



Universidade Estadual de Londrina

Rafael Palhano Fedato

Danos genéticos em bivalves *Corbicula fluminea* (Veneroidea, Corbiculidae) expostos à fração solúvel da gasolina

Londrina
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agrônomo do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Rafael Palhano Fedato

Danos genéticos em bivalves *Corbicula fluminea* (Veneroidea, Corbiculidae) expostos à fração solúvel da gasolina

Londrina
2009

Rafael Palhano Fedato

Danos genéticos em bivalves *Corbicula fluminea* (Veneroidea, Corbiculidae) expostos à fração solúvel da gasolina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvia Helena Sofia.

Londrina
2009

Rafael Palhano Fedato

Danos genéticos em bivalves *Corbicula fluminea* (Veneroidea, Corbiculidae) expostos à fração solúvel da gasolina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a **Silvia Helena Sofia**
Universidade Estadual de Londrina

Prof^o Dr. **Izabel Vianna Villela**
Instituto ROYAL

Prof^a Dr^a **Berenice Quinzani Jordão**
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 20 de fevereiro de 2009

Dedicatória

Dedico a realização dessa importante etapa de minha vida à Minha Família:

Meus pais Mário e Marcli

Meus Irmãos: Tiago, Mario Augusto e Leonardo

Meus Avós Cláudio e Icléia

Agradecimentos

À Deus por ser o articulador de todas as coisas em minha vida.

Aos meus pais em especial por acreditarem, investirem e incentivarem a qualquer custo. Prometo independência financeira pra breve. Obrigado! Amo muito vocês.

À minha orientadora Sílvia Helena Sofia que abriu as portas do laboratório para que eu pudesse fazer estágio. Talvez você não saiba o quanto sou grato pelos teus gestos de orientação, amizade, confiança e compromisso. Esse laço foi crescendo sob alguns tropeços meus, mas hoje estou aqui, finalizando uma etapa que você me ajudou a conquistar. A você minha eterna gratidão.

À Prof^a. Cláudia B. R. Martinez, minha segunda orientadora, pelo direcionamento e colaboração nestes quase três anos de convívio, serei sempre grato.

À Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral, Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular e CAPES.

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro a este trabalho.

Às Profas. Leda e Fernanda, por serem pessoas tão especiais e dedicadas.

À minha Professora Ms. Lindalva, por acreditar em mim e ser a grande facilitadora de minha entrada nesta Instituição. Muito obrigado pelo voto de confiança.

Ao prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani e profa. Dra. Marta Marques de Souza pelas valiosas sugestões durante estes dois anos de convívio.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Izabel Vianna Villela e Dra. Berenice Quinzani Jordão pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

À Sueli, secretária do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, por sempre ter um sorriso no rosto e receber-nos sempre disposta a ajudar.

Aos técnicos do Dário e Melyssa pela ajuda e atenção permanente.

A todos os Professores e Profissionais que de alguma forma fizeram parte desta minha caminhada.

Ao Bruno (tá maluco?) pelo aprendizado adquirido acompanhando ele ao longo de meu estágio de iniciação científica.

A toda galera do LAGEA que me acolheu super bem desde minha chegada em 25/04/2006 ao laboratório, onde fiz algumas amizades e lembranças que levarei por toda vida. ps. Não serei louco de tentar colocar todos os nomes aqui, são muitos pra uma cabeça prestes à defesa.

A todos os integrantes do LEFA pelo bom ambiente de trabalho e companheirismo para os dias de experimento.

Em especial à Lú Loira, Juliana e Carolzinha companheiras de corbículas e gasolina. Foi ó trabalhar com vocês.

AH, não poderia deixar de agradecer em especial, a todos que me ajudaram com as coletas: Lú Loira, Bel, Gabriel, Luzinha, Carolzinha, Renata, Tiago e Francisco.

Calma Natália, não teria como esquecer-la, ter tido você por perto foi muito bom, me ajudou tanto - com experimentos, coletas, até limpar casa. Conte sempre comigo. Te Omo.

À Dalita que admiro demais pelo companheirismo, dedicação e profissionalismo. Muito obrigado pelas conversas, dicas, broncas, ajudas e conselhos.

À Vanessa sempre disposta a ajudar. Nunca me esquecerei ta sua preocupação comigo. Caminhadas, conversas, liga pra ver se precisa de ajuda pra estudar pra estatística, etc. guardarei boas lembranças dessa nossa dupla. Ah! ia esquecendo das caronas. Obrigado por tudo!

Aos colegas e amigos conquistados do Programa de Mestrado. Pelas festas, pelo sucesso do 'Genética nas Férias', pelas conversas de corredores, por tudo.

Aos amigos de uma vida toda que sempre compreenderam minha ausência (Camila, Isabela, Lucken, e toda galera de Jataizinho).

À minha grande amiga e irmã Sarah, por sempre 'agüentar as pontas' comigo, me animar depois de um dia difícil, por ser sempre presente em minha vida, por entender as vezes que precisei dizer não, por ser uma pessoa que eu admiro tanto.

A todos que não foram citados aqui meu muito obrigado.

FEDATO, RAFAEL PALHANO. **Danos genéticos em bivalves *Corbicula fluminea* (Veneroidea, Corbiculidae) expostos à fração solúvel da gasolina.** 2009. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina.

Resumo

A contaminação de ecossistemas aquáticos por derivados de petróleo, como a gasolina, constitui um grave problema ambiental. A principal fonte de contaminação de solo e água pela gasolina deve-se a pequenos e contínuos vazamentos oriundos de postos de distribuição, que são favorecidos pelo envelhecimento e falta de manutenção dos tanques de armazenagem. Apesar disto, ainda são escassos os estudos na literatura que relatam os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos deste derivado do petróleo em organismos aquáticos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar possíveis danos genéticos da fração solúvel da gasolina (FSG) em bivalves da espécie *Corbicula fluminea* submetidos a exposições agudas (6, 24 e 96h) deste poluente. Adicionalmente, foi avaliada a capacidade de recuperação dos animais submetidos a 6h de exposição à FSG e períodos de 6, 24 e 96h de recuperação em água limpa. *C. fluminea* é um bivalve de água doce que vem sendo utilizado como organismo sentinela em diversos estudos ambientais. Para as análises, o ensaio do cometa foi empregado na avaliação de possíveis danos ao material genético de hemócitos e células de brânquias dos animais, enquanto o teste do micronúcleo e a análise de alterações nucleares foram utilizados para a estimativa de danos em hemócitos destes bivalves. Os resultados obtidos revelaram que a FSG promoveu danos no DNA de hemócitos e células branquiais de bivalves expostos a FSG durante 6, 24 e 96h. Contudo, os danos promovidos pela exposição de 6h foram reparados após 6 h de exposição do animal em água limpa. A ocorrência de hemócitos micronucleados aumentou significativamente após exposição à FSG de 96h. Portanto, a curta exposição (6h) à FSG produziu alterações no DNA de *C. fluminea* passíveis de reparo, entretanto, a exposição mais longa (96h) produziu alterações no material genético de origem clastogênica ou aneugênica, conforme indicado pelo teste do micronúcleo.

Palavras-chave: Ensaio do cometa, micronúcleo, hemócitos, brânquias, gasolina.

FEDATO, RAFAEL PALHANO. **Genetic damages in bivalves *Corbicula fluminea* (Veneroidea, Corbiculidae) after acute exposure to the water soluble fraction of gasoline**. 2009. Master Dissertation in Genetic and Molecular Biology. Universidade Estadual de Londrina.

Abstract

The contamination of aquatic ecosystems by petroleum derivatives, such as gasoline, represents a major environmental problem. Small and continuous leakages from gas stations, mainly due to the poor maintenance of the storage tanks, constitute the main source of water and soil contamination by gasoline. However, studies concerning the genotoxic and mutagenic effects of this fuel to aquatic organisms are still lacking. Thus, the aim of this study was to evaluate genetic damages in the mussel *Corbicula fluminea* after acute exposures (6, 24 and 96h) to gasoline water soluble fraction (GWSF). In addition, the capacity to recover the genetic damages was evaluated in mussels exposed to GWSF for 6h and then transferred to clean water for 6, 24 and 96h. *C. fluminea* represents a freshwater bivalve that has been used as a sentinel organism in environmental studies. The comet assay was employed to evaluate genetic damages in hemocytes and gill cells, while the micronucleus (MN) test and the occurrence of nuclear abnormalities were used to estimate DNA damages in the hemocytes. The results demonstrated that after 6, 24 and 96h of GWSF exposure mussels showed DNA damages both in hemocytes and gill cells. The damages observed after 6h exposure to GWSF were repaired 6h after the transference of the bivalves to clean water. The occurrence of MN in hemocytes increased significantly only after 96h exposure to GWSF. The shortest period of exposure to GWSF (6h) produced DNA alterations in *C. fluminea* which were repaired. On the other hand, the longest exposure (96h) produced clastogenic and/or aneugenic alterations in the genetic material, as indicated by the MN test.

Key words: Comet assay, micronucleus, hemocytes, gills, gasoline.

Sumário

I. Introdução	1
II. Objetivos	13
II.1 Objetivos Gerais	13
II.2 Objetivos Específicos	13
III. Artigo	14
1. Introdução	16
2. Material e Métodos	19
2.1 Espécie Estudada	19
2.2 Fração Solúvel da Gasolina	19
2.3 Coleta e Aclimatação dos Animais	20
2.4 Testes de toxicidade	20
2.5 Amostragem de hemolinfa e brânquias.....	21
2.6 Teste de Viabilidade Celular	23
2.7 Ensaio do Cometa	23
2.8 Controle da Técnica	25
2.9 Teste do Micronúcleo.....	25
2.10 Recuperação.....	26
2.11 Análise Estatística.....	27
3. Resultados	28
3.1 Viabilidade Celular	28
3.2 Ensaio de Toxicidade	28
3.2.1 Ensaio do Cometa	28
3.2.2 Teste do Micronúcleo.....	32
3.3 Recuperação.....	34
4. Discussão	37
5. Referências	43
IV. Conclusões	50
V. Referências Bibliográficas	51

I. Introdução

Mesmo ocupando menos de 1% da superfície do globo terrestre, os ecossistemas aquáticos dulcícolas são considerados de valor inestimável, em razão da importância destes como fontes naturais de recursos e da riqueza de biodiversidade que os ambientes dulcícolas abrigam (JOHNSON *et al.*, 2001). Apesar disto, os ecossistemas dulcícolas encontram-se seriamente ameaçados pelas mais variadas formas de interferência antropogênica, dentre as quais se incluem despejos de efluentes agrícolas, industriais e domésticos, os quais os impactam de forma extrema (JOHNSON *et al.*, 2001; FRENZILLI *et al.*, 2009). Dessa forma, Manson (1996) define a água como um bem escasso essencial à vida e que tem seus recursos cada vez mais comprometidos devido a ação antropogênica. Este comprometimento se agrava cada vez mais à medida que novos compostos químicos são sintetizados e lançados no ambiente, anualmente (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

O problema da contaminação ambiental tem sido alvo de vários estudos (LEMOS *et al.*, 2005; CAFFETTI *et al.*, 2008; CAVALCANTE *et al.*, 2008) que avaliam os danos causados nos mais diversos organismos (FRENZILLI *et al.*, 2004; VILLELA *et al.*, 2007) expostos a diferentes contaminantes (SIU *et al.*, 2004; JHA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005). Dentre os ecossistemas, o ambiente aquático é, sem dúvida, o mais prejudicado, pois mesmo de maneira indireta, acaba sendo o destino final de vários contaminantes utilizados pela ocupação humana (JHA *et al.*, 2005). As principais causas por esta descarga são oriundas de atividade industrial, urbana e agrícola (AL-SABTI; METCALFE, 1995; OHE *et al.*, 2004). Dessa forma, segundo o relatório apresentado em 2001 pela Agência Nacional de Águas (ANA), cerca de 70% dos rios que fazem parte das bacias hidrográficas que vão do Sergipe ao Rio

Grande do Sul apresentaram altos índices de contaminação (ANA, 2001). A descarga legal e acidental de compostos orgânicos e inorgânicos no ambiente aquático tem sido uma causadora de distúrbios na estrutura dos ecossistemas naturais (ÇAVAS *et al.*, 2005; JHA *et al.*, 2004) e vem deteriorando a qualidade do ambiente aquático (SILVA *et al.*, 2005).

Um dos principais problemas de contaminação aquática na atualidade relaciona-se aos desastres envolvendo derrames de petróleo e derivados (ZHANG *et al.*, 2003; ZHONG *et al.*, 2003; OHE *et al.*, 2004; SIMONATO *et al.*, 2006). É preciso levar em conta que o advento da revolução industrial e a urbanização em massa são fatores bastante relevantes para o aumento considerável na exploração destes combustíveis, bem como para o aumento da demanda por água limpa.

Embora os grandes vazamentos envolvendo navios petroleiros sejam preocupantes e ocupem amplo espaço na mídia, estima-se que a principal fonte de contaminação por petróleo e seus derivados deva-se a pequenos e contínuos vazamentos de combustíveis em postos de distribuição. No Brasil, estima-se que 20 a 30% dos postos de combustíveis apresentam problemas, seja pelo fato de manuseio incorreto de equipamentos para transferência de combustível (MANZOCHI, 2001 *apud* TIBURTIUS *et al.*, 2004; SOSA; ALVAREZ-RAMIREZ, 2008), seja por vazamentos favorecidos pela corrosão e rachaduras dos tanques de armazenagem (MOHAMMED; ALLAYLA, 1997; PROMME *et al.*, 1999; TIBURTIUS *et al.*, 2004, 2005 a,b). No Estado de São Paulo, no período 1984 a 2001, os vazamentos em postos de combustíveis foram responsáveis por cerca de 10% de todas as emergências ambientais atendidas e destas ocorrências, 75% referem-se ao vazamento de gasolina em postos de distribuição (CETESB, 2005).

A gasolina é uma mistura complexa de constituintes orgânicos líquidos e gasosos, composta principalmente de hidrocarbonetos, incluindo os aromáticos (PAIXÃO *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008). Os hidrocarbonetos monor aromáticos benzeno, tolueno e xileno (BTXs) estão entre os compostos mais danosos ao ambiente, tanto pela alta solubilidade destes em água, fator diretamente relacionado ao potencial poluidor destes compostos, quanto pela alta toxicidade aguda e crônica destes monoaromáticos (WATTS *et al.*, 2000; TIBURTIUS *et al.*, 2005a,b). Segundo Corseuil e Marins (1997), em razão da maior solubilidade destes hidrocarbonetos monoaromáticos, são eles os contaminantes que primeiro irão atingir o lençol freático. Tais hidrocarbonetos são os responsáveis pelos maiores danos ocasionados pela gasolina (POULSEN *et al.*, 1992). Para seres humanos, entre outros danos à saúde, estes contaminantes são considerados substâncias perigosas por agirem como depressantes do sistema nervoso central e por causarem leucemia em exposições crônicas. Dentre os BTEX (aqui incluído também o etilbenzeno), o benzeno é considerado o mais tóxico com padrão de potabilidade de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, segundo as normas do Ministério da Saúde (CORSEUIL; MARINS, 1997). Não menos importante são os efeitos dos hidrocarbonetos poli-aromáticos (PAHs), considerados uns dos piores contaminantes dos ambientes aquáticos devido aos seus efeitos mutagênicos e carcinogênicos sobre a biota (VAN DER OOST *et al.*, 2003), bem como por sua difícil degradação (PACHECO; SANTOS, 2001a, b). Além disso, os poluentes derivados de petróleo produzem alterações físico-químicas nos corpos d'água afetando diretamente a biota que nele vive. O óleo pode impregnar na superfície dos organismos e impedir as trocas gasosas, os compostos fenólicos impedem a absorção de oxigênio e os naftalenos são diretamente tóxicos para os organismos (GÓMEZ *et al.*, 2003). Estes compostos são, geralmente, evaporados

por efeito da radiação, no entanto, podem dissolver-se na água quando as moléculas mono e dicíclicas, bem como compostos apolares se incorporam à fração solúvel em água (ZIEMANN *et al.*, 1984).

Casos de acidentes ambientais envolvendo vazamentos de petróleo e derivados em águas continentais vêm se acumulando nos últimos anos no Estado do Paraná. Em julho de 2000, o vazamento de mais de quatro milhões de litros de óleo cru da Refinaria de Petróleo Presidente Getúlio Vargas, afetou diretamente a bacia hidrográfica do rio Barigüi, um importante afluente do rio Iguaçu, um dos mais importantes cursos hídricos do sul do Brasil (TIBURTIUS *et al.*, 2004). Em março de 2002, o ribeirão Lindóia, localizado em Londrina (PR), recebeu uma descarga de cerca de 100 mil litros de óleo diesel do vazamento de um “pool” de combustíveis (JORNAL DE LONDRINA, 2002).

Pacheco e Santos (2001a,b) tratam as frações solúveis de gasolina e óleo diesel como agentes genotóxicos e disruptores endócrinos. Vanzella *et al.* (2007) observaram altos índices de danos ao DNA com o ensaio do cometa e um aumento significativo na frequência de micronúcleos em peixes *Prochilodus lineatus* expostos à Fração Solúvel do Óleo Diesel (FSD), mostrando que compostos derivados de petróleo apresentam danos genotóxicos e mutagênicos.

Apesar dos destacados efeitos contaminantes da gasolina para os ambientes aquáticos e dos reconhecidos efeitos genotóxicos deste derivado do petróleo para diversos organismos, incluindo humanos (AHMED, 2001; PAIXÃO *et al.*, 2007), ainda são poucos os estudos na literatura relacionados aos danos causados pela gasolina em organismos aquáticos, especialmente em ambientes tropicais (VANZELLA *et al.*, 2007; SIMONATO *et al.*, 2008).

Nos ecossistemas aquáticos, os organismos invertebrados representam mais de 90% das espécies existentes, desempenhando importante papel no seu funcionamento (DIXON *et al.*, 2002). Espécies sésseis de mexilhões e outros bivalves, inclusive espécies exóticas como *Limnoperna fortunei* (VILLELA *et al.*, 2006, 2007) e *Corbicula fluminea* (BASACK *et al.*, 1998; RIGONATO *et al.*, 2005) são considerados bons indicadores de contaminação por metais pesados e compostos orgânicos, pois podem acumular uma série de contaminantes em seus tecidos, bem como apresentar várias alterações indicadoras de danos iniciais (VENIER *et al.*, 1997; O'CONNOR, 2002). Moluscos bivalves são também considerados animais relevantes para se estudar a qualidade de ambientes aquáticos tendo em vista que são organismos que filtram grande quantidade de água para provimento de suas necessidades respiratórias e nutricionais (BIGOT *et al.*, 2009). Outro aspecto importante é o fato de que tanto em trabalhos de campo quanto em trabalhos desenvolvidos dentro de laboratórios, os bivalves apresentam, em relação a outros invertebrados, a indução de cânceres melhores caracterizados, sugerindo assim, que estes moluscos representam um organismo sentinela ou então uma espécie substituta para estudos de efeitos neoplásicos em humanos (DIXON *et al.*, 2002).

Um bivalve que tem sido foco de diversos estudos toxicológicos de contaminação por poluentes é a espécie *Corbicula fluminea* (Müller, 1774), considerada indicadora de contaminação aquática (BASACK, 1997; LEGEAY *et al.*, 2005; CAFFETTI *et al.*, 2008), dada sua sensibilidade aos mais diversos contaminantes e à grande quantidade de água que filtra do meio (GOLDBERG *et al.*, 1975; PELTIER *et al.*, 2008). Esta espécie mostra-se também sensível à presença de agentes contaminantes como metais pesados (VILLAR *et al.*, 1999; LEGEAY *et*

al., 2005) e agrotóxicos (ZOU *et al.*, 2008), em ambientes aquáticos. As respostas de *C. fluminea* a descargas antropogênicas, contendo diversos contaminantes (CATALDO *et al.*, 2001; PELTIER *et al.*, 2008), e a hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, derivados do petróleo (COLOMBO *et al.*, 2005) foram também analisadas em diferentes estudos.

Corbicula fluminea é um molusco de água doce, pertencente à classe Bivalvia, ordem Veneroida, família Corbiculidae. É uma espécie nativa da Ásia leste e sul (Rússia leste, Filipinas, China, Coréia, Japão e outros países asiáticos), Austrália e África (KARATAYEV *et al.*, 2007). De acordo com estes autores, atualmente, *C. fluminea* é uma espécie distribuída por todo o mundo, sendo reconhecidamente uma espécie bioinvasora. Ainda segundo Karatayev *et al.* (2007), em continente americano, o primeiro registro para *C. fluminea* data de 1939, com ocorrência relatada para um rio dos Estados Unidos, de onde, então, teria se irradiado por todo o continente. Assim sendo, *C. fluminea* é considerada a espécie de água doce com distribuição mais extensa do continente americano (DARRIGRAN, 1992). Na América do Sul, *C. fluminea* foi registrada pela primeira vez por Ituarte em 1981 no Rio da Prata na Argentina e estima-se que sua entrada deva ter ocorrido por zona portuária, através de água de lastro na década de 1970.

Em território brasileiro, este bivalve apresenta uma ampla distribuição de ocorrência, sendo encontrado desde a região norte (PIMPÃO; MARTINS, 2008) até o sul do país (VEITENHEIMER-MENDES, 1981; CATALDO; BOLTOVSKOY, 1999; KARATAYEV *et al.*, 2007). O primeiro registro da ocorrência de *C. fluminea* no Brasil foi feito por Veitenheimer-Mendes (1981). Particularmente, na bacia do rio Paraná, *C. fluminea* pode ocorrer em densidades elevadas, variando entre 300 e 1000 indivíduos por metro quadrado (CATALDO; BOLTOVSKOY, 1999).

Diversas características biológicas de *C. fluminea* favorecem a habilidade invasora desta espécie, dentre as quais se destacam: a elevada capacidade reprodutiva deste bivalve, estágios juvenis de vida-livre favorecendo o arraste e conseqüente entrada dos indivíduos nos corpos d'água e, uma alta taxa de crescimento (McMAHON, 1983 *apud* BIDWELL *et al.*, 1995). Ainda, outra razão para o sucesso de *C. fluminea* na invasão de ecossistemas dulcícolas, como lagos e ribeirões, pode estar relacionada ao fato desta espécie se alimentar tanto na coluna d'água (usando um sifão para filtrar o alimento) quanto no sedimento (HAKENKAMP; PALMER, 1999; HAKENKAMP *et al.*, 2001).

Mesmo sendo *C. fluminea* uma espécie exótica, aspectos como a elevada capacidade de invasão destes animais, sua ampla ocorrência e abundância geralmente elevada de indivíduos de *C. fluminea* em vários ecossistemas aquáticos onde esta espécie tem sido encontrada, são fatores importantes para a escolha de tais organismos em estudos de contaminação aquática.

Em estudos de contaminação aquática envolvendo espécies de moluscos bivalves como organismos testes, células de hemolinfa, brânquias ou ainda, da glândula digestiva destes animais têm se mostrado bastante úteis em avaliações envolvendo a ação de agentes xenobióticos, comumente presentes em ambientes aquáticos, nos tecidos dos indivíduos expostos a estes agentes (RIGONATO *et al.*, 2005; BARSIENTE *et al.*, 2006; VILLELA *et al.*, 2006).

Dentre estes tecidos, a hemolinfa tem sido o tecido mais utilizado devido ao fato de os hemócitos já se apresentarem isolados, não necessitando, portanto, de ação mecânica ou enzimática para promover a dissociação celular, requisito básico para aplicação do ensaio do cometa e micronúcleo. Steinert e colaboradores (1998) realizaram avaliações genotóxicas utilizando hemolinfa do molusco *Mytilus*

galloprovincialis e observaram que, quando este esteve na presença de Hidrocarbonetos aromáticos poli-cíclicos e simultaneamente submetido à luz solar, houve uma redução do crescimento do animal e um aumento nos danos do DNA em relação ao grupo controle. Pavlica *et al.* (2001) utilizaram hemócitos para o ensaio do cometa em 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 e colaboradores (2003) avaliaram a hemolinfa desta mesma espécie de mexilhão quanto à genotoxicidade de amostras ambientais utilizando-se dos ensaios do cometa e micronúcleo (MN). 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.

Em bivalves filtradores, as células do epitélio branquial são as primeiras a estarem expostas ao contaminante presente na água representando, assim, um tecido alvo bastante interessante para monitoramento ambiental em ecossistemas aquáticos impactados (BARSIENE *et al.*, 2006). Embora Rigonato *et al.* (2005) tenham detectado um alto nível de dano basal neste tipo celular para a espécie de bivalve *C. fluminea*, vale ressaltar que a técnica de manipulação para isolamento de amostras celulares pode ser um fator determinante para esse elevado nível de danos a estas células isoladas. Contudo, trabalhos mais recentes vêm mostrando que a otimização dos métodos para obtenção de amostras celulares das brânquias já os tornam menos agressivos às células tanto para as brânquias de peixes (CAVALCANTE *et al.*, 2008) quanto para moluscos (BARSIENE *et al.*, 2006).

A Ecotoxicologia é a ciência que busca avaliar possíveis danos causados pelos mais diversos poluentes e dentro dela, a Genética Toxicológica é uma área voltada para a investigação dos efeitos de diversos agentes ao material genético dos organismos expostos a tais agentes (SHUGART, 1990; THEODORAKIS, 2001). Quando tais efeitos resultam em danos ao DNA dos organismos expostos, tais danos podem muitas vezes ser identificados em sua fase inicial. Tal fato possibilita a utilização de estratégias, na tentativa de se evitar que estes danos prejudiquem níveis mais elevados de organização biológica, comprometendo as comunidades dos organismos afetados (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Entre os biomarcadores que podem ser acessados em estudos ambientais, os biomarcadores genéticos têm sido rotineiramente utilizados em estudos de poluição aquática (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998). Nos bioensaios genéticos, o alvo toxicológico é o DNA, que existe em todas as formas celulares vivas. Assim pode-se extrapolar que compostos reativos com o DNA, em uma espécie, têm o potencial de produzir efeitos semelhantes em outras espécies (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

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 (KLEINJANS; VAN SCHOOTEN, 2002), que pode ocorrer por medidas contínuas de uma variável ambiental bem como o biomonitoramento através de algum organismo biológico (SILVA *et al.*, 2003).

Dentre os diversos ensaios genotóxicos, o *Ensaio do Cometa* (SCGE, do inglês *Single Cell Gel Electrophoresis*) vem sendo amplamente utilizado nos mais diversos tipos de estudos. Segundo Jha (2008) o uso desta técnica revolucionou a área da genética toxicológica ou eco-genotoxicologia. A alta sensibilidade da versão

alcalina deste ensaio possibilita a detecção de lesões primárias na molécula de DNA, seja em fita dupla ou simples, sítios incompletos de reparo, sítios apurínicos e apirimidínicos (álcali-lábeis) (TICE *et al.*, 2000).

O ensaio do cometa, segundo Tice *et al.* (2000), pode ser usado em amostra de células muito pequenas e envolve a detecção, sob condições alcalinas, de fragmentos de DNA, que na eletroforese migram do core nuclear muito mais rapidamente do que o DNA intacto, resultando na formação de um cometa com cauda. Assim, este ensaio se mostra como uma importante ferramenta para o monitoramento ambiental na detecção de estresse genotóxico e citotóxico (STEINERT, 1996). As lesões detectadas por este ensaio não indicam um dano permanente para o indivíduo, pois a técnica permite a detecção dos danos antes mesmo que o sistema de reparo da célula tenha atuado, mas ainda assim se mostra altamente eficiente nas avaliações de causa-efeito dos mais diversos poluentes (LEE; STEINERT, 2003; MATSUMOTO *et al.*, 2006; ÇAVAS; KONEN, 2007; VANZELLA *et al.*, 2007). Embora estas lesões também possam ser causadas eventualmente pelo próprio mecanismo do ciclo celular, a avaliação se dá sempre na comparação dos danos observados para ambos os grupos de tratamento: controle negativo, experimental e controle positivo (GONTIJO; TICE; 2003). Nas últimas décadas, uma série de estudos têm comprovado a eficácia da aplicação desta técnica para detectar danos genotóxicos promovidos pelos mais diversos contaminantes ambientais como metais, agroquímicos e derivados de petróleo (COLLINS *et al.*, 2008; JHA, 2008).

O *Teste do Micronúcleo* (MN) é um outro teste amplamente utilizado em avaliações de danos ao material genético de organismos expostos a vários tipos de agentes xenobióticos (VILLELA *et al.*, 2006, CAVALCANTE *et al.*, 2008). Os

micronúcleos são pequenos corpúsculos, estruturalmente similares a pequenos núcleos, contendo o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, por mecanismos de clastogênese ou aneugênese. Assim, o teste do micronúcleo é uma técnica que detecta mutagênese cromossômica em eucariotos (VILLELA *et al.*, 2003). Esta técnica detecta lesões cromossômicas que não foram reparadas mesmo após a atuação do sistema de reparo da célula (MARTINEZ; CÓLUS, 2002; VILLELA *et al.*, 2003). Villela *et al.* (2006) confirmam a sensibilidade tanto do ensaio do cometa quanto do ensaio do micronúcleo testados em hemolinfa de bilvaves expostos à radiação ultra-violeta e sulfato de cobre. Em conjunto com o teste do micronúcleo, a avaliação de alterações nucleares dos indivíduos expostos aos mais diversos contaminantes ambientais vem sendo considerada por alguns autores (VENIER *et al.*, 1997; BARSIENE; ANDREIKENAITE, 2007) que relacionam a maior ocorrência de alterações nucleares como núcleo fragmentado, binucleado e irregular como resultante da exposição à contaminantes ambientais, dada a maior frequência de alterações nos indivíduos experimentais em relação ao seus respectivos grupos controles.

Em associação com estas duas técnicas de estudo faz-se importante o uso do *Teste de Viabilidade Celular*, para que seja avaliado se o composto testado não estaria sendo citotóxico, ou seja, afetando diretamente a célula do indivíduo e resultando em processos apoptóticos e necróticos. Por outro lado, é necessário também avaliar, nos casos de células isoladas mecânica ou enzimaticamente de tecidos, se a técnica de isolamento empregada não estaria prejudicando a conformação da membrana, fazendo com que ela se torne inviável para a realização dos ensaios genotóxicos empregados (HARTMANN *et al.*, 2001).

Uma vez detectados danos genotóxicos em células de animais expostos aos mais diversos contaminantes ambientais, se faz necessário uma avaliação da capacidade de recuperação destes indivíduos frente a uma reestruturação do ambiente em que este habita. Dessa forma, alguns trabalhos já vêm abordando, em estudos laboratoriais, a capacidade de algumas espécies se recuperarem de danos genotóxicos provocados pelos mais diversos contaminantes ambientais (SILVA *et al.*, 2005; RIGONATO *et al.*, 2005). Um estudo de Rigonato *et al.* (2005) utilizando o ensaio do cometa em indivíduos da espécie *C. fluminea*, verificou que em 9 dias de recuperação após a exposição ao agente alquilante metil metanosulfonato, os indivíduos de *C. fluminea* voltaram a apresentar um nível basal de danos no DNA, sugerindo que esta espécie é capaz de recuperar danos genotóxicos frente à uma reestruturação do ambiente. No Trabalho de Silva *et al.* (2005) foram expostos ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* ao óleo diesel e após 24 h e 7 dias de recuperação, os indivíduos apresentaram uma diminuição na atividade da enzima de biotransformação GST (glutathione-S-transferase) em relação aos indivíduos expostos ao óleo diesel que não foram submetidos aos tempos de recuperação.

Diante do exposto e da falta de informações sobre os possíveis efeitos genotóxicos da gasolina, ou ainda da fração solúvel deste combustível, em animais de água doce, torna-se evidente a necessidade de um maior número de estudos voltados para esta abordagem. Com base na comprovada eficiência do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo para avaliação de danos ao material genético de organismos aquáticos e frente às ameaças frequentes a que estão sujeitos os ecossistemas aquáticos, o presente estudo teve como um de seus objetivos avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos da gasolina na espécie de bivalve *Corbicula fluminea*.

II. Objetivos

II.1 Objetivos gerais

- Avaliar o efeito genotóxico e mutagênico da Fração Solúvel da Gasolina para a espécie de bivalve dulcícola *Corbicula fluminea* em exposições agudas.
- Avaliar a capacidade de recuperação de danos genotóxicos dos animais promovidos pela exposição à FSG.

II.2. Objetivos específicos

- Avaliar, por meio dos ensaios do cometa, micronúcleo e alterações nucleares, o potencial genotóxico e mutagênico da FSG para células obtidas de hemolinfa e brânquias da espécie de bivalve *C. fluminea* após exposições agudas de 6, 24 e 96h.
-
- Avaliar por meio do ensaio do cometa a capacidade de recuperação dos danos genotóxicos em hemócitos e células das brânquias dos indivíduos expostos à FSG por 6h.
- Comparar a sensibilidade dos tecidos utilizados (hemolinfa e brânquias) para detecção do agente químico utilizado neste trabalho.

III. Artigo

Artigo a ser submetido ao Periódico

Mutation Research

**Danos genéticos em *Corbicula fluminea* (Veneroidea, Corbiculidae)
expostos à fração solúvel da gasolina**

Rafael Palhano Fedato¹, Cláudia Bueno dos Reis Martinez², Silvia Helena Sofia^{1}*

¹Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina

²Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina

Endereço: Rodovia Celso Garcia Cid, – PR 445 – Km 380 – Campus Universitário.

Cx. Postal – 6001 CEP – 86051-990

Londrina – PR – Brasil

Telefone: 55-43-33714437

E-mail: shsofia@uel.br

* Autor para Correspondência

Resumo

Atualmente pequenos e contínuos vazamentos de gasolina em postos de distribuição, favorecidos pelo envelhecimento dos tanques de armazenagem, constituem importantes fontes de contaminação aquática. Apesar disto, ainda são escassos os estudos na literatura que relatam os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos deste derivado do petróleo em organismos aquáticos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar possíveis danos genéticos da fração solúvel da gasolina (FSG) em bivalves dulcícolas da espécie *Corbicula fluminea* submetidos a exposições agudas (6, 24 e 96h) deste poluente. Adicionalmente, foi avaliada a capacidade de regeneração após três períodos de recuperação (6, 24 e 96h) de animais expostos por 6h à FSG. Para as análises, o ensaio do cometa foi empregado na avaliação de lesões primárias ao material genético de hemócitos e células de brânquias dos animais ainda passíveis de reparo, enquanto o teste do micronúcleo e a análise de alterações nucleares foram utilizados para a estimativa de danos mutagênicos em hemócitos destes bivalves. Os resultados obtidos revelaram que a FSG promoveu danos no DNA de hemócitos e células branquiais de bivalves expostos a FSG durante 6, 24 e 96h. Contudo, os danos promovidos pela exposição de 6 h foram reparados após 6 h de exposição do animal em água limpa. A ocorrência de hemócitos micronucleados aumentou significativamente após exposição à FSG de 96h. Portanto, a curta exposição (6h) à FSG produziu alterações no DNA de *C. fluminea* passíveis de reparo, entretanto, a exposição mais longa (96h) produziu alterações no material genético de origem clastogênica ou aneugênica, conforme indicado pelo teste do micronúcleo.

Palavras-chave: Ensaio do cometa, micronúcleo, hemócitos, brânquias, gasolina.

1. Introdução

As descargas deliberadas ou acidentais de compostos químicos antropogênicos no ambiente aquático estão entre as principais causas de distúrbios na estrutura dos ecossistemas naturais [1]. Vários são os agentes químicos contaminantes que atingem continuamente os corpos d'água na atualidade, sendo a maioria destes agentes resultante de atividades urbana, industrial e agrícola [2].

Do conjunto de poluentes que atingem os ecossistemas aquáticos, o petróleo e seus derivados, como a gasolina, estão entre os de impactos ecologicamente mais relevantes [3]. Embora os grandes desastres envolvendo os derrames de petróleo e seus derivados tenham um papel importante na contaminação de ambientes aquáticos [4-8], os vazamentos pequenos e contínuos de combustíveis como a gasolina em postos de distribuição, favorecidos em grande parte pelo envelhecimento dos tanques de combustíveis, constitui uma das principais fontes de contaminação dos solos e águas [9-11]. Atividades de recreação em ambientes aquáticos, envolvendo pequenos barcos, bem como o amplo uso da gasolina em veículos e máquinas são também fatores determinantes para a gasolina estar entre os produtos do petróleo mais comumente derramados no ambiente [3,12].

A gasolina é uma mistura complexa de constituintes orgânicos líquidos e gasosos, composta principalmente de hidrocarbonetos, incluindo os aromáticos [12,13]. Os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno e xileno (BTXs) estão entre os compostos mais danosos ao ambiente, tanto pela alta solubilidade destes em água, fator diretamente relacionado ao seu potencial poluidor destes, quanto pela alta toxicidade aguda e crônica destes.[9-11]. Tais hidrocarbonetos são os responsáveis pelos maiores danos ocasionados pela gasolina [14]. Não menos

importante são os efeitos dos hidrocarbonetos poli-aromáticos (PAHs), considerados uns dos piores contaminantes dos ambientes aquáticos devido aos seus efeitos mutagênicos e carcinogênicos sobre a biota [15], bem como por sua difícil degradação [3].

Outro problema da gasolina em alguns países relaciona-se aos vários tipos de aditivos que esta carrega, tal como o éter metil – *tert* - butil ou MTBE (*methyl-tert-butyl ether*) aplicado ao combustível com a finalidade de se obter melhor combustão, e que tem também se mostrado tóxico a vários organismos aquáticos [16]. No Brasil, a contaminação aquática por gasolina constitui também um problema bastante grave, uma vez que esta é aditivada com cerca de 20% de etanol, o qual aumenta a solubilidade dos hidrocarbonetos em água, favorecendo sua migração nos ambientes aquáticos [10,11].

Apesar dos destacados efeitos contaminantes da gasolina para os ecossistemas aquáticos e dos reconhecidos efeitos genotóxicos deste derivado do petróleo para diversos organismos, incluindo humanos [13,17], ainda são poucos os estudos na literatura relacionados aos danos ao material genético causados pela gasolina em organismos aquáticos.

Em ambientes aquáticos, espécies sésseis de mexilhões e outros bivalves são considerados bons bioindicadores de contaminação por metais pesados e compostos orgânicos, pois podem acumular uma série de contaminantes em seus tecidos, bem como apresentar várias alterações indicadoras de danos iniciais [18]. Um bivalve que tem sido foco de diversos estudos toxicológicos de contaminação por poluentes é a espécie *Corbicula fluminea*, considerada indicadora de contaminação aquática, dada a sua alta sensibilidade aos mais diversos contaminantes e à grande quantidade de água que filtra do meio [19,20]. *C. fluminea*

é também reconhecidamente uma espécie bioacumuladora [20]. Por outro lado, registros na literatura mostram que esta espécie apresenta também uma reconhecida capacidade de eliminação dos xenobióticos adquiridos [20] ou ainda uma considerável capacidade de degradação destes [21].

Assim, com base na reconhecida sensibilidade e eficiência dos ensaios do Cometa e Micronúcleo (MN) na detecção de danos genéticos [22,23], o presente trabalho investigou os efeitos ao DNA de indivíduos de *C. fluminea* submetidos à exposição aguda da fração solúvel da gasolina (FSG), onde compostos polares, mono e di-aromáticos estão normalmente presentes [13]. Adicionalmente, frente aos possíveis danos genéticos encontrados, foi avaliada a capacidade regenerativa dos danos promovidos nos organismos expostos durante 6 h a esta mesma fração da gasolina.

2. Material e métodos

2.1 Espécie estudada

Corbicula fluminea é um molusco (Bivalvia, Corbiculidae) dulcícola, nativo do sul e leste asiático, Austrália e África, que se encontra atualmente distribuído por todo o mundo [24]. Considerado uma espécie de bivalve altamente invasiva, após sua introdução no Brasil, por volta de 1970 [24], este molusco distribuiu-se atualmente do norte ao sul do país [24-26]. Vivem tanto na coluna d'água, quanto no sedimento, filtrando grande quantidade de água para provimento de suas necessidades respiratórias e nutricionais [27,28].

2.2 Fração Solúvel da Gasolina (FSG)

Este trabalho foi feito com base em uma simulação de derrame de gasolina em ambiente tropical, baseado em [29] com modificações. Foi utilizada gasolina comum, não aditivada, adquirida sempre no mesmo posto de comercialização de combustíveis, diminuindo, assim, o risco de eventuais alterações na composição do produto.

Para o preparo da FSG, uma solução constituída de uma parte de gasolina para quatro partes de água foi mantida por 24 h, seis das quais sob incidência de luz solar intensa e o restante ao abrigo da luz. O diferencial desta técnica de preparo da fração solúvel em água da gasolina está na exposição à luz solar, a qual promove a degradação e solubilização de moléculas fotossensíveis. Após as 24 h de preparo, foi obtida uma solução com duas fases, uma camada superficial de óleo e outra mais espessa contendo a água e o que nela se solubilizou. Com o auxílio de uma mangueira, esta solução abaixo da faixa de óleo foi retirada e armazenada em um

recipiente plástico dentro de câmara fria, onde ficou armazenada por no máximo 5 dias até o momento de utilização.

2.3 Coleta e aclimação dos animais

Os espécimes de *C. fluminea* foram coletados às margens de um lago urbano (Lago Igapó III), no município de Londrina, estado do Paraná, sul do Brasil. Os animais coletados foram transportados em um recipiente contendo água do lago e uma quantidade reduzida de sedimento. No laboratório, estes animais foram submetidos a uma pré-lavagem em um recipiente (5 L) contendo água desclorada, para a remoção do excesso de sedimento incrustado na concha do animal. Após esta rápida lavagem, os animais foram transferidos para aquários (20 L) contendo 10 L de água desclorada e cerca de 40 indivíduos por aquário, onde permaneceram por 21 dias, a fim de que houvesse uma detoxificação e uma possível recuperação de eventuais danos biológicos. Transcorrido este período, os animais foram submetidos aos diferentes tratamentos. A ausência de cloro na água foi verificada utilizando-se um kit comercial para teste de cloro (Atlantys).

Durante todo o período em laboratório, os animais foram mantidos em água desclorada, permanentemente aerada, temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e expostos a fotoperíodos de 12 horas.

2.4 Testes de toxicidade

Durante o período de aclimatação bem como durante as exposições agudas, não foram observados óbitos resultantes da exposição dos animais aos diferentes tratamentos. Foram realizados testes estáticos de toxicidade de exposição aguda (6, 24 e 96 h) para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos para *C. fluminea* expostos à FSG em uma diluição de 5%. Foram estabelecidos dois grupos de animais: CTR (controle negativo) e FSG (grupo experimental). Em cada grupo, 10 animais foram expostos a um volume de 10 L em aquários com capacidade para 20 L. Os animais do grupo controle negativo (CTR) foram expostos apenas a água limpa desclorada e foram amostrados ao final de cada intervalo experimental, juntamente com os indivíduos expostos à fração solúvel da gasolina (FSG). Os indivíduos de *C. fluminea* utilizados nos experimentos apresentaram um tamanho médio de 2,5 cm (Fig. 1).



Fig. 1. Exemplar de *Corbicula fluminea*.

2.5 Amostragem de hemolinfa e brânquias

As amostras de hemolinfa para realização do ensaio do cometa foram obtidas e manipuladas conforme [30], com algumas modificações. As amostras de hemolinfa dos animais foram coletadas do músculo adutor posterior de cada indivíduo, utilizando-se uma seringa de 1 mL e obtendo-se cerca de 500 μ L de hemolinfa por animal amostrado. Durante todo o período de amostragem, as amostras de hemolinfa coletadas para ambos os ensaios utilizados foram mantidas em um recipiente com gelo. Entretanto, algumas adequações nos procedimentos de coleta de amostras para os ensaios do cometa e micronúcleo tiveram que ser efetuadas para uma melhor preservação das células para cada um destes ensaios genéticos.

Para obtenção das amostras de hemolinfa para realização do teste do micronúcleo, foi adotado procedimento descrito por [31]. As seringas utilizadas na coleta de hemolinfa para este teste, foram previamente lavadas com EDTA (10 mM) para diminuir a aglomeração e garantir a integridade dos hemócitos, um dos problemas freqüentes. Ainda em relação à obtenção de amostras para o teste do MN, imediatamente após a coleta da hemolinfa, foram acrescentados 500 μ L de solução de citrato de sódio a 1% ao volume da hemolinfa coletada (V:V) (solução levemente hipotônica, que impede que as células murchem e também ajuda no combate à aglomeração dos hemócitos). Após 7 min, a esta suspensão celular foi acrescido um volume de 40% de solução formalina (formol 4%). Transcorridos 10 min deste procedimento, este material foi então centrifugado.

As amostras de hemolinfa obtidas a partir deste procedimento, assim como aquelas obtidas para o ensaio do cometa, foram centrifugadas a 550 g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os precipitados formados ressuspensos

em solução salina (NaCl 25,22 mM, KCl 1,26 mM, CaCl₂ 2,21 mM, MgCl₂ 0,59 mM, Dextrose 1,0 mM) e mantidos sob refrigeração por no máximo 1 hora até a realização dos ensaios. As amostras de hemolinfa utilizadas para o teste do MN e do ensaio do cometa foram ressuspensas em volumes diferentes de solução salina, respectivamente, 120 µL e 50 µL (volume mínimo necessário para o preparo de duas lâminas histológicas para cada um dos ensaios).

Para a obtenção de células branquiais utilizadas apenas para o ensaio do cometa, primeiramente foi feita a retirada das brânquias dos animais com auxílio de uma pinça. Este material foi armazenado em microtubos com 500 µL de tampão fosfato livre de cálcio e magnésio (KCl 2,68 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; NaCl 136,89 mM; Na₂HPO₄), por um período de no máximo 1 h. Em seguida, as brânquias foram “picotadas”, com auxílio de tesoura, em 2 mL de solução de tripsina a 0,05%, onde permaneceram homogeneizando delicadamente em placa agitadora por aproximadamente 30 min. A suspensão obtida com células da brânquia foi filtrada em rede de plâncton de 30 µm para um béquer contendo 2mL de soro bovino fetal (SBF) diluído a 10% em PBS livre de cálcio e magnésio, para a inativação da tripsina. Com uma pipeta “Pasteur”, esta suspensão (4 mL) foi dividida em duas partes iguais de 2 mL e centrifugada a 550 g por 10 min. Também com auxílio de pipeta “Pasteur”, o sobrenadante foi removido e o precipitado formado ressuspensado em 60 µL de solução salina; volume este suficiente para o preparo de duas lâminas para o ensaio do cometa e uma lâmina para verificar a viabilidade celular.

2.6 Teste de viabilidade celular

Análises de viabilidade celular foram realizadas paralelamente aos ensaios do cometa e micronúcleo, utilizando-se a metodologia de exclusão do corante azul de tripan (*Trypan blue*), diluído a 0,01%. Para cada animal foram analisados 100 hemócitos e 100 células branquiais e a viabilidade foi expressa como a porcentagem de células viáveis no total de células contadas. Foram consideradas as amostras dos indivíduos cuja viabilidade foi superior a 80% [32].

2.7 Ensaio do Cometa

A partir das suspensões celulares de hemolinfa e de células branquiais, seguiram-se os procedimentos para a realização do ensaio do cometa, o qual foi realizado conforme [31], com algumas modificações [33]. As suspensões celulares foram misturadas a uma solução de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% e então, espalhadas sobre lâminas histológicas, previamente preparadas com um filme de agarose de ponto de fusão normal (1,5%). As lâminas foram em seguida submetidas aos seguintes procedimentos: (a) lise – 1 a 2 horas a 4 °C, protegidas da luz e submersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 10% DMSO, 1mL Triton X-100, pH 10,0); (b) relaxamento e desnaturação do DNA – células de hemolinfa e de brânquias permaneceram, respectivamente, por 30 e 40 min, no escuro, em tampão de eletroforese (0,3N NaOH, 1mM EDTA, pH> 13); (c) eletroforese – 30 min, 300 mA, 25 V, 1 V.cm⁻¹; (d) neutralização – três lavagens de 5 min cada em tampão (0,4M Tris, pH 7,5). As lâminas foram então fixadas com etanol absoluto por 10 min e mantidas sob refrigeração até análise.

As lâminas foram coradas com solução aquosa de brometo de etídio (20 mg.mL⁻¹) e foram analisadas sob microscópio de fluorescência Leica com filtro de

excitação azul (450-490 nm) e filtro de barreira de 515 nm, em objetiva de 100X. Todas as lâminas foram codificadas e analisadas sem conhecimento deste código. Foram analisadas 100 células por animal, classificadas da seguinte forma de acordo com o tipo de dano ao DNA encontrado: classe 0 (sem dano visível), classe 1 (tamanho da cauda até uma vez maior que o core nuclear), classe 2 (tamanho da cauda de uma a duas vezes maior que o core nuclear) e classe 3 (tamanho da cauda duas vezes maior que o core nuclear) [34]. A partir destas análises, foi calculado o escore de danos para cada indivíduo, aplicando-se a seguinte fórmula: $\text{Escore de Danos} = \Sigma (A \times 0) + (B \times 1) + (C \times 2) + (D \times 3)$, onde A, B, C e D correspondem, respectivamente, ao número de células com classe 0, 1, 2 e 3. Outra análise também foi realizada, levando-se em conta o número de nucleóides danificados de cada indivíduo, que foi calculado da seguinte forma: $B + C + D$, onde B, C e D correspondem, respectivamente, ao número de células de classe 1, 2 e 3 [35].

2.8 Controle da técnica

Para controle da eficiência da técnica, bem como dos procedimentos adotados, foi realizado um ensaio em paralelo com o agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS) que tem ação direta na molécula de DNA. Para este ensaio, 8 animais foram expostos durante 6 h em volume de 0,2 L em solução de MMS na concentração final de $4 \times 10^{-4}\text{M}$.

2.9 Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo foi realizado conforme [36]. As amostras da hemolinfa foram espalhadas sobre lâminas de vidro, submetidas a secagem por 24 h, em ausência de luz, fixadas em metanol absoluto por 10 minutos e então, coradas com Giemsa (5%) por 10 minutos. Um total de 3000 hemócitos por animal foi analisado sob microscópio de luz Olympus (em um aumento de 1000x). Apenas hemócitos com membranas intactas foram considerados para a análise. Durante esta etapa, quatro categorias de hemócitos foram identificadas: hemócitos normais, hemócitos com micronúcleo, hemócitos binucleados e hemócitos com outras alterações nucleares (Fig. 2). As frequências médias de cada categoria identificada foram estimadas e expressas por 1000 células (%).

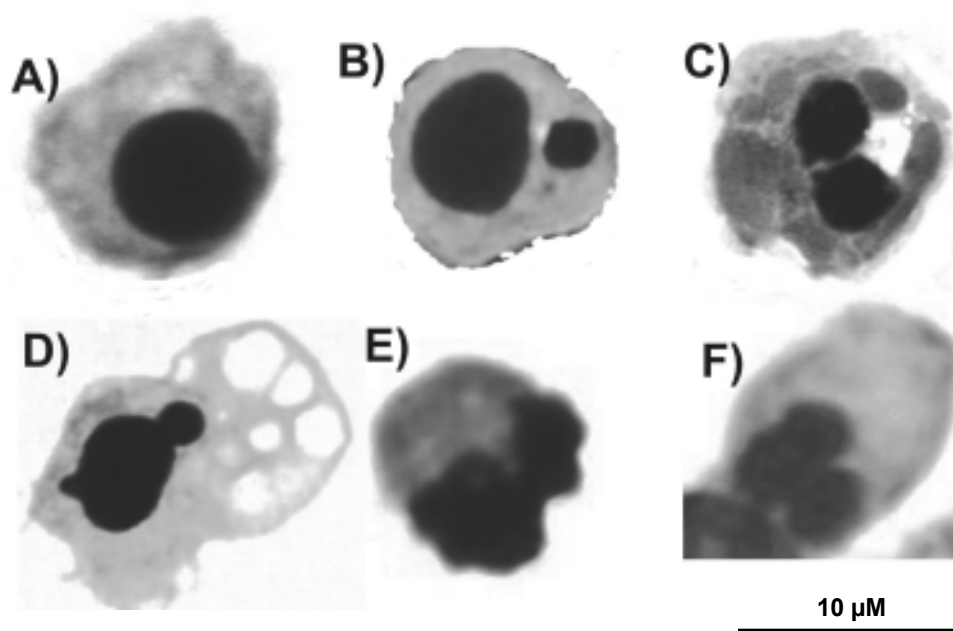


Fig. 2. Hemócitos de *C. fluminea* corados com Giemsa 5%. A) Hemócito normal; B) Hemócito micronucleado; C) Hemócito binucleado; D-F) alterações consideradas dentro do grupo de outras alterações: D-E) Hemócitos com núcleo irregular; F) Hemócito trinucleado.

2.10 Recuperação

Para verificar a capacidade de recuperação dos danos genéticos nos hemócitos de *C. fluminea* ocasionados após 6 h de exposição à FSG, foi realizado um teste estático com dois grupos de 18 animais cada um: grupo recuperação da fração solúvel da gasolina (RecFSG) e grupo recuperação controle negativo (RecCTR). Animais do grupo RecCTR ficaram expostos por 6 h em um aquário contendo 10 L de água limpa desclorada, enquanto os animais do grupo RecFSG foram submetidos a este mesmo tempo de exposição à FSG (5%). Em seguida, os animais do grupo RecFSG foram transferidos para outro aquário contendo apenas água limpa (10 L) e os animais do grupo RecCTR permaneceram no mesmo aquário. Feito isto, seis animais de cada grupo foram amostrados após 6, 24 e 96 h de recuperação.

2.11 Análise Estatística

Após verificação da distribuição dos dados e homogeneidades da variância, os resultados de escore de danos, número de nucleóides danificados, frequência de MN e ANs, obtidos para os grupos CTR e FSG, em cada tempo de exposição, foram comparados entre si pelo teste t de student (paramétrico) ou Mann-Whitney (não paramétrico). Os resultados obtidos com os animais expostos ao MMS foram comparados com os grupos CTR e FSG pela ANOVA (critério único) e as diferenças foram localizadas pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SigmaStat 2.0 e foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Viabilidade celular

Os testes de viabilidade celular revelaram viabilidades superiores a 95% e 90% para os hemócitos e células das brânquias, respectivamente, isoladas de *C. fluminea*, não indicando citotoxicidade da FSG para os indivíduos analisados e ausência de danos causados no manuseio do material biológico que pudesse comprometer as análises deste material.

3.2. Ensaio de Toxicidade

3.2.1 Ensaio do Cometa

Os resultados com o ensaio do cometa para células de hemolinfa e brânquias de indivíduos de *C. fluminea* expostos ao agente alquilante de ação direta MMS, na concentração de $4 \times 10^{-4}M$, apresentaram em ambos os tecidos avaliados um aumento significativo tanto no número de nucleóides danificados quanto no escore médio de danos quando comparados com os animais do grupo CTR (Tabela 1).

Tabela 1.

Freqüência relativa de nucleóides (%) observada em cada uma das classes de cometa (0, 1, 2 e 3), número médio de nucleóides danificados (média \pm EP) e escore médio de danos (média \pm EP) em hemócitos e células brânquiais de *Corbicula fluminea* expostos ao agente alquilante Metil Metano-Sulfonato (MMS) e grupo controle negativo (CTR) para a exposição de 6h. N = número de animais analisados.

Tecido	Grupo	N	Classe de Danos				Nucleóides danificados (Média \pm EP)	Escore de Danos (Média \pm EP)
			0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)		
Hemolinfa	MMS	8	18,86	55,86	20,14	5,14	81,14 \pm 3,75*	111,57 \pm 8,83*
	CTR	7	75,00	20,71	3,86	0,43	25,00 \pm 2,16	29,71 \pm 3,47
Brânquia	MMS	7	6,00	39,75	51,00	3,25	94,00 \pm 1,22*	151,50 \pm 4,80*
	CTR	7	69,86	26,29	3,71	0,14	30,14 \pm 2,55	38,50 \pm 1,82

* = indica diferença significativa em relação ao grupo CTR do respectivo tecido.

Para os animais expostos à FSG nos tempos de 6, 24 e 96h, foi observado no caso de hemócitos de *C. fluminea* um aumento significativo, em relação ao grupo CTR, no número médio de nucleóides de hemócitos danificados apenas nos animais expostos por 24 e 96h à FSG (Tabela 2). No caso das células das brânquias, as análises revelaram um aumento significativo no número médio de nucleóides danificados dos animais do grupo FSG em relação à média observada para os animais do respectivo grupo CTR em todos os tempos de exposição (6, 24 e 96h) (Tabela 2).

Tabela 2.

Frequência relativa de nucleóides (%) observada em cada uma das classes de cometa (0, 1, 2 e 3) e número médio de nucleóides danificados (média \pm EP) em hemócitos e células de brânquias de *Corbicula fluminea* expostos à fração solúvel da gasolina (FSG) ou apenas à água (CTR, controle negativo) durante 6, 24 e 96h.

Tecido	Tempo	Grupo	N	Classe de Danos				Nucleóides danificados Média \pm EP
				0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
Hemolinfa	6h	CTR	7	75,00	20,71	3,86	0,43	25,00 \pm 2,16
		FSG	9	67,00	22,66	8,67	1,67	33,00 \pm 3,00
	24h	CTR	9	72,11	21,67	5,22	1,00	27,89 \pm 2,75
		FSG	8	60,13	27,13	10,00	2,75	39,88 \pm 3,20*
	96h	CTR	9	80,00	16,67	3,11	0,22	20,00 \pm 2,62
		FSG	8	68,75	23,38	5,88	2,00	31,25 \pm 4,17*
Brânquia	6h	CTR	7	69,86	26,29	3,71	0,14	30,14 \pm 2,55
		FSG	10	61,20	29,20	8,30	1,30	38,80 \pm 2,48*
	24h	CTR	8	72,88	22,25	4,38	0,50	27,13 \pm 4,02
		FSG	7	56,43	28,14	10,71	1,86	40,71 \pm 2,48*
	96h	CTR	7	78,57	18,86	2,57	0,00	21,43 \pm 1,39
		FSG	6	59,50	28,00	10,00	2,50	40,50 \pm 3,96*

* Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo CTR.

As médias de escores de danos, revelados pelo ensaio do cometa, para hemócitos e células das brânquias dos animais submetidos aos diferentes tratamentos e tempos de exposição mostraram para ambos os tecidos analisados, que os animais expostos à FSG apresentaram escores de danos significativamente maiores que os do grupo CTR, para todos os tempos de exposição (Fig. 3). Os dados obtidos neste trabalho não revelaram nenhuma relação entre nível médio de danos e tempo de exposição a que os animais foram submetidos, ou seja, não os danos não se mostraram maiores nas exposições mais longas. Portanto, as

diferenças numéricas das médias de escores e número de nuclóides danificados para os dois tecidos em questão não refletem nenhuma diferença estatisticamente significativa.

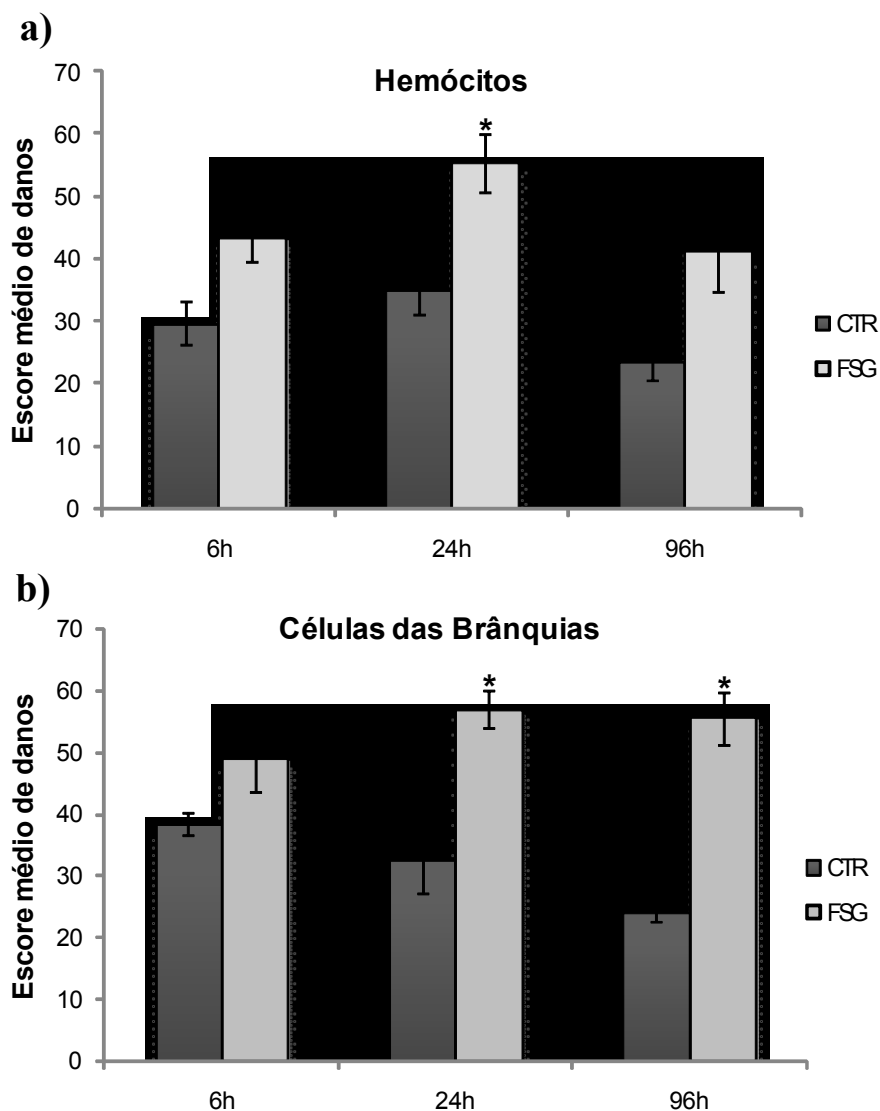


Fig. 3. Escores médios de danos calculados para hemócitos (a) e células de brânquias (b) de *C. fluminea* dos grupos controle negativo (CTR) e fração solúvel da gasolina (FSG) para os diferentes tempos de exposição. As linhas verticais representam o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo CTR.

3.2.2 Teste do Micronúcleo

Os resultados obtidos nas análises de ocorrência de Micronúcleos (MN) e Alterações Nucleares (AN) em hemócitos de *C. fluminea* estão apresentados na Tabela 3. Embora os resultados obtidos tenham mostrado uma tendência de maior frequência de ocorrência de MN nos animais do grupo FSG, para todos os tempos de exposição, somente após 96h foi possível detectar um aumento significativo na ocorrência de hemócitos micronucleados no grupo FSG em relação ao seu respectivo grupo CTR.

A ocorrência de hemócitos binucleados foi detectada em maior frequência em relação às demais características consideradas neste trabalho tanto para o grupo CTR quanto para o grupo FSG. Embora a frequência de hemócitos binucleados tenha se mostrado, numericamente, maior nos indivíduos expostos à fração solúvel da gasolina em relação aos respectivos grupos CTR para todos os tempos experimentais, quando comparados, esta diferença não representou nenhuma significância estatística (Tabela 3).

Em relação ao conjunto de alterações categorizadas como “outras alterações nucleares” (não incluídos aqui MN e células binucleadas) encontradas nos hemócitos de *C. fluminea* (Fig. 2), foi verificado um aumento significativo na frequência de ocorrência destas apenas para os animais expostos por 96h à FSG, quando comparados ao seu grupo controle negativo (Tabela 3).

Tabela 3.

Freqüência de ocorrência de alterações (micronúcleos – MN, células binucleadas e outros tipos de alterações) nucleares observada em hemócitos de *C. fluminea* para os dois grupos de tratamento: controle negativo (CTR) e fração solúvel da gasolina (FSG) nos diferentes tempos de exposição (6, 24 e 96h). N = número de animais analisados. EP = erro padrão.

Alterações	Tempo	Tratamento	N	Freqüência de alterações [média (%o) ± EP]
MN	6h	CTR	7	0,10 ± 0,06
		FSG	8	0,25 ± 0,14
	24h	CTR	8	0,04 ± 0,04
		FSG	8	0,21 ± 0,11
	96h	CTR	6	0,00 ± 0,00
		FSG	7	0,43 ± 0,10*
Células Binucleadas	6h	CTR	7	0,62 ± 0,11
		FSG	8	1,42 ± 0,58
	24h	CTR	8	0,29 ± 0,08
		FSG	8	0,67 ± 0,27
	96h	CTR	6	1,22 ± 0,24
		FSG	7	1,71 ± 0,37
Outras Alterações	6h	CTR	7	0,05 ± 0,05
		FSG	8	0,13 ± 0,09
	24h	CTR	8	0,13 ± 0,09
		FSG	8	0,25 ± 0,14
	96h	CTR	6	0,00 ± 0,00
		FSG	7	0,76 ± 0,14*

* Indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo CTR.

3.3 Recuperação

Os resultados das análises do ensaio do cometa com hemolinfa dos bivalves submetidos à recuperação de 6, 24 e 96h após 6h de exposição dos grupos teste, grupo FSG e grupo CTR, estão apresentados na Tabela 4 e Figura 4. Os valores referentes à exposição de 6h foram reapresentados novamente nesta tabela para melhor visualização dos dados de recuperação.

Com relação ao número de nucleóides danificados, os animais amostrados após 6h de recuperação não apresentaram diminuição significativa em relação à média observada nos animais expostos no grupo FSG. No entanto, foi observado uma diminuição significativa no número de nucleóides danificados dos grupos RecFSG nas recuperações de 24 e 96h em relação aos respectivos grupos RecCTR (Tabela 4).

Os resultados obtidos pelo cálculo do escore de danos para cada grupo de tratamento revelaram uma diminuição significativa nos danos detectados nos hemócitos dos indivíduos expostos ao grupo FSG quando comparados com os grupos RecFSG, submetidos aos três tempos de recuperação (6, 24 e 96h). Além disso, nenhuma diferença significativa foi detectada nas comparações entre os animais dos grupos RecCTR e RecFSG, para os três tempos de recuperação investigados.

Tabela 4.

Freqüência relativa de nucleóides (%) observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) dos dois grupos analisados - controle negativo (CTR), fração solúvel da gasolina (FSG) - e número de médio nucleóides danificados (média \pm EP) em hemócitos de *Corbicula fluminea*, durante os tempos de recuperação de 6, 24 e 96h. N = número de animais analisados.

Tratamento	Tempo	Grupo	N	Classe de Danos				Nucleóides danificados (Média \pm EP)
				0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
Exposição	6h	CTR	7	75,00	20,71	3,86	0,43	25,00 \pm 2,16#
		FSG	9	67,00	22,66	8,67	1,67	33,00 \pm 3,00*
Recuperação	6h	RecCTR	6	78,33	18,00	3,67	0,00	21,67 \pm 2,59#
		RecFSG	6	78,83	18,00	3,00	0,17	21,17 \pm 5,44#
	24h	RecCTR	6	79,33	18,00	2,57	0,00	20,67 \pm 4,36#
		RecFSG	5	80,20	14,00	5,20	0,60	19,80 \pm 3,53#
	96h	RecCTR	6	82,67	14,83	2,50	0,00	17,33 \pm 1,23#
		RecFSG	6	79,33	16,50	3,83	0,33	20,67 \pm 3,71#

* indica diferença significativa em relação ao grupo CTR; # indica diferença significativa em relação ao grupo FSG.

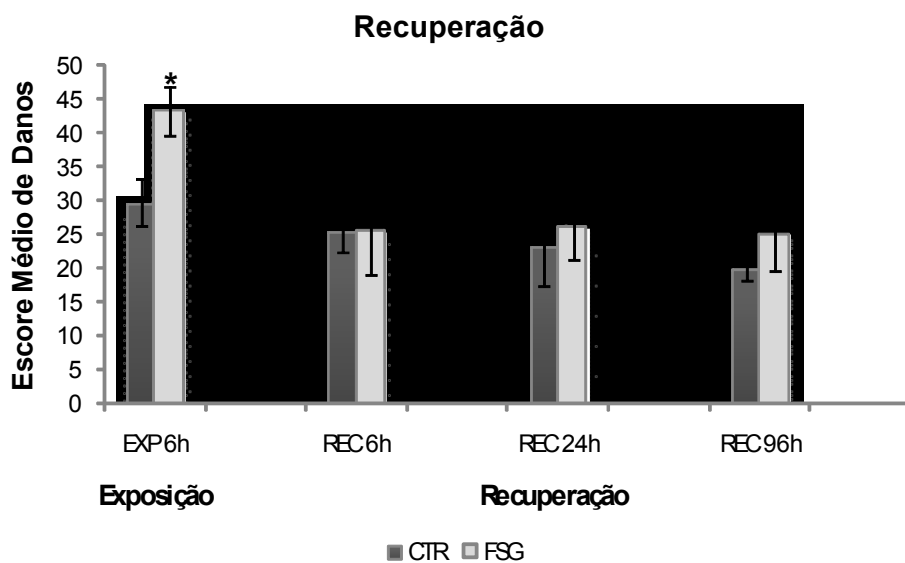


Fig. 4. As barras representam as médias de escores observados nos hemócitos de *C. fluminea* após exposição (EXP) de 6h a água (CTR) ou fração solúvel da gasolina (FSG) e recuperação (REC) nos tempos de 6, 24 e 96h. * representa diferença significativa em relação ao respectivo CTR; # representa diferença significativa em relação ao grupo FSG da exposição de 6h; @ representa diferença significativa em relação ao grupo CTR da exposição de 6h.

4. Discussão

Alguns estudos têm apontado *C. fluminea* como uma espécie sensível a diversos tipos de poluentes aquáticos [20,37,38]. Até o momento, contudo, ainda são poucos, na literatura, os trabalhos que avaliam os danos genéticos de agentes xenobióticos para esta espécie de bivalve. Dentre os poucos estudos de avaliação genotóxica envolvendo *C. fluminea*, esta espécie é reconhecida como uma ótima bioindicadora para a determinação de contaminantes genotóxicos em ambientes aquáticos [30] e como um bom modelo para monitorar tais ambientes usando-se o ensaio do cometa como técnica de estudo [39]. O hábito sedentário de *C. fluminea*, associado ao fato de serem animais que vivem em íntima associação com o meio onde habitam, sendo encontrados tanto no substrato quanto na coluna d'água, e serem organismos filtradores e bioacumuladores de quantidades consideráveis de agentes xenobióticos são algumas das características apresentadas por *C. fluminea* que tornam estes bivalves objetos interessantes para avaliações da ação de poluentes na biota aquática [28,30,37,38].

No presente trabalho, *C. fluminea* se mostrou uma espécie sensível à fração solúvel da gasolina (FSG), diluída a 5%, mostrando danos genéticos após exposições agudas a este poluente ambiental. Esta afirmação se apóia no fato dos resultados encontrados com o ensaio do cometa terem revelado danos significativos ao DNA de células de brânquias e de hemolinfa dos animais expostos a FSG em todos os tempos experimentais, quando foram considerados os escores de danos encontrados para os diferentes tratamentos.

Em bivalves, a hemolinfa é amplamente utilizada em ensaios ecotoxicológicos, pois além da fácil coleta deste tecido e dos hemócitos já estarem

isolados, é nela que irá circular todo contaminante a que o animal foi exposto [40,41]. Entretanto, outros tecidos de bivalves vêm sendo também utilizados em estudos de avaliação ambiental, como por exemplo, as brânquias destes animais [42,43], órgão por onde toda água que entra no animal atravessa, constituindo, assim, um órgão alvo bastante representativo para ensaios toxicológicos diversos. No presente trabalho, as células de brânquias se mostraram aparentemente mais sensíveis aos efeitos genotóxicos da FSG do que as células de hemolinfa, pois as primeiras apresentaram um aumento significativo no número de nucleóides danificados, em relação ao seu controle negativo, em todos os tempos de exposição, enquanto os hemócitos apresentaram este aumento apenas para os tempos de 24 e 96h. De forma similar, com os dados obtidos por [44] é possível observar que as células das brânquias se mostraram mais sensíveis aos danos detectados pelo ensaio do cometa em relação às células de hemolinfa quando levado em consideração a concentração mais alta de exposição dos indivíduos da espécie *Mytilus edulis* ao agente alquilante MMS. Destaca-se ainda, neste trabalho, o fato de terem sido detectados com o ensaio do cometa, na exposição dos indivíduos de *C. fluminea* com o agente alquilante MMS, danos genéticos expressivamente mais elevados em células de brânquias do que em células de hemolinfa dos animais expostos a este agente químico de ação direta sobre o DNA. Esta maior sensibilidade das células de brânquias ao MMS pode ser devida ao modo de exposição, com as brânquias servindo como porta de entrada para o contaminante [39]. [30] comparando a sensibilidade genotóxica de células de hemolinfa, brânquias e glândula digestiva de *C. fluminea* ao MMS, observaram que dos três tecidos avaliados, as células de brânquias se mostraram aparentemente menos adequadas

para estudos de avaliação genotóxica com estes bivalves não pela menor sensibilidade destas e sim pelos elevados níveis basais de danos no DNA encontrados para células deste tecido. Entretanto, ao contrário do presente estudo, no qual o isolamento de células de brânquias foi feito por dissociação enzimática, deve-se destacar que [30] fizeram uso exclusivamente da técnica de dissociação mecânica para a obtenção das células deste tecido, fator que pode ter sido determinante para detecção de um maior nível basal de danos.

O teste do micronúcleo (MN) é considerado uma das técnicas mais populares em estudos de genotoxicidade ambiental [45] e tem, de fato, se mostrando eficiente na detecção de danos genéticos para algumas espécies de bivalves expostos a petróleo e alguns de seus derivados [45,46]. No presente estudo, contudo, diferentemente do que foi observado com o ensaio do cometa, o teste do micronúcleo detectou danos significativos no material genético de *C. fluminea* apenas após 96h de exposição dos animais à FSG. Por outro lado, enquanto o ensaio do cometa se mostra uma técnica capaz de detectar danos ao DNA em curtos períodos de tempo, o aparecimento de MNs em um célula indica que esta passou por pelo menos um ciclo de divisão celular, para que estes MNs pudessem aparecer como uma alteração genética. Assim, em ensaios de exposição aguda, como no presente trabalho, o número de MNs esperado é geralmente pouco elevado, visto que as células dos organismos expostos devem ter atravessado um ou poucos ciclos celulares, dependendo muito da espécie em estudo.

De forma similar ao observado para os MNs, alguns tipos de alterações na forma de núcleos de hemócitos do grupo FSG apresentaram um aumento significativo em relação ao seu controle negativo apenas para o tempo de exposição

de 96h à FSG. Segundo [47], embora os mecanismos envolvidos no aparecimento destas alterações nucleares não estejam bem compreendidos, há indícios de que as alterações nucleares são induzidas em resposta à exposição a agentes genotóxicos [48]. De qualquer modo, tais alterações devem ser consideradas ainda com uma maior cautela em análises genotóxicas, por não serem um marcador de consenso entre os diferentes autores.

No presente estudo, os resultados obtidos com o ensaio do cometa empregado para avaliar a resposta de reparo de *C. fluminea*, após exposição aguda de 6h à FSG e recuperação destes animais em intervalos de 6, 24 e 96 h, que se seguiram à exposição, revelaram uma grande capacidade desta espécie de reparar aos danos previamente produzidos no DNA dos animais expostos ao poluente. Além disto, os resultados encontrados mostraram que em apenas 6h de recuperação os bivalves foram capazes de apresentarem novamente um escore de danos em nível basal, semelhante aos encontrados para os grupos CTR em todos os tempos de exposição.

O potencial poluente da gasolina está diretamente relacionado com os hidrocarbonetos aromáticos de maior solubilidade em água, ou seja, benzeno, tolueno e xilenos (BTXs) [10], que estão entre os compostos encontrados na fração aquosa na gasolina [12]. Contudo, outros compostos, como alguns poliaromáticos (PAH) com cadeias de 9 átomos de carbonos e naftaleno, presentes da gasolina utilizada no Brasil, se mostraram ainda mais tóxicos que estes hidrocarbonetos monoaromáticos [13]. A toxicidade de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) é amplamente reconhecida na literatura, tanto pela maior persistência destes

compostos nos ambientes aquáticos [49], quanto pelos danos variados causados na biota destes ambientes [3,50,51]. Incluídos entre os poluentes mais impactantes, os PAHs são considerados agentes mutagênicos e carcinogênicos [52], comprovadamente genotóxicos para diversos organismos aquáticos [5,50].

Estudos com outras espécies de moluscos bivalves apontam os PAHs como os prováveis causadores de danos genéticos encontrados nos animais presentes em locais onde estes agentes estavam presentes em grande quantidade [53] ou ainda em locais impactados por derrames de petróleo [45,52,54]. Assim, é possível que os PAHs sejam, pelo menos em parte, os responsáveis pelos danos ao DNA de *C. fluminea* expostos a FSG, detectados pelos ensaios do cometa e do micronúcleo no presente estudo. Entretanto, é importante se destacar que a interação dos PAHs com a luz solar pode ainda resultar na produção fotoquímica de derivados potencialmente mais genotóxicos que os PAHs [5,53].

Dentre os produtos presentes na FSG, os PAHs são comprovadamente metabolizados no citocromo P450, podendo gerar em decorrência deste processo, metabólitos que reagem com o DNA formando aductos, cujo reparo conduz a perda da integridade do DNA [5]. Além disto, o processo de biotransformação dos PAHs resulta no aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem ocasionar também danos ao material genético [5,50]. Em moluscos da espécie *Mytilus edulis*, [55] conseguiram purificar enzimas da família citocromo P450, mostrando atividade desta família de enzimas para bivalves. Por outro lado, [56] relatam que detectaram um aumento significativo na atividade da enzima glutationa-S-transferase (GST), uma enzima de biotransformação de fase II envolvida na metabolização de xenobióticos, em indivíduos da espécie *Crassostrea rhizophorae* expostos ao óleo

diesel. A atividade desta enzima, GST, também leva a produção de ROS que podem danificar diretamente a molécula de DNA.

O ensaio do cometa é reconhecidamente uma técnica eficiente na detecção de danos oxidativos ao DNA, danos estes, muitas vezes, passíveis de serem reparados com grande rapidez [57]. No presente trabalho, a rapidez com que os danos ao DNA de *C. fluminea* foram reparados reforçam a idéia de uma possível origem oxidativa para os danos encontrados. Adicionalmente, a comprovada capacidade desta espécie em degradar alguns tipos de hidrocarbonetos derivados de petróleo [21], bem como a rápida capacidade de recuperação de *C. fluminea* frente a alguns poluentes ambientais [20] podem ter sido dois fatores importantes neste processo de recuperação dos animais.

Os resultados encontrados neste estudo com o ensaio do cometa, teste do micronúcleo e alterações nucleares indicam que a fração solúvel da gasolina é um poluente de ações tanto genotóxica quanto mutagênica para *C. fluminea*. Ressalta-se que, neste estudo o ensaio do cometa se mostrou uma técnica altamente sensível na detecção de danos ao DNA deste bivalve, corroborando a reconhecida eficiência deste ensaio para avaliações genotóxicas com organismos aquáticos [47,58]. Estes dados sugerem que *C. fluminea* é uma espécie sensível para avaliação de danos ocasionados pela exposição a contaminantes ambientais, bem como em estudos de monitoramento ambiental, conforme já relatado em outros estudos [30,38].

5. Referências

- [1] A.N. Jha, Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview, *Mutat. Res.* 552 (2004) 1-17.
- [2] N. Johnson, C. Revenga, J. Echeveria, Managing water for people and nature, *Science* 292 (2001) 1071-1072.
- [3] M. Pacheco, M.A. Santos, Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters, *Ecotox. Environ. Safe.* 49 (2001a) 64–75.
- [4] C.H. Peterson, S.D. Rice, J.W. Short, D. Esler, J.L. Bodkin, B.E. Ballachey, D.B. Irons, Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science* 302 (2003) 2082-2086.
- [5] G. Frenzilli, V. Scarcelli, I. Del Barga, M. Nigro, L. Förlin, C. Bolognesi, J. Sturve, *Mutat. Res.* 552 (2004) 187-195.
- [6] A. Katsumiti, F.X.V. Domingos, M. Azevedo, M.D. Silva, R.C. Damian, M.I.M. Almeida, H.C.S. Assis, M.M. Cestari, M.A.F. Randi, C.A.O. Ribeiro, C.A. Freire, An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña oil spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil, *Environ. Monit. Assess* 2008 no prelo
- [7] C. Kelly, D. Santiollo, P. Johnston, G. Fayad, K.L. Baker, R.J. Law, Polycyclic aromatic hydrocarbons in oysters from coastal waters of the Lebanon 10 months after the Jihah oil spill in 2006, *Mar. Pollut. Bull.* 56 (2008) 1215-1233.
- [8] F. Melville, L.E. Andersen, D.F. Jolley, The Gladstone (Australia) oil spill – Impacts on intertidal areas: baseline and six months post-spill, *Mar. Pollut. Bull.* 2008 no prelo.
- [9] R.J. Watts, D.R. Haller, A.P. Jones, A.L. Teel, A foundation for the risk-based treatment of gasoline-contaminated soils using modified Fenton's reactions, *J. Hazard. Mater.* B76 (2000) 73–89.
- [10] E.R.L. Tiburtius, P. Peralta-Zamora, A. Emmel, E.S. Leal, Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados, *Química Nova* 28 (2005a) 61-64.

- [11] E.R.L. Tiburtius, P. Peralta-Zamora, A. Emmel, E.S. Leal, Treatment of gasoline-contaminated waters by advanced oxidation processes, *J. Hazard. Mater.* B126 (2005b) 86–90.
- [12] C.S. Chen, Yun-Wei Lai, Chien-Jung. Tien, Partitioning of aromatic and oxygenated constituents into water from regular and ethanol-blended gasolines, *Environ. Pollut.* 156 (2008) 988-995.
- [13] J.F. Paixão, I.A. Nascimento, S.A. Pereira, M.B.L. Leite, G.C. Carvalho, J.S.C. Silveira Jr. M. Rebouças, G.R.A. Matias, I.L.P. Rodrigues, Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: An approach to minimize environmental pollution risk, *Environ. Res.* 103 (2007) 365–374.
- [14] M. Poulsen, L. Lemon, J.F. Barker, Dissolution of monoaromatic hydrocarbons into groundwater from gasoline–oxygenate mixtures, *Environ. Sci. Technol.* 269 (1992) 2483–2489.
- [15] R. Van Der Oost; F.J. Van Schooten; F. Ariese; H. Heida; N.P.E. Vermeulen. Bioaccumulation, biotransformation and DNA binding of PAHs in feral eel (*Anguilla anguilla*) exposed to polluted sediments: a field survey. *Environment. Toxic. Chem.* 13 (1994) 859-870.
- [16] I. Werner, C.S. Koger, L.A. Deanovic, D.E. Hinton, Toxicity of methyl-*tert*-butyl ether to freshwater organisms, *Environ. Pollut.* 111 (2001) 83-88. 2001.
- [17] F.J. Ahmed, Toxicology and human health effects following exposure to oxygenated or reformulated gasoline, *Toxicol. Lett.* 123 (2001) 89–113.
- [18] T.P. O'Connor, National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA, *Mar. Environ. Res.* 53 (2002) 117–143.
- [19] E.D. Goldberg, The mussel watch: a first step in global marine monitoring, *Mar. Pollut. Bull.* 69 (1975) 111–132.
- [20] S.B. Basack, M.L. Oneto, N.R. Verrengia Guerrero, E.M. Kesten, Accumulation and elimination of pentachlorophenol in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58 (1997) p.497-503.

- [21] J.C. Colombo, A. Barreda, C. Bilos, N. Cappelletti, S. Demichelis, P. Lombardi, M.C. Migoya, C. Skorupka, G. Suárez, Oil spill in the Río de la Plata estuary, Argentina: 1. Biogeochemical assessment of waters, sediments, soils and biota, *Environ. Pollut.* 134 (2005) 277-289.
- [22] R.R. Tice; M. Furedi-Machacek; D. Satterfield; A. Udumudi; M. Vasquez; J.K. Dunnik. Measurement of micronucleated erythrocytes and DNA damage during chronic ingestion of phenolphthalein in transgenic female mice heterozygous for the *p53* gene. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 31 (1998) 113-124.
- [23] G.I.V. Klobucar, M. Pavlica, R. Erben, D. Papes, Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments, *Aquat. Toxicol.* 64 (2003) 15-23.
- [24] A.Y. Karatayev, D.K. Padilla, D. Minchin, D. Boltovskoy, L.E. Burlakova, Changes in global economies and trade: the potential spread of exotic freshwater bivalves, *Biol. Invas.* 9 (2007) 161-180.
- [25] D.H. Cataldo, D. Boltovskoy, Population dynamics of *Corbicula fuminea* (Bivalvia) in the Paraná river delta (Argentina), *Hydrobiologia* 380 (1999) 153-163.
- [26] D.M. Pimpão, D.S. Martins, Ocorrência do molusco asiático *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia, Corbiculidae) no baixo Rio Negro, Amazônia central. *Acta Amazônica* 38 (2008) 589-592.
- [27] C.C. Hakenkamp, S.G. Ribblett, M.A. Palmer, C.M. Swan, J.W. Reid, M.R. Goodson, The impact of an introduced bivalve (*Corbicula fluminea*) on the benthos of a sandy stream, *Freshwater Biol.* 46 (2001) 491-501.
- [28] A. Bigot; P. Doyen; P. Vasseur; F. Rodius. Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72 (2009) 382-387.
- [29] D.E. Nicodem; C.L.B. Guedes; R.J. Correa. Photochemistry of petroleum I. Systematic study of a brazilian intermediate crude oil. **Marine Chemistry**, 63 (1998) 93-104.

- [30] J. Rigonato, M.S. Mantovani, B.Q. Jordão, Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genet. Mol. Biol.* 28 (2005) 464-468.
- [31] I.V. Villela; I.M. Oliveira; J.C. Silveira; J.F. Dias; J.A.P. Henriques; J. Silva. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis** 628 (2007) 76-86.
- [32] D.G.S.M. Cavalcante, C.B.R. Martinez, S.H. Sofia, Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*, *Mutat. Res.* 655 (2008) 41-46.
- [33] T.P. Vanzella, C.B.R. Martinez, I.M.S. Colus, Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species, *Mutat. Res.* 631 (2007) 36-43.
- [34] I.V. Villela, I.M. Oliveira, J. Silva, J.A.P. Henriques, DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants, *Mutat. Res.* 605 (2006) 78-86.
- [35] T.S. Kumaravel, B. Vilhar, S.P. Faux, A.N. Jha, Comet Assay measurements: a perspective, *Cell. Biol. Toxicol.*, doi:10.1007/s10565-007-9043-9.
- [36] R.N. Hoftman, W.K. de Raat, Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulfonate. **Mutation Research** 104 (1982) 147-152.
- [37] C. Bilos; J.C. Colombo; M.J.R. Presa. Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Rio de la Plata Estuary, Argentina. **Environmental Pollution** 99, (1998) 1-11.
- [38] J.D Caffetti; M.S. Mantovani; M.C. Pastori; S.S. Fenocchio. First genotoxicity study of Paraná river water from Argentina using cells from the clam *Corbicula fluminea* (Veneroida Corbiculidae) and Chinese hamster (*Cricetulus griseus* Rodentia, Cricetidae) K1 cells in the comet assay. **Genetics and Molecular Biology** 31 (2008) 561-565.

- [39] D.H. Cataldo; J.C. Colombo; D. Boltovskoy; C. Bilos; P. Landoni. Environmental toxicity assessment in the Parana river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles. **Environmental Pollution** 112 (2001) 379-389.
- [40] C. Bolognesi; E. Landini; P. Roggieri; R. Fabbri; A. Viarengo. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 33 (1999) 287-292.
- [41] D.R. Dixon; A.M. Pruski; L.R.J Dixon; A.N Jha. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. **Mutagenesis** 17 (2002) 495-507.
- [42] P. Venier; S. Maron; S. Canova. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. **Mutation Research** 390 (1997) 33-44.
- [43] J. Rank. Intersexin *Littorina littorea* and DNA damage in *Mytilus edulis* as indicators of harbour pollution. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, no prelo (*on line*), 2009.
- [44] J. Rank; K. Jensen. Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. **Ecotoxicology and environmental safety**, 54 (2003) 323-329.
- [45] J. Baršienė; L. Andreikėnaitė; G. Garnaga; A. Rybakovas. Genotoxic and cytotoxic effects in the bivalve mollusks *Macoma balthica* and *Mytilus edulis* from the Baltic Sea. **Ecologija** 54 (2008) 44-50.
- [46] J. Baršienė; L. Andreikėnaitė. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in blue mussels exposed to crude oil from the North Sea. **Ecologija** 53 (2007) 9-15.
- [47] M.M. Hoshina; D.F. De Angelis; M.A. Marin-Morales. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis** 656 (2008) 44-48.

- [48] L. Serrano-Garcia; R. Montero-Montoya. Micronuclei and chromatine buds are related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 38 (2001) 38-45.
- [49] R. Van Der Oost; J. Beyer; N.P.E. Vermeulen. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 13 (2003) 57-149.
- [50] C.L. Mitchelmore; J.K Chipman. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, **Mutation Research** 399 (1998) 135–147.
- [51] M. Pacheco; M.A. Santos. Tissue distribution and temperature dependence of *Anguilla anguilla* L. EROD activity following exposure to model inducers and relationship with plasma cortisol, lactate and glucose levels. **Environmental International** 26 (2001b) 49–155.
- [52] B. Pérez-Cadahía; B. Laffon; E. Pásaro; J. Méndez. Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled Prestige crude oil. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** 138 (2004) 453-460.
- [53] S.A. Steinert; R. Streib-Montee; J.M. Leather; D.B. Chadwick. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. **Mutation Research** 399 (1998) 56-85.
- [54] G. Frenzilli; M. Nigro; B.P Lyons. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, 681 (2009) 80-92.
- [55] C. Porte; P. Lemaire; L.D. Peters; D.R. Livingstone. Partial purification and properties of cytochrome P450 from digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. **Marine Environmental Research**, 39 (1995) 27-31.
- [56] A.Z. Silva; J. Zanette; J.F. Ferreira; J. Guzinski; M.R.F. Marques; A.C.D. Bainy. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 62 (2005) 376-382.
- [57] A.R. Collins. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research** 681 (2009) 24-32.

[58] A.N. Jha. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**. 23 (2008).207-221.

IV. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- A fração solúvel da gasolina (FSG) mostrou-se genotóxica e mutagênica para a espécie de bivalve dulcícola *C. fluminea* em exposições agudas e sistema de tratamento estático.
- As células das brânquias mostraram-se, aparentemente, mais sensíveis aos danos genotóxicos detectados pelo ensaio do cometa, sendo, portanto, recomendadas para uso em estudos ambientais, juntamente com as células de hemolinfa.
- Danos genotóxicos após exposição aguda de 6h à FSG (5%) foram passíveis de reparo após curtos períodos de recuperação dos animais.
- Ambas as metodologias empregadas se mostraram eficientes na detecção dos danos genotóxicos e mutagênicos, pelos ensaios do cometa e micronúcleo, respectivamente.
- *C. fluminea* mostrou-se sensível à exposição aguda à FSG e uma espécie potencialmente adequada para ensaios genotóxicos voltados para o monitoramento ambiental.

V. Referências Bibliográficas

AHMED, F.J. Toxicology and human health effects following exposure to oxygenated or reformulated gasoline. **Toxicology Letters**, v.123, p.89–113, 2001.

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

ANA. Site oficial. Agência Nacional de Águas. Disponível em <http://www.ana.gov.br/diadaagua/relatorios.pdf>; acessada em 29 de janeiro de 2009.

BARŠIENĖ, J.; SCHIEDEK, D.; RYBAKOVAS, A.; SYVOKIENE, J.; KOPECKA, J.; FORLIN, L. Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus spp.* from different zones of the Baltic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v.53, p.469-478, 2006.

BARŠIENĖ, J.; ANDREIKĖNAITĖ, L. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in blue mussels exposed to crude oil from the North Sea. **Ecologija**, v.53, p.9-15., 2007.

BARŠIENĖ, J.; ANDREIKĖNAITĖ, L.; GARNAGA, G.; RYBAKOVAS, A. Genotoxic and cytotoxic effects in the bivalve mollusks *Macoma balthica* and *Mytilus edulis* from the Baltic Sea. **Ecologija**, v.54, p.44-50, 2008.

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

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

BIDWELL, J.R.; FARRIS, J.L.; CHERRY, D.S. Comparative response of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, and the Asian clam, *Corbicula fluminea*, to

DGH/QUAT, a monoxidizing molluscicide. **Aquatic Toxicology**, v.33, p.183-200, 1995.

BIGOT, A.; DOYEN, P.; VASSEUR, P.; RODIUS, F. Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.382-387, 2009.

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

BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; ROGGIERI, P.; FABBRI, R.; VIARENGO, A. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.33, p.287-292, 1999.

CAFFETTI, J.D.; MANTOVANI, M.S.; PASTORI, M.C.; FENOCCHIO, A.S. First genotoxicity study of Paraná river water from Argentina using cells from the clam *Corbicula fluminea* (Veneroida Corbiculidae) and Chinese hamster (*Cricetulus griseus* Rodentia, Cricetidae) K1 cells in the comet assay. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.561-565, 2008.

CATALDO, D.H.; BOLTOVSKOY, D. Population dynamics of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) in the Parana river delta (Argentina). **Hydrobiologia**, v.380, p.153-163, 1999.

CATALDO, D.H.; COLOMBO, J.C.; BOLTOVSKOY, D.; BILOS, C.; LANDONI, P. Environmental toxicity assessment in the Parana river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles. **Environmental Pollution**, v.112, p.379-389, 2001.

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

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

ÇAVAS, T.; KONEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, v.22, p.263-268, 2007.

CETESB. Site oficial. São Paulo/SP. Disponível em <http://www.cetesb.sp.br>; acesso em 15 de outubro de 2005.

CHEN, C.S.; LAI, YUN-WEI; TIEN. CHIEN-JUNG. Partitioning of aromatic and oxygenated constituents into water from regular and ethanol-blended gasolines. **Environmental Pollution**, v.156, p.988-995, 2008.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I., GIOVANELLI, L., KRUSZEWSKI, M., SMITH, C.C., STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v.23, p.143-151, 2008.

COLLINS, A.R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, p.24-32, 2009.

COLOMBO, J.C.; BARREDA, A.; BILOS, C.; CAPPELLETTI, N.; DEMICHELIS, S.; LOMBARDI, P.; MIGOYA, M.C.; SKORUPKA, C.; SUÁREZ, G. Oil spill in the Río de la Plata estuary, Argentina: 1. biogeochemical assessment of waters, sediments, soils and biota. **Environmental Pollution**, v.134, p.277-289, 2005.

CORSEUIL, H.X.; MARINS, M. DAL MOLIN. Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave? **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.2, p.50-54, 1997.

DARRIGRAN, G. Variación temporal y espacial de la distribución de las especies de *Corbicula* Megerle, 1811 (Bivalvia, Corbiculidae) en el estuario del Río de La plata, República Argentina. **Neotropica**, v.38, p.59–63, 1992.

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.

FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I.; NIGRO, M.; FÖRLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. **Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.552, p.187-195, 2004.

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

GOLDBERG, E.D. The mussel watch: a first step in global marine monitoring. **Marine Pollution Bulletin**, v.6, p.111–132; 1975.

GÓMEZ, S.E.; GIUSTO, A.; BELTRAMI, C.R.; NAYA, J.G. Resistencia a diversos combustibles derivados del petróleo em *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Cyprinodontiformes). **Bioikos**, v.17, p.57-64, 2003.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de danos no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental, Canoas, Ed.ULBRA, p.247-279, 2003.

HAKENKAMP, C.C.; PALMER, M.A. Introduced bivalves in freshwater ecosystems: the impact of *Corbicula fluminea* on organic matter dynamics in a sandy stream. **Oecologia**, v.119, p.445-451, 1999.

HAKENKAMP, C.C.; RIBBLETT, S.G.; PALMER, M. A.; SWAN, C.M.; REID, J.W.; GOODSON, M.R. The impact of an introduced bivalve (*Corbicula fluminea*) on the benthos of a sandy stream. **Freshwater Biology**, v.46, p.491-501, 2001.

HARTMANN, A.; KISKINIS, E.; FJALLMAN, A.; SUTER, W. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. **Mutation Research**, v.497, p.199-212, 2001.

HOFTMAN, R.N.; RAAT, W.K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, v.104 p.147–152, 1982.

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

ITUARTE, C. F. Primera noticia de la introducción de Pelecípodos asiáticos en el área rioplatense. **Neotropica**, v.27, p.79–82, 1981.

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

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

JHA, A.N.; DOGRA, Y.; TURNER, A.; MILLWARD, G. E. Impact of low doses of tritium on the marine mussels, *Mytilus edulis*: Genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.586, p.47-57, 2005.

JOHNSON, N.; REVENGA, C.; ECHEVERIA, J. Managing water for people and nature. **Science**, v.292, p.1071-1072, 2001.

JORNAL DE LONDRINA (A), IAP multa pool de combustíveis em R\$ 20 mi, caderno cidade, 18 mai, 2002.

KARATAYEV, A. Y.; PADILLA, D. K.; MINCHIN, D.; BOLTOVSKOY, D.; BURLAKOVA, L. E. Changes in global economies and trade: the potential spread of exotic freshwater bivalves. **Biological Invasions**, v.9, p.161-180, 2007.

KATSUMITI, A.; DOMINGOS, F. X. V.; AZEVEDO, M.; SILVA, M. D.; DAMIAN, R. C.; ALMEIDA, M. I. M.; ASSIS, H. C. S.; CESTARI, M. M.; RANDI, M. A. F.; RIBEIRO, C. A. O.; FREIRE, C. A. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña oil spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, no prelo (DOI 10.1007/s10661-008-0309-3), acesso em 06/02/2009.

KELLY, C.; SANTIOLLO, D.; JOHNSTON, P.; FAYAD, G.; BAKER, K. L.; LAW, R. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons in oysters from coastal waters of the Lebanon 10 months after the Jihel oil spill in 2006. **Marine Pollution Bulletin**, v.56, p.1215-1233, 2008.

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

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

KUMARAVEL, T.S.; VILHAR, B.; FAUX, S.P.; JHA, A.N. Comet Assay measurements: a perspective, *Cell. Biol. Toxicol.*, doi:10.1007/s10565-007-9043-9.

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.

LEGEAY, A.; ACHARD-JORIS, M.; BAUDRIMONT, M.; MASSABUAU, J.C.; BOURDINEAUD, J.P. Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. **Aquatic Toxicology**, v.74, p.242-253, 2005.

LE MOS, 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**, v.19, p.197-201, 2005.

MANSON, A.F. **Biology of Freshwater Pollution**. 3a edição. Longmann, Essex, 1996.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.C. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. cap. 29, p. 551-577, In: MEDRI, M.E. BIANCHINI, E. SHIBATTA, O.A.; PIMENTA J.A. (eds.), **A Bacia do Rio Tibagi**. Edição dos Editores, Londrina, PR, 2002.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and molecular biology**, v.29 (1), p.148-158, 2006.

MELVILLE, F.; ANDERSEN, L.E.; JOLLEY, D.F. The Gladstone (Australia) oil spill – Impacts on intertidal areas: baseline and six months post-spill. **Marine Pollution Bulletin**, no prelo (disponível *on line*), 2008, acesso em 06/02/2009.

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.

MOHAMED, N; ALAYLLA, R.I. Modeling transport and biodegradation of BTX compounds in saturated sandy soil. **Journal of Harzardous Material**, v.54, p.155-174.,1997.

NICODEM, D.E.; GUEDES, C.L.B.; CORREA, R.J. Photochemistry of petroleum I. Systematic study of a brazilian intermediate crude oil. **Marine Chemistry**, v.63, p.93-104, 1998.

O'CONNOR, T.P. National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. **Marine Environmental Research**, v. 53, p. 117–143, 2002.

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

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49 p. 64–75, 2001a.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Tissue distribution and temperature dependence of *Anguilla anguilla* L. EROD activity following exposure to model inducers and relationship with plasma cortisol, lactate and glucose levels. **Environmental International**, v.26 p. 49–155, 2001b.

PAIXÃO, J.F.; NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.L.; CARVALHO, G.C.; SILVEIRA JR. J.S.C.; REBOUÇAS, M.; MATIAS, G.R.A.; RODRIGUES, I.L.P. Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: An approach to minimize environmental pollution risk. **Environmental Research**, v. 103, p. 365–374, 2007.

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.

PELTIER, G. L.; MEYER, J. L.; JAGOES, C. H.; HOPKINS, W. A. Using trace element concentration in *Corbicula fluminea* to identify potential sources of contamination in a urban river. **Environmental Pollution**, v. 154, p. 283-290, 2008.

PÉREZ-CADAHÍA, B.; LAFFON, B.; PÁSARO, E.; MÉNDEZ, J. Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled Prestige crude oil. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.138, p.453-460, 2004.

PIMPÃO, D.M.; MARTINS, D.S. Ocorrência do molusco asiático *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia, Corbiculidae) no baixo Rio Negro, Amazônia central. **Acta Amazônica**, v. 38, p.589-592, 2008.

PETERSON, C.H.; RICE, S.D.; SHORT, J.W.; ESLER, D.; BODKIN, J.L.; BALLACHEY, B.E.; IRONS, D.B. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. **Science**, v. 302, p. 2082-2086, 2003.

PORTE, C.; LEMAIRE, P.; PETERS, L.D.; LIVINGSTONE, D.R. Partial purification and properties of cytochrome P450 from digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. **Marine Environmental Research**, v.39 p.27-31, 1995.

POULSEN, M.; LEMON, L.; BARKER, J.F. Dissolution of monoaromatic hydrocarbons into groundwater from gasoline–oxygenate mixtures. **Environmental Science and Technology**, v.26, p.2483–2489, 1992.

PROMME, H. R; BARRY, D.A.; DAVIS, G.B. A one-dimensional reactive multi-component transport model for biodegradation of petroleum hydrocarbons in groundwater. **Environmental Modelling and Software**, v.14, p.213–223,1999.

RANK, J. Intersexin *Littorina littorea* and DNA damage in *Mytilus edulis* as indicators of harbour pollution. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, no prelo (*on line*), 2009.

RANK, J.; JENSEN, K. Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.54 p. 323-329, 2003.

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, p.464-468, 2005.

SERRANO-GARCIA, L; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatine buds are related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.38, p.38-45, 2001.

SILVA, A.Z.; ZANETTE, J.; FERREIRA, J.F.; GUZENSKI, J.; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.62, p.376-382, 2005.

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

SIMONATO, J.D.; ALBINATI, A.C.L.; MARTINEZ, C.B.R. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.76, p.505–511, 2006.

SIMONATO, J.D.; GUEDES, C.L.B.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.69, p.112-120, 2008.

SIU, W.H.L.; CAO, J.; JACK, R.W.; WU, R.S.S.; RICHARDSON, B.J.; XU, L.; LAM, P. K.S. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). **Aquatic Toxicology**, v.66, p.381-392, 2004.

SHUGART, L.R. Environmental Genotoxicology. **In: Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Edited by RAND, G.M. 2ª ed., Flórida, 1990.

SOSA, E.; ALVAREZ-RAMIREZ, J. Time-correlations in the dynamics of hazardous material pipelines incidents. **Journal of Hazardous Materials**, no prelo (doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.09.094), 2008.

STEINERT, S.A. Contribution of Apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. **Marine Environmental Research**, v.42, p.253-259, 1996.

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.

THEODORAKIS, C.W.; Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. **Ecotoxicology**, v.10, p.245-256, 2001.

TIBURTIUS, E.R.L.; LEAL, E.S.; PERALTA-ZAMORA, P. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v.27, p.441-446, 2004.

TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P.; EMMEL, A.; LEAL, E.S. Degradação de BTXs *via* processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v.28, p. 61-64, 2005a.

TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P.; EMMEL, A.; LEAL, E.S. Treatment of gasoline-contaminated waters by advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v.B126, p.86–90, 2005b.

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

TICE, R.R.; FUREDI-MACHACEK, M.; SATTERFIELD, D.; UDUMUDI, A.; VASQUEZ, M.; DUNNIK, J.K. Measurement of micronucleated erythrocytes and DNA damage during chronic ingestion of phenolphthalein in transgenic female mice heterozygous for the *p53* gene. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.31, p.113-124, (1998).

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.

VAN DER OOST, R.; VAN SCHOOTEN F.J.; ARIESE F.; HEIDA H.; VERMEULEN N.P.E. Bioacumutation, biotransformation and DNA biding of PAHs in feral eel (*Anguilla anguilla*) exposed to polluted sediments: a field survey. **Environment. Toxic. Chem.** , v.13, p.859-870, 1994.

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

VEITENHEIMER-MENDES, I., *Corbicula manilensis*, (Philippi, 1844) Molusco asiático, na bacia do Jacuí e do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil (Bivalvia, Corbiculidae). **Iheringia Série Zoologia**, v.70, p.63-74, 1981.

VENIER, P.; MARON, S.; CANOVA, S. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. **Mutation Research**, v.390, p.33-44, 1997.

VILLAR, C.; STRIPEIKIS, J.; D'HUICQUE, L.; TUDINO, M.; TROCCOLI, O.; BONETTO, C. Cd, Cu and Zn concentrations in sediments and the invasive bivalves *Limnoperna fortune* and *Corbicula fluminea* at the Rio de La Plata basin, Argentina. **Hydrobiologia**, v.416, p.41-49, 1999.

VILLELA, I.V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H.C.; SILVEIRA, J.D. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: **Genética Toxicológica**, editado por SILVA, J.; EDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. Porto Alegre, Alcance, 2003.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M.; SILVA, J.; HENRIQUES, J.A.P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortune*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, p. 78-86, 2006.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M.; SILVEIRA, J.C.; DIAS, J.F.; HENRIQUES, J.A.P.; SILVA, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.628, p.76-86, 2007.

WATTS, R.J.; HALLER, D.R.; JONES, A.P.; TEEL, A.L. A foundation for the risk-based treatment of gasoline-contaminated soils using modified Fenton's reactions. **Journal of Hazardous Materials**, v.B76, p.73-89, 2000.

WERNER, I.; KOGER, C.S.; DEANOVIC, L.A.; HINTON, D.E. Toxicity of methyl-*tert*-butyl ether to freshwater organisms. **Environmental Pollution**, v.111, p.83-88, 2001.

ZHANG, J.F.; SHEN, H.; XU, T.L.; WANG, X.R.; LI, W.M.; GU, Y.F. Effects of long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.71, p.1234-239, 2003.

ZHONG, P.; KONG, L.R.; LIN, Z.F.; LIU, G.M. Photodegradation of diesel oil in aqueous solutions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.70, p.1128-1135, 2003.

ZHOU, R.; ZHU, L.; CHEN, Y.; KONG, Q. Concentrations and characteristics of organochlorine pesticides in aquatic biota from Qiatag River in China. **Environmental Pollution**, v.151, p.190-199, 2008.

ZIEMAN, J.C.; ORTH, R.; PHILLIPS, R.C.; THAYER, G.; THORHANG, A. The effects of oil on seagrass ecosystems. In: CAIRNS, J., BUIKEMA, A.I. (Eds.), *Restoration of Habitats Impacted by Oil Spills*. Butterworth, Boston, p.37-64, 1984.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)