASSO, N. Ambientes Micelares em Química Analítica. **Química Nova**, v. 24, p.87-93, 2001.

MARIA, V. L.; CORREIA, A. C.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. Biochemical and genotoxic responses to benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 86-92, 2002.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel** / Adriano Pinto Mariano. Rio Claro, 2006 162 f. Disponível em: http://www.anp.gov.br/CapitalHumano/Arquivos/PRH05/Adriano-Pinto-Mariano_PRH05_UNESP_D.pdf. Acessado em 15/10/2008 e 11/11/2008.

MARIN-MORALES, M. A.; LEME, D. M.; MAZZEO, D. E. C. **A review of hazardous effects of polycyclic aromatic hydrocarbon on living organisms**. In: HAINES, P. A.; HENDRICKSON, M. D. Polycyclic aromatic hydrocarbon: pollution, health effects and chemistry, Eds. Nova Science Publishers, Inc. New York, 2009.

MASTRANGELO, G.; FADDA, E.; MARZIA, V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, p. 1166-1170, 1996.

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

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

MAZZEO, D. E. C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero.** 2009. 144f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

MEIRA, J. A. **Produção de biossurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2007.

METCALFE, J. L. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrates communities: history and present status in Europe. **Environmental Pollution**, v. 60, p. 101-139, 1989.

MICHEL, J.; SHIGENAKA, G.; HOFF, R. **Oil Spill Response and Clean up Techniques.** In: An Introduction to Coastal Habitats and Biological Resources for Oil Spill Response. NOAA, Seattle, 401 p. 1992.

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

MILANELLI, J. C. C. **Efeitos do petróleo e da limpeza por jateamento em um costão rochoso da praia de Barequeçaba, São Sebastião, São Paulo**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 103 p. 1994.

MILLER, R .M. Biosurfactant - facilitated remediation of metal-contaminated soils. **Environmental Health Perspective**, v. 103, p. 59-62, 1995.

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

MOREIRA C. A.; DOURADO J. C. Análise de contaminantes de fase líquida não aquosa (NAPLs) por aplicação do método Eletromagnético Indutivo (EM). **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 23, p. 213-220, 2005.

MORRALL, D. D.; BELANGER S. E.; DUNPHY, J. C. Acute and chronic toxicity structure–activity relationships for alcohol ethoxylates. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 56, p. 381-389, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-98, 2005.

MUTTI, A.; BERGAMASCHI, E. In: **Idrocarburi policicliciaromatici negli ambienti de vita e di lavoro: esposizione ed effetti**; Apostoli, P.; Minoia, C.; Alessio, L., Eds.; ATTI, Gargnano, p. 213, 1996.

NALECZ-JAWECKI, G. GRABINSKA-SOTA E. NARKIEWICZ, P. The toxicity of cationic surfactants in four bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 87-91, 2003.

NATARAJAN, A. T.; DARROUDI F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v. 6, p. 399-403, 1991.

NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION - NOAA. **Characteristic Coastal Habitats - Choosing Spill Response Alternatives**. NOAA, Seattle, 87 p. 2000.

NETTO, A. D.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; BAREK A. S. O. J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, 756-773, 2000.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L. A. G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 21, p.1562-1566, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações **Química Nova**, v.. 25, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid Surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593-1600, 2005.

NRC. Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects Committee on Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects. **National Research Council**, 2003.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SILVA DE ASSIS, H. C. AChE inhibition as a biomarker for pollutants contamination in tropical aquatic ecosystems. In: PARVEEN, M.;

KUMAR, S. (Eds). **Recent Trends in the Acetylcholinesterase System**. Netherlands, p.103-124, 2005.

OLIVEIRA, E. M. **Study of physical environment's conditioners of subsidize to the construction of environment sensitivity to oil spill charts in cubatão city (SP)** 4º PDPETRO, Campinas, SP 6.2.0020 – 1 21-24 de outubro de 2007.

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

PACHECO, M.; SANTOS, A. M. Biotransformation, Endocrine, and Genetic Resposes of *Anguilla anguilla* L. to Petroleum Distillate Products and Environmentally Contaminated Waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 64-75, 2001.

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

PARK S.Y.; CHOI, D. J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure, **Environmental International**, v. 33, p. 817-822, 2007.

PATEL, M. N.; GOPINATHAN, K. P. Lysozyme-sentive bioemulsifier for immiscible organophosphorus pesticides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 1224-1226, 1986.

PAX-Y-MIÑO, C.; DÁVALOS, M. V.; SÁNCHEZ, M. E.; ARÉVALO, M.; LEONE, P. E. Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay. **Mutation Research**, v. 516, p. 57-61, 2002.

PETTERSSON, A. ADAMSSON, M. DAVE, G. Toxicity and detoxification of Swedish detergents and softener products, **Chemosphere**, v. 41, p. 1611-1620, 2000.

PEYPOUX, F., BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, p. 553-563, 1999.

POLMAN, J. K.; MILLER, K. S.; STONER, D. L.; BRACKENRIDGE, C. R. Solubilization of bituminous and lignite coals by chemically and biologically synthesized surfactants. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 61, p. 1-17, 1994.

RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S. M.R.; BANAT, I. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 1277-1281, 2002.

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.

RAMSDORF, W. A. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR)**. 2007. 127p. Dissertação.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, v. 390, p. 121-127, 1997.

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

RAO, S. S.; NEHELI, T.; CAREY, J. H.; CAIRNS, V. W. Fish hepatic micronuclei as an indication of exposure to genotoxic environmental contaminants. **Environmental Toxicology Water Quality**, v.12, p. 217-222, 1997.

REISER, J.; KOCH, A. K.; JENNY, K.; KAPPELI, O. In: **Advances in Applied Biotechnology Series**; ORINGER, J.W.; TILLINGUEST, H. S. Cap. 3. London: Gulf Publishing Company, 1989.

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

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

ROSENBERG E, RUBINOVITZ A, GOTTLIEB A, ROSENHAK S, RON E. Z Production of biodispersan by *Acientobacter calcoaceticus* A2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 317–322, 1988.

ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. (Org.) **Freshwater Biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: CHAPMAN and HALL, 1993.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A. R.; IZQUIERDO, J. I.; GARCIA-VAZQUEZ, E., Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. **Mutation Research**, v. 412, p. 219-225, 1998.

SCHLEGEL R.; MACGREGOR, J.T. The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats: implication for cytogenetic screening. **Mutation Research**, v. 127, p. 169-174, 1984.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I. W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v.40, p.207-217, 1995.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.) **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, p. 167-170, 2003.

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

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

SIMS, R. C.; SIMS, J. L.; SORENSE, D. L.; HASTINGS, L. L. **Waste/soil treatability studies for four complex industrial waste: methologies and results**. USEPA, Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory, v. 1, p. 154, 1988.

SOBREIRA, T. P. M. **Análise, sob o ponto de vista ambiental, do plano de contingências da Transpetro – Petrobrás transporte S.A., no porto de Paranaguá, Paraná**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2004.

SOLDATOV, A. A. Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system. **Journal of Evolutionary Biochemistry Physiology**, v. 41, p. 272-281, 1995.

STANGHELLINI, M. E.; MILLER, R. M. Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Disease**, v. 81, p. 4-12, 1997.

STANLEY, E. M. **Toxicological Chemistry**. 2nd ed. USA: Lewis Publishers. 1992.

STEGEMAN, J. J.; BROWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. **Molecular responses to environmental**

contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Biomarkers: Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE JR., P. P.; BERGMAN, H .L. (Ed.). Chelsea, MI: Lewis Publishers, p. 235-335, 1992.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; WALLACH, J.; MICHEL, G. Effect of the lipopeptide antibiotic iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. **FEMS. Microbiology Letters**, v. 128, p. 101-106, 1995.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIAYMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 3, p. 206-221, 2000.

TSUBOY, M. S.; ANGELI, J. P. F.; MANTOVANI, M. S.; KNASMÜLLER, 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, **Toxicol. In Vitro**, v. 21, p. 1650-1655, 2007.

TULLY, D. B.; COLLINS, B. J.; OVERSTREET J. D.; SMITH, C. S. Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 168, p. 79-90, 2000.

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

UCHIDA, Y.; TSUCHIYA, R.; CHINO, M.; HIRANO, J.; TABUCHI, T. Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, p. 757-763, 1989.

UHL, M.; HELMA C.; KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay with human-derived hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 441, p. 215-224, 1999.

UHL, M.; HELMA C.; KNASMÜLLER, S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 468, p. 213-225, 2000.

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**, v. 57, p. 1139-1150, 2004.

USEPA. **Monitored natural attenuation of petroleum hydrocarbons**. EPA/600/F-98/021. 1999.

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

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, p.604-620, 2006.

VANCE - HARROP, M. H.; DE GUSMAO, N. B.; DE CAMPOS-TAKAKI, G. M. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 120-123, 2003.

VATER, P. J. Lipopeptides in food applications. In; Kosaric N (ed) **Biosurfactants: production, properties and applications**. New York: Marcel Dekker, p. 419-446. 1986.

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. 42-51, 2008.

WALKER, C. M.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. Bristol, PA: Taylor e Francis, 1996.

WANG, X.; LI, K.Q., ZHU, C.J., HAN, X.R., DENG, N.N., CHENG, H. Pollution condition of petroleum hydrocarbon pollutant and estimation of its environmental capacities in summer in the Bohai Sea. **Marine Science Bulletin**, v. 7, 21-29, 2005.

WANG, X.; GONG, L. LIANG, S. HAN, X.; ZHU, C.; LI, Y. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Harmful Algae**, v. 4, p. 433-443, 2005.

WOLSKA, L.; SAGAJDAKOW, A.; KUCZYŃSKA, A.; NAMIEŚNIK. J. Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: Possibilities and problems. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 332-344, 2007.

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.

YAMANE T. Enzyme technology for the lipid industry. An engineering overview. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 64, p. 1657-1662, 1987.

YENDER, R.; MICHEL, J.; LORD, C. **Managing seafood safety after oil spill**. Hazardous Materials Response Division, Office of Response and Restoration, National Oceanic and Atmospheric Administration, EUA, pp. 72, 2002.

ZAJIC, J. E.; SEFFENS, W. Biosurfactants. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 1, p. 87-107, 1984.

ZANA, R. **Dynamics of surfactant self-assemblies: micelles, microemulsions, vesicles, and lyotropic phases.** (Surfactant science series; v. 125) New York: CRC Press, 539p., 2005.

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of *n*-Alkanes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2247–2251. 1995,

ZHOU, W.; HORSTICK, E. J.; HIRATA, H.; KUWADA, J. Y. Identification and expression of voltage-gated calcium channel beta subunits in Zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 237, p. 3842-3852, 2008.