



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

FERNANDO POSTALLI RODRIGUES

**ENSAIOS BIOLÓGICOS DE GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE UM
EFLUENTE DE REFINARIA DE PETRÓLEO**

**Londrina
2007**



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agrônomo do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

FERNANDO POSTALLI RODRIGUES

**ENSAIOS BIOLÓGICOS DE GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE UM
EFLUENTE DE REFINARIA DE PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular como pré-requisito para obtenção do título de Mestre

Docente Orientadora:

Profa. Dra. BERENICE QUINZANI
JORDÃO

**Londrina
2007**

FERNANDO POSTALLI RODRIGUES

**ENSAIOS BIOLÓGICOS DE GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE UM
EFLUENTE DE REFINARIA DE PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular como pré-requisito para
obtenção do título de Mestre

Comissão examinadora:

Prof^a. Dr^a. Berenice Quinzani Jordão
Depto. Biologia Geral
CCB – UEL

Prof^a. Dr^a. Ilce Mara de Syllos Cólus
Depto. Biologia Geral
CCB – UEL

Prof^a. Dr^a. Deborah Arnsdorff Roubicek
CETESB
São Paulo - SP

Londrina, 14 de fevereiro de 2007

Ele me faz deitar em pastagens relvasas;
Conduz-me junto a lugares de descanso bem regados.

Refrigera a minha alma.
Guia-me nos trilhos da
justiça por causa do seu nome.

Ainda que eu ande pelo vale da sombra tenebrosa,
Não temerei mal nenhum,
Porque tu estás comigo;
Tua vara e teu bastão são as coisas que me consolam.

Aprontas diante de mim uma mesa perante
os que me são hostis.
Untaste-me a cabeça com óleo;
Meu copo está bem cheio.

Decerto, a própria bondade e benevolência estarão no meu
encalço todos os dias da minha vida;
E eu vou morar na casa
de Jeová pela longura dos dias.

Salmo 23: 2-6.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir que estejamos todos aqui e que por meio de seu Filho, em breve, promete mudanças para melhor, principalmente às pessoas que fazem a sua vontade.

Aos meus pais, José Jaime e Dora Alice, por terem proporcionado a minha existência, minha educação, meu desenvolvimento como homem e a realização dos meus estudos e dessa dissertação. Obrigado por demonstrarem e me ensinarem qualidades exemplares como caráter e moral, essenciais aos seres humanos.

Aos meus irmãos, Pablo e Flávia, que são espelhos para mim, exemplos de dedicação, persistência nos estudos e na vida. Também por estarem presentes desde as brigas de infância até as boas conversas de hoje.

Aos meus avós maternos, Bruno e Ana Postalli, por serem especiais demais na minha vida, pelo incentivo de sempre dizer a verdade e trabalhar com amor.

Aos meus avós paternos, José e Maria Rodrigues (*in memoriam*) por terem vindo da Espanha para o Brasil trazendo meu pai, que conheceu minha mãe e tiveram a mim.

A todo o pessoal do Salão, em especial aos amigos de longa data, Ricardo Mello, André Marcacini e Rejane Bianchi.

A toda turma do Guanabara, em especial ao Márcio (Negão), André (Tonho) e ao Leandro ('André') que me incentivaram em todos os momentos e souberam entender e apoiar minhas decisões na vida de estudar e escolher um caminho espiritual.

A toda turma do laboratório de mutagênese, principalmente o Gustavo, Zé e a Mariana pelas lambanças que aprontamos juntos e principalmente pelos momentos de trabalho e companheirismo.

À galera do laboratório de fisiologia, pela disposição em ajudar, em especial à Prof^a. Dra. Cláudia B. Martinez pelas sugestões e fundamental colaboração nesta dissertação.

À Juliana Serpeloni por ser especial e me mostrar que somos capazes de ‘fazer a diferença’ e mudar coisas imutáveis em nossas vidas. Fez-me compreender também que ‘coisas humanamente impossíveis’ acontecem e só dependem de nós mesmos.

Aos amigos da graduação que jamais esquecerei, pois estiveram comigo na melhor fase da minha vida: Luiz, Henrique, Palomino, Felipe (Itu), Haroldo, Fabrício (Alemão) e aí vai...

À Universidade Estadual de Londrina – PR.

Ao Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade oferecida.

À CAPES/MEC pelo apoio recebido para execução desta Dissertação por meio do Programa de Pós-Graduação.

À Sueli Miranda, secretária do Programa pela dedicação e atenção durante os 2 anos do curso.

À Prof^a. Dr^a. Berenice Quinzani Jordão pelos anos de orientação, companheirismo e instrução profissional e pessoal que levarei por toda minha vida.

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani pela dedicação e atenção demonstrada ao longo de minha formação profissional e nesta dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Ilce Mara de Syllos Cólus por participar e contribuir neste trabalho de dissertação.

RODRIGUES, F. P. ENSAIOS BIOLÓGICOS DE GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE UM EFLUENTE DE REFINARIA DE PETRÓLEO. 2007.

Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

O desenvolvimento industrial juntamente com os outros setores da economia mundial gerou progresso e subsídio para o crescimento econômico de países do mundo todo. No entanto, os benefícios dos avanços tecnológicos vêm acompanhados de um aumento dos efluentes e despejos provenientes de diferentes tipos de indústrias, os quais se tornam indesejáveis subprodutos que carregam consigo milhões de toneladas de químicos tóxicos lançados todo ano no solo, ar e água. Em especial, as indústrias de refino de petróleo produzem efluentes ricos em metais pesados e químicos inorgânicos e orgânicos, como os hidrocarbonetos aromáticos, conhecidamente tóxicos. Neste contexto, faz-se necessário o desenvolvimento e aplicação de ferramentas para avaliação de amostras ambientais possivelmente impactadas por dejetos químicos. Neste trabalho, os efeitos biológicos de um efluente industrial de refino de petróleo foram observados por meio de diferentes metodologias ecotoxicológicas aplicadas em *Allium cepa* e em *Corbicula fluminea*, *in vivo*, e em células de hepatoma de rato (HTC), *in vitro*. A exposição do bivalve ao efluente foi avaliada pelo teste do cometa (pH>13), em três diferentes tempos (6, 24 e 96h) e depois de cada tempo os animais foram transferidos para aquários com água de poço para recuperação por 24, 72 e 144h. Um controle foi feito usando água de poço artesiano. Como resultado da exposição, houve, às 96h, um aumento significativo de quebras que geram fragmentos de DNA, detectadas após a corrida eletroforética, que foram gradualmente reparadas nos tempos de recuperação. Enquanto isso, parâmetros bioquímicos enzimáticos, catalase (CAT) e glutationa-S-transferase (GST), foram avaliados quanto à sua fisiologia nas brânquias. Os resultados significativos indicam que o animal apresentou reduzida atividade da CAT em 24 e 96h de tratamento, já que pode ter havido excreção direta de peróxido de hidrogênio pelas brânquias ou suficiente ação da enzima endógena glutaciona peroxidase (GPx). Entretanto, a GST esteve aumentada em 24 e 96h de tratamento e se manteve elevada mesmo em recuperação na hora 144. Os fragmentos (quebras e sítios álcali-labeis) detectados pelo ensaio do cometa podem ser atribuídos, principalmente, aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) que, quando metabolizados a compostos intermediários, formam aductos de DNA. No entanto, além da eliminação das lesões pelo sistema de reparo celular, a alta atividade da GST na hora 144, demonstra haver ação protetora excretando possíveis intermediários metabólitos quando não mais exposto à mistura complexa. Num outro sistema teste, o efluente foi avaliado quanto à capacidade de quebras ou perdas cromossômicas não reparadas pelo menos após um ciclo celular. O teste do micronúcleo em *Allium cepa* não detectou em 24 e 48h nenhum micronúcleo, porém, os químicos presentes neste efluente produziram lesões primárias no DNA, detectadas pelo ensaio do cometa, com 2h de exposição direta em cultura. Estes ensaios forneceram respostas diferentes mostrando haver maior sensibilidade e eficiência do ensaio do cometa. Além do ensaio, deve ser considerada a capacidade de metabolização de xenobióticos apresentada pelo tipo celular usado neste ensaio *in vitro*, ou seja, células HTC, que são xeno-metabolizadoras, capacidade esta menos eficiente nas células vegetais aplicadas neste estudo. Os resultados sugerem ainda que os principais agentes causadores de lesões genotóxicas deste despejo industrial devam ser dependentes de metabolização celular. Portanto, as observações reforçam a idéia de que os HPA são os principais causadores de lesões no DNA avaliadas

neste trabalho e que os mecanismos de avaliação de genotoxicidade tornam-se melhor entendidos quando bioensaios de natureza diferente são combinados na análise.

RODRIGUES, F. P. **GENOTOXIC AND MUTAGENIC BIOLOGICAL ASSAYS OF AN EFFLUENT ORIGINATED FROM A PETROLEUM REFINERY**. 2007. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

The industrial development together with other segments of the world economy has generated progress and funds for the economical growth of several countries around the world. On the other hand, the benefit of the technology advance comes together with an increase of the effluents and wastes, originated from several different industries, generating by-products that are thrown into the environment. Special attention is designated to the petroleum industry, since they generate effluents rich in heavy metals, organic (mainly polycyclic aromatic hydrocarbon – PAH) and inorganic chemical substances, with known toxic effect. This way, makes it necessary the development of tools for the analysis of environmental samples probably impacted by chemicals waste. In the present work, the biological effect of an industrial waste produced by a petroleum refinery, were analyzed by different ecotoxicological methodologies applied in *Allium cepa* and *Corbicula fluminea*, *in vivo*, and in the cell line HTC *in vitro*. The bivalve was exposed to the effluent and different times of exposure were applied (6, 24 and 96h). After exposure 3 recuperation times (24, 72 and 144h) were given to the animals. The control was water of artesian well. Genetic damaged was assessed by the comet assay (pH>13). We observed that at 96h, an increase in DNA damaged occurred and these were gradually repaired in the recuperation times. Together with the comet assay also biochemical parameters of the gills were analyzed, these were catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST). The results showed that the animals showed reduced activity of CAT activity in the 24 and 96h of treatment, since that it could possibly already have direct excretion of hydrogen peroxide by the gills, or sufficient action of the endogenous enzyme glutathione peroxidase (GPx). As for the GST, this was kept at higher levels at the 24 and 96h, and was kept high even with 144h recuperation treatment. The breakages detected by the comet assay could be attributed mainly to the PAH which, when metabolized to intermediary compounds can form DNA-bulky adducts. We can also say that, together with the elimination of the damage by the DNA repair machinery, the high GST activity found in the 144h, showed that a protective effect could be taking place, by eliminating possible metabolites of the PAH when not exposed to the effluent. In another assay, the effluent was analyzed for his capacity to induce breaks or chromosome loss. The *Allium cepa* micronucleus assay did not demonstrated a raise in the number of micronuclei in 24 and 48 hours. By the other hand, the chemicals have caused primary damage in the cell line HTC when exposed for 2h. Both assays showed different responses, demonstrating a higher sensibility and efficiency in the comet assay. The metabolism system should also be taken in account since the cell HTC is proficient in phase I and II enzymes, and this capacity in metabolism is lower in the plant cells used in this study. The results suggest also that the main causers of damage present in the effluent need metabolic activation. So, this observation reinforce the idea that the PAH are the main factor causing DNA damage in this work, and that the mechanism of genotoxicity are better understand when bioassays of different nature are combined in the analysis.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1 – Teste de genotoxicidade em hemócitos de *Corbicula fluminea* pelo ensaio do cometa após 6, 24 e 96 horas de exposição ao efluente. C = controle em água de poço artesiano; T = Tratamentos com o efluente (mesma concentração). Escore médio de danos (ED) = somatória do número de células danificadas multiplicado pelo valor da classe de dano (de 1 a 3). Valores médios obtidos da contagem de 100 células por animal. A e B = viabilidade celular = 0,90 e 0,97 respectivamente. * Diferença estatística significativa por meio de ANOVA ($P < 0,001$) e Tukey; neste caso a significância foi observada em comparação ao controle do respectivo tempo e ao controle 0h.....53

Figura 2 – Figura 3. Média de células com danos (%) nos tempos de recuperação. Eixo X mostra a classe de danos (0 até 3). Eixo Y mostra os tratamentos utilizados, onde C=controle e T=tratamento, junto a seus respectivos tempos. Eixo Z mostra frequência média de células com danos (%)......54

Figura 3 – Teste de genotoxicidade em hemócitos de *Corbicula fluminea* pelo ensaio do cometa em efluente de refino de petróleo após 96h de exposição seguida dos tempos de recuperação dos animais em água de poço artesiano e mais o valor do controle inicial (0h). * Diferença estatística significativa por meio de ANOVA ($P < 0,001$) e Tukey entre todos os tratamentos de recuperação, exceto quando foi comparado a recuperação de 144h e o controle inicial 0h.....55

Figura 4 – Viabilidade celular mostrada no tratamento de 96h com efluente, e depois, após a recuperação de 144h. C=controle e T=tratamento, junto a seus respectivos tempos.....56

Figura 5 – Atividade das enzimas GST (A) e CAT (B) em brânquias de *Corbicula fluminea* submetidas a diferentes períodos de tratamento com o efluente permeado de refino de petróleo e após 144 horas de recuperação (REC) em água de poço artesiano e mais o valor do controle inicial (0h). Diferença estatística significativa ($P < 0,001$) foi observada entre os tratamentos por meio de ANOVA e Tukey: * em comparação ao controle do respectivo tempo e ao controle 0h; ** em comparação ao controle do respectivo tempo e; *** em comparação ao controle 0h.....57

ARTIGO 2

Figura 1 – Índice mitótico obtido a partir de células meristemáticas de raízes em *Allium cepa* expostas ao efluente de refino de petróleo, sendo 24h de exposição para 25 (P25), 50 (P50) e 100% (P100/24h) e ainda 48h para 100% de efluente (P100/48h).....75

Figura 2 – Teste de genotoxicidade em células de hepatoma de rato (HTC) pelo ensaio do cometa em efluente de refino de petróleo após 2h de exposição direta na cultura. * Diferença estatística significativa comparada ao controle negativo por meio de ANOVA ($P < 0,001$) e Tukey. CTR- = controle negativo; CTR+ = controle positivo; TR 1, TR2, TR3, TR4 e TR5 são os tratamentos de 500, 200, 100, 25 e $5\mu\text{l}/1000\mu\text{l}$ de meio de cultura, respectivamente. O desvio padrão da amostra TR5 foi igual a zero.....76

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Constituintes monoaromáticos e poliaromáticos presentes no efluente58

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos do efluente obtidos nos diferentes tempos experimentais após os tratamentos e do efluente original fornecido pela refinaria. C = controle de cada tempo de exposição. T = Tratamento com o efluente em diferentes tempos.....59

Tabela 3 – Valores médios de danos observados pelo ensaio do cometa em hemócitos de *Corbicula fluminea* tratado em três tempos de exposição.....60

ARTIGO 2

Tabela 1 – Constituintes monoaromáticos e poliaromáticos presentes no efluente77

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos do efluente78

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA = do inglês Analysis of Variance (Análise de variância)

B[a]p = Benzo[a]pireno

BTEX = Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno

CAT = Catalase

CDNB = do inglês 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (1 cloro 2-4 dinitrobenzeno)

CG-DIC = Cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização em chama

CHO = do inglês Chinese Hamster Ovary (Ovário de hamster chinês)

DMSO = do inglês Dimethyl Sulfoxide (Dimetil sulfóxido)

DNA = do inglês Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)

EDTA = do inglês Ethylene Diamine Tetra-Acetic acid (ácido etilendiamino tetra-acético)

ERO = Espécies reativas de oxigênio

GSH = Glutathiona reduzida

GST = Glutathiona -S- transferase

HPA = Hidrocarboneto Policíclico Aromático

HTC = células de hepatoma de rato *Rattus norvegicus*

LAFLURPE = Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética Eletrônica

LMP = do inglês Low Melting Point (Ponto de fusão baixo)

MMS = Metilmetanosulfonato

MN = Micronúcleo

NaCl = Cloreto de Sódio

NaOH = Hidróxido de Sódio

NER = do inglês Nucleotide Excision Repair (Reparo por excisão de nucleotídeo)

NMP = do inglês Normal Melting Point (Ponto de fusão normal)

PVC = Policloreto de Vinila

SCGE = do inglês Single Cell Gel Electrophoresis (Ensaio do cometa)

SOD = Superóxido desmutase

UEL = Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Efluentes Industriais e os Danos ao DNA	15
1.2 Alguns Dejetos Industriais e os Compostos Presentes	18
1.3 Ecotoxicologia	19
1.4 Bivalves e <i>Corbicula fluminea</i> como Bioindicadores de Genotoxicidade	21
1.5 Ensaio do Cometa	22
1.6 Teste de micronúcleo em <i>Allium cepa</i>	24
1.7 Cultura de Células <i>in vitro</i>	25
1.8 Parâmetros Bioquímicos	26
2 OBJETIVOS	28
3 ARTIGO 1 - Indicador genotóxico (SCGE) e bioquímico (GST e CAT) em <i>Corbicula fluminea</i> exposto a um efluente de refino de petróleo	30
4 ARTIGO 2 - Comparação dos efeitos de um efluente industrial por bioensaios vegetal e animal, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	61
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Efluentes Industriais e os Danos ao DNA

No Brasil, o crescimento da indústria incidiu diretamente na geração de empregos. De janeiro a setembro de 2006, a indústria de produtos alimentícios, têxteis, químicos, metalúrgicos, etc., liderou os novos empregos no país abrindo 346.644 novos postos de trabalho, conforme o Cadastro Geral de Empregados e Desempregados (Caged) de setembro de 2006. Os benefícios à sociedade estão ligados ao crescimento econômico e ao desenvolvimento de novas tecnologias, assim como os milhares de produtos gerados pelas indústrias, no Brasil e também no mundo todo, estão relacionados aos dejetos gerados ao final das etapas de produção. Baseado no documento oficial da agência regulatória ambiental norte-americana, o *US EPA's Toxic Relatory Inventory (TRI)*, milhões de toneladas de despejos são liberados no ar, solo e água anualmente sem tratamentos específicos (físicos, biológicos, reciclagem) que visem o destino adequado.

Quando imprópriamente manuseados, estes despejos podem alcançar o meio ambiente e são capazes de alterar a composição anterior do meio devido a sua composição (HOUK, 1992). O despejo de grande carga orgânica de esgotos domésticos devolvida aos cursos d'água sem tratamento, a queima de combustíveis dos automóveis como fontes liberadoras de compostos químicos tóxicos e os despejos industriais que podem conter compostos orgânicos e inorgânicos além de metais, são potencialmente capazes de alterar um sistema biológico em níveis crescentes estendendo-se do nível molecular ou bioquímico, para o nível fisiológico ou individual, até os níveis da população e ecossistema (STEGEMAN et al., 1992). Assim sendo, os efluentes e os despejos industriais são motivo de grande preocupação dos especialistas e gestores ambientais. Trabalhos de pesquisadores do mundo todo relatam que eles são danosos ao homem e ao meio ambiente (MCGEORGE et al. 1985; HOUK, 1992; WELLS et al., 1994; CLAXTON et al., 1998; LE PENNEC; LE PENNEC, 2001; PACHECO; SANTOS, 2001; JHA, 2004; OHE et al., 2004).

Os compostos químicos presentes nestes dejetos industriais podem causar danos na molécula de DNA dos organismos. As lesões consistem em qualquer modificação capaz de introduzir um desvio da estrutura normal da molécula dupla e podem ser classificadas em duas categorias: 1) modificações de uma única base ou algumas bases e 2) distorções

estruturais. A primeira afeta a seqüência do DNA, o que permite que ocorra a replicação e a transcrição quando a fita do duplex de DNA é separada. Já as distorções estruturais podem resultar em impedimentos físicos para a replicação e a transcrição (LEWIN, 2001).

As conseqüências das atividades destes agentes podem variar desde quebras de fita simples e de fita dupla na cadeia de DNA, até ligações cruzadas (*cross-links*) entre bases de DNA ou entre bases de DNA e proteínas e formação de aductos por adição de compostos químicos às bases do DNA (PRESTON; HOFFMANN, 2001). Os agentes podem provocar quebras de cadeia de quatro maneiras diferentes: 1) diretamente por ligação dos compostos genotóxicos; 2) através da interação com radicais de oxigênio; 3) por meio da interação com outros intermediários metabólitos reativos e 4) como conseqüência da ação de enzimas de reparo por excisão (EASTMAN; BARRY, 1992; SPEIT; HARTMANN, 1995).

Os danos descritos acima são os precursores das mutações no DNA, que podem ocorrer pontualmente nos genes, assim como nos cromossomos, ambas podendo ocorrer em células somáticas e/ou germinativas. As mutações gênicas envolvem mudança de uma ou poucas subunidades, por substituição, deleção ou adição de pares de bases. Enquanto isso, as mutações cromossômicas podem ser classificadas, de acordo com o tipo de dano, sendo os estruturais os que envolvem deleção, duplicação, translocação ou inversão de partes de cromossomos. Os danos numéricos envolvem ganho ou perda de um ou mais cromossomos (aneuploidia) (HOUK, 1992) e também os indivíduos ou espécies com números cromossômicos (n) múltiplos do comum na espécie ou no gênero (PRESTON; HOFFMANN, 2001).

Assim sendo, mutações são as alterações genéticas hereditárias não resultantes de processos de recombinação ou segregação. Ainda que com a alta fidelidade do mecanismo de replicação de DNA somado ao aparato de reparo celular (revisão), as mutações podem se originar. Quando é resultante de atividades celulares ou interações ao acaso com o ambiente as mutações são chamadas espontâneas, entretanto, quando o DNA é exposto ou tratado com compostos chamados mutágenos, tal como muitos compostos químicos, estes podem elevar os níveis (números) de mutações espontâneas e são agora ditas mutações induzidas (LEWIN, 2001).

O acúmulo de mutações pode levar ao câncer. Diversos tipos de câncer, tais como o de bexiga, o gastrointestinal e a leucemia, além de má formação congênita e anomalias de caráter reprodutivo, têm sido observados em populações que vivem próximas a áreas de despejos (BUDMICK et al., 1984; GOLDMAN et al., 1985; GRIFFITH et al., 1989; JOHNSON, 1999).

Nestas populações, já foram registrados casos de dor de cabeça, náusea, irritações na pele e até doenças graves, como as que afetam o coração (GOLDMAN et al., 1985; GRIFFITH et al., 1989; SHINKA et al., 1991; MORIKAWA et al., 1997; MATHUR et al., 2005).

Além dos seres humanos, plantas e outros animais podem ser prejudicados quando expostos aos despejos industriais (HOUK, 1992). Kleklowski e Levin (1979) relataram que plantas coletadas em rios poluídos por despejos industriais apresentaram aumento nas mutações cromossômicas quando comparadas com plantas coletadas em locais não contaminados. Ma et al. (1995) também constataram que plantas tais como *Vicia faba* e *Allium cepa* sofreram danos citogenéticos como micronúcleos quando expostas a misturas complexas industriais. A planta *Tradescantia sp.* também refletiu, por meio do teste de mutação em pêlo estaminal, os efeitos provocados por águas poluídas por despejos industriais (CHEN; XIANG, 1983; CHEN et al., 1984; ZHENG, 1985; RUIZ et al., 1987).

Animais em geral também são atingidos e lesados por estarem expostos a águas ambientais contaminadas por despejos industriais. Alguns trabalhos observaram a ocorrência de danos citogenéticos, genotóxicos, além da incidência de neoplasias, em peixes de água doce ou salgada coletados nestes ambientes (BROWN et al., 1973; MALINS, 1984; HARSHBARGER et al., 1984; STEIN et al., 1990; MYERS et al., 1991; AL-SABTI; METCALFE, 1995; RAJAGURU et al., 2003; LEMOS et al., 2004). Roedores coletados próximo às áreas de despejos demonstraram aumento da incidência de micronúcleos em células de medula óssea (TICE, 1987; HARTMAN et al., 2003). Invertebrados filtradores, como moluscos e mexilhões, possuem a capacidade de acumular poluentes que podem atingir as células, causando danos em macromoléculas, como degradação protéica e peroxidação lipídica (HALLIWELL, 1993), alcançando até mesmo o DNA (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; VIDAL et al., 2001; DIXON, 2002; KLOBUCAR et al., 2003). Também anfíbios foram lesionados por ação de agentes químicos presentes em amostras ambientais poluídas por despejos (RALFH; PETRAS, 1997).

Assim sendo, metodologias de estudos de genética toxicológica buscam avaliar os potenciais efeitos da poluição ambiental na forma de agentes genotóxicos sobre a saúde do ecossistema (KLEIJANS; VAN SCHOOTEN, 2002) que pode ocorrer por medidas contínuas de uma variável ambiental bem como o biomonitoramento através de algum organismo biológico (SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

1.2 Alguns Despejos Industriais e os Compostos Presentes

Os despejos industriais têm diversas origens e são de natureza variada. Ohe e colaboradores (2004) revisaram estudos de mutagenicidade/genotoxicidade feitos em águas de superfície onde foram lançados diferentes tipos de despejos. Entre estes estão casos de despejos ilegais de indústrias de químicos em lagos da China (NUKAYA et al., 2001), de dejetos de indústrias petroquímicas nos rios do Japão (SAYATO et al., 1993) e no rio Schwechat da Polônia (HELMA et al., 1996), de efluentes de grandes complexos industriais no rio Guaíba no Brasil (VARGAS et al., 1995) e de metais pesados no rio St. Laurence do Canadá (LANGEVIN et al., 1992), além dos despejos provenientes diretamente de indústrias químicas no rio Saale, na Alemanha (BRAUN et al., 1994 apud OHE, 2004). Estes trabalhos demonstraram que é preciso haver séria preocupação com o destino destes rejeitos industriais, pois é um risco à saúde ambiental e humana.

A quantidade de despejos tóxicos lançados no ambiente é alarmante. Somente nos EUA, no ano de 2001, o relatório da *US EPA (Toxic Relatory Inventory -TRI)* aponta que as indústrias de alimentos e produtos relacionados liberaram mais de 25.000 toneladas de químicos em águas de superfície e o mesmo volume na atmosfera. O relatório ainda destaca que os principais emissores de agentes químicos na água de superfície e no ar são: as indústrias de processamento de metais, as refinarias de petróleo e, a maior de todas, as indústrias de produtos químicos e produtos relacionados.

Dentre as diferentes origens dos poluentes industriais, destacam-se os provenientes de indústrias de substâncias químicas (manufatura de compostos químicos, plásticos, borrachas, tinturas, corantes e pesticidas), indústrias de papel e de metais, e em especial, os efluentes provenientes de indústrias de refino de petróleo e derivados. Estes se caracterizam por apresentar toxicidade alta, atribuída, na maior parte das vezes, à parte solúvel que contém compostos inorgânicos (ex. sais, metais) e orgânicos (ex. óleos, graxa), cadeias de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA), entre outros (CLAXTON et al., 1998; ALMEIDA-VAL et al., 2002). Os compostos químicos monoaromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) são descritos como presentes em efluentes provenientes de refinarias de petróleo e relatados como mutagênicos em diversos estudos revisados por Ohe et al. (2004).

Estudos de campo revelam que hidrocarbonetos poliaromáticos despejados na água e no sedimento aos quais populações de peixes são expostas estão relacionados com o

aparecimento de neoplasias (STEIN et al., 1990; MYERS et al., 1991), demonstrando suas propriedades carcinogênicas (PACHECO; SANTOS, 2001). Metais, tais como As, Cd, Cr entre tantos outros, também podem ser encontrados em despejos e efluentes industriais e, por sua vez, também são prejudiciais à biota do meio e causam danos à saúde humana. Sendo assim, são necessárias avaliações químicas para identificação destes metais, bem como avaliações toxicológicas a respeito de seus efeitos biológicos (STEINKELLNER et al., 1998; KNASMÜLLER et al., 1998).

1.3 Ecotoxicologia

Pesquisadores pelo mundo todo buscam esclarecer os mecanismos de ação e os efeitos provocados por meio da liberação de compostos químicos tóxicos no ambiente (atmosfera, água e solo). A Ecotoxicologia é a ciência que tem como princípio básico o estudo dos efeitos dos agentes físicos, químicos e biológicos sobre os organismos vivos no ecossistema. Inclui as formas de transporte, distribuição, transformação, interação e destino final desses agentes (WALKER et al., 1996). Mais específico ainda pode ser o estudo da Ecogenotoxicologia, que aplica os princípios e técnicas da genética toxicológica para avaliar os potenciais efeitos da poluição ambiental, por exemplo, de misturas complexas industriais, na forma de agentes genotóxicos sobre a saúde do ecossistema (KLEIJANS; VAN SCHOOTEN, 2002; BELFIORE; ANDERSON, 2001).

De acordo com o nível de organização biológica, são fixados parâmetros que sinalizam biologicamente alterações associadas à presença de contaminantes. Sendo assim, pode-se atribuir o nome de biomarcadores aos parâmetros que expressam qualquer alteração biológica relacionada à presença de um composto químico no ambiente medida dentro do organismo ou em seus produtos (DNA, enzimas, fezes e penas), que indica uma mudança comparada ao estado normal e que não pode ser detectada no organismo intacto. Outro parâmetro é chamado de bioindicador; trata-se de um organismo que fornece informações sobre as condições ambientais de seu hábitat por sua presença ou ausência ou pelo seu comportamento (VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996).

Muitos princípios e técnicas da ecogenotoxicologia verificam alterações na seqüência do DNA genômico (KLEIJANS; VAN SCHOOTEN, 2002). Já se conhece que todos os organismos sofrem um determinado número de mutações como resultado normal de

operações celulares normais ou de interações com o ambiente. Porém, a ocorrência de mutações pode ser aumentada pela interação, contato ou tratamento com certos compostos (LEWIN, 2001), sendo então avaliadas nos estudos de efeitos adversos de xenobióticos em organismos vivos (PARKINSON, 2001).

Segundo Ian Freshney (2001) e Brendler-Schwaad et al. (2005), muitos ensaios biológicos que já existem são aplicados, *in vitro* ou *in vivo*, para compostos químicos isolados ou em misturas complexas com os objetivos de elucidar seus mecanismos de ação, as respostas que induzem e de medir a genotoxicidade destes agentes. Jha (2004) salienta a importância de testes *in vitro*, tais como ensaios com bactérias e cultura de células de mamíferos e, por outro lado, os testes *in vivo*, com plantas e animais, ressaltando que ambos são relevantes como metodologias de estudo e que possibilitam bons resultados nos estudos genotoxicológicos.

Ohe et al. (2004) e Jha (2004) revisaram em estudos que utilizaram a genética toxicológica, o progresso ocorrido nas duas últimas décadas, da avaliação do impacto de agentes físicos e compostos químicos genotóxicos de despejos industriais e águas de superfície em organismos diversos. Eles descreveram os diversos tipos de bioensaios genéticos capazes de detectar danos no DNA, por diferentes mecanismos de ação. Por exemplo, na década de 70 foi desenvolvido o teste de Ames, que usa linhagens de *Salmonella typhimurium* incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem sua capacidade de síntese. Este ensaio vem sendo o mais utilizado dentre todos os testes de mutagenicidade e pode ser aplicado em amostras ambientais de despejos industriais.

Além do ensaio em procariontes, podem ser usados ainda outros organismos sentinelas ou bioindicadores, tais como as plantas (*Allium cepa*, clone híbrido 4430 de *Tradescantia* [*T. subcaulis* Bush x *T. hirsutiflora* Bush], *Vicia faba*, entre outras) (RANK; NIELSEN, 1993; MA, 1999; CHANDRA et al., 2005; SRIVASTAVA et al., 2005) e os animais, como peixes (*Oncorhynchus mykiss*, *Tilapia rendalli*) (AL-SABTI; METCALFE, 1995; LEMOS et al., 2004), invertebrados filtradores, como moluscos e mexilhões (*Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*) (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; VIDAL et al., 2001; DIXON, 2002; KLOBUCAR et al., 2003), roedores (HARTMAN et al., 2003) e anfíbios (*Rana clamitans*, *Bufo americanus*) (RALFH; PETRAS, 1998), entre outros (HARTMAN et al., 2003).

1.4 Bivalves e *Corbicula fluminea* como Bioindicadores de Genotoxicidade

Na literatura se destacam inúmeros tipos de bioensaios com o objetivo de analisar os efeitos tóxicos e genotóxicos de várias espécies químicas sobre os organismos vivos (MA, 1999), o que inclui medir a genotoxicidade de uma ampla série de despejos e efluentes industriais (CLAXTON et al., 1998). Nos últimos anos, nota-se um aumento nas pesquisas toxicológicas que utilizam moluscos e mexilhões em bioensaios ambientais (KLEINJANS; VAN SCHOOTEN, 2002). A escolha destes animais é devido à sua capacidade de filtrar grandes volumes de água, acumular uma ampla gama de contaminantes e refletir as mudanças nos níveis de poluição de seu ambiente.

Nos estudos que utilizam moluscos, de uma forma geral, as células da glândula digestiva, das brânquias e da hemolinfa são as ferramentas biológicas utilizadas para avaliação toxicológica ambiental (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; JHA, 2004; MILLER et al., 2005). Em se tratando de ensaios de genotoxicidade, alguns autores usam preferencialmente a hemolinfa. Steinert (1998) realizou avaliações genotóxicas utilizando hemolinfa do molusco *Mytilus galloprovincialis* e observou que, quando este esteve na presença de HPA e simultaneamente submetido à luz solar, houve uma redução do crescimento do animal e um aumento nos danos do DNA em relação ao organismo controle. Pavlica et al. (2001) utilizaram hemócitos para o SCGE de mexilhão zebra *Dreissena polymorpha* exposto ao pentaclorofenol ou mantido em pontos do Rio Sava, o qual recebe efluentes de uma indústria química e esgoto doméstico. Klobucar et al. (2003) avaliaram hemolinfa do mesmo mexilhão quanto à genotoxicidade de amostras ambientais por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo. Rigonato et al. (2005) descreveram a utilização de hemolinfa como um bom tecido para estudo, dadas às facilidades de manipulação e a eficiente resposta frente a compostos estressores do DNA. Villela et al. (2006) padronizaram a utilização de mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) quanto a sua exposição a contaminantes ambientais, a partir do ensaio do cometa em hemolinfa.

O molusco bivalve *Corbicula fluminea* utilizado no presente trabalho, teve sua origem no sudeste da Ásia e, ao final do século XIX, foi introduzido na América do Norte de onde se espalhou pelas Américas (ARAUJO et al., 1993). Ele vive frequentemente em córregos e rios com fundos arenosos ou enlameados, contendo pedras e rochas frouxas (THE ASIATIC CLAM, 2006).

Dentre as características morfofisiológicas destes animais destacam-se o fato de serem hermafroditas, tendo um testículo anterior e um ovário posterior, que juntos confluem num gonoduto comum. Os ovos são fertilizados numa câmara suprabranquial, e as larvas trocófora e véliger, 1° e 2° estágios larvais respectivamente, são fertilizadas na câmara branquial. Quando avança em seu desenvolvimento, as larvas véliger são então expelidas para a coluna d'água. Estes mariscos vivem de 2 a 4 anos e dois anéis de crescimento são produzidos por ano, alcançando tamanho médio de 3,5 a 5 cm (THE ASIATIC CLAM, 2006).

Johns e Luoma (1990), Roberts (1996), Bilos et al. (1998) e Basack et al. (1998) consideram em especial o bivalve *C. fluminea*, um organismo adequado para o monitoramento ecotoxicológico, uma vez que comprovadamente podem apresentar respostas fisiológicas e bioquímicas diferenciadas, quando expostos a contaminantes. Esta espécie possui a capacidade de filtrar grande volume de água, acumulando uma ampla gama de contaminantes tais como metais pesados (BAUDRIMONT et al., 1997), retendo hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) (NARBONNE et al., 1999) e podem refletir os efeitos destes e demais compostos químicos poluentes presentes no ambiente (JOHNS; LUOMA, 1990; ROBERTS, 1996; BASACK, 1997; BILOS et al., 1998). Rigonato et al. (2005) padronizaram a utilização da glândula digestiva e da hemolinfa de *C. fluminea* na avaliação de amostras ambientais num ribeirão em Londrina – Paraná, Brasil, enquanto que Narbonne e colaboradores (1999) avaliaram o acúmulo de HPA presentes no sedimento neste mesmo bivalve.

1.5 Ensaio do Cometa

No mundo todo, o “*Single Cell Gel Electrophoresis*” (SCGE) ou ensaio do cometa, tem sido amplamente usado como teste de genotoxicidade (TICE et al., 2000; BRENDLER-SCHWAAD et al., 2005). Comparado com outros métodos, o ensaio do cometa tem se mostrado altamente sensível na detecção de danos no DNA em células individualizadas (SINGH, 1998; SPEIT; HARTMANN, 1999; TICE et al., 2000; SINGH et al., 2000; PAVLICA, 2001; RAJAGURU, 2003; VILLELA et al., 2006). Em sua primeira versão, o pH neutro na solução tampão eletroforética detectaria quebras de cadeia dupla no DNA (ÖSTLING; JOHANSON, 1984). Quando utilizado na sua versão alcalina, que desnatura o DNA (SINGH et al., 1998; SPEIT; HARTMANN, 1999), o ensaio detecta também quebras de

cadeia simples e sítios álcali-labeis em células individuais. Em certas condições, o ensaio também detecta ligações entre moléculas de DNA (DNA-DNA) e DNA ligados a proteínas (DNA-PTS) evidenciadas após relativa diminuição na migração do DNA comparado com grupos controle (HARTMAN et al., 2003).

Os danos observados no DNA são considerados primários, ou seja, são passíveis de correção; dessa forma, o ensaio do cometa não é utilizado para detectar mutações e sim lesões genômicas (GONTIJO; TICE, 2003).

O protocolo básico para realização deste teste se desenvolve inicialmente a partir de uma suspensão celular. Esta suspensão de células é misturada a agarose e depositada sobre lâminas citológicas, que se transforma em gel após solidificação. Depois de lisadas, as células são submetidas à desnaturação do DNA celular em solução tampão alcalina ($\text{pH} > 13$) e, então, à corrida de eletroforese, que se realiza por um tempo pré-determinado e sob condições previamente estabelecidas. No momento da análise, elas são coradas com brometo de etídeo e analisadas ao microscópio de fluorescência (SPEIT; HARTMANN; 1999).

As metodologias empregadas para avaliar o dano causado diferem. A avaliação pode ser feita tanto visualmente como por programas específicos de computador (*softwares*). Os danos são medidos e posteriormente classificados de acordo com o tamanho da cauda em 4 classes: classe 0- células que não apresentaram cauda; classe 1- com cauda menor que o diâmetro do núcleo; classe 2- com cauda entre 1 a 2X o diâmetro do núcleo e classe 3- com cauda maior que 2X o diâmetro do núcleo.

A detecção de migração de DNA alterada é dependente de vários fatores e parâmetros, tais como: concentração da agarose no gel, temperatura, pH e duração da desnaturação alcalina, temperatura, pH, voltagem, amperagem e duração da eletroforese (HARTMANN et al., 2003).

As vantagens deste ensaio incluem a aplicabilidade em vários tecidos e/ou tipos de células de organismos eucarióticos; a sensibilidade para detectar baixo nível de danos no DNA; o uso de um pequeno número de células por amostra; a facilidade geral do desempenho do teste, o curto tempo necessário para completar um estudo e o relativo baixo custo do ensaio (SPEIT; HARTMANN, 1995; 1999; EASTMAN; BARRY, 1999; LEE; STEINERT, 2003).

Vários trabalhos relatam o uso do ensaio do cometa como indicador de genotoxicidade, como em células de sangue de vertebrados e de hemolinfa de invertebrados aquáticos. Ainda outros incluem aves, anfíbios e peixes (PETRAS et al., 1995; NACCI et al.,

1996, RALPH; PETRAS, 1997; CLEMENTS et al., 1997; LEMOS et al., 2004) como bons bioindicadores ambientais a partir do ensaio do cometa. Hemolinfa de moluscos, crustáceos e celomas de anelídeos também têm sido usados para avaliação ambiental por meio do ensaio do cometa (NACCI et al., 1996; BOECK; KIRSCH-VOLDERS, 1997; GAUTHIER et al., 1997; GIELAZYN et al., 2003; SASTRE et al., 1997; SALAGOVIC et al., 1996; STEINERT, 1998).

1.6 Teste de Micronúcleo em *Allium cepa*

A aplicação deste método é ampla e consiste na investigação de danos no DNA causados por propriedades de vários produtos químicos incluindo os de indústrias farmacêuticas e também os presentes amostras ambientais do solo, ar e água (MACGREGOR, 1987). O teste do micronúcleo é o ensaio, *in vivo*, mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). Quando isso acontece, o material genético fragmentado ou perdido não se incorpora corretamente ao núcleo da célula filha, originando um novo núcleo de tamanho menor que o principal, o micronúcleo (FENECH et al., 1999) Este teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos (SCHMID, 1975), mas é também realizado em ratos (HEDDLE, 1983) e plantas (MA et al., 1995).

Os bioensaios com plantas são conduzidos principalmente para monitoramento de contaminantes ambientais e de misturas complexas. As células podem apresentar MN caso misturas complexas industriais, fármacos ou qualquer outro composto xenobiótico cause dano ao DNA e este permaneça após o término do ciclo celular (MA et al., 1995). É importante ressaltar que a divisão celular é essencial para a formação de MN, sendo estes, em função disso, analisados nas células da geração F1, presentes na raiz, que são resultantes de mais de um ciclo celular.

Micronúcleo (MN) em pontas de raiz foi inicialmente observado por Evans et al. (1959). No entanto, somente após o aprimoramento do protocolo experimental desenvolvido por Ma et al. (1995) para população sincronizada de células de ponta de raiz (células da geração F1), este ensaio passou a ser mais usado em plantas. Segundo Majer et al. (2003), estes ensaios são principalmente conduzidos, em plantas, para monitorar ambientes sujeitos a

contaminantes e misturas complexas, enquanto, em células cultivadas de mamíferos e roedores, *in vivo*, têm sido mais usados para investigar a potencialidade genotóxica de substâncias químicas industriais e de produtos farmacêuticos.

Assim como descrito para células animais o princípio é o mesmo em plantas, a ocorrência de micronúcleos se dá a partir de corpos extranucleares de material cromatídeo, formados como consequência de quebra cromossômica ou por aneuploidia durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas (SCHIMID, 1976).

Além de ser um parâmetro de mutagenicidade, o bioensaio do MN em *Allium* tem a vantagem do baixo custo para ser realizado, pois não exige condições laboratoriais caras tal como casa de vegetação ou câmara de crescimento (MA et al., 1995).

1.7 Cultura de Células *in vitro*

Ensaio biológicos de curta duração, baixo custo, sensíveis e confiáveis são procurados para avaliação de amostras ambientais (MITCHELMORE et al., 1998; AVISHAI et al., 2002; KLOBUCAR et al., 2003). Estes ensaios podem detectar mutagenicidade, clastogenicidade, recombinogenicidade, conversão gênica, alterações e reparo do DNA, a partir da ação de substâncias químicas genotoxicamente ativas e potencialmente carcinogênicas por entrar em contato com a molécula de DNA (MENOLI, 2000).

Os sistemas *in vitro* apresentam facilidade para padronizar as condições experimentais (densidade populacional, pH, temperatura, composição do meio de cultivo), economia e boa reprodutibilidade dos resultados, uma vez que o material apresenta uniformidade em requisitos metabólicos e em seu comportamento (RABELLO-GAY, et al., 1991). Vale ressaltar que as células em cultura apresentam a mesma organização dos cromossomos e do DNA que a das células *in vivo* (RODRIGUES, 1991).

Diferentes tipos celulares utilizados nos ensaios *in vitro*, são aplicados na avaliação de amostras ambientais aquáticas. Por exemplo, há um estudo em que foram utilizadas células epiteliais primárias de truta arco-íris na investigação de contaminantes ambientais (DOWLING; MOTHERSILL 2001) e outro em que houve a aplicação da linhagem celular de

hepatoma de peixe (RTH-149) na avaliação genotóxica do rio Kishon, Israel, pelo ensaio do cometa (AVISHAI et al., 2002).

Além de ensaio *in vivo*, o cometa vem sendo utilizado por pesquisadores do mundo todo em testes *in vitro* e em estudos ambientais. Na Alemanha, hepatócitos primários de peixes (Zebrafish - *Danio rerio*) foram cultivados em cultura e submetidos às amostras ambientais do rio e avaliados pelo ensaio do cometa (SCHNURSTEIN; BRAUNBECK, 2001). Na Ásia (China), linfócitos humanos foram utilizados na avaliação de despejos domésticos em um rio por meio do ensaio do cometa (ZHONG et al., 2001) e em Israel, também foram utilizados testes *in vitro* e ensaio do cometa para amostras ambientais. Por exemplo, no rio Kishon, uma linhagem celular de hepatoma de peixe (RTH-149) foi avaliada, pelo ensaio do cometa, quanto à genotoxicidade de metais pesados e materiais orgânicos, mostrando haver, mais uma vez, eficiente aplicação deste ensaio para testes *in vitro* de amostras ambientais (AVISHAI et al., 2002).

1.8 Parâmetros Bioquímicos

Bivalves do gênero *Corbicula sp.* têm sido usados como um monitor biológico em ambientes de água doce e podem ser usados para avaliar a presença de compostos orgânicos em água por parâmetros bioquímicos (BASACK, 1997). Nestes animais, espécies reativas de oxigênio (ERO) são constantemente produzidas como subproduto da respiração. Estas causam numerosos efeitos deletérios incluindo peroxidação lipídica, inativação de enzimas, oxidação das bases do DNA e degradação protéica (HALLIWELL, 1993).

Para proteger contra as ERO, as células se utilizam de processos específicos mediados por agentes antioxidantes não enzimáticos como os tocoferóis, ácido ascórbico, carotenos e os antioxidantes enzimáticos tais como a superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa-S-transferase (GST). Além da constante produção de ERO pelas células, alguns moluscos podem responder à exposição aos xenobióticos pela indução destas enzimas específicas (VAN der OOST et al., 2003).

As reações catalisadas por essas enzimas são divididas basicamente em duas fases. As enzimas da família do citocromo P450 (CYP) são classificadas como da fase I de metabolização e parecem estar diretamente relacionadas ao processo de ativação de grande parte dos xenobióticos. Estas reações são frequentemente oxidativas e inserem um grupo

funcional polar, por ex. OH⁻, no contaminante lipofílico tornando-o mais hidrofílico. Na fase II, ocorre a transformação dos xenobióticos por conjugação com compostos endógenos de ocorrência comum nas células, gerando produtos hidrossolúveis e de fácil excreção, principalmente pela ação das enzimas glutationa-S-transferase (GST) e UDP Glicuronil Transferases (UDPGT) (MARTINEZ, 2006).

As GST formam um grupo de enzimas multifuncional e estão envolvidas na detoxificação celular e excreção de muitas substâncias fisiológicas e xenobióticas (VAN der OOST et al., 2003). As Catalases, juntamente com a GST, decompõem o peróxido de hidrogênio e a primeira vem sendo também utilizada como indicador bioquímico (ALMEIDA et al., 2005). Os bivalves metabolizam muitos agentes carcinogênicos de maneira análoga aos organismos mamíferos (STEGEMAN; LECH, 1991) formando também os mesmos tipos de metabólitos dos mamíferos (DE MAAGD; VETHAAK, 1998).

Houk (1992) apontou a relevância de se detectar contaminantes presentes em misturas complexas que sejam potencialmente mutagênicos ou carcinogênicos. Para analisar essa potencialidade existe mais de 200 bioensaios (MA, 1999) que, uma vez associados com indicadores químicos, identificação e análise dos constituintes da mistura e com indicadores físicos, como temperatura e condutividade, levam ao sucesso do estudo (HOUK, 1992; JHA, 2004). No presente trabalho, análises químicas, determinações de atividades enzimáticas, testes biológicos com plantas (*Allium cepa*) e animais (*Corbicula fluminea*) e estudo *in vitro* com células de hepatoma de (células HTC), foram realizados com a intenção de caracterizar o efeito genotóxico potencial de um efluente de refino de petróleo e correlacionar os resultados obtidos nestes ensaios.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

A presente pesquisa buscou avaliar um efluente permeado do biorreator de refinaria de petróleo quanto a sua capacidade de ser genotóxico e mutagênico em diferentes sistemas celulares e de alterar atividades enzimáticas. Buscar correlacionar estes resultados com a sua composição química a fim de entender os mecanismos causadores de danos, reparo e alterações fisiológicas.

Objetivos específicos

- Conferir se o molusco bivalve *Corbicula fluminea* comporta-se como um bom bioindicador de efeitos genotóxicos e bioquímicos causados por substâncias químicas de amostra complexa.
- Avaliar a capacidade genotóxica do efluente de refinaria de petróleo, por meio da análise de hemócitos quanto à produção de cometa, após exposição do molusco *C. fluminea* a diferentes tempos de tratamento.
- Verificar como este mesmo animal responde à exposição ao efluente a partir da utilização de parâmetros bioquímicos enzimáticos obtidos nas brânquias.
- Avaliar o bivalve *C. fluminea* quanto à capacidade de se recuperar de possíveis danos causados ao DNA e de alterações enzimáticas ocorridas após exposição ao efluente.
- Observar os possíveis efeitos mutagênicos da substância-teste, como quebras cromossômicas ou aneuploidias, que viessem a causar a formação de micronúcleos (MN) em células da geração F1 de raízes de *Allium cepa*.

- Avaliar a genotoxicidade do efluente em cultura de células de hepatoma de rato (HTC) proficientes em metabolização, diretamente expostas em meio de cultivo.

- Analisar os possíveis mecanismos de ação genotóxica dos componentes químicos presentes neste efluente de refino estudado, comparando os resultados alcançados em diferentes bioensaios, em células animais e vegetais e em protocolos desenvolvidos *in vivo* e *in vitro*.

ARTIGO 1

Indicador genotóxico (SCGE) e bioquímico (GST e CAT) em *Corbicula fluminea* (Mollusca) exposto a um efluente de refino de petróleo

Artigo a ser submetido à revista “Ecotoxicology and Environmental Safety”, Elsevier – San Diego, CA, USA

**Indicador genotóxico (SCGE) e bioquímico (GST e CAT) em *Corbicula fluminea*
(Mollusca) exposto a um efluente de refino de petróleo**

RESUMO

Milhões de toneladas de químicos tóxicos são liberados todo ano no solo, ar e água resultantes de ações antropogênicas tais como: transporte, agricultura, atividades doméstica e industrial. Esta última, incluindo em especial a de refino de petróleo, produz efluentes com metais pesados e químicos inorgânicos e orgânicos, como compostos hidrocarbonetos aromáticos, conhecidamente tóxicos. Neste trabalho, os efeitos biológicos de um efluente industrial de refino de petróleo foram avaliados no bivalve filtrador *Corbicula fluminea*. Pelo teste do cometa foram avaliados os danos causados no material genético de células de hemolinfa, enquanto os parâmetros bioquímicos enzimáticos foram medidos nas brânquias pela atividade enzimática da catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST). Um controle foi feito usando água de poço artesiano. A exposição em aquário ocorreu com durações de 6, 24 e 96h e depois de cada tempo os animais foram transferidos para aquários com água de poço, para recuperação, por 24, 72 e 144h. A genotoxicidade foi detectada no tempo amostral de 96h e sua recuperação foi gradual ao longo do tempo até se igualar ao nível basal obtido no controle. A CAT reduziu significativamente sua atividade em 24 e 96h, pois pode ter havido excreção direta de peróxido de hidrogênio pelas brânquias ou suficiente ação da enzima endógena glutathione peroxidase (GPx). Quanto à recuperação, a atividade da GST esteve aumentada em 24 e 96h e se manteve elevada mesmo após 144h demonstrando ação protetora desta enzima, que foi capaz de eliminar os possíveis intermediários metabólitos após a retirada do efluente, reduzindo os danos gradualmente. Enquanto isso, a CAT mostrou sutil aumento após 144h, demonstrando recuperação dos animais em água de poço. Os danos detectados em 96h podem ser atribuídos, principalmente, aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) que, juntamente com os monoaromáticos Etilbenzeno, Tolueno e Xilenos (BTEX), foram detectados quimicamente nas amostras do efluente. Estes HPA são metabolizados a compostos intermediários que podem formar aductos de DNA, os quais, quando reparados pelo mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo (*Nucleotide Excision Repair* - NER), geram fragmentos que podem ter sido detectados pelo ensaio do cometa. Admite-se que os danos tenham sido eficientemente reparados após os animais terem sido retirados do efluente e ainda pela atividade da GST que se manteve elevada mesmo no período de recuperação, eliminando os agentes causadores de danos. A utilização do *C. fluminea* é recomendada na aplicação combinada de ensaios biológicos genéticos e bioquímicos, pois permite entender melhor os mecanismos pelos quais amostras ambientais podem causar toxicidade.

Palavras-chave: *Corbicula fluminea*; Hemolinfa; Brânquias; Teste do Cometa; Enzimas; Dejeito de petróleo.

1 Introdução

Os benefícios trazidos pelas indústrias no Brasil e também no mundo todo à sociedade estão ligados ao crescimento econômico e ao desenvolvimento de novas tecnologias. No entanto, os milhares de produtos gerados pelas indústrias estão relacionados a dejetos gerados ao final das etapas de produção. Os despejos e efluentes industriais, que são produtos do desenvolvimento econômico e tecnológico industrial põem em risco a saúde humana e ambiental (Goldman et al., 1985; Griffith et al., 1989; Shinka et al., 1991) sendo demonstrado, em diversos estudos, o seu potencial genotóxico em organismos bioindicadores (McGeorge et al., 1985; Wells et al., 1994; Claxton et al., 1998; Le penec; Le penec, 2001; Pacheco; Santos, 2001; Jha, 2004).

A indústria de refino de petróleo, em particular, é conhecida por produzir efluentes genotóxicos que muitos pesquisadores mostraram serem potencialmente eficazes em relação a outros despejos. Brown et al. (1984) e Donnelly et al. (1985) destacam que indústrias de refinaria utilizam muita água durante o processo de refino e que os despejos gerados contêm normalmente água, sais, metais, óleos, graxas e misturas de vários compostos químicos orgânicos. Houk (1992) afirma que os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), nitrogênio heterocíclico e metais pesados são responsáveis, na maioria das vezes, pela toxicidade destes despejos.

Ensaio genéticos de toxicidade foram muitas vezes aplicados em estudos de despejos provenientes de indústrias de refino de petróleo (Houk 1992). Ensaio realizados com microrganismos mostraram que os tais despejos são capazes de induzir mutações em *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) e em *Aspergillus nidulans*, bem como causar danos cromossômicos neste último (Houk, 1992). Donnelly (1983) avaliou três frações orgânicas de um efluente de petróleo que mostraram ser mutagênicas pelo teste de Ames. Andon et al.

(1986) avaliaram a citotoxicidade de um efluente líquido de refino de óleo que mostrou produzir redução superior a 50% tanto na concentração de ATP celular como no índice de viabilidade das células de ovário de hamster chinês (CHO). Em anos mais recentes, os ensaios com invertebrados ganharam destaque na literatura mundial para estudos em áreas próximas às indústrias de refino e de outros derivados de petróleo. Por exemplo, Klobucar et al. (2003) avaliaram a genotoxicidade de amostras ambientais por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo (MN) utilizando hemócitos do mexilhão zebra (*Dreissena polymorpha*). Rigonato et al. (2005) descreveram haver genotoxicidade em molusco *Corbicula fluminea* expostos às águas ambientais coletadas em locais próximos a despejos de postos de gasolina. Dixon et al. (2002) reforçaram o conceito a respeito do uso de bivalves para monitoramento ecotoxicológico por mostrarem que os resultados obtidos em estudos de genotoxicidade com células de bivalves apresentam sensibilidade similar à observada em mamíferos. Johns e Luoma (1990), Roberts (1996), Bilos et al. (1998) e Basack et al. (1998) consideram os moluscos, em especial o bivalve *C. fluminea*, organismos adequados para monitoramento ecotoxicológico.

O molusco bivalve *Corbicula fluminea*, utilizado no presente trabalho, tem sua origem no sudeste da Ásia e, ao final do século XIX, foi introduzido na América do Norte de onde se espalhou pelas Américas. Ele vive frequentemente em córregos e rios com fundos arenosos ou enlameados, contendo pedras e rochas soltas (The Asiatic Clam, 2003). Esta espécie possui a capacidade de filtrar grande volume de água, acumulando uma ampla gama de contaminantes e podem refletir os efeitos de compostos químicos poluentes presentes no ambiente (Johns e Luoma, 1990; Roberts, 1996; Basack, 1997; Bilos et al., 1998; Narbone et al., 1999; Rigonato et al., 2005).

Quando um organismo é exposto a contaminantes químicos pode ocorrer o aumento de intermediários reativos e/ou espécies reativas de oxigênio (ERO) que interagem com a célula

e também com o DNA. Danos na célula e no DNA são geralmente reparados por mecanismos de defesa enzimática e não enzimática que reduz a um nível basal de danos (Van der Oost et al., 2003; Halliwell e Gutteridge, 2005). Estes mecanismos de defesa geralmente são mais utilizados na presença de compostos xenobióticos. Sabe-se que alguns moluscos podem responder à exposição a estes agentes pela indução destas enzimas específicas (Van der Oost et al., 2003). Este é mais um “endpoint” utilizados para avaliar a ação destes agentes nocivos presentes em amostras complexas.

No presente trabalho, o ensaio do cometa foi utilizado em células de hemolinfa do bivalve *C. fluminea*, com o objetivo de avaliar a genotoxicidade de um efluente de refino de petróleo, bem como avaliar a capacidade do organismo de se recuperar, em água de poço artesiano, dos danos induzidos por esse efluente. Além disso, este estudo também buscou caracterizar as respostas quanto à atividade bioquímica das enzimas catalase e glutathione-S-transferase de brânquias de *C. fluminea* após os diferentes tempos de tratamento com o efluente e tempos de recuperação posterior à exposição.

2 Materiais e Métodos

2.1 Efluente

No presente estudo foi utilizado um efluente, originado no refino de petróleo, após remoção de sólidos, colóides e tratamento biológico no local de sua geração, para ser testado quanto ao potencial genotóxico.

O efluente foi fornecido, assim como caracterizado, pelo Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética Eletrônica (LAFLURPE) do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Análises químicas para investigar a presença de BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno) e HPA (Hidrocarboneto Policíclico Aromático), descritas por Cayres em 2006 (Tabela 1), revelaram a presença de alguns destes componentes aromáticos no efluente, porém em concentrações abaixo do limite máximo permitido para descarte de efluentes industriais em corpos hídricos (CONAMA 357).

2.2 Coleta do *Corbicula fluminea* e sua manutenção em laboratório

Aproximadamente 200 moluscos bivalves da espécie *Corbicula fluminea*, de tamanho entre 1,5~3,0cm, foram coletados manualmente em um único ponto no Lago Igapó III, em Londrina e imediatamente transportados do local para o laboratório, em galão de plástico de 20L, com água do próprio local. Imediatamente, foram distribuídos em três (3) aquários de vidro de 8L de capacidade, contendo 5L de água não clorada, sob aeração constante, à temperatura ambiente em torno de 24°C e protegidos da exposição direta à luz solar. Nestas condições, os animais foram mantidos durante 20 dias antes do início dos experimentos, com objetivo de aclimatá-los e recuperá-los de qualquer efeito deletério do meio ambiente em que viviam. Rigonato (2005) e Vilela et al. (2006) descreveram haver redução ao nível basal de danos no DNA destes animais a partir do 9º e 7º dias, respectivamente. Isto sugere que ocorra a recuperação dos danos após este tempo e que as amostras estejam homogêneas no início dos tratamentos experimentais.

2.3 Teste de toxicidade estática aguda e teste para recuperação de danos

Depois do período de adaptação dos animais, os experimentos se iniciaram ao mesmo tempo, em aquários de 8L de capacidade, nos quais foram, individualmente, colocados 25 animais. Um (1) aquário, com água de poço artesiano, não clorada, serviu como controle e outros três (3) aquários, contendo o efluente foram usados para tratamentos de 6, 24 e 96 horas, conforme definido em ensaio piloto (dados não apresentados) que mostrou haver morte dos animais após 15 dias de exposição ao efluente. Todos os aquários receberam aeração constante e foram cobertos com filme plástico (de PVC *WydaPratic Red Rose*) para evitar perda por volatilização dos componentes do efluente. Os animais não foram alimentados durante o experimento e não houve morte de nenhum animal durante a experimentação.

Transcorrido cada tempo de tratamento, cinco (5) animais que haviam sido expostos ao efluente e cinco (5) animais do grupo controle (n=5) foram amostrados para o ensaio de genotoxicidade. Amostras de hemolinfa do músculo posterior adutor da concha do bivalve foram coletadas com seringa hipodérmica (de 1mL de volume). Os animais que restavam nos aquários com efluente iam sendo transferidos, ao final de cada tempo de tratamento, para um novo aquário contendo água não clorada, para que se mantivessem expostos em condições de recuperação dos possíveis danos causados pela exposição. Após os tempos de 24, 72 e 144 horas nestas condições, nova amostragem de hemolinfa foi feita em grupos de 5 animais. Os resultados observados nestes tempos foram comparados com os resultados obtidos ao final de cada tratamento.

2.5 Ensaio alcalino do cometa

O teste do cometa foi conduzido na sua versão alcalina, adaptado de Speit e Hartmann (1999). Hemolinfa extraída do músculo posterior adutor da concha de cada um dos bivalves foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Eppendorf) para concentrar as células. Estas foram ressuspensas em cerca de 0,5mL de sobrenadante, misturadas a 100µL de agarose LMP (0,5%, mantida a 37°C) e posteriormente dispersas e imobilizadas em um gel de agarose (NMP, a 1,5%) sobre lâminas citológicas. Apenas uma lâmina foi preparada com a hemolinfa extraída de cada animal. Após solidificação do gel, as lâminas foram submersas (1 hora a 4°C) em uma solução de lise contendo NaCl 2,5M, EDTA 100mM e Tris 10mM mais DMSO e Triton X-100, um potente detergente para lisar as células e dispersar os componentes celulares. Para a desnaturação do DNA, as lâminas foram imersas em uma solução tampão alcalina, pH>13, a 4 °C, contendo EDTA titriplex 100mM, NaOH 10N e H₂O deionizada, por um período de 20min. Em seguida, procedeu-se a uma corrida de eletroforese de 20min (4°C), a 300mA e 25V (~1,2V/cm). As lâminas foram então enxaguadas por 15 minutos com solução de neutralização (0.4M Tris-HCl, pH 7.5) e fixadas (10 minutos) com etanol absoluto.

2.6 Análise microscópica das lâminas

As lâminas coradas com o corante fluorescente DNA – específico, brometo de etídio (0,002mg/mL), foram examinadas ao microscópio de fluorescência (filtro de excitação de 515-560nm e filtro de barreira de 590nm), numa ampliação de 400X, com óleo de imersão.

Foram contadas 100 células por lâmina, por animal, as quais foram classificadas de acordo com o dano que apresentavam, ou seja, o tamanho da cauda formada por arraste de DNA fragmentado, em 4 classes: classe 0- células que não apresentaram cauda; classe 1- com cauda menor que o diâmetro do núcleo; classe 2- com cauda entre 1 a 2X o diâmetro do

núcleo e classe 3- com cauda maior que 2X o diâmetro do núcleo. Células com núcleo totalmente fragmentado não foram contabilizadas. Os escores de danos de cada tratamento foram calculados pela somatória do número de células identificadas em cada classe, multiplicada pelo valor da classe à qual pertenciam (de 1 a 3). Em todo o experimento, as células foram analisadas em teste cego, sempre pelo mesmo observador.

2.7 Análise de viabilidade celular

A viabilidade das células de hemolinfa coletadas do *C. fluminea* foi realizada como controle experimental de citotoxicidade por meio do método de Azul de Trypan descrito por Lindl e Bauer (1994). Uma pequena alíquota de células de cada tratamento (controle, efluente e recuperação) foi colocada numa câmara de Neubauer. As células foram coradas com o azul de Trypan (Trypan blue Stain, 0,4% - GIBCO) e contabilizadas de acordo com o seguinte critério de coloração: azul para células inviáveis (pois permite a entrada do corante através da membrana plasmática) e células normais, não coradas. Somente foram consideradas viáveis as amostras com sobrevivência celular maior que 80%, porcentagem obtida com a divisão do número de células vivas pelo total de células contadas.

2.8 Análise de parâmetros bioquímicos

Amostras das brânquias de animais tratados foram utilizadas para análises das enzimas glutationala-S-transferase (GST) e catalase (CAT). Este órgão foi extraído de animais controle e daqueles submetidos aos tratamentos com o efluente e mantido congelado a -80°C até análise. Posteriormente, foi pesado, homogeneizado em tampão fosfato 0,1M (pH=7,0) (3X o

volume), centrifugado durante 20 minutos a 14.700g (a 4°C) e o sobrenadante separado para as determinações enzimáticas. De acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), foi determinada a atividade da CAT seguindo-se a velocidade de decomposição de H₂O₂, por meio do decréscimo de absorbância em 240nm e esta foi expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína extraída das brânquias. Segundo a técnica de Keen e Willian (1976), foi calculada a atividade da GST seguindo-se a complexação da glutathiona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em 340nm e ela foi expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína branquial. A concentração de proteínas totais do sobrenadante foi determinada de acordo com Lowry et al (1951), em espectrofotômetro a 700 nm, usando albumina de soro bovino (BSA) para a curva-padrão.

2.9 Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos com a contagem das células com e sem cauda no ensaio do cometa foram avaliados pelo teste estatístico de análise de variância de médias (sigla do inglês - ANOVA) pelo programa *Jandel Scientific – SigmaStat 2.0*, entre os tratamentos aplicados: controle 0h, controles dos tempos de tratamento e tratamentos com o efluente. A ANOVA também foi utilizada para calcular a diferença estatística entre as variáveis bioquímicas. Em ambos os ensaios, genotóxico e bioquímico, seguiram-se o teste de Tukey para comparação múltipla de médias, $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,001$.

3. Resultados

3.1 Parâmetros físico-químicos e análises químicas

Os parâmetros físico-químicos do efluente (Cayres, 2006) foram comparados aos resultados das medidas dos parâmetros físico-químicos obtidos nos tempos amostrais usados no bioensaio, ou seja, após exposição dos moluscos em laboratório. Estes dados se encontram na Tabela 2.

3.2 Genotoxicidade em hemócitos de *Corbicula fluminea* e recuperação de danos

A Tabela 3 mostra os valores médios de células com danos (CD) e as classes de danos que essas células apresentaram no ensaio do cometa enquanto que a Figura 2 traz o escore médio de danos (ED). De acordo com a intensidade de dano, classe 1, 2 ou 3, o escore de danos permanece igual ou aumenta em relação à frequência de células com danos. Sendo assim, a média de células com danos no tempo de 96h foi 41,2 enquanto que o escore médio nesta exposição foi 69,6. Este valor do escore é significativamente diferente ($p < 0,001$) do seu respectivo controle, que foi de 6,6 sendo que o número médio de células com danos no controle, descritos foi 6,2. Os valores do controle inicial (0h) e dos controles dos itens tempo de exposição relativos tanto a CD quanto à ED não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre si.

Neste trabalho, foram aplicados três tempos de recuperação (24, 72 e 144h), posteriores às exposições de 6, 24 e 96h, com o intuito de avaliar a capacidade de reparo do DNA de *C. fluminea* aos danos induzidos pelo efluente. No entanto, uma vez que apenas com a exposição mais prolongada de 96h o efluente mostrou-se genotóxico, somente os resultados da recuperação deste tratamento estão representados nas Figuras 3 e 4. Observa-se que a genotoxicidade (valores de CD e ED) decresceu gradualmente ao longo dos tempos de 24 e 72h, $p < 0,05$, alcançando o nível basal de danos ao fim de 144h de recuperação.

A Figura 5 mostra a viabilidade celular encontrada nos grupos de células de hemolinfa coletados após os tratamentos nos tempos amostrais do controle, tratamento com efluente e recuperação. Todas as contagens foram superiores a 80%, considerando-se assim viável a realização do ensaio do cometa.

3.3 Indicadores bioquímicos: GST e CAT

As Figuras 6 A e B, mostram, respectivamente, as atividades de glutathione-S-transferase (GST) e de catalase (CAT) em brânquias de *C. fluminea* expostas ao efluente. A atividade da GST, que se manteve constante em todos os controles, mostrou uma tendência à elevar-se a partir das 24h de exposição ao efluente e se manteve neste nível significativamente elevado, visível à hora 96, até o final do período de recuperação. Por outro lado, a atividade da enzima antioxidante CAT, específica para reduzir peróxido de hidrogênio, ainda que demonstrasse uma tendência a elevar-se ao longo do tempo dentro dos controles, se mostrou em queda com a exposição ao efluente e se manteve baixa até o fim do tratamento (96h). Ao final do tempo de recuperação em água (144h) a atividade enzimática da CAT demonstrou uma tendência de ligeira recuperação.

4 Discussão

Este trabalho mostrou que o bivalve *Corbicula fluminea* fornece respostas de genotoxicidade e recuperação de danos avaliados pelo ensaio do cometa, bem como respostas bioquímicas das enzimas GST e CAT para o efluente de refino de petróleo testado. Alguns autores sugerem a utilização deste molusco como um bom bioindicador de amostras

ambientais, o que também pode ser sugerido neste caso que trata de um efluente industrial (Bilos et al., 1998; Narbonne et al., 1999; Rigonato et al., 2005). Foi observado que antes de os animais serem expostos a qualquer dos tempos de tratamento com o efluente, a quantidade de células danificadas ou de danos que apresentava sempre se assemelhava ao controle, o que representa um nível basal de danos. Este nível basal foi aumentando somente com uma longa exposição ao efluente de 96h, elevação esta que pode retroceder ao nível basal com apenas 144h na ausência do efluente. Está assim demonstrada a eficiência deste organismo como bioindicador de genotoxicidade. Rigonato et al. (2005) também haviam detectado a capacidade do *C. fluminea*, em responder ao agente sabidamente genotóxico metilmetanosulfonato (MMS) usado como controle positivo no teste do cometa efetuado no mesmo tipo celular (hemócitos) e nas mesmas condições experimentais usadas no presente estudo.

As análises químicas das amostras se mostraram de grande relevância para o entendimento dos resultados e compreensão das informações obtidas acerca do material de estudo. Em relação aos valores de parâmetros físico-químicos observados na origem do efluente, a variação no volume de oxigênio dissolvido foi, provavelmente, devida ao fato dos aquários com efluente e água de poço artesiano terem permanecido sob constante aeração. De forma semelhante, o pH do efluente nos três tratamentos variou, mantendo-se em torno da média de 7,83, valor 1,58 superior ao pH da amostra original do efluente. Este aumento pode estar relacionado às pequenas diferenças observadas na temperatura, parâmetro que não foi avaliado no momento em que o efluente foi disponibilizado.

Quanto aos parâmetros COT (Carbono orgânico total) e o DQO (Demanda química de oxigênio) estes foram mensurados em sua origem apenas para a caracterização do efluente. A análise cromatográfica descrita por Cayres (2006) qualificou e quantificou os compostos

monoaromáticos (BTEX) presentes neste efluente, a saber: etilbenzeno, tolueno e xilenos, bem como os poliaormáticos (HPA): benzo(a)antraceno, pireno e benzo(a)pireno.

Muitos trabalhos indicam mutagenicidade causada por BTEX e HPA, conforme revisão feita por Ohe et al. (2004). Um relatório internacional, o *US EPA's Toxic Relatory Inventory* (TRI) de 2001, destacou que estes compostos hidrocarbonetos monoaromáticos estão entre os 20 compostos mais liberados no ar e na água nos EUA. No rio Llobregat, na Espanha, o resultado positivo para o teste de Ames foi creditado, entre outros compostos, aos alquilbenzenos (composto orgânico monoaromático) presentes nas suas águas. Também o benzeno e o etilbenzeno, em diversos estudos, foram considerados mutagênicos em células de bactérias, fungos e leveduras, sendo o benzeno ainda mutagênico em ensaios *in vitro* com células de plantas e animais. Um derivado do tolueno também foi relatado como possivelmente carcinogênico para humanos. Assim como estes resultados foram positivos em estudos que utilizaram organismos diferentes em ensaios genéticos diferentes, a presença de etilbenzeno, tolueno e xilenos no efluente sugere que tenha havido contribuição destes componentes no aparecimento de resultados positivos do ensaio do cometa no molusco avaliado.

Em especial, outra classe de contaminantes também presentes no efluente estudado, os HPA vêm sendo descritos como compostos causadores de neoplasias em peixes (Stein et al., 1990; Myers et al., 1991) e como agente carcinogênico em vários organismos (Pacheco e Santos, 2001; White, 2002; Cebulska-Wasilewska et al., 2005).

Os compostos HPA requerem ativação metabólica antes de provocar dano no DNA. Isto envolve a produção de metabólitos eletrofilicos pelo sistema citocromo P-450 e estes mesmos metabólitos podem se ligar ao DNA nucleofílico produzindo uma variedade de lesões (Cohen e Rice, 2001; Lee e Steinert, 2003). Alguns HPA, após metabolizados, podem ligar-se à molécula de DNA e dar origem a aductos (Lee e Steinert, 2003) com diferentes estruturas e

atividades biológicas descritas em células de mamíferos (Ohe, 2004), bem como em invertebrados como *Mytilus edulis* (Ericson et al., 2002) e *Dreissena polymorpha* (Klobucar et al., 2003).

O benzo[a]pireno e o nitropireno são dois grupos de compostos aromáticos conhecidos por formar aductos após a ativação metabólica numa variedade de vertebrados (Roy et al., 1989). Peixes possuem um sistema P-450 muito ativo e aductos de metabólitos do benzo[a]pireno têm sido encontrados em *Parophrys vetulus* (Varanasi et al., 1989), *Lepomis macrochirus*, *Salmo gairdneri* (Smolarek et al., 1987) e *Ictalurus nebulosus* (Sikka et al., 1991). Também foram detectados danos pelo ensaio do cometa em hepatócitos de *Salmo trutta*, com exposição ao benzo[a]pireno e ao nitropireno (Mitchelmore e Chipman, 1998). Estes aductos podem ser reparados pela via de reparo por excisão de base (do inglês *Base Excision Repair* - BER) ou por excisão de nucleotídeo (do inglês *Nucleotide Excision Repair* - NER). Esta última via, NER, é conhecida por envolver a retirada de um fragmento de DNA em torno da lesão e se constitui na principal via de reparo de danos induzidos por HPA (Scicchitano, 2005). Danos incompletamente reparados por estas vias podem ter sido detectados pelo ensaio do cometa após as 96 horas de tratamento.

A relação entre a atividade de sistemas enzimáticos com a exposição à xenobióticos estão em grande quantidade na literatura (para revisão ver Van der Oost et al., 2003). Estas interações xenobióticos - sistemas enzimáticos, incluindo enzimas de detoxificação, geram intermediários reativos e espécies reativas de oxigênio (ERO) (Machala et al., 1997). Power e Sheehan (1996) e Manduzio et al. (2004) observaram aumento da atividade de GST como resposta ao estresse oxidativo quando outras enzimas antioxidantes estavam em baixa atividade. Neste trabalho, a presença de atividade aumentada da GST nos tratamentos de 24 e 96h empregados pode estar demonstrando a ocorrência de ERO ou de metabólitos intermediários em nível acima do basal encontrado nos respectivos controles. Camargo e

Martinez (2006) e Almeida e colaboradores (2005) mostraram aumento da GST quando expuseram peixes em córrego urbano (*in situ*) uma vez que há neste córrego diversos tipos de despejos e contaminantes. Assim como os compostos contaminantes em águas ambientais causaram elevação da presença da GST, os agentes presentes no efluente em estudo podem ter causado efeitos similares.

Para proteger as células contra ERO, além de enzimas de detoxificação das fases I e II, enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) são utilizadas. Várias são as evidências de que xenobióticos geram ERO, inclusive peróxido de hidrogênio (Wilhelm Filho et al., 2001). A atividade exclusiva da catalase é eliminar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) da célula, convertendo-o diretamente a oxigênio e água (Van der Oost et al., 2003) ou por meio da oxidação de substratos. Sendo assim, a atividade da CAT em *C. fluminea* seria um importante parâmetro indicativo de estresse oxidativo produzido pelo efluente. A tendência à queda da atividade da catalase em relação ao aumento do tempo de tratamento com o efluente poderia ser atribuída à ação alternativa da enzima GPx como mecanismo celular suficiente para a metabolização do H_2O_2 (Almeida et al., 2005), ou a capacidade das brânquias de excretar diretamente o peróxido de hidrogênio para a água (Wilhelm Filho et al., 1994), ou ainda devido à produção aumentada do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), visto que um excesso deste ânion pode inibir a atividade da catalase (Bainy et al., 1996).

Uma vez que o ensaio do cometa pode detectar danos no DNA induzidos num curto espaço de tempo, poder-se-ia esperar que houvesse danos causados por agentes genotóxicos no tempo mínimo de exposição de 6h. Buschini et al., (2003) e Bolognesi (2004) avaliaram amostras complexas obtidas em tempos de exposição de 3h e 20h. Porém, neste tempo mínimo de 6h de exposição, não foram observados danos significativos, os quais foram detectados somente com 96h de exposição. Mesmo que alguns autores encontrem resultados

positivos para misturas complexas num curto período de tempo, o resultado deste estudo pode ser compreendido pelo fato do efluente ser uma mistura complexa que apresenta muitos compostos químicos diluídos (Houk, 1992; Donnelly et al., 1995; Mitchelmore e Chipman, 1998). Essa mistura aumenta a dificuldade de se identificar os componentes presentes (Doe, 1995; Claxton et al., 1998) bem como de refletir o potencial genotóxico em tempos curtos, tais como 6 e 24h.

Assim como discutido anteriormente, os HPA detectados no efluente podem ser genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. Sendo assim, os resultados de genotoxicidade observados após 96h de exposição ao efluente podem ser atribuídos principalmente a eles. Mas, identificar claramente de onde surgiram as lesões primárias no DNA, não é uma tarefa fácil. Houk (1992) afirma que em misturas complexas, tal como o efluente estudado, pode ocorrer interações químicas (antagonismos, sinergismos, etc.) ou a produção de metabólitos tóxicos resultantes de várias vias de degradação, de origem química ou biológica. O efeito biológico dessas interações químicas e a produção de metabólitos tóxicos seriam as alterações no padrão de genotoxicidade, isto é, tempo de exposição e/ou gravidade da lesão.

Para avaliar se os danos produzidos após a exposição de 96h ao efluente eram reparáveis, os animais foram transferidos para água de poço artesianos, durante três tempos de recuperação, os quais mostraram ser suficientes para correção dos danos observados. Tendo conhecimento da presença de alguns dos agentes potencialmente genotóxicos neste efluente e conhecendo seus mecanismos de ação é possível justificar esta correção por diferentes hipóteses: Pode ter ocorrido o reparo por excisão de nucleotídeos de aductos que tenham sido induzidos por alguns componentes do efluente. Outra possibilidade pode ser a presença de espécies reativas de oxigênio no interior das células, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, inclusive, é utilizado como controle positivo para o teste do cometa por alguns autores (Singh et al., 1988; Gielazyn et al., 2003). A redução deste composto gera inúmeros

radicais hidroxil extremamente reativos capazes de causarem danos oxidativos no DNA (Gielazyn et al., 2003). Estes radicais hidroxil são então eliminados por reparo por excisão de bases.

5 Conclusão

Em suma, o bivalve *Corbicula fluminea* mostrou seu potencial como bioindicador toxicológico ao refletir as condições ambientais às quais foi submetido, e assim, confirmar como ferramenta para biomonitorar locais contaminados intermitentemente ou ambientes que tenham sofrido um acidente de contaminação. Este molusco mostrou ter sensibilidade ao refletir a ação de agentes contaminantes, o que foi demonstrado por meio de respostas bioquímicas enzimáticas e de genotoxicidade e reparo de danos pelo ensaio do cometa. A genotoxicidade detectada foi passível de reparo num período de tempo relativamente curto quando o molusco foi devolvido à água limpa, conferindo vantagem para a utilização destes animais em bioensaios.

6 Referências

Almeida, E.A., Bairy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 318, 21-30.

Andon, B., Jackson, M., Houk, V.S., Claxton, L., 1986. Evaluation of chemical and biological methods for the identification of mutagenic and cytotoxic hazardous waste samples, In: Petros, J.K., Lacy W.J., Conway, R. A. (Eds.), Hazardous and Industrial Solid Waste Testing: Fourth Symposium, ASTM STO 886, Philadelphia, PA, pp. 204-215.

Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Junqueira, V.B.C., 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology* 34, 151-162.

Basack, S.B., Oneto, M.L., Guerrero N.R.V., Kesten E.M., 1997. Accumulation and elimination of pentachlorophenol in the freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 497-503.

Basack, S.B.; Oneto, M.L.; Fuchs, J.S.; Wood, E.J.; Kesten, E.M., 1998. Esterases of *Corbicula fluminea* as biomarkers of exposure to organophosphorus pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 569-576,

Beutler, E., 1975. In: *Red blood cell metabolism: A manual of biochemical methods*. (2nd) Grunne and Straton, New York, 2-43.

Bilos C., Colombo J.C., Presa M.J.R., 1998. Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environ Pollut.* 99, 1-11.

Bolognesi, C., Buschini, A., Branchi, E., Carboni, P., Furlini, M., Martino, A., Monteverdea, M.; Poli, P., Rossi, C., 2004. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Sci Total Environ*, 333, 127-136.

Brown, K.W., Donnelly, K.C., Thomas, J.C., 1984. Use of short-term bioassays to evaluate environmental impact of land treatment of hazardous industrial waste, U. S. Environ. Protect. Ag., Project Summary, EPA-600/ 52-84-135, Ada, Sept.

Buschini, A.; Carboni, P.; Martino, A.; Poli, P.; Rossi, C., 2003. Effects of temperature on baseline and genotoxicants-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutat Res*, 537, 81-92.

Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ an urban stream in southern Brazil. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.* 21, 61-69.

Cayres, V.P. 2006. Processo de degradação e adsorção de compostos orgânicos aromáticos em água residual e efluente da indústria do petróleo. Dissertação de mestrado: Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais. Universidade Estadual de Londrina – PR.

Cebulska-Wasilewska, A., Wiecheć, A., Panek, A., Binková, B., Radim, J., Peter, S., Farmer, B., 2005. Influence of environmental exposure to PAHs on the susceptibility of lymphocytes to DNA-damage induction and on their repair capacity. *Mutat Res*, 588, 73-81.

Claxton, L.D., Houk, V.S., Hughes, T.J., 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat Res.* v. 410, p. 237-243.

Cohen, D.E., Rice, R.H. Toxic responses of the skin. In: Curtis D. Klaassen, (Ed.). *Casarett & Doull's, Toxicology, the basic science of poisons*. 6. ed. USA: McGraw-Hill Companies, 2001. p. 653-671.

Department of the Environment (DOE), 1995. The Second Priority Substance List, Canada Gazette Part v. 1, 4238-4240,

Dixon, D.R., Pruski, A.M., Dixon, L.R.J., Jha A.N., 2002. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis*. 17, 495-507.

Donnelly, K.C., Brown, K.W., Scott, D.R., 1983. The use of short-term bioassays to monitor the environmental impact of land treatment of hazardous wastes. In: Waters, M. D., Sandhu, S. S., Lewtas, J., Claxton, L., Chernoff, N., Nesnow, S. (Eds.). *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III*. New York: Plenum Press, 431-459.

Donnelly, K. C., Brown, K. W., Thomas, J. C., Davol, P., Scott, B. R., Kampbell, D., 1985. Evaluation of the hazardous characteristics of two petroleum wastes. *Hazard. Waste. Hazard. Matter*. 2, 191-208.

Ericson, G., Skarphedinsdottir, H., Zuanna, L.D., Svavarsson, J., 2002. DNA adducts as bioindicators of genotoxic exposure in indigenous and transplanted mussels, (*Mytilus edulis*) L. from Icelandic coastal sites. *Mutat. Res*. 516, 91-99.

Gielazyn, M.L., Ringwood, A., Pegorsch, W.W., Stancyk, S.E., 2003. Detection of oxidative DNA damage in isolated marine bivalve hemocytes using the comet assay and formamidopyrimidine glycosylase (Fpg). *Mutat Res*. 542, 15-22.

Goldman, L.R., Paigen, B., Magnant, M.M., Highland, J.H., 1985. Low birth weight, prematurity and birth defects in children living near hazardous waste site, Love Canal. *Hazard. Waste. Hazard. Matter*. 2, 209-223.

Griffith J., Duncan, R.C., Riggan, W.B., Pellom, A.C., 1989. Cancer mortality in U.S. counties with hazardous waste sites and ground water pollution. *Arch. Environ. Health*. 44, 69-74.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2005. *Free radicals in biology and medicine*. (3th). Oxford: Oxford University Press, p. 936.

Houk, V.S., 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review. *Mutat. Res*. 277, 91-138.

Jha, A.N., 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat. Res*. 552, 1-17.

Johns, C., Luoma, S.N., 1990. Arsenic in benthic bivalves of San Francisco Bay and the Sacramento/San Joaquin River delta. *Scienc. Tot. Environ*. 97, 08, 673-684.

Keen, J.H., Willian, B.J., 1976. Mechanism for the several activities of glutathione-S-transferase. *J. Biolog. Chem*. 20, 6183-6188,

Klobucar, G.I. V. M., Pavlica, M., Erben, R., Papes, D. 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquat. Toxicol*. 64, 15-23.

Le Penneec, G., Le Penneec, M., 2001. Evaluation of the toxicity of chemical compounds using digestive acini of the bivalve mollusc (*Pecten maximus*) L. maintained alive *in vitro*. *Aquat. Toxicol.* 53, 1-7.

Lee R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 544, 43-64.
Lindl T, & Bauer J. *Zell-und Gewebekultur. Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, p. 189, 1994.

Lowry, O.H., Rosenberbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurements with folin phenol reagent. *J. Biolog. Chem.* 193, 265-275,

Machala, M., Petrivalsky, M., Nezveda, K., Ulrich, R., Dusek, L., Piacka, V., Svobodova, Z. 1997. Responses of carp hepatopancreatic 7-ethoxyresorufin-O-deethylase and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants-a field study. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1410-1416.

Manduzio, H., Monsinjon, T., galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in the blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.*, 70, 83- 93.

Martinez, C. B. R., 2006. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Silva-Souza, A. T. Sanidade de organismos aquáticos no Brasil. São paulo: Abrapoa.

MCGeorge, I. J.; Louis, J. B.; Atherholt, T. B.; MC Garity, G. J. Mutagenicity analysis of industrial effluents results and consideration for integration into water pollution control programs. In: Waters, M.D., Sandhu, S.S., Lewtas, J., Claxton, L., Strauss, G., Nesnow, S. (Eds.). *Short Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures, IV.* New York: Plenum Press, 1985. p. 247-268.

Miller J.S., 1999. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by spectrofluorimetry *Anal. Chim. Act.* 388, 27-34.

Mitchelmore, C. L., Chipman, J.K., 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potencial value of the comet assay in environmental monitoring, *Mutat. Res.* 399, 135-147.

Myers, M.S., Landahl, J.T., Krahn, M.M., Mcc, B.B., 1991. Relation ship between hepatic neoplasm and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. WEST. COAST. *Environ. Health Perspect.* 90, 7-15.

Narbonne J.F., Djomo J.E., Ribeira, F.V., Garrigues, P., 1999. Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 42, p.1-8,

Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi. K. 2004. Mutagens in surface waters: a review, *Mutat. Res.* 567, 109–149.

- Pacheco, M., Santos, A.M. 2001. Biotransformation, endocrine, e genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 64-75.
- Pavlica, M., Klobucar, G.I.V.M., Mojas, N., Erben, R., Papes, D. 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay, *Mutat. Res.* 490, 209-214.
- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variations in the antioxidant defense systems of gill and digestive gland of the blue mussel, (*Mytilus edulis*). *Compar. Biochem. Physiol. Part C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 114, 99-103.
- Rigonato, J., Mantovani, M.S., Jordão, B.Q., 2005. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genet. Molec. Biol.* 28, 3, 464-468.
- Roberts, C.A., 1996. Selenium contamination in *Corbicula* transplanted into agricultural drains in the Imperial Valley, California, Division of Environmental Contaminants, Carsbad Field Office U. S. Fish and Wildlife Service.
- Roy, A.K., El-Bayoumy, K., Hecht, S.S., 1989. 32P-postlabeling analysis of 1-nitropyrene-DNA adducts in female Sprague-Dawley rats, *Carcinogenesis*, 10, 195–198.
- Scicchitano, D. A., 2005. Transcription past DNA adducts derived from polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 577, 146-154.
- Shinka, T., Sawada, Y., Morimoto, S., Fujinaga, T., Nakamura, J., OHKANA, T. 1991. Clinical study on urothelial tumors of dye workers in Wakayama City. *J. Urology*, 146, 1504-1507.
- Sikka, H.C., Steward, A.R., Kandaswani, C., Rutkowski, J.P., Zaleski, J., Kumar, S., Earley, K., Gupta, R.C., 1991. Metabolism of benzo(a)pyrene and persistence of DNA adducts in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). *Compar. Biochem. Physiol.* 100C, 25–28.
- Singh, N.P., Mc Coy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experim. Cell Res.* 175, 184-191.
- Smolarek, T.A., Morgan, S.L., Moynihan, C.G., Lee, H., Harvey, R.G., Baird, W.M., 1987 Metabolism and DNA adduct formation of benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in fish cell lines in culture. *Carcinogenesis*. 8, 1501–1509.
- Speit, G., Hartmann, A., 1999. The comet assay (single-cell gel test) - a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In Henderson, D.S. (ed.), *Methods in Molecular Biology, DNA Repair Protocols: Eucaryotic Systems*. Humana Press, Totowa, NJ, 113, 203–212.
- Stein, J.E., Reichert, W.L., Nishimoto, M., Varanasi, U., 1990. Overview of studies on liver carcinogenesis in English sole from Puget Sound: Evidence for a xenobiotic chemical etiology. II. Biochemical studies. *Scienc. Tot. Environ.*, 94, 51-69.

The Asiatic Clam, *Corbicula fluminea*. Disponível em ><http://www.pnl.gov/ecology/rivers/aquarium/clam>> Acesso em: 15/08/2006.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.

Varanasi, U. Reichert, W.L. Leeberhart, B.T. Stein, J.E., 1989. Formation and persistence of benzo(a)pyrene-diolepoxide-DNA adducts in liver of English sole (*Parophrys vetulus*), *Chem.-Biolog. Interact.* 69, 203–216.

Villela, I.V., 2006. DNA Damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat. Res.* 697, 78-86.

Wells, M.J.M., Rossano, A.J., Roberts, E.C., 1994. Textile wastewater effluent toxicity identification evaluation. *Environ. Contam. Toxicol.* 27, 555-560.

White, P. A., 2002. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixture. *Mutat. Res.* 515, 85-98.

Wilhelm Filho, D.W., Gonzalez-Flecha, B., Boveris, A., 1994. Gills diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. *Braz. J. Molec. Biol. Res.* 27, 2879-2882.

Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Tribess, T.B.; Pedrosa, R.C.; Soares, C.H.L., 2001. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acara (*Geophagus brasiliensis*). *Braz. J. Molec. Biol. Res.* 34, 719-726.

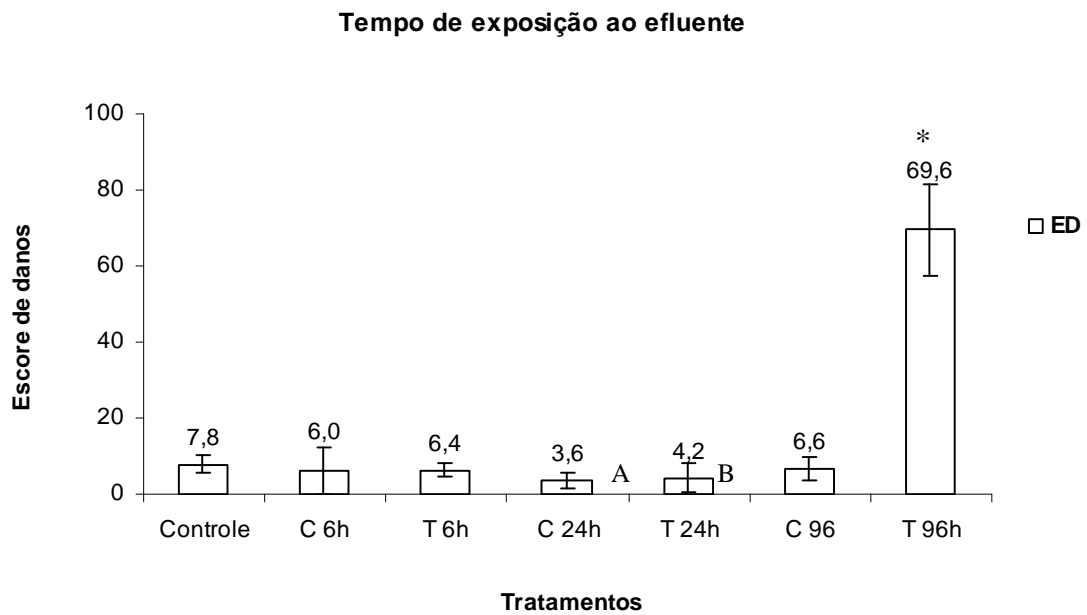


Figura 1 – Teste de genotoxicidade em hemócitos de *Corbicula fluminea* pelo ensaio do cometa após 6, 24 e 96 horas de exposição ao efluente. C = controle em água de poço artesiano; T = Tratamentos com o efluente (mesma concentração). Escore médio de danos (ED) = somatória do número de células danificadas multiplicado pelo valor da classe de dano (de 1 a 3). Valores médios obtidos da contagem de 100 células por animal. A e B = viabilidade celular = 0,90 e 0,97 respectivamente. * Diferença estatística significativa por meio de ANAVA ($P < 0,001$) e Tukey; neste caso a significância foi observada em comparação ao controle do respectivo tempo e ao controle 0h.

Recuperação em água de poço artesiano

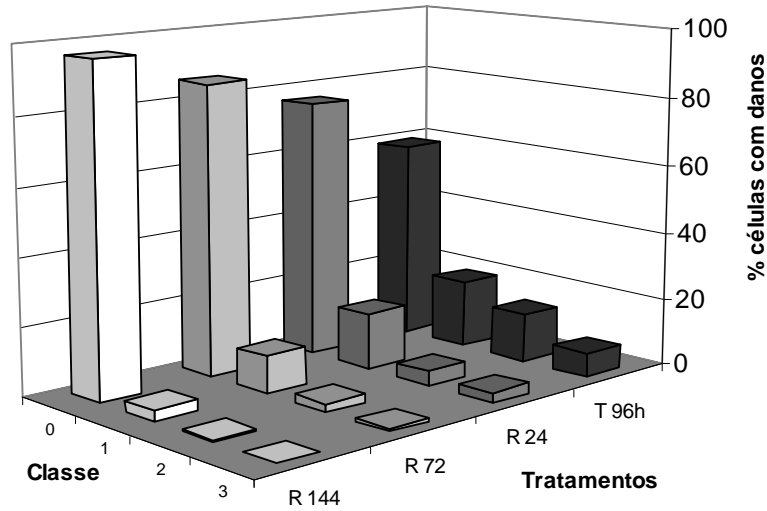


Figura 2 – Média de células com danos (%) nos tempos de recuperação. Eixo X mostra a classe de danos (0 até 3); Eixo Y mostra os tratamentos utilizados, onde C=controle e T=tratamento, junto a seus respectivos tempos; Eixo Z mostra frequência média de células com danos (%).

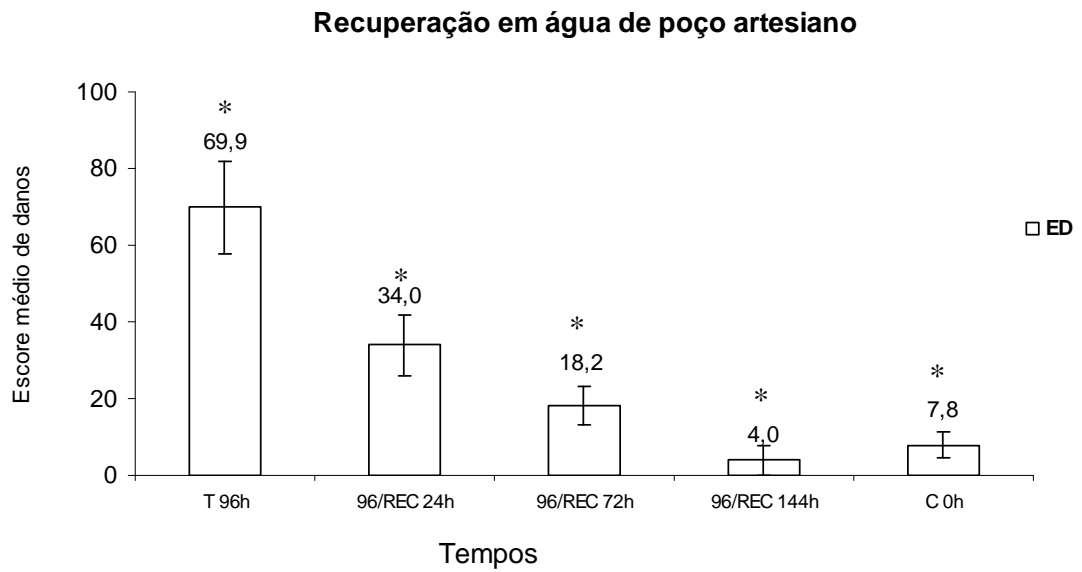


Figura 3 – Teste de genotoxicidade em hemócitos de *Corbicula fluminea* pelo ensaio do cometa em efluente de refino de petróleo após 96h de exposição seguida dos tempos de recuperação dos animais em água de poço artesiano e mais o valor do controle inicial (0h). * Diferença estatística significativa por meio de ANOVA ($P < 0,001$) e Tukey entre todos os tratamentos de recuperação, exceto quando foi comparado a recuperação de 144h e o controle inicial 0h.

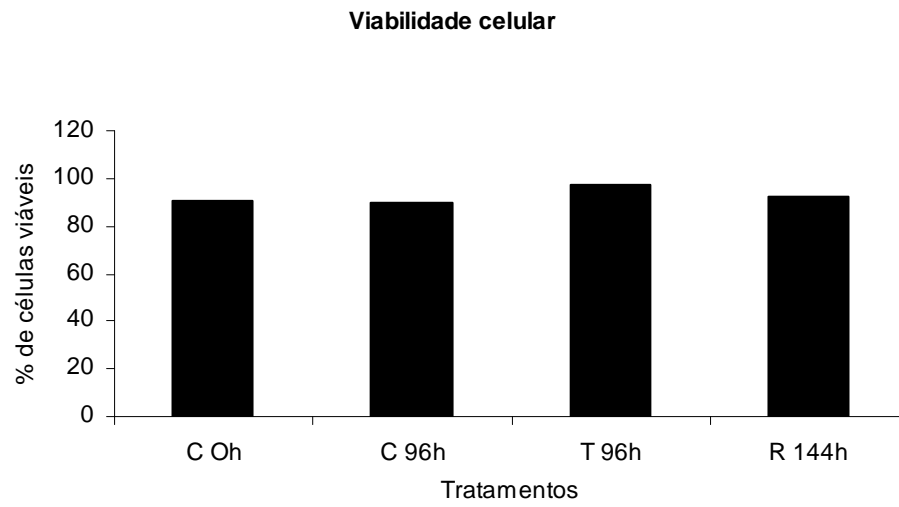
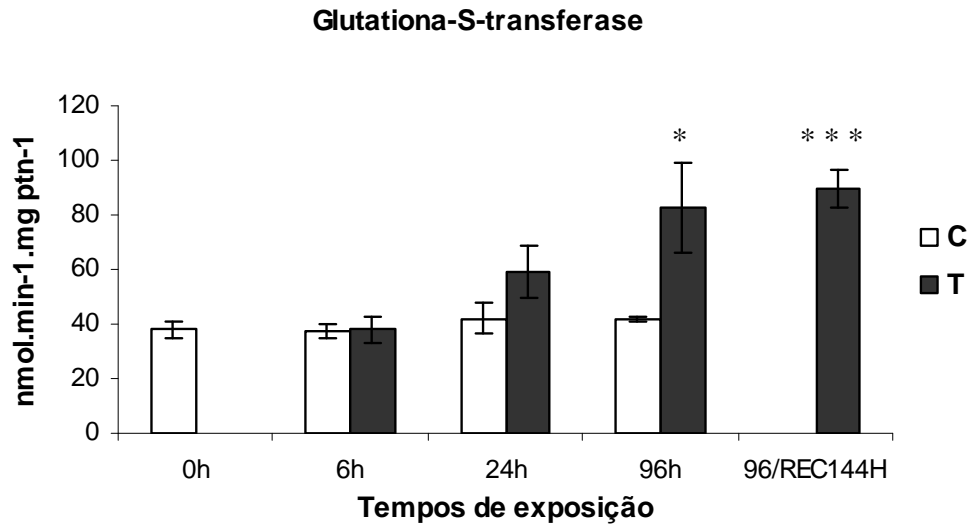


Figura 4 – Viabilidade celular mostrada no tratamento de 96h com efluente, e depois, após a recuperação de 144h. C=controle e T=tratamento, junto a seus respectivos tempos.

A)



B)

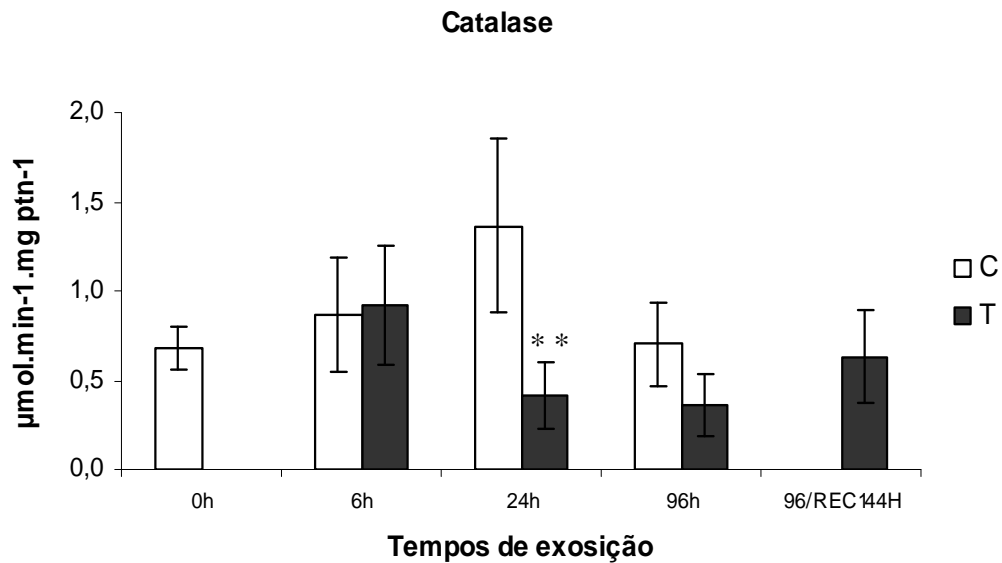


Figura 5 – Atividade das enzimas GST (A) e CAT (B) em brânquias de *Corbicula fluminea* submetidas a diferentes períodos de tratamento com o efluente permeado de refino de petróleo e após 144 horas de recuperação (REC) em água de poço artesiano e mais o valor do controle inicial (0h). Diferença estatística significativa ($P < 0,001$) foi observada entre os tratamentos por meio de ANAVA e Tukey: * em comparação ao controle do respectivo tempo e ao controle 0h; ** em comparação ao controle do respectivo tempo e; *** em comparação ao controle 0h.

Tabela 1 - Constituintes monoaromáticos e poliaromáticos presentes no efluente (Cayres, 2006).

Hidrocarboneto	Concentração (ppb)
Monoaromáticos	
Tolueno	75
Etilbenzeno	126
Xileno	85
Poliaromáticos	
Pireno	9
Benzo(a)antraceno	33
Benzo(a)pireno	61

ppb = parte por bilhão

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos do efluente obtidos nos diferentes tempos experimentais após os tratamentos; C = controle de cada tempo de exposição. T = Tratamento com o efluente em diferentes tempos.

Tempo exposição	Grupo	pH	OD (mg O ₂ /L)	C (μS/cm)	T (°C)	COT (ppm)	DQO (ppm)
	Efluente original	6,25	6,20	1242	23	20,07	81,24
0h	C	8,25	7,82	188	23	-	-
6h	C	8,27	7,91	180	22	-	-
	T	7,86	7,45	1967	22	-	-
24h	C	8,22	8,01	186	23	-	-
	T	7,97	7,80	1985	23	-	-
96h	C	8,19	8,03	191	23	-	-
	T	7,68	7,90	1920	23	-	-

OD=oxigênio dissolvido; C= condutividade; T=temperatura; COT=carbono orgânico total; DQO=demanda química de oxigênio.

Tabela 3 – Valores médios de danos observados pelo ensaio do cometa em hemócitos de *Corbicula fluminea* tratado em três tempos de exposição.

Classe de dano	0	1	2	3	Frequência média Células com danos
Controle 0h	95	4	1	0	5
	93	7	0	0	7
	88	11	1	0	12
	92	7	1	0	8
	96	4	0	0	4
Média/DP	92,8 ±3,11	6,6 ±2,88	0,6 ±0,54	0 ± 0	7,2±3,11
Controle 6h	95	3	1	1	5
	94	5	1	0	6
	96	4	0	0	4
	98	1	1	0	2
	92	8	0	0	8
Média/DP	95 ±2,24	4,2 ±2,59	0,6 ±0,55	0,2 ± 0,45	5±2,23
Tratamento 6h	95	3	2	0	5
	94	4	2	0	6
	93	6	1	0	7
	96	4	0	0	4
	97	2	0	1	3
Média/DP	95,0 ±1,58	3,8 ±1,48	1,0 ±1,0	0,2 ±0,45	5±1,58
Controle 24h	91	9	0	0	9
	99	1	0	0	1
	95	5	0	0	5
	99	1	0	0	1
	98	2	0	0	2
Média/DP	96,4 ±3,44	3,6 ±3,44	0 ±0	0 ±0	3,6±3,43
Tratamento 24h	100	0	0	0	0
	95	5	0	0	5
	90	10	0	0	10
	98	2	0	0	2
	96	4	0	0	4
Média/DP	95,8 ±3,77	4,2 ±3,77	0 ±0	0 ±0	4,2±3,76
Controle 96h	91	9	0	0	9
	95	5	0	0	5
	91	7	2	0	9
	95	5	0	0	5
	97	3	0	0	3
Média/DP	93,8 ±2,68	5,8 ±2,28	0,4 ±0,89	0 ±0	6,2±2,68
Tratamento 96h	55	20	14	11	45
	63	15	18	4	37
	67	11	15	7	33
	50	23	20	7	50
	59	30	5	6	41
Média/DP	58,5 ±6,65	19,8 ±7,33	14,4 ±5,77	7,0 ±2,55	41,2±6,64*

N=5; * aumento significativo por meio de ANAVA ($P < 0,001$) e Tukey entre o tratamento e seu respectivo controle; DP=desvio padrão.

ARTIGO 2

Comparação dos efeitos de um efluente industrial por bioensaios vegetal e animal, *in vivo* e *in vitro*

Comparação dos efeitos de um efluente industrial por bioensaios vegetal e animal, *in vivo* e *in vitro*

RESUMO

A genética toxicológica tem como objetivo detectar e entender as lesões e alterações induzidas por substâncias químicas, físicas ou biológicas a partir de ferramentas tais como estudos *in vivo* e *in vitro* de microorganismos, plantas, animais e culturas de células. Os agentes químicos podem ser encontrados em despejos industriais tais como os de indústria de refino de petróleo em que os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) se destacam como tóxicos. Duas metodologias, teste do micronúcleo (MN) em *Allium cepa* (*in vivo*) e ensaio do cometa em cultura de células HTC (*in vitro*) foram utilizadas para avaliar um efluente de refinaria de petróleo a fim de comparar os diferentes graus de efeitos detectados pelas duas metodologias e determinar o potencial mutagênico e genotóxico do dejetto. O teste do MN em *A. cepa* mostrou resultados negativos para as três concentrações utilizadas (25, 50 e 100%) tanto em 24 quanto em 48h de exposição a 25°C. Enquanto isso, o ensaio do cometa realizado nas células expostas às concentrações de 500, 200, 100, 25 e 5µl em 1000µl de meio de cultura foi positivo para a maior concentração utilizada. Os químicos presentes no efluente não causaram quebras ou perdas cromossômicas que tenham sido detectadas mesmo após 24 e 48h pelo teste do MN, porém produziram lesões primárias no DNA, que foram detectadas pelo ensaio do cometa, com apenas 2h de exposição direta em cultura. Usados na avaliação de amostras ambientais, estes ensaios forneceram respostas diferentes mostrando haver maior sensibilidade e do ensaio do cometa. Também, somando-se a estes fatores, deve ser considerada a capacidade de metabolização de xenobióticos apresentada pelo tipo celular usado neste ensaio *in vitro*, ou seja, células HTC, que são xeno-metabolizadoras. Os resultados sugerem ainda que os principais agentes causadores de lesões genotóxicas deste despejo industrial devam ser, para tal, dependentes de metabolização celular, a qual foi pouco eficiente nas células vegetais aplicadas neste estudo. Assim, os mecanismos de genotoxicidade tornam-se melhor entendidos quando dois bioensaios de natureza diferente são combinados.

Palavras-chave: *Allium cepa*; Células HTC; Micronúcleo; Ensaio do Cometa; dejetto de petróleo.

1 Introdução

A genética toxicológica é um campo multidisciplinar de pesquisa envolvida em detectar compostos capazes de causar danos e/ou proteger o DNA, buscando entender as conseqüências biológicas do dano e os mecanismos moleculares que conduzem à alteração e ao reparo do material genético (UHL et al., 2003).

Os compostos prejudiciais ao DNA, são emitidos em larga escala pelo setor secundário da economia mundial, incluindo o setor petroquímico de refino de petróleo e indústrias relacionadas, que geralmente, contêm desde metais pesados (químicos inorgânicos) até hidrocarbonetos mono e poliaromáticos, compostos orgânicos clorados e fosfatados (químicos orgânicos); ácido sulfúrico, etc. (HOUK, 1992; OHE et al., 2004). Nos EUA, as indústrias de refino de petróleo, em especial, estão entre as quatro maiores fontes de emissão de químicos tóxicos no ambiente (ar e água), segundo o *US EPA's Toxic Relatory Inventory* (TRI) de 2001.

Ensaio biológicos (toxicológicos) de curta duração, baixo custo, sensíveis e confiáveis são procurados para avaliação de amostras ambientais (MITCHELMORE et al., 1998; AVISHAI et al., 2002; KLOBUCAR et al., 2003) Testes citogenéticos em plantas superiores que avaliam as alterações cromossômicas e de ciclo celular, tal como o teste do micronúcleo em *Allium cepa*, tem se mostrado confiável na avaliação clastogênica de águas poluídas, desde sua criação por Evans et al. (1959) até os dias de hoje (MA et al., 1995; MAJER et al., 2005; CHANDRA et al., 2005; SRIVASTAVA et al., 2005).

Além de ensaios *in vivo*, destacam-se os sistemas *in vitro* que apresentam facilidade para padronizar as condições experimentais, economia e boa reprodutibilidade dos resultados (RABELLO-GAY, et al., 1991). Diferentes aplicações de ensaios *in vitro* são eficazes na avaliação em amostras ambientais aquáticas, tais como o estudo em células epiteliais primárias a partir de ensaios citotóxicos (DOWLING; MOTHERSILL 2001) e em linhagem celular de hepatoma de peixe (RTH-149) pelo ensaio do cometa (AVISHAI et al., 2002). Combinado com o ensaio do cometa, um teste conhecido por ser rápido, simples, sensível e relativamente barato para medir e analisar quebras no DNA de células individuais (SINGH et al., 1988; SPEIT; HARTMANN, 1999; BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005), os testes *in vitro* se mostraram ótimas ferramentas em estudos toxicológicos (KURODA et al, 1992; AVISHAI et al., 2002).

São poucos os estudos disponíveis, em que amostras ambientais foram testadas em um painel de procedimentos diferentes, que permite comparações da sensibilidade de sistemas-teste diferentes (UHL et al., 2003). Sendo assim, amostras de um efluente de refinaria de petróleo foram avaliadas quanto à mutagenicidade pelo ensaio do MN em *Allium cepa* e a mesma amostra foi exposta à cultura de células de hepatoma de rato (HTC) (proficientes em metabolização) para avaliação de genotoxicidade medida pelo ensaio do cometa.

2 Materiais e Métodos

2.1 Efluente

No presente estudo foi utilizado um efluente, originado no refino de petróleo, após remoção de sólidos, colóides e tratamento biológico no local de sua geração, para ser testado quanto ao potencial genotóxico.

O efluente foi fornecido, assim como caracterizado, pelo Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética Eletrônica (LAFLURPE) do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina.

Análises químicas para investigar a presença de BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno) e HPA (Hidrocarboneto Policíclico Aromático), descritas por Cayres em 2006 (Tabela 1), revelaram a presença de alguns destes componentes aromáticos no efluente, porém em concentrações abaixo do limite máximo permitido para descarte de efluentes industriais em corpos hídricos (CONAMA 357).

2.2 Teste do MN e determinação do índice mitótico em *Allium cepa*

A metodologia utilizada para o teste de MN em *Allium cepa*, foi a mesma descrita por Ma (1995), com modificações. Os tempos de exposição ao efluente foram de 24 horas em concentrações de 100%, 50% e 25% e 48 horas, na de 100% diluídas em água de poço artesiano. Anteriormente aos tratamentos, os bulbos de cebola foram lavados em água corrente e colocadas para crescer durante dois dias (48h) em estufa tipo BOD à $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$,

tempo em que as raízes atingiram cerca de 2cm. Um tratamento controle foi realizado usando água de poço artesiano desclorificada. A temperatura foi mantida a $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em BOD, desde o início do cultivo de 3 bulbos por tratamento. Foram analisadas 5000 células/ tratamento (1000 células/lâmina) da geração F1 de células da raiz para observação de micronúcleos (MN). Destas mesmas raízes, 1000 células meristemáticas de cada lâmina foram contadas para obtenção do índice mitótico (IM) (número de células em divisão/número de células observadas x 100) e avaliação de citotoxicidade.

2.3 Ensaio do cometa em células HTC

Para o ensaio do cometa em células proficientes em metabolização hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC), foi utilizado o protocolo proposto por Uhl et al. (1999, 2000) e as premissas propostas por Tice et al. (2000). As células HTC foram cultivadas meio DMEM F12, por 24 horas antes do tratamento. Após este período o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com PBS. Todos os tratamentos foram aplicados às culturas de células durante duas horas (2h) de forma direta sobre a cultura, sendo realizadas três repetições para cada tratamento. Assim, os protocolos experimentais foram:

a) Tratamento com efluente: O tratamento foi realizado adicionando o efluente no meio de cultura concentrado nas 5 seguintes diferentes diluições: 500, 200, 100, 25 e $5\mu\text{l}$ para $1000\mu\text{l}$ de meio de cultura. No momento da realização do experimento, o pH do efluente foi corrigido para 7,2.

b) Controle positivo: 2-amino antraceno foi adicionado na proporção de $1\mu\text{g/ml}$ de meio.

c) Controle negativo: foi acrescentado PBS (pH=7,4) ao meio de cultura na proporção de 1:2.

Ao final dos tratamentos as células foram coletadas e uma pequena amostra utilizada para a análise de citotoxicidade pelo método do Azul de Trypan. O restante das células foi, então, embebido em agarose de baixo ponto de fusão e adicionado a uma lâmina previamente gelatinizada com agarose, seguido de lise onde permanecia *overnight*, sendo então realizada a eletroforese (pH do tampão $>13,0$; corrida de 20 min. precedida de 20min no tampão para desnaturação do DNA; 300mA e $\sim 0,8\text{V/cm}$).

Para cada tratamento foram realizadas 3 repetições independentes. Foram analisadas 100 células visualmente (KOBAYASHI et al., 1995) e classificadas de acordo com o seguinte critério: *classe 0* - células com dano indetectável, que não apresentavam cauda; *classe 1* - células com cauda menor que o diâmetro do núcleo; *classe 2* - células com cauda entre 1 a duas vezes o diâmetro do núcleo; e, *classe 3* - células com cauda maior que duas vezes o diâmetro do núcleo. Células apoptóticas que apresentaram o núcleo totalmente fragmentado não foram levadas em consideração na análise (SPEIT; HARTMANN, 2005). O ensaio do cometa foi realizado somente para tratamentos que apresentaram viabilidade superior a 80%, como mostrado pelo teste do Azul de Trypan.

2.4 Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos foram avaliados pelo programa Jandel Scientific – SigmaStat 2.0. por análise de variâncias de médias ANAVA para células HTC e Kruskal-Wallis (ANAVA) para teste de *Allium cepa*, e seguiu o teste de Tukey por comparação múltipla de médias ($\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,001$)

3 Resultados

3.1 MN em *Allium cepa* (in vivo)

A exposição das raízes de *Allium cepa* ao efluente de refinaria de petróleo produziu resultado negativo em relação ao controle, ou seja, ausência total de MN em células da geração F1 para todos os tratamentos, até mesmo após 48 horas de exposição ao efluente.

3.2 Índice mitótico em *Allium cepa*

As concentrações utilizadas (100, 50 e 25%) de efluente de refino de petróleo, não se mostraram citotóxicas, uma vez que não houve redução do índice mitótico em relação ao

controle, demonstrando que a proliferação celular no meristema não foi retardada ou interrompida com a exposição a esta substância-teste (Figura 2).

3.3 Ensaio do cometa em células HTC (*in vitro*)

Os resultados obtidos com este bioensaio estão representados na Figura 3. As quatro menores concentrações do efluente testadas (200, 100, 25 e 5µl/mL de meio de cultura) não apresentaram efeito genotóxico. No entanto, a concentração de 500µL/mL alterou a migração do DNA, uma vez que o escore de danos ao DNA foi três vezes maior que o encontrado no controle negativo e não diferiu significativamente do controle positivo. Todas as concentrações testadas não apresentaram efeito citotóxico, uma vez que em todos os tratamentos a viabilidade celular permaneceu superior a 90%.

4 Discussão

Neste trabalho, foi avaliado o potencial mutagênico e genotóxico de um efluente de refino de petróleo, respectivamente pelo ensaio do micronúcleo (MN) em *Allium cepa* e do cometa em células HTC. Assim como testes *in vitro* são sugeridos na detecção de agentes mutagênicos ambientais (KURODA et al, 1992), ensaios utilizando plantas também são recomendados para detectar compostos presentes em amostras ambientais que causem instabilidade genética no DNA (MA et al., 1983; PLEWA; WAGNER, 1993; RODRIGUES et al., 1997).

As indústrias de refino de petróleo, em especial, estão entre as quatro maiores fontes de emissão de químicos tóxicos no ambiente (ar e água) nos EUA, segundo o *US EPA's Toxic Relatory Inventory* (TRI) de 2001 e seus despejos caracterizam-se por apresentar toxicidade alta, atribuída, na maior parte das vezes, à parte solúvel que contém compostos inorgânicos (ex. sais, metais pesados) e orgânicos (ex. óleos, graxa, HPA e BTEX) (CLAXTON et al., 1998; ALMEIDA-VAL et al., 2002). Por análises químicas, foi detectada a presença de HPA no efluente em estudo. O histórico desta classe de químicos revela que em populações de peixes, os HPA presentes na água e no sedimento estão relacionados com o aparecimento de neoplasias (STEIN et al., 1990; MYERS et. al., 1991), demonstrando propriedades

carcinogênicas (STALKER et al., 1991; PACHECO; SANTOS, 2001; WHITE, 2002; CEBULSKA-WASILEWSKAA et al., 2005).

Entre os HPA, o Nitropireno e o Benzo[a]pireno (B[a]p) são capazes de formar aductos de DNA após a ativação metabólica, reação presente em vertebrados (ROY et al., 1989). Comumente, peixes, por exemplo, possuem um sistema P-450 muito ativo que produz metabólitos do benzo[a]pireno e formam aductos que foram detectados em salmão (*Salmo trutta*) (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998), em *Ictalurus nebulosus* (SIKKA et al., 1991), em *Lepomis macrochirus* (SMOLAREK et al., 1987) e em *Parophrys vetulus* (VARANASI et al., 1989).

A quantidade de B[a]p presente no efluente estudado foi de 61ppb e mesmo sendo um dos mais potentes mutagênicos da classe dos HPA, neste efluente, a presença não foi capaz de causar quebra ou perda crossômica em *Allium cepa*, produzindo resultados negativos quanto à produção de MN nas células F1, assim como ocorreu em outros estudos com plantas (VELIMINSKY; GICHNER, 1988). Por outro lado, células HTC proficientes em metabolização, ao serem expostas ao mesmo efluente, tiveram danos genotóxicos detectados pelo ensaio do cometa. Sabe-se que os HPA se submetem a um complexo metabolismo em mamíferos e humanos (SCHITTIANO, 2005) o qual também parece ser desempenhado por esta linhagem celular (HTC) *in vitro*, já que elas se mostraram capazes de ativar estes xenobióticos e refletir as lesões produzidas pelo ensaio do cometa.

Uhl et al. (2003) afirmam que bioensaios com plantas são relativamente insensíveis à classe de contaminantes ambientais HPA quando estes se encontram no ambiente diluídos e em concentrações relativamente baixas. Talvez a questão ainda mais importante seja o fato de eles agirem indiretamente no DNA, isto é, precisam ser ativados metabolicamente para que possam causar algum dano, o que envolve a produção de metabólitos eletrofílicos pelo sistema citocromo P-450 da fase I do processo de detoxificação (COHEN; RICE, 2001; LEE; STEINERT, 2003). Plewa e Wagner (1993) relataram que plantas expostas diretamente a compostos de ação indireta produziram resultados pouco expressivos. Entretanto, plantas com ativação metabólica de agentes químicos promutágenos têm sido usadas com mais sucesso. Estes estudos têm levantado à questão do quanto as plantas podem ser usadas para detectar compostos que causem danos ao DNA e câncer em humanos (PLEWA; WAGNER, 1993). Esta extrapolação é diretamente dependente da capacidade dos vegetais possuírem sistemas de metabolização semelhantes aos encontrados em animais. No entanto, Higashi (1988) e Sanderman (1992) detectaram que as células vegetais, mesmo contendo enzimas ativas do

sistema citocromo P450, apresentam atividade bem mais baixa do que as encontradas em roedores e humanos e seus substratos específicos diferem substancialmente dos encontrados em mamíferos.

As diferentes respostas celulares obtidas entre os testes do cometa em HTC e do MN em *Allium cepa* poderiam também ser atribuídas aos diferentes *endpoints* avaliados em cada metodologia (GUTERRES et al., 2005). O ensaio do cometa detecta quebras de cadeia de DNA e sítios álcali-lábeis, entre outras lesões primárias passíveis de reparo celular (TICE, 2000). Enquanto isso, o teste do micronúcleo detecta quebras cromossômicas e/ou dispersão de cromossomos inteiros, quando estas lesões não são reparadas e são fixadas após um ciclo celular (RABELLO-GAY et al., 1991). No presente estudo, não houve tempo para um possível reparo de lesões provocadas pelos tratamentos das células HTC, já que estas foram colhidas imediatamente após o período de exposição e submetidas ao protocolo do ensaio do cometa. Assim, é provável que as lesões primárias formadas tenham sido detectadas. Já no protocolo do teste de MN usado em *Allium cepa*, mesmo sendo analisadas as células da geração F1, é admissível que, se HPA presentes na substância-teste produziram aductos de DNA, estes aductos não foram convertidos em quebras cromossômicas que originariam micronúcleos.

Há que se considerar ainda os compostos químicos monoaromáticos presentes no efluente de refino que foi aqui estudado (benzeno, tolueno e etilbenzeno) mostraram efeitos positivos quanto à mutagenicidade em alguns estudos revisados por Ohe et al. (2004). No rio Llobregat, na Espanha, o resultado positivo para o teste de Ames foi creditado, entre outros compostos, aos alquilbenzenos (orgânico monoaromático) presentes nas águas daquele rio. O benzeno e o etilbenzeno, em diversos estudos, foram considerados mutagênicos em células de bactérias, fungos e leveduras, sendo o benzeno ainda mutagênico em ensaios *in vitro* com células de plantas e animais. Um derivado do tolueno também foi relatado como possivelmente carcinogênico para humanos. Estes agentes podem ter contribuído para o aparecimento de danos no ensaio genotóxico *in vitro* realizado no presente estudo com células proficientes em metabolização de xenobióticos.

Metais pesados também podem estar presentes em efluentes de refino de petróleo, os quais, por sua vez, são acumulados em peixes, por exemplo, podendo causar danos à saúde humana via alimentação. Neste estudo, os metais pesados presentes no efluente não foram mensurados. Entretanto, outros estudos que estão sendo realizados pelo mesmo grupo de pesquisadores mostram que danos induzidos pelo mesmo efluente e avaliados pelo ensaio do

cometa em um sistema *in vivo* se recuperam gradativa e rapidamente na ausência do efluente (dados não mostrados), sugerindo não haver acúmulo celular de metais. Esta observação indica, uma vez mais, que os danos detectados pelo ensaio do cometa em células HTC podem ter sido causados pelos HPA que compõem o efluente, o que merece ser confirmado em estudos adicionais. Como discutido, amostras ambientais sempre serão avaliadas primeiramente como uma mistura de compostos químicos, que podem ou não interagir entre si e contribuir sinérgica, aditiva ou antagonicamente para se tornarem nocivos.

5 Conclusão

Os resultados do presente trabalho reforçam a idéia de que, por meio de protocolos experimentais diferentes quanto aos tipos de ensaios, ao tempo de exposição e ao tipo celular utilizados, pode-se encontrar a melhor maneira de examinar o mecanismo de toxicidade de uma mistura (KURODA et al., 1992). Segundo ZHONG et al. (2001), embora o teste do cometa seja um teste sensível para detectar danos no DNA, diferentes mecanismos e diferentes parâmetros estão envolvidos em testes de genotoxicidade diferentes.

Portanto, embora seja difícil afirmar qual dos componentes químicos identificados e quantificados no efluente estudado causou os danos detectados, os resultados indicam que os principais agentes genotóxicos deste despejo industrial são, como os hidrocarbonetos aromáticos, dependentes de metabolização celular, a qual foi pouco eficiente nas células vegetais empregadas. Se, nestas células, lesões no DNA chegaram a ser provocadas, os tipos de lesões induzidos não foram transformados e fixados como micronúcleos nas células F1.

6 Referências

ALMEIDA - VAL, V. M. F.; DUNCAN, W. P.; VAL, A. L. Crude oil effects on fish of the Amazon: Current Status. In: *Tropical Fish: News and Reviews. Internation Congress on The Biology of Fish*. Vancouver: University Of British Columbia, 2002. p. 49.

AVISHAI, N. RABINOWITZ, C. MOISEEVA, E. RINKEVICH, B. Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay, *Mutation Research*, v. 518 p. 21-37, 2002.

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

CAYRES, V. P. Processo de degradação e adsorção de compostos orgânicos aromáticos em água residual e efluente da indústria do petróleo. Dissertação de mestrado: *Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais*. Universidade Estadual de Londrina – PR, 2006.

CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; WIECHEĆ, A.; PANEK, A.; BINKOVÁ, B.; RADIM, J.; PETER, S.; FARMER, B. Influence of environmental exposure to PAHs on the susceptibility of lymphocytes to DNA-damage induction and on their repair capacity. *Mutation Research*, v. 588, p. 73-81, 2005.

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

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

COHEN, D. E.; RICE, R. H. Toxic responses of the skin. In: CURTIS D. KLAASSEN, (Ed.). *Casarett & Doull's, Toxicology, the basic science of poisons*. 6. ed. USA: McGraw-Hill Companies, 2001. p. 653-671.

DOWLING, K.; MOTHERSILL, C. The further development of rainbow trout primary epithelial cell cultures as a diagnostic tool in ecotoxicology risk assessment. *Aquatic Toxicology*, v. 53, p. 279-89, 2001

EVANS, H. J.; NEARY, G. J.; WILLIAMSON, F. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *International Journal of Radiation Biology*, v. 3, p. 216-229, 1959.

GUTERRES Z. R.; MANTOVANI, M. S.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; JORDÃO, B. Q. Genotoxic and antigenotoxic effects of organic extracts of mushroom *Agaricus blazei* Murrill on V79 cells. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 3, p. 458-463, 2005.

HELMA C., ECKL P., GOTTMANN E., KASSIE P., RODINGER W., STEINKELLNER H., WIND-PASSINGER C., SCHULTE-HERMANN R., KNASMÜLLER S. Genotoxic and ecotoxic effects of groundwaters and their relation to routinely measured chemical parameters. *Environmental Science & Technology*. v. 32 p. 1799-1805, 1998.

HIGASHI K., Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutation Research*, v. 197, p. 273-288, 1988.

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

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

KNASMÜLLER S., HELMA C., ECKL P.M., GOTTMANN E., STEINKELLNER H., KASSIE P., HAIDER T., PARZEFALL W., SCHULTE-HERMANN R., Investigations on genotoxic effects of groundwater from the Mitterndorfer Senke and from the vicinity of Wiener Neustadt. *Wien Klin. Wochenschr*, v. 110, p.824-833, 1998.

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

KURODA, Y.; JAIN, A. K.; TEZUKA, H.; KADA, T. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research*, v. 267, p. 201-209, 1992.

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

MA, T. H.; ANDERSON, V. A.; HARRIS, M. M.; BARE, J. L. Tradescantia-Micronucleus (Trad-MCN) test on the genotoxicity of malathion. *Environmental Mutagenesis*, v. 5, p. 127-137, 1983.

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.

MAJER, B. J.; GRUMMT, T.; UHL, M.; KNASMÜLLER, S. TI. Use of Plant Bioassays for the Detection of Genotoxins in the Aquatic Environment SO: *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, v. 33, p. 45-55, 2005.

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

MYERS, M. S.; LANDAHL, J. T.; KRAHN, M. M.; MCC, B. B. Relation ship between hepatic neoplasm and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. WEST. COAST. *Environmental Health Perspectives*, v. 90, p. 7-15, 1991.

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

PACHECO, M.; SANTOS, A. M. Biotransformation, Endocrine, e Genetic Responses of *Anguilla anguilla* L. to Petroleum Distillate Products and Environmentally Contaminated Waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 49, p. 64-75, 2001.

PLEWA M.J., WAGNER E.D., Activation of promutagens by green plants. *Annual Review of Genetics*, v. 27 p. 93-113, 1993.

RABELLO-GAY, M.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.). Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Ed. Sociedade Brasileira de Genética, 1991.

RODRIGUES, G. S.; MA, T. H.; PIMENTAL, D.; WEINSTEIN, L. H. Tradescantia Bioassays as Monitoring Systems for Environmental Mutagenesis: A Review. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 16, p. 325-359, 1997.

SANDERMANN H. Jr. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 17, p. 82-84, 1992.

SCICCHITIANO, D. A. Transcription past DNA adducts derived from polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research*, v. 577, p. 146-154, 2005.

SIKKA, H.C. STEWARD, A.R. KANDASWANI, C. RUTKOWSKI, J.P. ZALESKI, J. KUMAR, S. EARLEY, K. GUPTA, R.C. Metabolism of benzo(a)pyrene and persistence of DNA adducts in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*), *Comparative Biochemistry & Physiology*, v. 100C, p. 25–28, 1991.

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.

SMOLAREK, T.A. MORGAN, S.L. MOYNIHAN, C.G. LEE, H. HARVEY, R.G. BAIRD, W.M. Metabolism and DNA adduct formation of benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in fish cell lines in culture, *Carcinogenesis*, v. 8 p. 1501–1509, 1987.

SPEIT, G. AND HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test)—a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In Henderson, D.S. (ed.), *Methods in Molecular Biology, DNA Repair Protocols: Eucaryotic Systems*. Humana Press, Totowa, NJ, v. 113, p. 203–212, 1999.

SPEIT, G., HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods in Molecular Biology*, v. 291, p. 85-95, 2005.

SRIVASTAVA, R.; KUMAR, D.; GUPTA, S. K. Bioremediation of municipal sludge by vermicomposting and toxicity assessment by *Allium cepa*. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1867-1871, 2005.

STALKER, M. J.; KIRBY, G. M.; KOCAL, T. E.; SMITH, I. R.; HAYES, M. A. Loss of glutathione S-transferases in pollution-associated liver neoplasms in white suckers (*Catostomus commersoni*) from Lake Ontario. *Carcinogenesis*, v. 12, p. 2221-2226, 1991.

STEIN, J. E.; REICHERT, W. L.; NISHIMOTO, M.; VARANASI, U. Overview of studies on liver carcinogenesis in English sole from Puget Sound: Evidence for a xenobiotic chemical etiology. II. Biochemical studies. *Science Total Environmental*, v. 94, p. 51-69, 1990.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. The single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 206-221, 2000.

U.S. EPA, 2001. 1999 Toxics Release Inventory Public Data Release. Disponível em: <http://www.epa.gov/triexplorer/industry.htm>. Acessado em: 25-09-2006.

UHL, M., HELMA, C., KNASMULLER, S., Single cell gel electrophoresis assay with human-derived hepatoma (hepg2) cells. *Mutation Research*, 441, 215-224, 1999.

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

UHL, M.; PLEWA, M. J.; MAJER1, B. J.; KNASMÜLLER, S. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. 2003.

VARANASI, U.; REICHERT, W.L.; LEEBERHART, B.T. Stein, J.E. Formation and persistence of benzo(a)pyrene-diolepoxide-DNA adducts in liver of English sole (*Parophrys vetulus*), *Chemico-Biological Interactions*, v. 69 p. 203–216, 1989.

VELEMINSKY, J.; GICHNER, T. Mutagenic activity of promutagens in plants: indirect evidence of their activation. *Mutation Research*, v. 197, p. 221-242, 1988.

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

ZHONG Y.; FENG, S.L.; LUO, Y.; ZHANG, G.D.; KONG, Z.M. Evaluating the genotoxicity of surface water of Yangzhong city using the *Vicia faba* micronucleus test and the comet assay, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 67 p. 217–224, 2001.

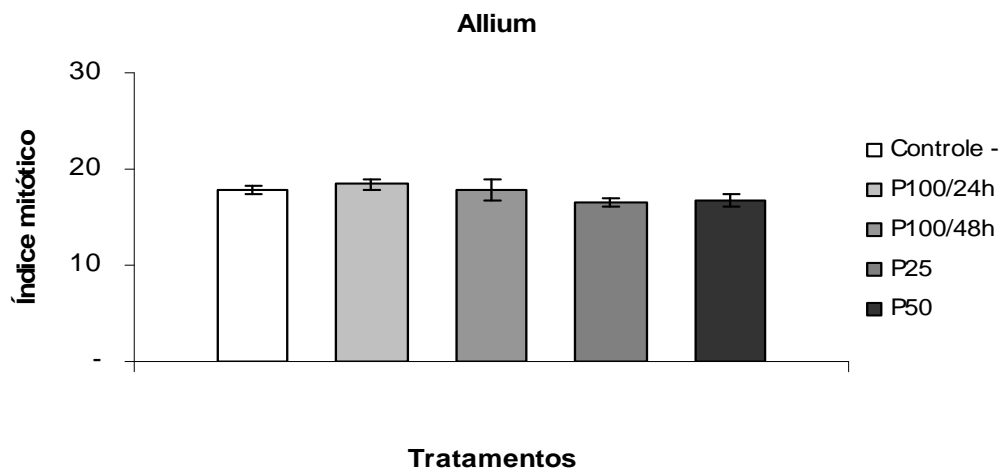


Figura 1 – Índice mitótico obtido a partir de células meristemáticas de raízes em *Allium cepa* expostas ao efluente de refino de petróleo. Sendo 24h de exposição para 25 (P25), 50 (P50) e 100% (P100/24h), ainda 48h para 100% de efluente (P100/48h).

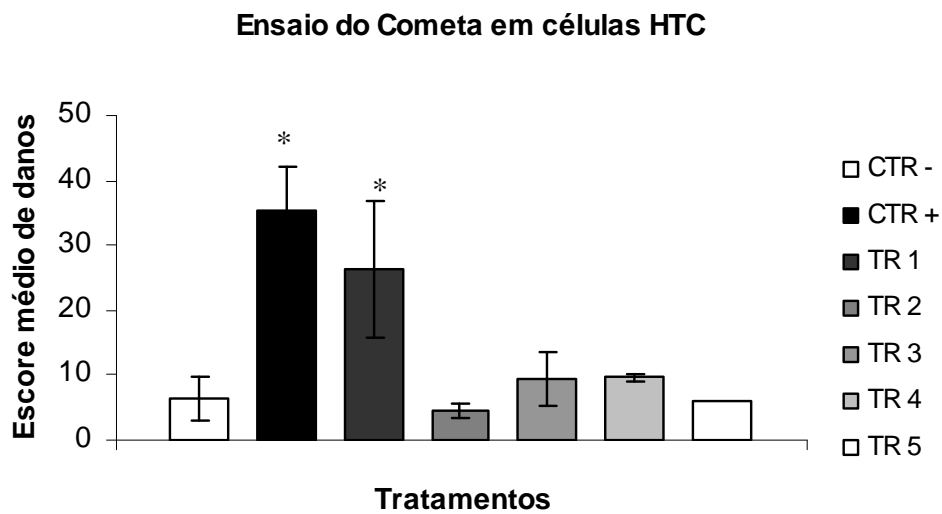


Figura 2 – Teste de genotoxicidade em células de hepatoma de rato (HTC) pelo ensaio do cometa em efluente de refino de petróleo após 2h de exposição direta na cultura. * Diferença estatística significativa comparada ao controle negativo por meio de ANAVA ($P < 0,001$) e Tukey. CTR- = controle negativo; CTR+ = controle positivo; TR 1, TR2, TR3, TR4 e TR5 são os tratamentos de 500, 200, 100, 25 e $5\mu\text{l}/1000\mu\text{l}$ de meio de cultura, respectivamente. Não há desvio padrão na amostra TR5.

Tabela 1 - Constituintes monoaromáticos e poliaromáticos presentes no efluente (Cayres, 2006).

Hidrocarboneto	Concentração (ppb)
Monoaromáticos	
Tolueno	75
Etilbenzeno	126
Xileno	85
Poliaromáticos	
Pireno	9
Benzo(a)antraceno	33
Benzo(a)pireno	61

ppb = parte por bilhão

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos do efluente.

Tempo exposição	Grupo	pH	OD (mg O ₂ /L)	C (μS/cm)	COT (ppm)	DQO (ppm)
	Efluente original	6,25	6,20	1242	20,07	81,24

OD=oxigênio dissolvido; C= condutividade; T=temperatura; COT=carbono orgânico total;
DQO=demanda química de oxigênio.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O perigo de vazamento e liberação de despejos indústrias é algo preocupante e afeta todo o planeta, sendo notório o aumento dos problemas de ordem ambiental. Os químicos lançados no solo, ar e água causam doenças e morte aos organismos ao redor, entretanto, as soluções podem ser alcançadas somente por meio de mudanças no volume produzido e no manejo correto destes dejetos.

As metodologias utilizadas no presente estudo permitiram avaliar a mistura complexa que constitui o efluente da indústria petroquímica de forma simples, com relativo baixo custo e com grande eficiência, vantagens importantes nos estudos de toxicologia ambiental. A combinação de bioensaios permitiu concluir firmemente a respeito do potencial tóxico da amostra em estudo.

Entende-se pelos resultados que a utilização de diferentes tipos de organismos numa avaliação de ecotoxicidade e, o uso de diferentes metodologias para avaliação de danos e alterações fisiológicas pode ser crucial para a compreensão dos mecanismos e efeitos biológicos causados por amostras ambientais.

Dois ensaios genéticos com princípios diferentes, tal como o micronúcleo e o cometa, puderam demonstrar resultados diferentes quando testados para uma mesma amostra. Porém, somente o ensaio do cometa pôde ser utilizado para verificar a capacidade de recuperação dos animais após tratamento com o efluente, sendo um teste específico para detectar lesões passíveis de reparo. Esta correção ocorreu quando o bivalve se recuperou dos danos em 144h em água de poço e dois mecanismos, entre outros, certamente ocorreram: sistema de reparo celular e eliminação de xenobióticos por processos de biotransformação enzimática. Assim, o ensaio do cometa assume destaque, pois pode ser aplicado para avaliar o dano causado por xenobióticos bem como a capacidade de eliminar os efeitos destes. Também as enzimas respondem aos estressores aos quais são submetidos os animais, mostrando-se eficientes na detecção de efeitos de tratamento de dejetos desta natureza e recuperação.

A capacidade e habilidade de metabolização de xenobióticos são diferentes os tipos de células, tal como de plantas, animais e células cultivadas de fígado. Sendo particular de cada célula, os resultados da exposição a químicos podem ser melhor entendidos quando se conhece a natureza do composto exógeno e assim é possível entender o modo de ação de químicos no DNA da célula avaliada.

Sugere-se, após este estudo, que efluentes industriais continuem a ser monitorados e tratados pelas indústrias geradoras como muitas têm feito, e as leis existentes, pertinentes a lançamentos de dejetos, sejam cumpridas por indústrias em todo o mundo. Testes biológicos de genotoxicidade, *in vivo* ou *in vitro*, poderão colaborar para a avaliação da qualidade destas amostras industriais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA - VAL, V. M. F.; DUNCAN, W. P.; VAL, A. L. Crude oil effects on fish of the Amazon: Current Status. In: *Tropical Fish: News and Reviews. Internation Congress on The Biology of Fish*. Vancouver: University Of British Columbia, 2002. p. 49.

ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D.; DAFRE, A. L.; GOMES, O.F.; MEDEIROS M. H.G.; DI MASCIO, P. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 318, n.1, p. 21-30, 2005.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish Micronuclei for Assessing Genotoxicity in Water. *Mutation Research*, v. 343, p. 121-135, 1995.

ARAUJO, R.; MORENO, D.; RAMOS, M.A. The Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia : Corbiculidae) in Europe. *American Malacol Bull*, v. 10 p. 39-49, 1993.

AVISHAI, N. RABINOWITZ, C. MOISEEVA, E. RINKEVICH, B. Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay, *Mutation Research*, v. 518 p. 21-37, 2002.

BASACK, S. B.; ONETO, M. L.; GUERRERO N. R. V.; KESTEN E. M. Accumulation and eliminatio.n of pentachlorophenol in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 58, p. 497-503, 1997.

BASACK, S. B.; ONEFO, M. L.; FUCHS, J. S.; WOOD, E. J.; KESTEN, E. M. Esterases of *Corbicula fluminea* as biomarkers of exposure to organophosphorus pesticides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 61, p. 569-576, 1998.

BAUDRIMONT, M.; METIVAUD, J.; MAURY-BRACHET R.; RIBEYRE F.; BOUDOU A. Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic Clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environmental Toxicology Chem*. v. 16, p. 2096-2105, 1997.

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

BILOS C.; COLOMBO J. C.; PRESA M. J. R. Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Pollution*, v. 99, p. 1-11, 1998.

BOECK, M.; DE KIRSCH-VOLDERS, M., *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) is not an adequate sentinel species to assessthe genotoxic risk (comet assay) of PAH exposure to the environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 30, p. 82-90, 1997.

BRAUN, R. GEBHARDT, J. BRUSDYLINS, S. PIECHOCKI, Untersuchungen zum Gehalt toxischer und mutagener Verbindungen im Wasser der Saale 1. Mutagenita"t von Dichlormethanextrakten im Ames-Mutagenita"tstest, *Biol. Zent*, v. 113 p.305-316, 1994

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

BROWN, E. R.; HAZDRA, J. J.; KEITH, L.; GREENSPAN, I.; KWAPINSKI, J. B.; BEAMER, P. *Frequency of fish tumors found in a polluted watershed as compared to nonpolluted Canadian waters*. *Cancer Research*, v. 33, n. 2, p. 189- 198, 1973.

BUDMICK, L. D.; SOKAL, D. C.; FALK, H.; LOGUE, J. N.; FOX, J. M. Cancer and birth defects near Drake Superfund site Pennsylvania. *Archives of Environmental Health*, v. 39, p. 409-413, 1984.

CADASTRO GERAL DE EMPREGADOS E DESEMPREGADOS (Caged). Disponível em: <https://www.caged.gov.br/index.html#> . Acessado em: 26/02/2007.

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

CHEN, D. J.; DEAVEN, L. L.; MEYNE, J.; OKINAKA, R. T. STRNISTE, G. F. Determination of direct-acting mutagens and clastogens in oil shale retort process waster. In: WATERS, M. D.; SANDHU, S. S.; LEWTAS, J.; CLAXTON, L.; CHERNOFF, N.; NESNOW, S. (Eds.). *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III*. New York: Plenum Press, 1983. p. 269-275.

CHEN, D.; XIANG. D. Preliminary results of Tradescantia-micronucleus tests on the wastewater samples from several industrial factories in Qingdao. *Journal Environmenta. Science*, v. 4 p. 45-47, 1983.

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

CLEMENTS, C., RALPH, S., PETRAS, M., Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 29, p. 277–288, 1997.

DE BOECK, M. KIRSCH-VOLDERS, M. *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) is not an adequate sentinel species to assess the genotoxic risk (comet assay) of PAH exposure to the environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 30, p. 82–90, 1997.

DE MAAGD, P. G.; VETHAAK, A. D. Biotransformation of PAHs and their carcinogenic effects in fish. In: NEILSON, A.H. (Ed.). *The Handbook of Environmental Chemistry, Part I PAHs and Related Compounds*. v. 3. Berlin: Springer, 1998. p. 266-309.

DIXON, D. R.; PRUSKI, A. M.; DIXON, L. R. J.; JHA A. N. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* v. 17, p. 495-507, 2002.

EASTMAN, A.; BARRY, M. A. The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair or apoptosis? *Cancer Investigation*, v. 10, p. 229-240, 1992.

EVANS H.J., NEARY G.J., WILLIAMSON F., The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *International Journal of Radiation Biology*, v. 3, p. 216-229, 1959.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W. P.; ZEIGER, E. & BONASSI, S., The human micronucleus project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, v. 428, p. 271-283, 1999.

GAUTHIER, J.M. DUBEAU, H. RASSART, E. *In vitro* analysis of genotoxic effects of environmental contaminants in beluga whale (*Delphinapterus leucas*) cells using the micronuclei and comet assays, Abstracts of the 18th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, Pensacola, FL, 1997, p. 43.

GIELAZYN, M. L.; RINGWOOD, A.; PEGORSCH, W. W.; STANCYK, S. E. Detection of oxidative DNA damage in isolated marine bivalve hemocytes using the comet assay and fomamidopyrimidine glycosylase (Fpg). *Mutation Research*, v. 542, p. 15-22, 2003.

GOLDMAN, L. R.; PAIGEN, B.; MAGNANT, M. M.; HIGHLAND, J. H. Low birth weight, prematurity and birth defects in children living near hazardous waste site, Love Canal. *Hazardous Waste Hazardous Materials*, v. 2, p. 209-223, 1985.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, I.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (orgs). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: ULBRA, cap. 10, p. 247-279, 2003.

GRIFFITH J.; DUNCAN, R. C.; RIGGAN, W. B.; PELLOM, A. C. Cancer mortality in U.S. counties with hazardous waste sites and ground water pollution. *Archives of Environmental Health*, v. 44, p. 69-74, 1989.

HALLIWELL, B., Oxidative DNA damage: meaning and measurement. In: Halliwell, B., Auroma, O.I. (Eds.), 1993. *DNA and Free Radicals*. Ellis Horwood, New York.

HARSHBARGER, J. C.; CULLEN, L. J.; CALABRESE, M. J.; SPERO, P. M. Epidermal, hepatocellular and cholangiocellular carcinomas in brown bullheads, *fetaturus nebulosus*, from industrially polluted Black River, Ohio. *Marine Environmental Research*, v. 14, p. 535-536, 1984.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V. ; TICE, R. R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*, v. 18, p. 45-51, 2003.

HEDDLE, J.A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutation Research*, v. 123, p. 61-118, 1983.

HELMA, C.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; HOUK, V. S.; GLASBRENNER, U.; KLEIN, C.; WENQUING, L.; KASSIE, F.; SCHULTE-HERMANN, R.; KNASMÜLLER, S. Comparative evaluation of four bacterial assays for the detection of genotoxic effects in the dissolved water phases of aqueous matrices. *Environmental Science & Technology*, v. 30, p. 897-907, 1996.

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

IAN FRESHNEY, Application of Cell Cultures to Toxicology. In: Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands; *Cell Biology and Toxicology*. 2001; v. 17 p. 213-230.
JHA, A.N. Genotoxicological Studies In Aquatic Organisms: An Overview. *Mutation Research*, v. 552, p. 1-17, 2004.

JOHNS, C.; LUOMA, S. N. Arsenic in benthic bivalves of San Francisco Bay and the Sacramento/San Joaquin River delta. *The Science of the Total Environment*, v. 97, n. 08, p. 673-684, 1990.

JOHNSON, B. L. Impact of Hazardous Waste on Human Health. *Atlanta: CRC Press*, 1999. p. 408.

KLEINJANS, J. C.S.; SCHOOTEN, F. J. Ecogenotoxicology: the evolving field. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.11, p. 173-179, 2002.

KLEKOWSKI, E.; LEVIN, D. E. Mutagens in a river heavily polluted with a paper recycling wastes: Results of field and laboratory mutagen assays. *Environmental Mutagenesis*, v. 1, p. 209-219, 1979.

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

KNASMÜLLER S., HELMA C., ECKL P.M., GOTTMANN E., STEINKELLNER H., KASSIE P., HAIDER T., PARZEFALL W., SCHULTE-HERMANN R., Investigations on genotoxic effects of groundwater from the Mitterndorfer Senke and from the vicinity of Wiener Neustadt. *Wien Klin. Wochenschr.* v. 110 p. 824-833, 1998.

LANGEVIN, R.; RASMUSSEN, J. B.; SLOTERDIJK, H.; BLAISE, C. Genotoxicity in water and sediment extracts from the St Lawrence River system, using the SS Chromotest. *Water Research*, v. 26, p. 419-429, 1992.

LE PENNEC, G.; LE PENNEC, M. Evaluation of the toxicity of chemical compounds using digestive acini of the bivalve mollusc *Pecten maximus* L. maintained alive *in vitro*. *Aquatic Toxicology*, v.53, p. 1-7, 2001.

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

LEMOS, N. G., DIAS, A. L., SILVA-SOUZA, A. T., MANTOVANI, M. S., Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2004.

LEWIN, B. Genes VII. Tradução de Henrique Ferreira et al. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001. p. 990

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.

MA T. H. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutation Research*, v. 426, p. 103-106, 1999.

MACGREGOR, J.T. et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, v. 189, p. 103–112, 1987.

MALINS, D. C.; MCCAIN, B. B.; BROWN, D. W.; CHAN, S. L. ; MYERS, M. S.; LANDAHL, J. T.; PROHASKA, P. G.; FRIEDMAN, A. J.; RHODES, L. D.; BURROWS, D. G.; GRONLUND, W. D.; HODGINS, H. O. Chemical pollutants in sediments and diseases of bottom-dwelling fish in Puget Sound, Washington. *Environmental science & technology*, v. 18, n. 3, p. 705-713, 1984.

MARTINEZ, C. B. R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: SILVA-SOUZA, A. T. *Sanidade de organismos aquáticos no Brasil*. São paulo: Abrapoa, 2006.

MATHUR, N. BHATNAGARA, P. NAGARB, P. KUMAR M. Mutagenicity assessment of effluents from textile/dye industries of Sanganer, Jaipur (India): a case study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 61 p. 105–113, 2005.

MCGEORGE, I. J.; LOUIS, J. B.; ATHERHOLT, T. B.; MC GARITY, G. J. Mutagenicity analysis of industrial effluents results and consideration for integration into water pollution control programs. In: WATERS, M.D., SANDHU, S.S., LEWTAS, J., CLAXTON, L., STRAUSS, G., NESNOW, S. (Eds.). *Short Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures, IV*. New York: Plenum Press, 1985. p. 247-268.

MENOLI, R. C. R. N. Avaliação dos efeitos mutagênicos ou antimutagênicos de extratos de Cogumelo-do-sol (*Agaricus blazei*) em cultura celulares. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 2001.

MILLER, W.A.; ATWILL, E. R.; GARDNER, I. A.; MILLER, M. A.; FRITZ, H. M.; HEDRICK, R. P.; MELLI, A. C.; BARNES, N. M.; CONRAD, P. A.; Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. *International Journal of Parasitology*, v. 35, p. 673-684, 2005.

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

MORIKAWA, Y.; SHIOMI, K.; ISHIHARA, Y.; MATSUURA, N.; Triple primary cancers involving kidney, urinary bladder and liver in a dye workers. *American Journal of Industrial Medicine*, v. 31, p. 44-49, 1997.

MYERS, M. S.; LANDAHL, J. T.; KRAHN, M. M.; MCC, B. B. Relation ship between hepatic neoplasm and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. WEST. COAST. *Environmental Health Perspectives*, v. 90, p. 7-15, 1991.

NACCI D.E, CAYULA S., JACKIM, E., Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay, *Aquatic Toxicology*, v. 35, p. 197–210, 1996.

NARBONNE J. F.; DJOMO J. E.; RIBEIRA, F. V.; GARRIGUES, P. Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol Environmental Safety*, v. 42, p.1-8, 1999.

NUKAYA, H.; SHIOZAWA, T.; TADA, A.; TERAQ, Y.; OHE, T.; WATANABE, T.; ASANOMA, M.; SAWANISHI, H.; KATSUHARA, T.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Identification of 2-[2-(acetylamino)- 4-amino-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo- 4 - chloro-2H-benzotriazole (PBTA-4) as a potent mutagen in river water in Kyoto and Aichi prefectures, Japan. *Mutation Research*, v. 492, p. 73-80, 2001.

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

ÖSTLING O.; JOHANSON J., Microelectrophoretics studies of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical Biophysical Research Communications*, v. 123, p. 291-298, 1984.

PACHECO, M.; SANTOS, A. M. Biotransformation, Endocrine, e Genetic Responses of *Anguilla anguilla* L. to Petroleum Distillate Products and Environmentally Contaminated Waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 49, p. 64-75, 2001.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: CURTIS D. KLAASSEN, (Ed.). *Casarett & Doull's, Toxicology, the basic science of poisons*. 6. ed. USA: McGraw-Hill Companies, 2001. p 133-224.

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

PETRAS, M. VRZOC, M. PANDRANGI, R. RALPH, S. PERRY, K. Biological monitoring of environmental genotoxicity in southwestern Ontario, In: F.M. Butterworth, L.D. Corkum, J. Guzman-Rincon (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Plenum Press, New York, 1995, p. 115–137.

PRESTON, J. R.; HOFFMANN, G. R. Genetic toxicology. In: CURTIS D. KLAASSEN, (Ed.). *Casarett & Doull's, Toxicology, the basic science of poisons*. 6. ed. USA: McGraw-Hill Companies, 2001. p 321- 350.

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 Molecular Mutagenesis*, v. 41, p. 85-91, 2003.

RALPH, S.; PETRAS, M. Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.29, p. 418-430, 1997.

RANK, J.; NIELSEN, M. H., *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazid, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research*, v. 390, p. 121-127, 1993.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M. S.; JORDÃO, B. Q.. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 3, p. 464-468, 2005.

ROBERTS, C. A. Selenium contamination in *Corbicula* transplanted into agricultural drains in the Imperial Valley, California, Division of Environmental Contaminants, Carsbad Field Office U. S. *Fish and Wildlife Service*, 1996.

RODRIGUES, M. A. L. R. Teste CHO/HGPRT. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R., eds. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. p.67-74.

RUIZ, E. F.; RABAGO. V. E. R.; MA, T. H. Presencia de agentes genotoxicos en aguas residuales empleadas para riego utilizando el sistema de micronucleos en células gaméticas de *Tra-descantia* clone 4430. In: /// Semana de la Ecología y Protección del Ambiente. 50: pp. 198. 1987. Universidad Autónoma de Queretaro. Mexico.

SALAGOVIC, J., GILLES, M., VERSCHAEVE, L., KALINA, I. The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites, *Folia Biologica*, v. 42, p. 17-21, 1996.

SASTRE, M. STEINERT, S. STREIB-MONTEE, R., Single cell gel/comet assay applied to the analysis of pollution-induced damage in the mud wick *Nassarius tegula* and the ribbed mussel *Musculista senhousia*, Abstracts of the 18th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, *Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL*, p. 77, 1997.

SAYATO, Y.; NAKAMURO, K.; UENO, H.; GOTO, R. Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in mutagenic adsorbates to a copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water. *Mutation Research*, v. 300, p. 207-213, 1993.

SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutation Research*, v. 31, p. 9-15, 1975.

SCHMID, W. The Micronucleus Test for Cytogenetics Analysis. In: Hollander, A. (ed.) *Chemical Mutagens; Principles and Methods for Their Detection*. New York: Plenum Press, 1976; v. 6, p. 31- 53.

SCHNURSTEIN, A. BRAUNBECK, T. Tail moment versus tail length - application of an in vitro version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 49 p. 187–196, 2001.

SHINKA, T.; SAWADA, Y.; MORIMOTO, S.; FUJINAGA, T.; NAKAMURA, J.; OHKANA, T. Clinical study on urothelial tumors of dye workers in Wakayama City. *Journal of Urology*, v. 146, p. 1504-1507, 1991.

SILVA, J. da, HEUSER, V., ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (orgs). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance. 2003. Cap.8, p. 167-170.

SINGH, N. P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research*, v. 455, p. 111-127, 2000.

SINGH, N.P.; MC COY, 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

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*, v. 10, p. 555-559, 1995.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test) - a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In Henderson, D.S. (ed.), *Methods in Molecular Biology, DNA Repair Protocols: Eucaryotic Systems*. Humana Press, Totowa, NJ. 1999. v. 113, p. 203–212.

SRIVASTAVA, R.; KUMAR, D.; GUPTA, S. K. Bioremediation of municipal sludge by vermiculture technology and toxicity assessment by *Allium cepa*. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1867-1871, 2005.

STEGEMAN, J.J; BROUWER, 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: HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE JR, P.M.; BERGMAN, H.L. (eds.) *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Boca Raton, Lewis Publishers, 1992, p. 235-335.

STEGEMAN, J. J.; LECH, J. J. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure., *Environmental Health Perspective.*, 90, 101-109, 1991.

STEIN, J. E.; REICHERT, W. L.; NISHIMOTO, M.; VARANASI, U. Overview of studies on liver carcinogenesis in English sole from Puget Sound: Evidence for a xenobiotic chemical etiology. II. Biochemical studies. *Science Total Environmental*, v. 94, p. 51-69, 1990.

STEINERT, S. A.; STREIB-MONTEE, R.; LEATHER, J. M.; CHADWICK, D. B. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Research*, v. 399, p. 56-85, 1998.

STEINKELLNER, H.; MUNSIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T. H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 31, p. 183-191, 1998.

THE ASIATIC CLAM, *Corbicula fluminea*. Disponível em ><http://www.pnl.gov/ecology/rivers/aquarium/clam>> Acessado em: 15/08/2006.

TICE, R. R.; ORMISTON, B. G.; BOUCHER, R.; LUKE, C. A.; PAQUETTE, D. E. Environmental biomonitoring with fetal rodent species. In: SANDHU, S. S.; DeMARINI, D. M.; MASS, M. J.; MOORE, M. M.; MUNFORD, J. L. (Eds.). Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures V. New York: Plenum Press, 1987. p. 175-180.

TICE, R. R., The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In Phillips, D. H. and Venitt, S. (eds), *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific, Oxford, UK, p. 315-339, 1995.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. The single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 206-221, 2000.

U.S. EPA, 2001. 1999 Toxics Release Inventory Public Data Release. Disponível em: <http://www.epa.gov/triexplorer/industry.htm>. Acessado em: 25/09/2006.

VAN GESTEL, C. A. M.; VAN BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, v. 5, p. 217-225, 1996.

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

VARGAS, V. M. F.; GUIDOBONO, R. R.; JORDÃO, C.; HENRIQUES, J. A. P. Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures. *Mutation Research*, v. 343, p. 31-52, 1995.

VIDAL, M.; BASSERES, A.; NARBONNE, J. Potential biomarkers of trichloroethylene and toluene exposure in *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 9, p. 87-97, 2001.

VILLELA, I. V. DNA Damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Research*, v. 697, p. 78-86, 2006.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. *Principles of ecotoxicology*. 2. ed. London: Taylor & Francis, 1996, p. 309.

WELLS, M.J.M.; ROSSANO, A.J.; ROBERTS, E. C. Textile wastewater effluent toxicity identification evaluation. *Environmental Contamination and Toxicology*, v. 27, p. 555-560, 1994.

ZHENG, D. Tradescantia-micronucleus tests on the industrial wastewater from a printing and dyeing factory in Fuzhou city. *J. Fujian No. Uni.* p 5-7. 1985.

ZHONG Y.; FENG, S.L.; LUO, Y.; ZHANG, G.D.; KONG, Z.M. Evaluating the genotoxicity of surface water of Yangzhong city using the *Vicia faba* micronucleus test and the comet assay, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 67 p. 217–224, 2001.