

---

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

---

**AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO  
DAS ÁGUAS DO RIBEIRÃO TATU, REGIÃO DE LIMEIRA/SP,  
APÓS O RECEBIMENTO DE EFLUENTES URBANOS**

**BARBARA CASSU MANZANO**

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

**Abril – 2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E  
MUTAGÊNICO DAS ÁGUAS DO RIBEIRÃO TATU, REGIÃO DE  
LIMEIRA/SP, APÓS O RECEBIMENTO DE EFLUENTES URBANOS**

**BARBARA CASSU MANZANO**

**Orientador: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Marin-Morales**

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

**Rio Claro  
2010**

574.88      Manzano, Barbara Cassu  
M296a      Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das  
              águas do ribeirão Tatu, região de Limeira/SP, após o recebimento de  
              efluentes urbanos / Barbara Cassu Manzano. - Rio Claro : [s.n.], 2010  
              115 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

              Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
              Biociências de Rio Claro  
              Orientador: Maria Aparecida Marin Morales

              1. Biologia molecular. 2. Mutagênese ambiental. 3. Contaminação de  
              recursos hídricos. 4. Allium cepa. 5. Células HTC. 6. Biomonitoramento  
              ambiental. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do ribeirão Tatu, região de Limeira/SP, após o recebimento de efluentes urbanos

**AUTORA:** BÁRBARA CASSÚ MANZANO

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES

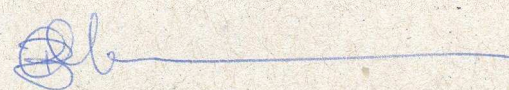
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES  
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI  
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Profa. Dra. BRUNA DE CAMPOS VENTURA CAMARGO  
Secretaria de Agricultura e Meio Ambiente / Prefeitura Municipal de Itapetininga

✓ Data da realização: 17 de maio de 2010.



*Dedico este trabalho a Rogerio Entringer e  
Frederico Manzano Entringer,  
pelo amor incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales, pela confiança, brilhante orientação, paciência, amizade e carinho.

À Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular.

Ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido para a realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Silvia Tamie Matsumoto e ao Prof. Dr. Amauri Antônio Menegário.

À Sandra Veloso, Gerson Mello Souza, Francisca de Assis Mattioli Gonçalves, Eleni Nadai Malagutti.

Ao “Tio Vurto”, geólogo e doutorando do Programa de Pós-Graduação em Geologia Regional do Instituto de Geociências e Ciências Exatas da UNESP de Rio Claro.

Ao Gilberto de Almeida, biólogo do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Limnologia da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP – Campus de Limeira.

A todos os amigos do Laboratório de Mutagênese, Bruna, Cintya, Cris, Dani, Dânia, Gui, Jana, Jaque, Livia, Márcia, Matheus, Nádia, Raquel, Rê, Tati e Thais, pela amizade sincera, apoio, carinho, enfim, por fazerem parte da minha vida e proporcionarem um convívio tão harmônico, durante esse tempo de mestrado. Muito obrigada por tudo!!!

A todos que, de alguma forma, me ajudaram na realização deste trabalho.

## RESUMO

Os problemas que mais afetam a qualidade da água de rios e lagos estão associados com os descartes realizados nestes ambientes, principalmente, os de esgotos domésticos e industriais tratados de forma inadequada ou não tratados. Esses efluentes podem conter compostos químicos perigosos pela sua potencialidade em induzir efeitos citotóxicos e genotóxicos à biota exposta. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo verificar o possível potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de químicos presentes nas águas do ribeirão Tatu, Limeira/SP, provenientes de descartes ilegais de pequenas indústrias e esgotos domésticos por meio do teste de aberrações cromossômicas (ACs) e micronúcleo (MN) em *Allium cepa* e ensaio do cometa em células de mamíferos. Foram realizadas coletas sazonais em cinco diferentes pontos do ribeirão, entre os anos de 2008 e 2009. As análises físico-químicas das amostras de água mostraram uma grande degradação na qualidade da água do ribeirão, decorrente dos descartes de esgotos domésticos e industriais, de águas pluviais contaminadas e escoamento da agricultura. Os dados referentes ao bioensaio com *A. cepa* mostram que os períodos de seca são os mais críticos, pois levaram as respostas mais severas de indução de ACs e de MN no organismo teste utilizado. Em relação ao ensaio do cometa com as células HTC, as amostras de água coletadas no período de chuva intensa, apresentaram maior genotoxicidade, principalmente nos pontos mais impactados pelo recebimento dos efluentes, devido, possivelmente, ao carreamento de contaminantes para o leito do rio, promovido pelo escoamento da água das chuvas.

**Palavras-chave:** contaminação de recursos hídricos, *Allium cepa*, células HTC, biomonitoramento ambiental.



## **ABSTRACT**

The issues that most affect the water quality of rivers and lakes are associated with discharges in these environments, especially those of domestic and industrial sewage inadequately or not treated. These effluents may contain hazardous chemical compounds for their ability to induce cytotoxic and genotoxic effects to the biota exposed. In this sense, the present study aimed to determine the potential cytotoxic, genotoxic and mutagenic of chemicals present in the waters of the ribeirão Tatu, Limeira / SP, from illegal discharges from small industries and domestic sewage through the test of chromosomal aberrations (CAs) and micronucleus (MN) in *Allium cepa* and comet assay in mammalian cells. Five seasonally collections were performed at five different places of the river in 2008 and 2009. The physical-chemical analysis of water samples showed a large degradation in water quality of the stream, resulting from discharges of municipal and industrial wastewater, storm water and contaminated runoff from agriculture. The data on *A. cepa* bioassay show that the droughts are the most critical because the answers led to more severe induction of CAs and MN in the test organism used. Concerning the comet assay with HTC cells, water samples collected during the period of strong rain, had higher genotoxicity, especially at points of most impacted by the receipt of effluents, due possibly to the carrying of contaminants to riverbed, sponsored by runoff from rainfall.

**Key-words:** water resources contamination, *Allium cepa*, HTC cells, environmental biomonitoring.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	
2.1. Contaminação de recursos hídricos .....	10
2.2. Caracterização da área de estudo .....	12
2.3. <i>Allium cepa</i> como sistema-teste para o monitoramento ambiental .....	14
2.4. Células de mamíferos, mantidas em cultura, usadas como sistema-teste .....	16
2.5. Teste ACs .....	17
2.6. Ensaio do cometa .....	19
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	
4.1. Localização da área de estudo e coleta das amostras de água .....	23
4.2. Material biológico .....	26
4.3. Análise físico-química das amostras de água .....	26
4.4. Teste de ACs e do MN em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> .....	26
4.5. Teste do MN em células F <sub>1</sub> de <i>A. cepa</i> .....	27
4.6. Ensaio do cometa com cultura de células de mamíferos (células HTC) .....	28
<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1. Análise dos parâmetros físico-químicos .....	30
5.2. Artigo 1: O uso de cultura de células de mamíferos em avaliações da contaminação de recursos hídricos .....	38
5.3. Artigo 2: Avaliação da toxicidade das águas do ribeirão Tatu, região de Limeira/SP, por meio do sistema-teste <i>Allium cepa</i> .....	63
5.4. Artigo 3: Avaliação da genotoxicidade de águas impactadas por efluentes domésticos e industriais de uma região altamente industrializada do Estado de São Paulo-Brasil, por meio do ensaio do cometa em células HTC .....	89
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>108</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>110</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Como consequência do crescimento da população humana e do desenvolvimento industrial, vem aumentando, gradativamente, a produção, o consumo e o descarte de produtos químicos e de resíduos derivados das ações antropogênicas. Pela alta contaminação ambiental, particularmente dos ambientes aquáticos, que é o destino final desta gama crescente de produtos, e pelos muitos contaminantes com potencial genotóxico e cancerígeno (JHA, 2004), torna-se necessário o desenvolvimento e aplicação de testes que avaliem os efeitos destas substâncias presentes nos recursos hídricos (GROVER; KAUR, 1999).

A bacia do ribeirão Tatu, um dos três principais cursos d'água da cidade de Limeira (SP/Brasil), cobre grande parte da área urbana do município. Nasce na zona rural do município de Cordeirópolis e deságua no Rio Piracicaba. Segundo a CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2008) e de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005, o ribeirão é considerado, na área urbana, um rio de classe 4, ou seja, suas águas são destinadas apenas à navegação, à harmonia paisagística e aos usos menos exigentes. Este rio possui inúmeros problemas como lançamento de efluentes industriais, domésticos e agrícolas sem tratamento, além da ausência, quase total, de matas ciliares (MARRARA, 2008).

Efluentes industriais e domésticos tratados de forma inadequada ou não tratados contêm perigosos compostos químicos que podem induzir efeitos citotóxicos e genotóxicos à biota exposta (CLAXTON et al., 1998; RANK; NIELSEN, 1998), que, em muitos casos, pode não levar a efeitos imediatos, mas, a longo prazo, pode comprometer a reprodução, induzir defeitos congênitos, além de doenças como o câncer (WHITE; RASMUSSEN, 1998; GROVER; KAUR, 1999).

Para os estudos de monitoramento da qualidade da água, os métodos *in vitro* apresentam vantagens, em relação aos *in vivo*, pela possibilidade de se limitar o número de variáveis experimentais; facilidade de obtenção de dados relevantes; e curto período necessário para o desenvolvimento dos testes, quando comparados com outras técnicas rotineiramente usadas (ROGERO et al., 2003).

Testes com plantas são apropriados para realização de estudos de mutagênese em curto prazo, tanto em laboratório como em biomonitoramento *in situ* (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994; MA et al., 1995; COTELLE, et al., 1999; GROVER; KAUR, 1999). Segundo Grant (1994), os vegetais superiores são particularmente indicados para ensaios de genotoxicidade por apresentarem alta sensibilidade e produzirem poucos resultados falsos. O teste de aberrações cromossômicas (ACs) realizado com *Allium cepa*, é mundialmente empregado nos estudos de genotoxicidade ambiental, constituindo-se num ensaio muito

sensível e confiável para o biomonitoramento de recursos hídricos (MATSUMOTO et al., 2006; EGITO et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008; GANA et al., 2009; HOSHINA et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; RADIC' et al., 2010), para a avaliação da genotoxicidade de efluentes urbanos e industriais (GROVER; KAUR, 1999; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008) e de agentes químicos (VENTURA, 2004; FERETTI et al., 2008; SETH et al., 2008; FERNANDES et al., 2009; YILDIZ et al., 2009) e físicos (EVSSEVA et al., 2005; SAGHIRZADEH et al., 2008).

Os ensaios *in vitro*, realizados com cultura de células, são empregados, com sucesso, em análises de genotoxicidade, por estas serem sensíveis a agentes químicos e físicos; apresentarem um ciclo de divisão celular curto e, em consequência disso, responderem rapidamente aos efeitos dos agentes testados; além de serem relativamente baratos e de fácil reprodutibilidade (SPEIT et al., 1998; ROGERO et al., 2003; CARDOZO et al., 2006). Dentre as linhagens requeridas em mutagênese, as células metabolizadoras são muito usadas em avaliações ambientais, pois possuem um papel fundamental na metabolização e detoxicação de xenobióticos que podem reagir com o DNA e, assim, induzirem possíveis eventos mutacionais (TSUBOY et al., 2007). As células metabolizadoras expressam as enzimas de fase I e de fase II, que promovem a biotransformação do xenobionte. Na fase I, ocorrem as reações de oxidação, redução e hidrólise, ocasionando sempre uma modificação estrutural do químico e na fase II, conhecida como fase de conjugação, ocorrem reações de conjugação do químico com substâncias endógenas, o que também promove alteração estrutural no xenobionte original.

As quebras na molécula de DNA são consideradas lesões pré-mutagênicas potenciais, que, quando evidenciadas, constituem eficientes e sensíveis marcadores de danos genotóxicos. A técnica mais utilizada para detecção de quebras no DNA é o ensaio de eletroforese em microgel de células individuais (SCGE) ou ensaio do cometa. Diversos autores, utilizando o ensaio do cometa, obtiveram resultados bastante satisfatórios em estudos de genotoxicidade no meio aquático, evidenciando a versatilidade deste teste na avaliação de efeitos danosos provocados por poluentes de recursos hídricos sobre os seres vivos a eles expostos (MATSUMOTO et al., 2003, 2005; SOUZA; FONTANETTI, 2007; LEME, 2008; VENTURA et al., 2008).



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Contaminação de recursos hídricos

O crescente desenvolvimento, tanto industrial como social, tem levado a um aumento considerável na produção de resíduos, que, quando lançados no ambiente *in natura*, ou seja, sem tratamento, podem causar sérios comprometimentos à qualidade ambiental.

Dentre todos os ecossistemas, o aquático é o que tem sofrido os maiores impactos frente à poluição, uma vez que a água acaba sendo o destino final de todo poluente. Segundo Lemos e Erdtmann (2000), o ambiente aquático, por ser um depósito de diferentes tipos de descargas antropogênicas, vem sofrendo crescentes contaminações por químicos diversos, que podem, ainda, se associar e formar outras misturas mais complexas de constituição e ação desconhecidas. Por isso, há uma necessidade eminente de se avaliar o possível efeito tóxico de contaminantes ambientais, para se estimar os eventuais danos que eles possam causar aos ecossistemas. Neste contexto, os estudos em ambientes aquáticos são de alta relevância, considerando que as águas superficiais, que muitas vezes encontram-se contaminadas por diversos compostos desconhecidos, são usadas em todo o mundo como fonte de água potável, para fins agrícolas, na dessedentação de animais e em atividades recreativas e religiosas. Conseqüentemente, a poluição da água pode desencadear graves problemas para saúde pública e para o próprio ecossistema aquático (HOUK, 1992; CLAXTON et al., 1998).

Os problemas mais graves de alterações da qualidade da água de rios e lagos decorrem de contaminações promovidas por esgotos domésticos, tratados de forma inadequada ou não tratados, de controles inadequados do lançamento de efluentes industriais, da perda e destruição das bacias de captação, da localização errônea de unidades industriais, do desmatamento, da agricultura migratória sem controle e de práticas agrícolas deficientes (MORAES; JORDÃO, 2002).

Efluentes urbanos (domésticos e industriais) tratados de forma inadequada ou não tratados podem conter compostos químicos perigosos pela sua potencialidade em induzir efeitos citotóxicos e genotóxicos à biota exposta (CLAXTON et al., 1998; RANK; NIELSEN, 1998). Tais efluentes contêm misturas, formadas pela associação de agentes como pesticidas, metais, diferentes resíduos industriais, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), aminas heterocíclicas e uma variedade de outras substâncias (VEGA et al., 1996; DEARFIELD et al., 2002; OHE et al., 2004) que, em muitos casos, podem não apresentar efeitos imediatos nos organismos expostos, mas, a longo prazo, podem diminuir a sobrevivência dos mesmos (WHITE; RASMUSSEN, 1998).

Muitos estudos têm sugerido uma correlação direta entre a mutagenicidade e a presença de certos poluentes no ambiente, como, por exemplo, os metais e os pesticidas presentes na água (HOUK, 1992; FATIMA; AHMAD, 2006). Estes agentes podem atuar sobre a molécula de DNA, induzindo mutações e desencadeando prejuízos à saúde, como, por exemplo, anormalidades reprodutivas, defeitos congênitos ou doenças como o câncer (GROVER; KAUR, 1999).

Ohe et al. (2004) compilaram dados que demonstram que alguns rios do mundo, especialmente na Europa, Ásia e América do Sul, estão contaminados por potentes químicos de ação direta ou indireta na formação de mutações tanto do tipo *frameshift* como por substituição de base.

Frente ao grande aumento da poluição causada pela introdução de agentes químicos no ambiente, vêm sendo desenvolvidos inúmeros bioensaios capazes de avaliar o potencial mutagênico e/ou genotóxico dos poluentes ambientais (GROVER; KAUR, 1999). Para se avaliar, eficientemente, a presença de agentes mutagênicos na água, Ohe et al. (2004) destacam a necessidade da realização, além das análises químicas, de ensaios específicos de mutagenicidade/genotoxicidade, por estes testes constituírem parâmetros adicionais para programas de monitoramento ambiental. Segundo Marrara (2008), uma simples determinação dos parâmetros físico-químicos não permite avaliar a toxicidade de contaminantes. Assim, os bioensaios são fundamentais na avaliação do grau de comprometimento de amostras tanto de água, quanto de sedimentos. É fundamental salientar, também, a importância da utilização de múltiplos marcadores biológicos em estudos ecotoxicológicos, especialmente quando a biota está exposta a misturas complexas de contaminantes ambientais (INZUNZA et al., 2006).

Para Ohe et al. (2004), o uso de bioensaios de curta duração, que detectam uma vasta gama de substâncias químicas potencialmente genotóxicas, permite a quantificação dos riscos mutagênicos, sem, no entanto, requerer um conhecimento prévio sobre a identidade ou as propriedades físico-químicas dos agentes genotóxicos e/ou mutagênicos presentes nas águas.

Foi observada, pelo teste do micronúcleo (MN) em *Vicia faba*, uma alta indução de micronúcleos na maioria dos sedimentos coletados no rio Tibre na área urbana de Roma e em seus principais tributários (Prima Porta, Traversa Acqua, Aniene e Magliana). A elevada mutagenicidade detectada nos sedimentos foi atribuída à alta concentração de HPAs e metais, revelado pelas análises químicas (MINISSI et al., 1998).

Inzunza et al. (2006) verificaram que trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), submetidas a sedimentos do Rio Biobio (Concepción, Chile), contaminados com efluentes de

uma indústria petroquímica, exibiram aumento da atividade da enzima CYP4501A1, medida por meio da atividade de EROD (7-etoxiresorufina-O-deetilase); a presença de metabólitos de HPAs na bile; e quebras no DNA. A presença de HPAs detectados nas amostras de sedimentos indicou que esses compostos foram os responsáveis pelas alterações registradas tanto a nível bioquímico como celular no organismo teste, sendo, portanto, razoável esperar que esta situação possa também ser encontrada nos peixes que habitam, naturalmente, estas águas. Neste trabalho foi sugerido que a indução da atividade CYP4501A1 estava relacionada com a alta concentração de HPAs, confirmando a elevada genotoxicidade destes compostos, bem como o risco para a biota presente nesta área do rio. Porém, os autores afirmam que não pode ser descartada a presença de outros contaminantes nos sedimentos, dada a intensa atividade industrial e urbana na região de estudo.

Hoshina et al. (2008, 2009) avaliaram a qualidade da água do rio Atibaia (São Paulo/Brasil), em uma área de influência de uma refinaria de petróleo, bem como a eficácia dos tratamentos de efluentes utilizados pela refinaria. Os resultados obtidos indicaram que, mesmo após os tratamentos físico-químicos, biológicos e passagem por lagoa de estabilização, o efluente final da refinaria foi capaz de induzir ACs e MNs em células meristemáticas de *A. cepa* e MNs e anormalidades nucleares (ANs) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Assim, o descarte de efluentes de refinaria de petróleo no rio Atibaia pode interferir na qualidade de suas águas. Esses resultados estão de acordo com aqueles verificados por Souza e Fontanetti (2006), ao estudar a qualidade da água do rio Paraíba do Sul (São Paulo/Brasil) em uma área afetada por efluentes de uma refinaria de petróleo. As autoras detectaram substâncias com potencial clastogênico e/ou aneugênico, verificados por meio da incidência de MNs e ANs em eritrócitos de Tilápia do Nilo, principalmente para as coletas realizadas na estação seca e fria. Considerando que os resultados obtidos na estação quente e chuvosa foram insignificantes, em relação aos testes controles, as autoras sugerem que a concentração de poluentes é diretamente dependente dos índices pluviométricos e do equilíbrio hidrológico do Rio Paraíba do Sul. Este trabalho, ainda mostrou, que o tratamento de efluentes, realizado pela refinaria, não foi totalmente eficiente para minimizar os efeitos de substâncias citotóxicas e mutagênicas no organismo-teste estudado.

## **2.2. Caracterização da área de estudo**

A cidade de Limeira, localizada na região leste do Estado de São Paulo (a 150 Km de São Paulo), pertence à Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) das Bacias do Piracicaba, Capivari e Jundiá – PCJ (Lei Estadual n.º 9.034/94). Esta UGRHI,

composta por 57 municípios, tem uma densidade populacional superior a 11% da população do Estado e é classificada como de caráter agroindustrial, visto que as suas principais atividades econômicas são agroindústrias, indústrias químicas, têxteis, metalúrgicas e de eletrodomésticos (CETESB, 2008)

A Bacia do Piracicaba encontra-se em uma região de alta densidade populacional, onde um dos principais usos da água é o abastecimento público. Verifica-se que as descargas contínuas de efluentes domésticos *in natura* representam o grande estressor ambiental, que acarreta a degradação da qualidade da água e, conseqüentemente, altera as comunidades biológicas. Entretanto, isto não exime a atividade industrial e as fontes difusas como agentes ativos e significativos no desequilíbrio ecológico desses ambientes aquáticos. Segundo a CETESB (2008), a coleta e o tratamento de esgotos domésticos são fundamentais para a atenuação deste quadro de deterioração observado.

A bacia do ribeirão Tatu, um dos três principais cursos d'água de Limeira, cobre grande parte da área urbana do município. Nasce na zona rural do município de Cordeirópolis e deságua no Rio Piracicaba. Segundo a Resolução CONAMA 357/2005, o ribeirão é considerado, na área urbana, um rio de classe 4 (CETESB, 2008). Possui inúmeros problemas como lançamento de efluentes domésticos, industriais e agrícolas sem tratamento, poluição urbana e ausência, quase total, de matas ciliares (MARRARA, 2008). Marrara (2008) verificou que o ribeirão, ao avançar o perímetro urbano de Limeira, diminui, sensivelmente, sua qualidade, devido, possivelmente, aos descartes de efluentes industriais sem tratamento adequado.

Limeira possui hoje, de acordo com estatísticas oficiais da prefeitura municipal ([www.limeira.sp.gov.br](http://www.limeira.sp.gov.br)), cerca de 1.000 indústrias com uma produção bem diversificada. Porém, um segmento que vem se destacando no município é o de bijuterias. Os processos de galvanoplastia, necessário para a folheação das bijuterias, geram resíduos que contém metais como cobre e níquel, que são extremamente tóxicos e com potencialidade de bioacumulação. A maioria destas empresas não destina adequadamente seus resíduos, gerando um impacto ambiental preocupante (BOSCO et. al, 2003).

O ribeirão Tatu recebe 82% da carga poluidora *in natura* (ou seja, sem tratamento) de origem doméstica da cidade de Cordeirópolis e 72% do esgoto doméstico da cidade de Limeira, sendo que somente 56% do total de esgoto coletado é tratado (CETESB, 2009). Como este é um dos principais cursos d'água da cidade de Limeira, há uma necessidade urgente de recuperação, assim como a conscientização das empresas que descartam seus efluentes sem



tratamento adequado e também um eficiente tratamento dos efluentes domésticos lançados nas suas águas.

### **2. 3. *Allium cepa* como sistema-teste para o monitoramento ambiental**

Os vegetais superiores são amplamente citados como excelentes indicadores de efeitos mutagênicos, pois respondem, eficientemente, às substâncias químicas. Segundo Grant (1994), os testes que usam vegetais superiores apresentam uma alta sensibilidade, pois produzem poucos resultados falsos. Testes com plantas são apropriados para realização de estudos de mutagênese em curto período, tanto em laboratórios como em biomonitoramento *in situ* (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994; MA et al., 1995; COTELLE, et al., 1999; GROVER; KAUR, 1999).

O uso do sistema- teste *A. cepa* foi introduzido por Levan (1938), quando o autor observou que a colchicina promovia distúrbios no fuso mitótico das células deste organismo. Desde então, a espécie tem sido citada como um dos melhores sistemas-teste utilizados para a avaliação do potencial genotóxico de substâncias químicas ambientais, devido ao seu baixo custo, boa sensibilidade, eficiente correlação com sistema-teste de mamíferos, crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, fácil manuseio e cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ) (GRANT, 1982; RANK; NIELSEN, 1994; SMAKAKINCL et al., 1996; CHAUHAN et al., 1999; ATEEQ et al., 2002; FATIMA;AHMAD, 2006; MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; MIGID et al., 2007). Além disso, também fornece parâmetros microscópicos como anáfases prematuras, aderências cromossômicas, pontes, fragmentações cromossômicas, C-metáfases e MNs, que podem caracterizar evidências de eventuais mutações no material genético da célula (FERNANDES, 2005).

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

Ao longo das várias décadas, muitos autores propuseram modificações nos testes realizados com o sistema *A. cepa*, para que estes se tornassem mais sensíveis na avaliação de químicos ambientais e de amostras complexas. Fiskesjö (1985) e Rank e Nielsen (1993) propuseram algumas modificações no teste, que permitiram torná-lo padrão para monitoramentos ambientais, pela possibilidade de avaliar, por meio da análise de ACs, efeitos

genotóxicos de misturas complexas como, por exemplo, água de rio e efluentes industriais. Ma et al. (1995) propuseram modificações do teste, introduzindo a avaliação de efeitos mutagênicos pela indução de MNs em células F<sub>1</sub> de raízes de cebola expostas a poluentes ambientais.

Segundo Fenech et al. (2002), Akimboro e Bakare (2007) e Fernandes et al. (2007), as ACs decorrentes de quebras ou perdas cromossômicas levam à formação de células micronucleadas, pois, tanto os fragmentos cromossômicos como cromossomos inteiros não associados a fibras do fuso podem não ser incorporados ao núcleo principal, durante o ciclo celular. A presença de MN é um bom indicador da ação da substância testada (GROVER; KAUR, 1999). No caso da substância promover perdas cromossômicas, ela tem um efeito inibidor na polimerização do fuso, chamado de ação aneugênica, e quando promove quebras no material genético é porque ela tem um efeito clastogênico

Para Ma et al. (1995), dentre todos os *endpoints* verificados em células meristemáticas de vegetais, os MNs são os mais efetivos e simples para indicar danos citológicos. Porém, para Rank e Nielsen (1997), a avaliação de ACs como *endpoint* não é válida apenas para detecção do potencial genotóxico, mas também para avaliação de mecanismos de ação dos agentes testados, fornecendo informações tanto de efeitos clastogênicos como de efeitos aneugênicos.

De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), mesmo que as análises de MNs em células meristemáticas e em células F<sub>1</sub> sejam adequadas para monitoramento ambiental, é recomendável a realização de uma análise combinada de MNs em células meristemáticas e F<sub>1</sub> e a análise de ACs em células meristemáticas, a fim de tornar os resultados mais confiáveis.

Estudos de sensibilidade e de correlação entre sistemas-teste são fundamentais para a avaliação, mais precisa, de riscos ambientais, bem como para a extrapolação de dados para outros organismos alvos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). O sistema-teste *A. cepa* tem mostrado alta sensibilidade e boa correlação quando comparado com outros sistemas-teste, principalmente com os de mamíferos. Bianchi (2008), estudando os efeitos genotóxicos do agrotóxico Malation obteve resultados positivos tanto no sistema-teste *A. cepa* como em células de mamíferos mantidas em cultura, reforçando a eficiência desse teste em avaliações de poluentes ambientais.

A espécie *A. cepa* é frequentemente utilizada em estudos de avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de recursos hídricos ao redor do mundo. Gana et al. (2008) obtiveram resultados positivos nos testes de AC e MN na avaliação das águas do Rio Salí, Tucumán, Argentina. Em um estudo de avaliação da toxicidade da água e do sedimento de um

rio impactado por efluentes de curtume no Rio Grande do Sul, Brasil, Júnior et al. (2007) verificaram que *A. cepa* mostrou-se mais sensível para a detecção de toxicidade do que os outros organismos utilizados (*Daphnia similis*, *D. magna*, *Ceriodaphnia dubia* e *Hyalella azteca*).

Segundo Matsumoto et al. (2006) *A. cepa* é eficiente na detecção de danos genotóxicos e mutagênicos causados por metais presentes em água de rio, apresentando resultados compatíveis com outros sistemas-teste.

#### **2.4. Células de mamíferos, mantidas em cultura, usadas como sistema-teste**

A busca de metodologias alternativas, que substituam a utilização de animais em experimentos, precisa ser um dos objetivos da ciência moderna (MORALES, 2008). Ainda segundo esta autora, o uso de culturas de células é uma alternativa eficiente para ser aplicada em diversos ensaios de toxicidade, pela sua facilidade de manipulação e observação de parâmetros microscópicos, bioquímicos e moleculares.

O modelo *in vitro* ganhou, nos últimos anos, uma ampla aceitação na investigação toxicológica, por proporcionar ferramentas avançadas, protocolos confiáveis e possuir diferentes aplicações, desde estudos de morte celular até a toxigenômica (MAZZEO, 2009). De acordo com Lewinska et al. (2007), os ensaios com cultura de células constituem uma importante ferramenta de investigação, servindo a diversas áreas da ciência, como a imunologia, a virologia, a genética e a toxicologia.

Ensaio *in vitro*, realizados com cultura de células, são empregados, com sucesso, em análises de genotoxicidade, por estas serem sensíveis a agentes químicos e físicos, apresentarem um ciclo de divisão celular curto e, por isso, responderem rapidamente aos efeitos dos agentes testados, além de serem financeiramente acessíveis e de fácil reprodutibilidade (SPEIT et al., 1998; ROGERO et al., 2003; CARDOZO et al., 2006). Estes testes permitem uma melhor padronização das etapas dos ensaios, possibilitando o controle físico-químico do ambiente experimental (pH, temperatura, concentração de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) e o controle das condições fisiológicas, que devem ser mantidas praticamente constantes durante todo o experimento (BRUSICK, 1987; CARVALHO, 1996; FRESHNEY, 2005).

Várias linhagens celulares de mamíferos podem ser utilizadas em testes de genotoxicidade de amostras ambientais, como as células de hepatoma de camundongo (HTC), células de hepatoma humano (HepG2), células de carcinoma humano (HeLa), células de ovário de hamster (CHO), células de pulmão de hamster (V79 e CHL), células epiteliais de pulmão humano (L132 e A549), células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC),

fibroblastos de ratos (L929), fibroblastos humanos (RTL-W1 e NIH-3T3), leucócitos de ratos e camundongos e linfócitos humanos.

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

Castaño e Gómez-Lechón (2005) compararam a sensibilidade de células de mamíferos e células de peixes, observando tanto dados ecotoxicológicos descritos na literatura como respostas de testes realizados por eles, com diversos químicos. Segundo os autores, apesar das células de peixe apresentarem facilidade no manuseio, levando muitos autores a usá-las na rotina laboratorial, elas possuem um ciclo celular mais lento, o que poderia diminuir sua sensibilidade, quando comparadas às células de mamíferos. Porém, utilizando principalmente os ensaios de viabilidade celular MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina) e NRU (absorção do vermelho neutro), tanto as células de mamíferos como as células de peixes apresentaram uma sensibilidade semelhante para a maioria dos 51 químicos testados pelos autores, mostrando que tanto as células de mamíferos como as de peixes podem ser usadas, com segurança, em testes de toxicidade.

Para Claxton e Woodall (2007), a vantagem na utilização de ensaios *in vitro* com células de mamíferos, em relação às células de outros organismos (procariontes ou outros eucariontes), é que as de mamífero, além de oferecerem resultados eficientes para avaliações ambientais, fornecem respostas mais relacionadas aos riscos à saúde humana. Segundo Oliveira et al. (2006), os testes realizados com células de mamíferos permitem estabelecer correlações mais seguras com os seres humanos, pela proximidade taxonômica que apresentam.

## **2.5. Teste de ACs**

As ACs são alterações caracterizadas por uma mudança na estrutura ou no número normal de cromossomos de uma espécie (RUSSEL, 2002). Tanto as aberrações estruturais como as numéricas (aneuploidias e poliploidias) podem ocorrer de maneira



espontânea, devido a fatores intrínsecos e extrínsecos do organismo (NATARAJAN, 2002), ou ainda como resultado da exposição a agentes químicos ou físicos (RUSSEL, 2002). Mesmo que os sistemas de reparo celular corrijam, de maneira eficiente, as lesões no DNA, uma interferência em qualquer etapa desse processo poderá levar a um aumento de efeitos biológicos, incluindo as ACs (NATARAJAN, 2002).

Uma quebra no DNA, tanto no estágio de intérfase como na prófase, pode levar a várias consequências cromossômicas, como, por exemplo, uma deleção terminal, uma reintrodução na sua posição original (restituição) ou a união com outra porção derivada de quebra no mesmo cromossomo ou em um cromossomo diferente, podendo, desta forma, gerar vários tipos diferentes de aberrações (NATARAJAN, 2002; MATEUCA et al., 2006).

As aberrações estruturais são decorrentes de quebras diretas na fita de DNA, replicação de um DNA molde danificado, inibição da síntese de DNA ou de inibidores de topoisomerase II (ALBERTINI et al., 2000). As ACs são, geralmente, divididas em ACs propriamente ditas (ACs) e aberrações cromatídicas (ACTs), diferindo morfologicamente uma da outra. As ACs envolvem o mesmo locus em ambas as cromátides irmãs de um ou de vários cromossomos, enquanto as ACTs afetam uma das cromátides irmãs de um ou de vários cromossomos (HAGMAR et al., 2004).

Já as aberrações numéricas resultam de uma disjunção anormal dos cromossomos durante a divisão celular, com conseqüente falha na migração das cromátides para os pólos (ALBERTINI et al., 2000). A não-disjunção cromossômica, onde uma célula ganha um cromossomo e a outra perde, ou ainda a perda cromossômica durante a anáfase, podem levar a aneuploidia. As poliploidias são induzidas pela ausência de fuso mitótico funcional, citocinese insuficiente ou fusão nuclear em células binucleadas (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002; OBE et al., 2002; FERNANDES et al., 2007).

Segundo Mateuca et al. (2006), o tipo de AC é decisivo para o destino da célula. Células portadoras de ACs instáveis, tais como cromossomos dicêntricos, cromossomos em anel ou fragmentos cromossômicos, podem ser eliminadas por apoptose, enquanto que aberrações estáveis, como, por exemplo, translocações balanceadas, podem ter consequências deletérias para o organismo, uma vez que são muito menos eficazes em causar morte celular por apoptose.

As ACs são reconhecidamente importantes biomarcadores da exposição humana a radiações ionizantes e químicos genotóxicos. Tanto as aberrações estruturais como as numéricas estão associadas com riscos à saúde humana, como por exemplo, abortos

espontâneos, anomalias congênitas nos recém-nascidos e neoplasias em humanos (NATARAJAN, 2002).

O teste de ACs, utilizando *A. cepa* como organismo-teste, é mundialmente empregado nos estudos de genotoxicidade ambiental, constituindo-se num ensaio muito sensível e confiável na avaliação de químicos ambientais. Segundo Grant (1982), uma das vantagens dessa espécie é o fato de possuir cromossomos grandes, o que permite, facilmente, a detecção das ACs.

Recentemente, muitos autores vêm utilizando o teste de ACs em *A. cepa* para estudos de biomonitoramento de recursos hídricos (MATSUMOTO et al., 2006; GANA et al., 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; BARBOSA et al., 2010; RADIC et al., 2010), na avaliação da genotoxicidade de efluentes urbanos e industriais (GROVER; KAUR, 1999; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009), de agentes químicos (FERETTI et al., 2008; SETH et al., 2008; FERNANDES et al., 2009; YILDIZ et al., 2009) e físicos (EVSSEVA et al., 2005; SAGHIRZADEH et al., 2008).

O teste de ACs tem sido usado, nos últimos 30 anos, em estudos de monitoramento ocupacional e ambiental como biomarcador de efeitos genotóxicos provocados por substâncias cancerígenas (HAGMAR et al., 2004), ocupando, assim, uma posição de destaque na bateria de testes utilizados na avaliação de compostos genotóxicos (MATEUCA et al., 2006).

## **2.6. Ensaio do cometa**

As quebras na molécula de DNA são consideradas lesões pré-mutagênicas potenciais, que, quando evidenciadas, constituem eficientes e sensíveis marcadores de danos genotóxicos. A técnica mais utilizada para detecção de quebras no DNA é o ensaio de eletroforese em microgel de células individuais (SCGE) ou ensaio do cometa. Segundo Cotelle e Férard (1999), o ensaio do cometa é capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes ou oxidativos.

Östling e Johanson (1984) foram os primeiros a desenvolver a técnica de eletroforese em microgel para detectar danos no DNA em células individuais. Posteriormente, Singh et al. (1988) introduziram uma técnica de eletroforese em microgel sob condições alcalinas (pH 13). Este pH alcalino, segundo Tice et al. (2000) e Collins (2004), aumentou, substancialmente, a sensibilidade do teste na identificação de agentes genotóxicos, permitindo não só a detecção de quebras de fita simples e ligações cruzadas, mas também a observação de quebras de fita dupla, sítios álcali-lábeis, e excisão de sítios incompletos de reparo.

De acordo com Koppen et al. (1999), o ensaio do cometa tem sido indicado como um método apto a detectar mudanças pequenas na estrutura do DNA, tais como as atividades de reparo, o seu modo de empacotamento e sua integridade.

A técnica do cometa desenvolvida em condições alcalinas promove o desenovelamento do DNA e, conseqüentemente, a liberação de fragmentos decorrentes de quebras. Estes fragmentos de material genético, quando são submetidos à corrente elétrica, migram do núcleo em direção ao pólo negativo desta corrente. Os fragmentos cromossômicos deslocados pela corrida eletroforética, após a neutralização e coloração com brometo de etídio, formam imagens, onde as células se assemelham a cometas. Quanto maior as caudas formadas, maior é a extensão dos danos sofridos pelo DNA. Desta forma, muitos autores utilizam a extensão da cauda do cometa, decorrente da migração dos fragmentos, como critério para a quantificação das quebras ocorridas na fita do DNA (AVISHAI et al., 2002).

As quebras no DNA são decorrentes de quebras na própria fita, excisão de sítios incompletos de reparo e sítios álcali-lábeis, sendo todos estes eventos expressos, sob condições alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ), como quebras de fita simples. Em contrapartida, a diminuição na migração do DNA, na corrida eletroforética, acontece de forma proporcional à frequência de ligações cruzadas existentes no material genético. Portanto, a extensão da migração do DNA no ensaio cometa, realizado em qualquer tipo celular, é um equilíbrio entre os diversos processos biológicos que atuam em direções opostas nas células (FRENZILLI et al., 2000).

Comparado a outros testes de genotoxicidade (ACs e troca entre cromátides irmãs – SCE), o ensaio do cometa apresenta vantagens pela sensibilidade na detecção de pequenos danos no DNA, pela necessidade de um reduzido número de células para a sua execução, flexibilidade para uso de células proliferantes ou não, economicamente viável, facilidade de aplicação e período de tempo relativamente curto (alguns dias) para realização do ensaio (TICE et al., 2000; DHAWAN et al., 2009).

Durante a última década, o ensaio do cometa vem sendo utilizado como uma ferramenta básica em muitas áreas de pesquisa, como em aplicações clínicas, biologia da radiação, processos de reparo do DNA (COLLINS, 2004), biomonitoramento ambiental (AVISHAI et al., 2002; COTELLE; FÉRARD, 1999; DHAWAN et al., 2009) e genética ecotoxicológica (TICE et al., 2000). Esta técnica tem se mostrado, especialmente, eficiente e sensível na avaliação da genotoxicidade de substâncias químicas e de misturas complexas encontradas no ambiente. Segundo Kosz-Vnenchak e Rokosz (1997), o ensaio do cometa pode ser usado, especificamente, para determinar o potencial genotóxico de poluentes da água. Diversos autores, utilizando este teste, obtiveram resultados bastante satisfatórios em

estudos de genotoxicidade no meio aquático, evidenciando a sua versatilidade na avaliação de efeitos danosos aos seres vivos, provocados por poluentes lançados nos recursos hídricos (MATSUMOTO et al., 2003, 2005; HOSHINA, 2005; SOUZA; FONTANETTI, 2007; LEME, 2008; VENTURA et al., 2008).

Mazzeo (2009) verificou que o ensaio do cometa, realizado com células HTC mantidas em cultura, mostrou-se bastante sensível na detecção de danos genotóxicos provocados pela mistura de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno). Rocha et al. (2007) verificaram, por meio do ensaio do cometa realizado com fibroblastos RTL-W1, que os sedimentos do rio Tietê, coletados desde a nascente do rio até a represa Billings (região da cidade de SP), apresentam uma alta genotoxicidade, quando comparados aos sedimentos coletados à jusante da Billings, evidenciando o grande impacto causado pela poluição da grande São Paulo.

Para Cotellet e Féraud (1999), a sensibilidade do ensaio do cometa pode ser comparada a do teste do MN, que também é uma técnica que detecta quebras na fita de DNA. O teste do MN, considerado indicativo de mutagenicidade, evidencia eventos de quebras não reparadas e que promoveram alterações definitivas no material genético, enquanto que o ensaio do cometa (versão alcalina), considerado um teste de genotoxicidade, identifica quebras ocorridas não só por efeito do agente indutor, mas também pela ação dos sistemas de reparo celular, que identificaram erros e extraíram porções de DNA que sofreram alterações na sua estrutura.

### 3. OBJETIVOS

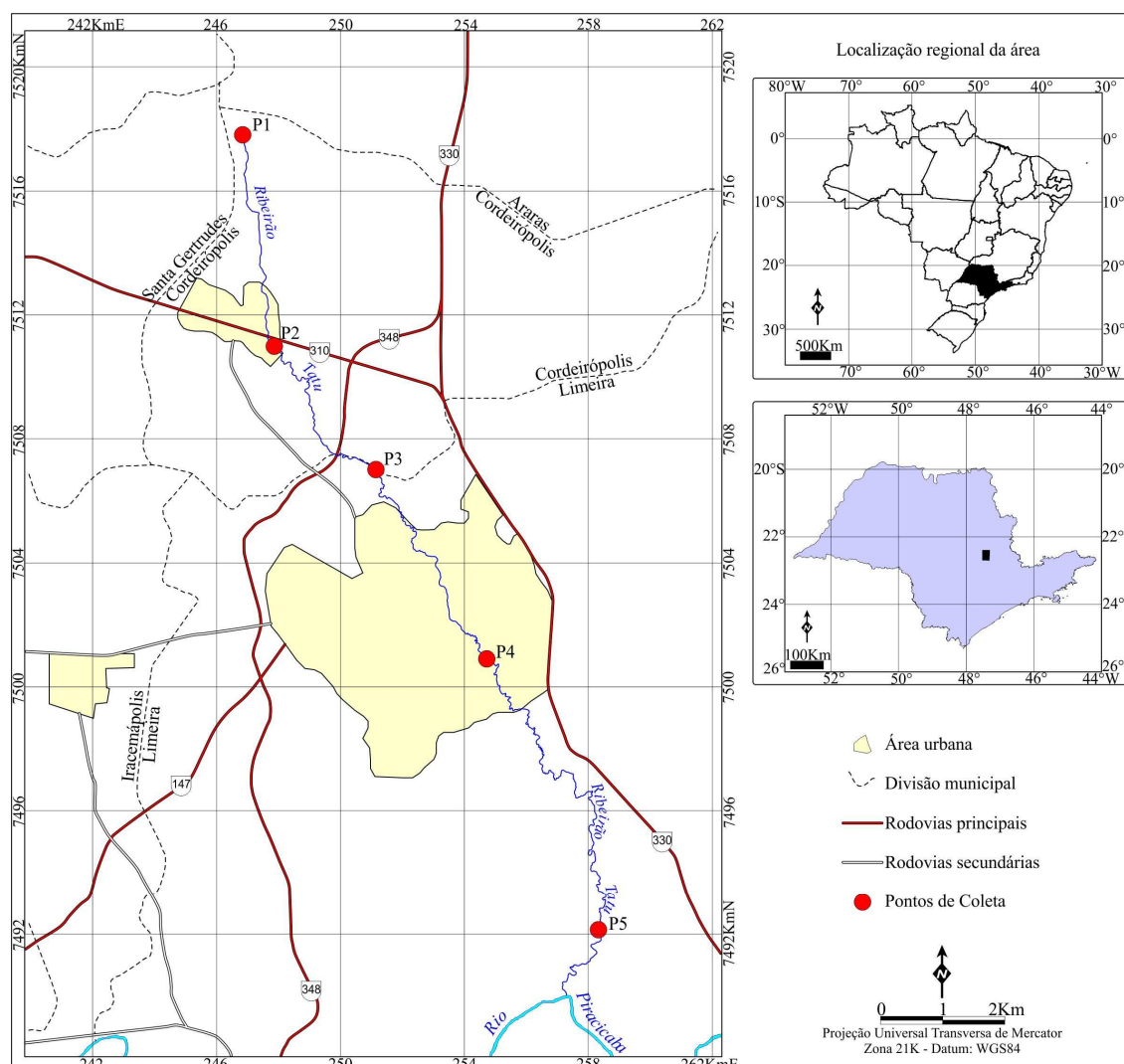
Considerando que o ribeirão Tatu recebe resíduos diversos, derivados de atividades domésticas, industriais e agrícolas, e pelo grande número de galvanoplastias clandestinas da cidade de Limeira, este trabalho teve como objetivos:

- investigar a possível presença de agentes contaminantes com potencialidade citotóxica (análise do índice mitótico), genotóxica (análise de aberrações cromossômicas) e mutagênica (análise de micronúcleos), nas águas do rio sobre células meristemáticas de *A. cepa*;
- investigar o possível potencial mutagênico (análise de micronúcleos) das águas do rio sobre células F<sub>1</sub> de *A. cepa*;
- Investigar o possível potencial genotóxico (ensaio do cometa) das águas do rio sobre células de mamíferos mantidas em cultura;
- Verificar a influência da sazonalidade na alteração do comprometimento do rio e na ação dos possíveis agentes contaminantes presentes nas suas águas;
- Avaliar o comprometimento do rio, por meio de análises físico-químicas de suas águas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Localização da área de estudo e coleta das amostras de água

As amostras de água foram coletadas ao longo do Ribeirão Tatu (figura 1), em três épocas do ano: novembro de 2008 (período quente e seco), fevereiro de 2009 (período quente e chuvoso) e agosto de 2009 (período frio e seco).

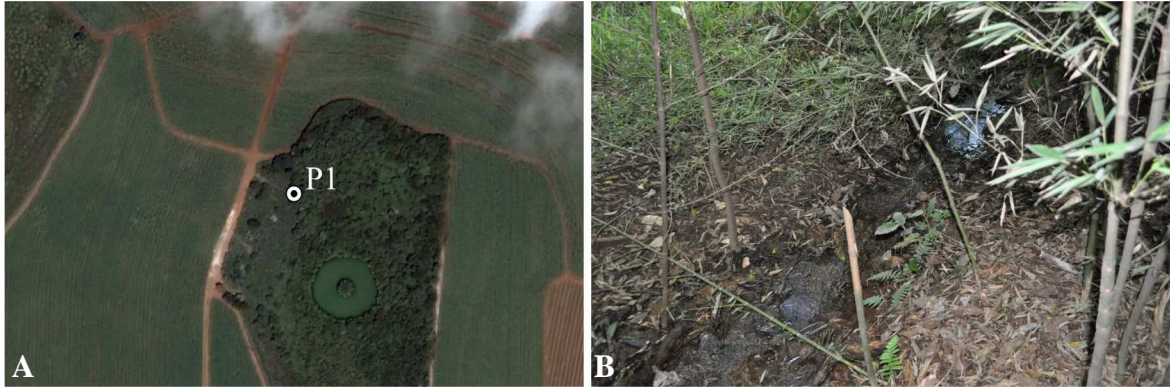


**Figura 1.** Mapa de localização dos municípios de Cordeirópolis e Limeira/SP e dos pontos de coleta ao longo do ribeirão Tatu (P1: ponto 1; P2: ponto 2; P3: ponto 3; P4: ponto 4; P5: ponto 5).

Foram estabelecidos 5 pontos de coleta da água:

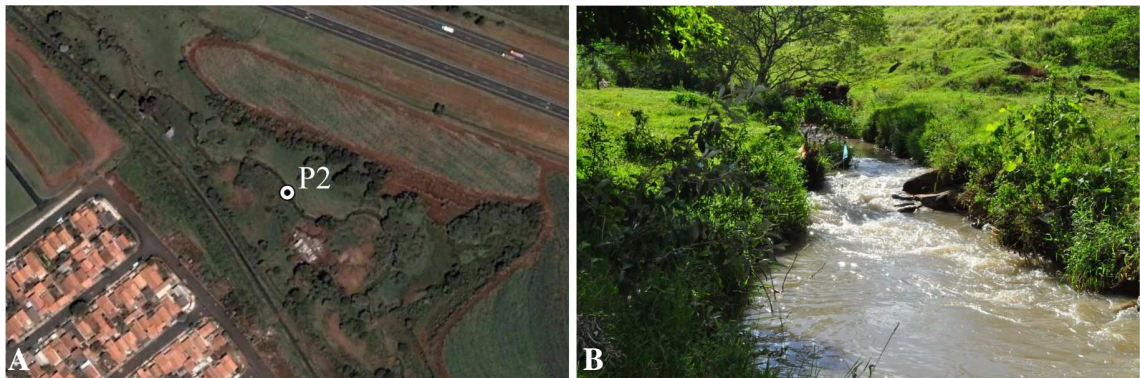
- P1 (nascente): posição geográfica nas coordenadas 23K 246860 m E e 7517816 m N com altitude de 692 metros. Este ponto situa-se na área rural do município de Cordeirópolis. O ribeirão possui, no entorno de sua nascente, árvores de pequeno e médio porte e bastante vegetação rasteira, caracterizando uma mata ciliar. Esta mata ciliar restringe-se somente à

área da nascente, pois esta é circundada por campos de agricultura com plantação de cana-de-açúcar.



**Figura 2:** Nascente do Ribeirão Tatu, Cordeirópolis/SP. A: Vista aérea (fonte: Google Earth®). B: Ponto 1 (P1) de coleta das águas.

- P2: posicionado nas coordenadas 23 K 247922 m E e 7511007 m N e com altitude de 631 metros. É um local situado após passagem pela zona urbana da cidade de Cordeirópolis. Neste local, o ribeirão encontra-se totalmente poluído, devido ao descarte do esgoto doméstico, sem tratamento, da cidade. Nas margens deste ponto do rio não há a presença de matas ciliares e sim de pastagens.



**Figura 3:** Ribeirão Tatu, Cordeirópolis/SP. A: Vista aérea (fonte: Google Earth®). B: Ponto 2 (P2) de coleta das águas (fotografia: Rogerio Entringer).

- P3: localizado nas coordenadas 23 K 251367 m E e 7507063 m N, a uma altitude de 561 metros. Este ponto situa-se a montante da zona urbana do município de Limeira. No local, pode-se observar certa cobertura vegetal, porém não de vegetação natural. Próximo ao local de coleta existem algumas áreas ocupadas por pastagens e agricultura.





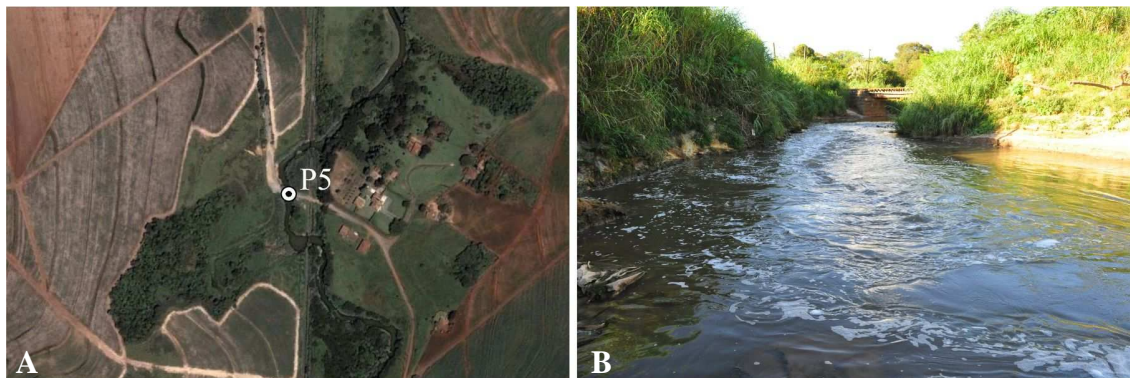
**Figura 4:** Ribeirão Tatu, Limeira/SP. A: Vista aérea (fonte: Google Earth®). B: Ponto 3 (P3) de coleta das águas (fotografia: Rogerio Entringer).

- P4: localizado nas coordenadas 23 K 254682 m E e 7500823 m N, a 547 metros de altitude. Este ponto esta situado na área urbana da cidade de Limeira. Neste local, o ribeirão foi revitalizado, com a implantação de canteiros marginais cobertos com árvores e arbustos. A água apresenta sinais, neste ponto, de piora na qualidade, decorrente do recebimento de efluentes domésticos e industriais do município de Limeira, além do escoamento que recebe de águas pluviais da região.



**Figura 4:** Ribeirão Tatu, Limeira/SP. A: Vista aérea (fonte: Google Earth®). B: Ponto 4 (P4) de coleta das águas (fotografia: Rogerio Entringer).

- P5: localizado nas coordenadas 23 K 258237 m E e 7492132 m N, altitude de 518 metros. Este ponto refere-se a uma região rural, que já passou por todo perímetro urbano da cidade de Limeira. Localiza-se próximo ao local de deságüe do Ribeirão Tatu no Rio Piracicaba (aproximadamente 2630m). Neste ponto, o rio já recebeu os efluentes da estação de tratamento de esgoto e lixiviados de campos agricultáveis. Neste local, a água apresenta uma coloração muito escura, um cheiro desagradável e uma freqüente presença de espumas, indicando o comprometimento da sua qualidade.



**Figura 5:** Ribeirão Tatu, Limeira/SP. A: Vista aérea (fonte: Google Earth®). B: Ponto 5 (P5) de coleta das águas (fotografia: Rogerio Entringer).

#### 4.2. Material biológico

Os sistemas-teste utilizados neste trabalho constituíram-se de sementes de *Allium cepa*, variedade Baia piriforme e de células de mamíferos (linhagem de hepatócitos – HTC), mantidas em cultura no Laboratório de Mutagênese do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências – UNESP Campus de Rio Claro.

#### 4.3. Análise físico-química das amostras de água

As análises físico-químicas das amostras de águas, coletadas nos diferentes pontos do ribeirão Tatu, foram realizadas nos Laboratórios de Química e de Microbiologia do Centro de Estudos Ambientais (CEA) da UNESP, Campus de Rio Claro. Foram avaliados os parâmetros: temperatura, condutividade, pH, cor aparente, turbidez, salinidade, STD (sólidos totais dissolvidos), OD (oxigênio dissolvido), amônia, nitrito, nitrato, fósforo total, DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e metais (alumínio, cádmio, chumbo, cobre, cromo, níquel, zinco).

#### 4.4. Teste de ACs e do MN em Células Meristemáticas de *A. cepa*

Para os testes de AC e do MN em células meristemáticas de raiz de cebola, foi adotado o protocolo descrito por Grant (1982), com algumas modificações padronizadas no Laboratório de Mutagênese da UNESP, Campus de Rio Claro. Sementes de *A. cepa* foram colocadas para germinar em placas de Petri forradas com papel filtro, contendo, em cada placa, a amostra de água coletada em um dos pontos de coleta (1 a 5). Os testes controles foram realizados, submetendo as raízes à água ultrapura, para o controle negativo, e a 10 mg/L de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3), para o controle positivo. Quando as radículas atingiram cerca de dois centímetros de comprimento, foram coletadas e fixadas

em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 de ácido acético – v:v). Após a fixação, as raízes passaram por três banhos em água destilada. Posteriormente, foram submetidas à hidrólise ácida em HCl 1 N a 60° C, por onze minutos e, novamente, lavadas em água destilada (3 banhos). As raízes foram, então, transferidas para frascos escuros contendo reativo de Schiff, onde permaneceram por, aproximadamente, duas horas. Realizada a reação, as raízes passaram por banhos em água ultra pura, até a total retirada do reativo. Para a confecção das lâminas, os meristemas foram suavemente esmagados em uma gota de carmim acético (2%) e recobertos com lamínula. Estas foram retiradas em nitrogênio líquido, e as lâminas montadas, permanentemente, com resina sintética.

Foram confeccionadas 10 lâminas para cada amostra e examinadas, aproximadamente, 500 células de cada lâmina observada. A observação foi feita em microscopia de luz, com aumento de 400 vezes.

A avaliação dos efeitos citotóxicos foi feita pelas análises do índice mitótico, de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{I.M. (Índice Mitótico)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células em divisão}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de células observadas}} \times 100$$

Para a análise do efeito genotóxico, foram considerados os diferentes tipos de AC (perdas, quebras, aderências e pontes cromossômicas), nas diferentes fases da divisão das células meristemáticas de *A. cepa*. O efeito mutagênico foi contabilizado pela frequência de células meristemáticas de *A. cepa* portadoras de micronúcleos.

Após a obtenção dos resultados de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, foram realizadas as análises estatísticas pelo teste de Mann-Whitney, com  $p < 0,05$ , para indicar o valor significativo.

As lâminas portadoras das alterações mais representativas, para cada anormalidade, foram fotodocumentadas, para ilustrarem os resultados.

#### **4.5. Teste do MN em Células F<sub>1</sub> de *A. cepa***

O procedimento para confecção das lâminas, utilizando as células F<sub>1</sub>, foi o mesmo descrito acima, porém o material utilizado foi a região da raiz que se localiza 1 milímetro acima da região meristemática.

A contagem de micronúcleos e a análise estatística também seguiram o procedimento descrito acima, para as lâminas de células meristemáticas.

#### 4.6. Ensaio do cometa com cultura de células de mamíferos (células HTC)

Linhagem de células de hepatoma de rato (HTC – Hepatoma Tissue Culture) foi cultivada em 5 mL de meio de cultura D-MEM/F-12, suplementado com 10% de soro bovino fetal, em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, com uma concentração inicial de  $1 \times 10^6$  células por frasco. As células foram mantidas em estufa a 37° C, por um ciclo celular completo (24 horas).

Após esse período, foram adicionados aos frascos 5 mL das amostras de água do ribeirão, filtradas em membrana milipore 0,2 µm. O frasco referente ao controle negativo recebeu 50 µL de tampão fosfato – PBS (phosphate buffered saline). Para o controle positivo, foi utilizado 50 µL de MMS, na concentração de  $4 \times 10^{-2}$  M. Os frascos foram mantidos em estufa a 37° C, por 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após o tratamento com as amostras, foi descartado o meio dos frascos de cultura. As células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e tripsinizadas com 0,5 mL de tripsina-EDTA 0,025% por, no máximo, dois minutos. Decorrido este tempo, o processo foi interrompido pela adição de 5 mL de um novo meio com soro. O conteúdo foi homogeneizado e centrifugado, por cinco, minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, deixando-se apenas 0,5 mL de meio, onde o *pellet* foi ressuspendido.

Para o teste de viabilidade celular, foram misturados 20 µL de suspensão celular e 20 µL de Azul de Trypan. A análise foi feita em câmara de Neubauer, sob microscopia de luz. Para a determinação da citotoxicidade, foi quantificada a proporção de células vivas (coloração branca) e de células mortas (coradas em azul), pelo método da coloração com Azul de Trypan, aceitando-se o limite mínimo de 80% de células viáveis, para o prosseguimento do experimento.

Para a montagem das lâminas (foram montadas duas lâminas por repetição, totalizando 6 lâminas por tratamento), foi seguido o protocolo descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações. As lâminas, previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), foram montadas com 20 µL de suspensão celular misturados a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Estas foram cobertas com lamínulas e levadas à geladeira (4°C), por vinte minutos. Decorrido este tempo, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram mantidas em cubetas (protegidas da luz), contendo solução de lise (1 mL de triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: 2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris, ~ 8,0 g de NaOH sólido, 10 g de lauryl sarcosinato sódico para 1 litro) gelada, que permaneceram em geladeira, por uma hora.

Após a lise, as lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (300 mM de NaOH, 1 mM de EDTA, pH>13) gelada e recém-preparada, por vinte minutos, para desnaturação do DNA. Após esse período, foi iniciada a corrida de

eletroforese com corrente 39 V (aproximadamente 1 V/cm) e amperagem de 300mA, por 20 minutos. As lâminas foram, então, neutralizadas com 5 mL de solução tampão neutralizadora (0,4 M de Tris-HCl, pH 7,5), em 3 séries de 5 minutos cada, secas na horizontal e fixadas com etanol 100%, por 10 minutos. As lâminas foram deixadas à temperatura ambiente, para secagem, e estocadas em geladeira para posterior análise. Para a análise, as lâminas foram coradas com 80 µL de solução de brometo de etídio (0,02 mg/mL) e cobertas com lamínula, uma por uma, para serem, imediatamente, analisadas.

Foram analisados 50 nucleóides por lâmina, totalizando 300 nucleóides por amostra. A análise foi feita em microscopia de fluorescência com filtro de excitação de 510-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm, em um aumento de 400X. Os nucleóides foram classificados, visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA, segundo Kobayashi et al. (1995), em: Classe 0: nenhum dano; Classe 1: dano pequeno; Classe 2: dano médio; Classe 3: dano grande.

Células com o núcleo completamente fragmentado, ou seja, em processo de morte celular, não foram contabilizadas.

O escore de cada tratamento foi obtido, multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe de dano pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3). Os resultados foram submetidos ao teste estatístico *t*-Student ( $p < 0,05$ ), para a comparação das amostras das águas coletadas com o controle negativo.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Análise dos parâmetros físico-químicos

Os resultados obtidos nas análises dos parâmetros físico-químicos, realizadas nas amostras de água coletadas na nascente e ao longo do leito do ribeirão Tatu, estão reunidos na tabela 1.

Naturalmente, os ecossistemas apresentam variações na temperatura decorrentes da sazonalidade e do comprimento dia/noite, variações estas consideradas parte do regime climático natural de um ambiente. A temperatura superficial dos corpos d'água também é influenciada por fatores diversos como latitude, altitude, estação do ano, período do dia, taxa de fluxo e profundidade. A temperatura é o principal fator que controla as características do meio aquático, condicionando as influências de uma série de variáveis físico-químicas, tais como, viscosidade, tensão superficial, compressibilidade, calor específico, constante de ionização, condutividade térmica, pressão de vapor, dentre outros (CETESB, 2009).

Temperaturas elevadas promovem um aumento na velocidade da agitação térmica dos átomos. Assim, a temperatura exerce um importante papel na velocidade de reações químicas e no estado físico da matéria (ESTEVES, 1998). Segundo o mesmo autor, o alto calor específico da água é responsável pela grande estabilidade térmica dos ecossistemas aquáticos, notada por meio das baixas variações diárias e sazonais da temperatura nesses ecossistemas, quando comparados aos terrestres. Os valores da temperatura das amostras de água coletadas no ribeirão Tatu variaram de 20,82° a 27,32° C, apresentando o menor valor no mês de agosto de 2009, para o P5, e maior valor no mês de novembro de 2008, para o P2, variando de maneira compatível com a sazonalidade (tabelas 1 e 2).

A condutividade é a expressão numérica da capacidade da água conduzir corrente elétrica. Este parâmetro físico da água é dependente das concentrações iônicas e da temperatura e indica a quantidade de sais existentes na coluna d'água, portanto, representa uma medida indireta da concentração de poluentes. A condutividade da água aumenta à medida que mais sólidos dissolvidos são adicionados (CETESB, 2009). Em geral, níveis superiores a 100  $\mu\text{S}/\text{cm}$  indicam ambientes impactados. Análises de condutividade, realizadas com amostras de água coletadas ao longo do ribeirão Tatu, indicaram valores elevados, a partir do P2 até o P5, em todas as coletas realizadas. Pelos resultados obtidos, observamos que as amostras coletadas em novembro de 2008 foram as que exibiram maior condutividade, cujos valores chegaram a 1125  $\mu\text{m}/\text{cm}$ , para amostras do P5, evidenciando a grande quantidade de poluentes presentes nesse local amostrado.

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos das águas do ribeirão Tatu, região de Limeira/SP, coletadas em agosto de 2008, fevereiro de 2009 e agosto de 2009.

Parâmetros	Amostras														
	Novembro de 2008					Fevereiro de 2009					Agosto de 2009				
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
Temperatura (°C)	23,59	27,32	24,81	24,58	25,82	25,36	26,37	25,94	26,39	26,20	21,13	21,01	21,10	20,90	20,82
Condutividade (µS/cm)	17	977	732	476	1125	17	223	137	212	373	17	692	391	377	517
pH	3,7	7,42	7,34	7,18	7,76	4,59	6,92	6,77	7,23	7,23	4,91	7,08	6,97	6,91	7,17
Cor aparente (units PtCo)	8	2482	477	322	942	2	319	241	162	352	4	944	473	221	556
Turbidez (NTU)	1,6	402,0	37,6	22,8	56,0	1,4	42	21,6	20	29	1,39	110	59	22	51
Salinidade (sal)	0,01	0,48	0,36	0,23	0,56	0,01	0,10	0,06	0,10	0,18	0,01	0,34	0,19	0,18	0,25
STD (mg/L)	11	635	475	309	731	11	145	80	138	244	11	450	254	245	336
OD (mg/L)	6,53	0,82*	2,43	1,04*	1,58*	5,61	1,17*	5,31	4,11	1,38*	8,08	1,40*	2,83	2,20	0,69*
Amônia (mg/L de NH <sub>3</sub> )	0,08	10,76	6,64	2,31	26,60	0,08	2,28	0,60	1,62	4,88	0,08	5,50	3,34	4,72	13,04
Nitrito (mg/L de NO <sub>2</sub> )	0,002	0,082	0,034	0,042	0,075	0,001	0,092	0,292	0,308	0,007	0,000	0,036	0,018	0,004	0,039
Nitrato (mg/L de NO <sub>3</sub> )	0,2	2,8	1,3	0,8	3,30	0,2	0,9	1,1	1,5	0,3	1,9	2,8	2,3	1,9	3,0
Fósforo Total	4,271	1394	1045	171,75	413,9	10,65	602,5	155,4	329,5	789,5					
DBO (mg/L de O <sub>2</sub> )	4,9	266	78	80	176	20,8	238	178	148	210	7,5	90	92	98	120
Alumínio (mg/L)	0,04359	0,43638	0,39898	0,31568	0,23348	<0,013	0,72368	0,24058	0,36448	0,17328	0,09911	0,36568	<0,013	0,06543	0,21568
Cádmio (mg/L)	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Chumbo (mg/L)	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	0,48175	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035
Cobre (mg/L)	<0,006	<0,006	<0,006	0,01105	0,32091	<0,006	<0,006	<0,006	<0,006	0,03236	<0,006	<0,006	<0,006	0,01353	0,11151
Cromo (mg/L)	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	0,03453	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015
Níquel (mg/L)	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	0,01188	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	0,02555	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	0,06890
Zinco (mg/L)	0,02928	0,02392	0,01007	0,04102	0,11009	0,03734	0,01620	0,02689	0,04661	0,05966	0,02681	0,04072	<0,001	0,05532	0,05881

\* Valores inferiores ao exigido para águas doces de classe 4, segundo a RES. CONAMA 357/2005

**Tabela 2.** Dados meteorológicos referentes aos períodos de coleta das amostras de água no ribeirão Tatu, região de Limeira/SP.

Período de coleta	Temperatura máxima (° C)	Temperatura mínima (° C)	Temperatura média (° C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Precipitação pluviométrica (mm)
Novembro/2008	27,1	13,2	20,2	63	32,2
Fevereiro/2009	30,3	20,8	25,6	68	175,6
Agosto/2009	29,5	18,4	24,0	62	98,6

Nota: os valores foram obtidos por meio do cálculo das médias dos valores diários.



A salinidade está intimamente relacionada com a condutividade, pois é uma medida da quantidade de sais presentes em uma amostra (ESTEVES, 1998). Com exceção do P1, todos os outros pontos apresentaram valores de salinidade bastante elevados, seguindo a tendência já observada nas análises de condutividade.

O potencial hidrogeniônico (pH) se destaca por ser um fator que influencia grande parte das reações químicas (FREITAS et al., 2002). A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos naturais pode se dar de forma direta, quando o próprio pH altera a fisiologia dos organismos. Este tipo de alteração pode ser vista, quando mudanças bruscas do pH levam ao desaparecimento dos organismos aquáticos mais sensíveis (GERTEL et al., 2003). As alterações no pH também podem levar a uma maior precipitação de elementos químicos tóxicos como metais, ou ainda interferir na solubilidade dos nutrientes. Nestes casos, os efeitos sobre a comunidade biológica são considerados de ação indireta. Os critérios de proteção à vida aquática fixam o pH entre valores de 6 a 9 (CETESB, 2009). Águas naturais, usualmente, apresentam valores de pH entre 4 a 9, sendo, na maioria das vezes, ligeiramente alcalina, devido a presença de bicarbonatos e carbonatos (MARRARA, 2008). Os valores de pH, registrados para as amostras coletas no ribeirão Tatu, entre os anos de 2008 e 2009, variaram de 3,7 a 7,76. O P1 exibiu, para todas as coletas realizadas, os menores valores de pH (3,7; 4,59 e 4,91, para as coletas de novembro de 2008, janeiro de 2009 e agosto de 2009, respectivamente). Os demais pontos apresentaram pHs próximos a neutralidade (6,77 a 7,76). O pH ácido das águas do P1 pode estar relacionado às próprias características geológicas da região ou à presença de agrotóxicos, que, eventualmente, podem ter sido carregados para o leito do rio, já que esse ponto localiza-se numa área com intensa atividade agrícola.

A cor de uma amostra de água está associada ao grau de redução que a luz sofre ao atravessá-la, devido à presença de sólidos dissolvidos, principalmente, material em estado coloidal orgânico e inorgânico. Além dos colóides orgânicos naturais presentes na água, como os ácidos húmico e fúlvico, os esgotos domésticos, por apresentarem matéria em estado coloidal, e os diversos efluentes industriais, por conter taninos, anilinas, corantes, lignina e celulose, contribuem para a alteração deste aspecto físico da água (sua cor). Alguns compostos inorgânicos também são capazes de promover efeitos sobre a cor aparente da água, por se apresentarem em estado coloidal, como é o caso dos óxidos de ferro e de manganês (CETESB, 2009). Pelas análises realizadas com as amostras de águas coletadas no ribeirão Tatu, todos os pontos amostrados, com exceção do P1, apresentaram índices de cor aparente bem elevados, principalmente as amostras coletadas em novembro de 2008 e agosto de 2009.



Isto pode ser explicado pelo menor potencial hídrico observado nestes períodos, devido aos menores índices pluviométricos registrados, somados aos descartes de efluentes urbanos e industriais sem tratamento, lançados, constantemente, neste recurso hídrico.

A turbidez de uma amostra de água é o grau de atenuação de intensidade que um feixe de luz sofre ao atravessá-la, devido à presença de sólidos em suspensão, como partículas inorgânicas (areia, silte, argila), detritos orgânicos, algas e bactérias, bem como a comunidade planctônica em geral, etc. Esse parâmetro não deve ser confundido com a cor aparente da água, pois não é considerada a alteração de cor e sim a presença de sólidos em suspensão, que impede a passagem da luz para as faixas de estratificação mais profundas. Assim, uma amostra pode apresentar cor aparente alterada e não ter valores de turbidez. A erosão das margens dos rios em estações chuvosas, esgotos sanitários e diversos efluentes industriais são exemplos de fenômenos que resultam em um aumento da turbidez da água, podendo reduzir a fotossíntese da vegetação submersa e das algas. Esta diminuição do suprimento de luz pode levar a uma redução no desenvolvimento de plantas, que, por sua vez, pode suprimir a produtividade de peixes, influenciando, negativamente, na dinâmica das comunidades biológicas aquáticas (CETESB). Os resultados obtidos com amostras de águas do ribeirão Tatu mostram valores elevados de turbidez, principalmente, nos pontos 2 e 5, para o mês de novembro de 2008. Esses dois pontos localizam-se em regiões sem a presença de matas ciliares, com barrancos sem cobertura vegetal e à jusante de descartes de esgotos domésticos e industriais, o que pode ter contribuído para a elevação dos índices de sólidos em suspensão na água e, conseqüentemente, o aumento nos valores de turbidez.

A presença de sólidos totais dissolvidos (STD) em recurso hídrico pode causar danos à vida aquática, por se sedimentarem nos leitos dos rios, impedindo o desenvolvimento de certos organismos e alterando a cadeia trófica; por danificarem os locais de desova; e por reterem bactérias e resíduos orgânicos no fundo dos rios, promovendo a eutrofização das águas (CETESB, 2009). Pelas análises químicas realizadas com águas do ribeirão Tatu foi observado que, de maneira geral, este rio apresentou valores elevados de STD, com exceção do P1. Os pontos P2 e P5 foram os mais comprometidos para este parâmetro, principalmente para as coletas realizadas em novembro de 2008. Neste período, o índice pluviométrico foi o menor registrado dentre todo o período amostrado, o que pode ter concentrado os sólidos nas águas do rio. Porém, isso não exclui a possibilidade de lançamentos de esgotos urbanos e industriais também terem contribuído para a elevação desses valores.

As principais fontes de oxigênio nas águas são o oxigênio proveniente da atmosfera e o produzido durante a fotossíntese de algas. O oxigênio dissolvido constitui um

importante parâmetro físico-químico de análise da qualidade de águas, uma vez que indica a capacidade de um corpo d'água natural manter a sua biota endêmica (CETESB, 2009). Os valores obtidos para esse parâmetro, para as águas coletadas no ribeirão Tatu, são preocupantes, pois, com exceção do P1 que apresentou valores entre 5,61 a 8,08 mg/L de O<sub>2</sub>, todos os outros pontos apresentaram um comprometimento na qualidade da água, em relação à quantidade de O<sub>2</sub> dissolvido, principalmente para as águas coletadas no mês de novembro de 2008, onde foi registrado para o P2 o valor de 0,82 mg/L de O<sub>2</sub>.

As fontes de nitrogênio nas águas naturais são diversas: os esgotos sanitários constituem, em geral, a principal fonte, seguidos de efluentes industriais, lixiviados de áreas agrícolas e drenagem das águas pluviais, associadas às deficiências do sistema de limpeza pública. O nitrogênio pode ser encontrado nas águas sob diversas formas, como: amônia, nitrito, nitrato, etc. A amônia é um tóxico bastante restritivo à vida dos peixes, sendo que muitas espécies não suportam concentrações acima de 5 mg/L. Além disso, a amônia provoca consumo de oxigênio dissolvido das águas naturais ao ser oxidada biologicamente, sendo, portanto, um importante parâmetro de classificação das águas naturais e, por isso, normalmente utilizado na constituição de índices de qualidade das águas (CETESB, 2009). Os níveis de amônia apresentados pelas amostras de água do ribeirão Tatu são bastante elevados, principalmente para o P2 e P5, que atingiram os seus maiores índices no mês de novembro de 2008 (10,76 para o P2 e 26,60 mg/L para o P5). Esse fato pode estar relacionado com a baixa pluviosidade desse período, associado à presença de poluentes lançados nos efluentes urbanos e industriais, já que esses pontos localizam-se em regiões posteriores ao descarte dos efluentes das cidades de Cordeirópolis e Limeira, respectivamente.

Assim como o nitrogênio, o fósforo aparece em águas naturais devido, principalmente, às descargas de esgotos sanitários, efluentes industriais e águas drenadas de áreas agrícolas e urbanas. O excesso de fósforo presente em esgotos sanitários e efluentes industriais conduz aos processos de eutrofização das águas naturais (CETESB, 2009). Nesse estudo, as amostras do P2 e P3, coletadas em novembro de 2008, apresentaram os maiores índices de fósforo total. Tais valores podem ser justificados pelo fato desses pontos sofrerem, diretamente, o impacto de descarte de todo o esgoto urbano sem tratamento do município de Cordeirópolis, aliado à baixa pluviosidade registrada nesse período.

A DBO (demanda bioquímica de oxigênio) de um recurso hídrico é a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica, por decomposição microbiana aeróbia, em uma forma inorgânica estável. A DBO é normalmente considerada como a quantidade de oxigênio consumido, durante um determinado período de tempo, numa temperatura de

incubação específica (geralmente 5 dias, a 20°C). Os maiores aumentos em termos de DBO, num corpo d'água, são provocados por despejos de origem, predominantemente, orgânica. A presença de um alto teor de matéria orgânica pode induzir ao completo esgotamento do oxigênio da água, provocando o desaparecimento de peixes e outras formas de vida aquática. Neste trabalho, foi verificado que os P2 e P5 apresentaram os maiores valores para a DBO, principalmente no mês de novembro de 2008. Esses valores podem estar associados, no período de estudo, ao despejo de efluentes domésticos e industriais sem tratamento adequado e à baixa pluviosidade.

Na água, o alumínio pode ser encontrado de diferentes formas, sendo influenciado pelo pH, temperatura, presença de matéria orgânica e de outros compostos como fluoretos, sulfatos e outros ligantes. A solubilidade do alumínio é baixa em pH entre 5,5 e 6,0. As concentrações de alumínio dissolvido em águas com pH neutro variam de 0,001 a 0,05 mg/L, mas aumentam para 0,5 a 1 mg/L em águas mais ácidas ou ricas em matéria orgânica. O aumento da concentração de alumínio, segundo a CETESB (2009), está associado com o aumento dos índices pluviométricos, portanto, com a alta turbidez. As amostras de água do ribeirão Tatu apresentaram as maiores concentrações de alumínio nos meses de novembro de 2008 e fevereiro de 2009. Os valores registrados para novembro de 2008 podem ser explicados pela alta concentração de solutos nas águas do rio, em decorrência da estiagem do período. Portanto, para fevereiro de 2009, estes altos valores de alumínio podem ser justificados pela alta pluviosidade do período, promotora de grande escoamento de água e conseqüente carregamento de soluto para o leito do rio.

O cádmio é liberado no ambiente por efluentes industriais, principalmente, de galvanoplastias, de fábricas de pigmentos, soldas, equipamentos eletrônicos, lubrificantes e acessórios fotográficos, bem como por poluição difusa causada por fertilizantes. Normalmente, a concentração de cádmio em águas não poluídas é inferior a 1 µg/L. O cádmio é um metal que se acumula nos organismos aquáticos, o que possibilita a sua transferência via cadeia alimentar (CETESB, 2009). As amostras de água do ribeirão Tatu apresentaram valores de cádmio inferiores a 0,003 mg/L, o que indicou que este metal não está comprometendo a qualidade das águas deste rio.

A presença do chumbo na água ocorre por deposição atmosférica ou lixiviação do solo. As doses letais deste metal para peixes variam de 0,1 a 0,4 mg/L, embora alguns resistam até 10 mg/L, em condições experimentais (CETESB, 2009). Esse metal foi detectado no ribeirão Tatu, somente na amostra de água do P5, no mês de novembro de 2008, numa concentração limítrofe de 0,48175 mg/L, acima daquela letal para peixes.

As fontes de contaminação por cobre no meio ambiente incluem minas de cobre ou de outros metais, corrosão de tubulações de latão por águas ácidas, efluentes de estações de tratamento de esgotos, uso de compostos de cobre como algicidas aquáticos, escoamento superficial e contaminação da água subterrânea, a partir do uso agrícola do cobre e precipitação atmosférica de fontes industriais. Doses elevadas de cobre são muito mais nocivas para peixes do que para o homem. Foi registrado que, concentrações de 0,5 mg/L são letais para trutas, carpas, bagres, peixes vermelhos de aquários ornamentais e outros. Os microorganismos apresentam sensibilidade a este metal (letalidade) para concentrações acima de 1,0 mg/L (CETESB, 2009). Somente as amostras do P4 e P5, coletadas no ribeirão Tatu, mostraram valores detectáveis de cobre.

O cromo é utilizado na produção de ligas metálicas, estruturas da construção civil, fertilizantes, tintas, pigmentos, curtumes, preservativos para madeira, dentre outras aplicações. Segundo a CETESB (2009), a maioria das águas superficiais contem valores de cromo variando entre 1 e 10 µg/L. Dentre as amostras de água coletadas no ribeirão Tatu, somente as águas coletadas no P5, mês de novembro de 2008, apresentaram quantidade de cromo detectável, indicando uma concentração de 0,03453 mg/L.

O níquel e seus compostos são utilizados em galvanoplastia, na fabricação de aço inoxidável, manufatura de baterias Ni-Cd, moedas, pigmentos, entre outros usos. Concentrações de níquel em águas superficiais naturais podem chegar a valores de 0,1 mg/L; porém, podem ser encontrados valores mais elevados deste metal em áreas de mineração (CETESB, 2009). O P5 do ribeirão Tatu apresentou concentrações detectáveis de níquel, variando de 0,01188 mg/L no mês de novembro de 2008 a 0,06890 mg/L em agosto de 2009.

O zinco e seus compostos são muito usados na fabricação de ligas e latão, galvanização do aço, na borracha como pigmento branco, suplementos vitamínicos, protetores solares, desodorantes, xampus, etc. As concentrações de zinco, observadas para águas superficiais naturais, geralmente ficam abaixo de 10 µg/L, enquanto que para águas subterrâneas este valor fica entre 10-40 µg/L (CETESB, 2009). Todas os pontos avaliados do ribeirão Tatu apresentaram concentrações detectáveis de zinco, variando de valores <0,001 (valor mais baixo), no P3 em agosto de 2009, a 0,11009 (valor mais altos), no P5 em novembro de 2008.

Os dados obtidos nas análises físico-químicas das amostras de água coletadas no ribeirão Tatu, nas diferentes épocas do ano, permitiram-nos inferir que o principal problema ambiental desse recurso hídrico é o lançamento de efluentes domésticos e industriais sem tratamento adequados, que comprometem a qualidade de suas águas, e conseqüentemente, a

sobrevivência dos organismos expostos. Com exceção do P1, que se localiza na nascente do ribeirão, todos os outros pontos apresentaram alterações nos parâmetros analisados, principalmente o P2 e o P5. O P2 localiza-se próximo ao descarte do esgoto urbano do município de Cordeirópolis – SP, fato este que contribui muito para a diminuição da qualidade da água, ao longo do curso deste rio. Já o P5 localiza-se à jusante do perímetro urbano do município de Limeira, ou seja, após o recebimento de toda carga poluidora desta cidade, que, somada a toda poluição recebida dos emissários da cidade de Cordeirópolis, agravam as condições deste rio.

**5.2. Artigo 1:** O uso de cultura de células de mamíferos em avaliações da contaminação de recursos hídricos.

**5.3. Artigo 2:** Avaliação da toxicidade das águas do ribeirão Tatu, região de Limeira/SP, por meio do sistema-teste *Allium cepa*.

**5.4. Artigo 3:** Avaliação da genotoxicidade de águas impactadas por efluentes domésticos e industriais de uma região altamente industrializada do Estado de São Paulo-Brasil, por meio do ensaio do cometa em células HTC.

**O uso de cultura de células de mamíferos em avaliações da contaminação de recursos  
hídricos**

Bárbara Cassu Manzano<sup>1</sup> e Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Autor correspondente: Tel.:(19) 3526-4143. Fax: (19) 3526-4136. E-mail: [mamm@rc.unesp.br](mailto:mamm@rc.unesp.br)

## I. Introdução

O crescente desenvolvimento, tanto industrial como social, têm levado a um aumento considerável na produção de resíduos, que, quando lançados no ambiente *in natura*, ou seja, sem tratamento prévio, podem causar sérios comprometimentos à qualidade ambiental.

Dentre todos os ecossistemas, o aquático é o que tem sofrido os maiores impactos, frente à poluição, uma vez que a água acaba sendo o destino final de todo poluente. Segundo Lemos e Erdtmann (2000), o ambiente aquático, por ser um depositário de diferentes tipos de descargas antropogênicas, vem sofrendo crescentes contaminações por químicos diversos, que podem, ainda, se associar e formar outras misturas mais complexas de constituição e ação desconhecidas. Por isso, há uma necessidade eminente de se avaliar o possível efeito tóxico de contaminantes ambientais, para se estimar os eventuais danos que eles possam causar aos ecossistemas. Neste contexto, estudos realizados em ambientes aquáticos são de alta relevância, considerando que a água chega aos animais pela dessedentação e alimentação, sendo que para o homem ainda existe uma outra via de exposição, que é a recreação.

Efluentes industriais e urbanos tratados de forma inadequada ou não tratados, contêm perigosos compostos químicos que podem induzir efeitos citotóxicos e genotóxicos à biota exposta (CLAXTON et al., 1998; RANK; NIELSEN, 1998). Tais efluentes contêm misturas, formadas pela associação de agentes como pesticidas, metais, diferentes resíduos industriais e uma variedade de outras substâncias (VEGA, et al., 1996) que, em muitos casos, podem não apresentar efeitos imediatos nos organismos expostos, mas, a longo prazo, podem diminuir a sobrevivência dos mesmos (WHITE; RASMUSSEN, 1998).

Muitos estudos têm sugerido uma correlação direta entre a mutagenicidade e a quantidade de certos poluentes, como por exemplo, os metais e os pesticidas presentes na água (HOUK, 1992; FATIMA; AHMAD, 2006). Estes agentes atuam sobre a molécula de DNA, causando mutações, o que pode decorrer em prejuízos à saúde, pela promoção de defeitos congênitos, anormalidades reprodutivas, além de doenças como o câncer (GROVER; KAUR, 1999).

Para os estudos de monitoramento da qualidade da água, os métodos *in vitro* apresentam vantagens, em relação aos *in vivo*, pela possibilidade de se limitar o número de variáveis experimentais; pela facilidade de obtenção de dados significativos; e pelo curto

período necessário para o desenvolvimento dos testes, quando comparados com outras técnicas rotineiramente usadas (ROGERO et al., 2003).

Ensaio *in vitro*, realizados com cultura de células, podem ser utilizados, com sucesso, em análises de genotoxicidade, por estas serem sensíveis a agentes químicos e físicos, por apresentarem um ciclo de divisão celular curto e, por isso, responderem rapidamente aos efeitos dos agentes testados, além de serem financeiramente acessíveis e de fácil reprodutibilidade (SPEIT et al., 1998; ROGERO et al., 2003; CARDOZO et al., 2006). Segundo Oliveira et al. (2006), os testes realizados com células de mamíferos permitem estabelecer correlações mais seguras com os seres humanos, pela proximidade taxonômica que apresentam.

## **2. Genotoxicidade e mutagenicidade de recursos hídricos**

### *2. 1. O uso de células de mamíferos em cultura nas avaliações de amostras ambientais*

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

Dentre as linhagens utilizadas em mutagênese, as células metabolizadoras, que expressam as enzimas de fase I e de fase II, são muito usadas em avaliações ambientais, pois possuem um papel fundamental na metabolização e detoxicação de xenobióticos que podem reagir com o DNA e, assim, induzir possíveis eventos mutacionais (TSUBOY et al., 2007). Na fase I, ocorre as reações de oxidação, redução e hidrólise, ocasionando sempre uma modificação estrutural do químico. As principais enzimas que atuam nesse processo são citocromo P-450, monoaminoxidase (MAO), esterases e proteases. Na fase II, conhecida como fase de conjugação, ocorrem reações de conjugação do químico com substâncias endógenas, o que também promove alteração estrutural no xenobionte original.

Testes utilizando células metabolizadoras mantidas em cultura, como as HTC e HepG2, constituem umas das melhores ferramentas para se detectar e avaliar os riscos que compostos químicos podem conferir a saúde do homem, pois são capazes de refletir o



metabolismo de compostos genotóxicos melhor do que outros modelos *in vitro*, que exigem ativação metabólica exógena (GÁBELOVÁ et al., 2004; PARK; CHOI, 2007).

Castaño e Gómez-Lechón (2005) compararam a sensibilidade de células de mamíferos e células de peixes observando tanto dados ecotoxicológicos descritos na literatura como respostas de testes realizados por eles com diversos químicos. Segundo os autores, apesar das células de peixe apresentarem facilidade no manuseio, levando muitos autores a usá-las na rotina laboratorial, elas possuem um ciclo celular mais lento, o que poderia diminuir sua sensibilidade, quando comparadas às células de mamíferos. Porém, utilizando principalmente os ensaios de viabilidade celular MTT e NRU (absorção do vermelho neutro), tanto as células de mamíferos como as células de peixes apresentaram uma sensibilidade semelhante para a maioria dos 51 químicos testados pelos autores, mostrando que ambas as células (mamíferos e peixes) podem ser usadas, com segurança, em testes de toxicidade.

Para Claxton e Woodall (2007), a vantagem na utilização de ensaios *in vitro* com células de mamíferos, em relação às células de outros organismos (procariótica ou eucariótica), é que as de mamífero, além de oferecerem resultados eficientes para avaliações ambientais, fornecem respostas mais relacionadas aos riscos à saúde humana.

## 2. 2. *Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese (cytokinesis-blocked micronucleus - CBMN)*

Os micronúcleos (MNs) são pequenos corpos arredondados, formados de material genético, que aparecem no citoplasma das células. Eles surgem quando um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico não migra juntamente com o conjunto de cromossomos para um dos pólos da célula, durante o processo de divisão celular. A presença de MN na célula é uma indicação de que a mesma foi exposta a um agente clastogênico e/ou aneugênico. Um agente aneugênico é aquele que interfere na formação do fuso mitótico, podendo ter como consequência desta ação a perda de um ou mais cromossomos durante a divisão celular, enquanto que um agente clastogênico é aquele que interage com o material genético, causando quebras no DNA, que resulta em fragmentação cromossômica (UDROIU, 2006; ERGENE et al., 2007).

Como acontece no núcleo celular, o envoltório nuclear, que é reorganizado na telófase, também se organiza em volta de cromossomos atrasados ou de fragmentos de cromossomos que se perderam do conjunto cromossômico, dando origem aos MNs. Assim como no núcleo principal, o material genético dos micronúcleos, após a formação do envoltório nuclear, se descondensa e, gradualmente, assume a morfologia de um núcleo

interfásico, com a diferença de serem menores que o núcleo principal da célula (FENECH, 2000). Desta forma, a presença de MNs caracteriza-se em uma resposta apropriada e confiável da ação de uma substância sob a célula, quer seja pelo seu efeito inibidor na polimerização das tubulinas do fuso ou por agir diretamente no material genético da mesma (GROVER; KAUR, 1999). Os MNs formados a partir desses processos podem ser visualizados em qualquer tipo celular (UDROIU, 2006).

Os danos no DNA, causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em MNs após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. Conseqüentemente, a comparação da frequência de MNs entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear, ocorrida após o dano ao DNA, fosse idêntica entre elas (FENECH, 1997).

Como os MNs podem ser visualizados somente em células que já completaram um ciclo de divisão nuclear, foi desenvolvido um método especial para identificar células que já passaram por este ciclo, pela aparência binucleada que exibem. Este método é conhecido como teste do MN com bloqueio da citocinese. Nesse teste, as células que já concluíram uma divisão nuclear são impedidas de realizar a citocinese, pela aplicação da citocalasina-B, que inibe a polimerização da actina G e, conseqüentemente a formação da actina F, não formando os microfilamentos necessários para contração do citoplasma e a clivagem da célula em duas células filhas. Os MNs são então computados somente nas células que são binucleadas, o que permite uma maior confiabilidade na comparação entre os danos cromossômicos de populações de células que apresentam cinéticas de divisão celular diferentes (FENECH, 1997; 2000).

Pela confiabilidade do teste CBMN na identificação de células que já tenham concluído uma divisão nuclear, pela sensibilidade e precisão de resposta, rapidez, simplicidade, capacidade de gerar grande número de células e boa reprodutibilidade (FENECH, 2000), ele vem sendo usado por muitos autores na avaliação de agentes químicos e físicos e de amostras ambientais complexas como os efluentes urbanos e industriais (LEMOS; ERDTMANN, 2000; LU et al., 2002, 2004; CARDOZO et al., 2006; TSUBOY et al., 2007; SHI et al., 2009).

### 2. 3. Ensaio do cometa (*single cell gel electrophoresis* – SCGE)

As quebras na molécula de DNA são consideradas lesões pré-mutagênicas potenciais, que, quando evidenciadas, constituem eficientes e sensíveis marcadores de danos genotóxicos. A técnica mais utilizada para detecção de quebras no DNA é a do ensaio de eletroforese em microgel de células individuais (SCGE) ou ensaio do cometa. Segundo Cotellet e Férard (1999), o ensaio do cometa é capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes ou oxidativos.

Östling e Johanson (1984) foram os primeiros a desenvolver a técnica de eletroforese em microgel para detectar danos no DNA em células individuais. Posteriormente, Singh et al. (1988) introduziram uma técnica de eletroforese em microgel sob condições alcalinas (pH 13). Este pH alcalino, segundo Tice et al. (2000) e Collins (2004), aumentou, substancialmente, a sensibilidade do teste na identificação de agentes genotóxicos, permitindo não só a detecção de quebras de fita simples e ligações cruzadas, mas também a observação de quebras de fita dupla, sítios álcali-lábeis, e excisão de sítios incompletos de reparo.

A técnica do cometa desenvolvida em condições alcalinas promove o desenovelamento do DNA e, conseqüentemente, a liberação de fragmentos decorrentes de quebras. Estes fragmentos de material genético, quando são submetidos à corrente elétrica, migram do núcleo em direção ao pólo negativo desta corrente. Os fragmentos cromossômicos deslocados pela corrida eletroforética, após a neutralização e coloração com brometo de etídio, formam imagens onde as células se assemelham a cometas. Quanto maior as caudas formadas, maior é a extensão dos danos sofridos pelo DNA. Desta forma, muitos autores utilizam a extensão da cauda do cometa, decorrente da migração dos fragmentos, como critério para a quantificação das quebras ocorridas na fita do DNA (AVISHAI et al., 2002).

As quebras no DNA são decorrentes de: quebras na própria fita, excisão de sítios incompletos de reparo e sítios álcali-lábeis, sendo todos estes eventos expressos, sob condições alcalinas (pH > 13), como quebras de fita simples. Em contrapartida, a diminuição na migração do DNA, na corrida eletroforética, acontece de forma proporcional à frequência de ligações cruzadas existentes no material genético. Portanto, a extensão da migração do DNA no ensaio cometa, realizado em qualquer tipo celular, é um equilíbrio entre os diversos processos biológicos que atuam em direções opostas nas células. (FRENZILLI et al., 2000).

Comparado a outros testes de genotoxicidade (aberrações cromossômicas e trocas entre cromátides irmãs), o ensaio do cometa apresenta vantagens pela sensibilidade na detecção de pequenos danos no DNA, pela necessidade de um número reduzido de células

para a sua execução, flexibilidade para uso de células proliferantes ou não, economicamente viável, facilidade de aplicação e período de tempo relativamente curto (alguns dias) para realização do ensaio (TICE et al., 2000; DHAWAN et al., 2009).

Durante a última década, o ensaio do cometa vem sendo utilizado como uma ferramenta básica em muitas áreas de pesquisa, como as aplicações clínicas, biologia da radiação, processos de reparo do DNA (COLLINS, 2004), biomonitoramento ambiental (AVISHAI et al., 2002; COTELLE; FÉRARD, 1999; DHAWAN et al., 2009) e genética ecotoxicológica (TICE et al., 2000), mostrando ser especialmente eficiente e sensível para aplicação na genotoxicidade de substâncias químicas e misturas complexas ambientais.

Para Cotellet e Férard (1999), a sensibilidade do ensaio do cometa pode ser comparada a do teste do MN, que também é uma técnica que detecta quebras na fita de DNA. O teste do MN, considerado de identificação mutagênica, identifica eventos de quebras não reparadas e que promoveram alterações definitivas no material genético, enquanto que o ensaio do cometa (versão alcalina), considerado um teste de genotoxicidade, identifica quebras ocorridas não só por efeito do agente indutor, mas também pela ação dos sistemas de reparo celular, que identificaram erros e extraíram porções de DNA que sofreram alterações na sua estrutura.

#### *2. 4. Outros ensaios*

O ensaio do cometa e o teste do MN são os dois “endpoints” mais utilizados na avaliação de danos ao material genético de células de mamífero mantidas em cultura, expostas a amostras de recursos hídricos impactados por poluentes diversos. Porém, outros testes também são utilizados nesse tipo de estudo, como por exemplo, os testes de aberrações cromossômicas (AC) (ECKL, 1995); testes citogenéticos de troca entre cromátides irmãs (SCE) (OHE et al, 1993; 2009; ECKL et al., 1995; LIU et al., 2007; 2009); testes de viabilidade celular, citotoxicidade, apoptose e necrose usando corantes vitais como MTT (ŽEGURA et al., 2009; SHI et al., 2009), XTT, NRU (CASTAÑO; GÓMEZ-LECHÓN, 2005), acridina orange, brometo de etídio (TSUBOY et al., 2007) e azul de Trypan; estresse oxidativo pela medição do malondialdeído (MDA) (YUAN et al., 2005; SHI et al., 2009); potencial antioxidante pela medição da glutathiona (GSH) (YUAN et al, 2005); e eficiência de clonagem (IERACE; DYE, 2001; CARDOZO et al., 2006).

### 3. Poluição por esgoto doméstico, efluentes industriais e lixiviados da agricultura

Células de pulmão de hamster Chinês (CHL) mantidas em cultura, foram utilizadas em ensaios de SCE por Ohe et al., 1993. Neste estudo, os autores avaliaram amostras de água dos rios Katsura, Nishitakase e Kamo, afluentes do Rio Yodo, na cidade de Kyoto, Japão. As amostras coletadas nos trechos a jusante de estações de tratamento de águas residuais induziram maior frequência de SCE em células com e sem ativação metabólica, do que aquelas coletadas a montante destas estações, sugerindo que os efluentes das estações de tratamento de água eram as fontes de poluição dos químicos genotóxicos encontrados nas águas dos rios. Os resultados mostraram a aplicabilidade do ensaio de SCE em células CHL para o monitoramento de genotoxicidade de água de rio.

Rao et al. (1995) avaliaram o potencial genotóxico de extratos do efluente de uma indústria de celulose, utilizando o ensaio de precipitação de DNA em células pulmonares de hamster Chinês (V79) e linhagens de células de fígado de rato (TIB73 e TIB75). As substâncias mutagênicas do efluente filtrado foram adsorvidas em resinas (XAD-4 e XAD-8) e eluídas com hidróxido de sódio e metanol. A fração mutagênica extraída por XAD-4 induziu quebras no DNA nos ensaios com as células V79, TIB73, e TIB75. As frações extraídas pela XAD-8 não induziram danos no DNA nas células V79.

Eckl (1995) utilizou hepatócitos primários de ratos para analisar amostras de água do rio Salzach, Áustria, impactado por efluentes urbanos e industriais. Os testes de SCE, MN e AC revelaram que amostras coletadas próximas a indústrias induziram uma maior frequência de danos nas células. Os resultados também confirmaram que, para estes parâmetros, o teste do MN mostrou-se mais sensível que o teste de AC. Das oito amostras testadas, sete induziram aumento significativo de MNs, enquanto somente cinco amostras, provenientes das regiões mais contaminadas do rio, induziram ACs nos hepatócitos.

Estudos realizados por Černá et al. (1996) na Bohemia oriental, República Tcheca, avaliaram um efluente industrial e a água do Rio Labe, numa área sob influência de um complexo químico industrial, por meio de análises citogenéticas em cultura de linfócitos periféricos humanos. A amostra do efluente industrial foi coletada em um emissário de águas residuais e a amostra de água superficial do rio foi coletada cerca de 6 km a jusante do local de descarte desse efluente. Foi observado um efeito citotóxico significativo, pela análise do índice mitótico dos linfócitos, somente para a concentração mais elevada (concentração final  $10^{-2}$  para 1 mL de cultura) da amostra do efluente. Nenhuma das amostras (efluente e água de rio) apresentou um aumento dose-dependente significativo de AC.

Foi avaliado por Kosz-Vnenchak e Rokosz (1997), o potencial genotóxico de águas residuais de uma usina termoeletrica e de uma metalúrgica da Cracóvia, Polônia, por meio do ensaio do cometa em células de hepatoma humano (HepG2). As células tratadas com amostras de água poluída induziram uma quantidade significativa de danos genéticos, indicando que o ensaio do cometa é uma ferramenta sensível e indicada para aplicação em estudos de biomonitoramento ambiental, que visa determinar o potencial de genotoxicidade de poluentes da água.

O lago Taihu, que é o terceiro maior lago de água doce da China, tem como principais fontes de contaminação os deságües de vários afluentes que apresentam grandes cargas orgânicas poluidoras. Além da pesca, o lago também é fonte de água potável para várias cidades e vilas do leste da China. Kong et al. (1998) realizaram um estudo para determinar a contaminação deste lago por agentes mutagênicos, a distribuição dos poluentes no lago e os efeitos potenciais desta contaminação sobre a saúde da população humana. Nesse estudo foram analisadas, pelo teste do MN em cultura de linfócitos periféricos humanos, amostras de água dos principais tributários do lago (rios Liangxi, Lujiang, Taipou, Xiaomei e Dapu). As amostras de água coletadas nas regiões do deságüe dos rios foram concentradas, por coluna de resina, e testadas em várias concentrações. Os rios Lujiang e Liangxi apresentaram mutagenicidade para todas as concentrações testadas, enquanto os rios Xiaomei e Dapu mostraram-se mutagênicos somente para as concentrações mais altas. A frequência de MN de células expostas às águas da foz do rio Taipou não foi significativa, em relação aos resultados do controle, nem mostrou uma relação dose-resposta dependente. Como o rio Taipou está situado à jusante do lago, os autores concluíram que os poluentes mutagênicos que chegam ao lago Taihu não excedem a sua capacidade de auto-depuração. No entanto, como muitos poluentes podem ser bioacumulados na biota aquática, os autores alertam para os perigos desta poluição para o futuro deste ecossistema.

Para avaliar a qualidade da água do rio Caí, localizado numa área sob influência de um Complexo Petroquímico do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, Lemos e Erdtmann (2000) utilizaram o teste do MN em cultura de linfócitos humanos. O rio Caí, além de ser fonte de água potável, é também utilizado para irrigação e para recreação. As amostras de água foram coletadas, durante 20 meses numa frequência bimestral (totalizando onze coletas para cada ponto), em quatro diferentes locais, sendo três deles na área de influência do complexo petroquímico e um à montante deste complexo. Das onze amostras coletadas próximas à área de disposição dos efluentes industriais, nove foram genotóxicas para os

linfócitos. As amostras coletadas a montante do complexo petroquímico apresentaram-se potencialmente mutagênicas. Essa área situa-se próxima a uma região agrícola o que sugere também uma possível contaminação por agrotóxicos. Os autores concluíram que o teste do MN em linfócitos humanos foi uma abordagem citogenética sensível para a detecção de substâncias com potencial clastogênico e/ou aneugênico em amostras ambientais aquáticas, e deveria ser melhor explorado para estudos de monitoramento de áreas sob influência industrial.

Num estudo de monitoramento, Ierace e Dye (2001) utilizaram o teste de eficiência de clonagem realizado com cultura de células fetais de ratos, para avaliar a qualidade da água de um córrego que atravessa a área da Universidade Estadual de Connecticut (USA), e que recebe grandes quantidades de sedimentos e efluentes de galerias de águas. Os testes realizados com as amostras de água coletadas em junho de 1997 não mostraram resultados positivos para citotoxicidade. Para as amostras coletadas em agosto de 1997, foi observado que dois dos locais amostrados apresentaram de 90 a 100% de eficiência de clonagem, semelhante aos resultados exibidos pelo teste controle, enquanto que um terceiro local exibiu uma taxa de eficiência de clonagem da ordem de 25%, nos seis dias de duração do teste. Essas culturas ainda apresentaram altas porcentagens de células gigantes e vacuolizadas. Por estes resultados, os autores inferiram que a degradação na qualidade da água do local amostrado ocorreu após junho de 1997. Esse ponto localiza-se próximo a uma estrada pavimentada e pode ter recebido hidrocarbonetos e compostos de petróleo que, por lixiviação, afetou a qualidade destas águas.

A citotoxicidade e genotoxicidade de três amostras de água de uma pequena bacia urbana formada pelos Córregos Agronomia e Capivara, na região metropolitana de Porto Alegre/RS – Brasil, foi avaliada por Cardozo et. al. (2006) por meio da medição da eficiência de clonagem e pelo teste do MN em células V79. Os resultados mostraram efeitos citotóxicos somente para as amostras de água coletadas nas áreas com urbanização média e alta. As amostras de água destas áreas possuem diferentes concentrações de clorofórmio, bromodiclorometano, tolueno, etilbenzeno, *m,p*-xileno e 1,4-diclorobenzeno, compostos que podem ter relação com a maior citotoxicidade observada. Quanto ao dano genotóxico, somente a amostra proveniente da área com maior ocupação urbana induziu danos no DNA de células V79, visualizados por meio do teste do MN.

Corantes têxteis são descartados no ecossistema aquático por meio de efluentes industriais e podem expor a biota local a efeitos adversos. Tsuboy et al. (2007) testaram a

genotoxicidade e a citotoxicidade de cinco concentrações (200 µg/mL, 400 µg/mL, 600 µg/mL, 800 µg/mL e 1000 µg/mL) do corante CI Disperse Blue 291 pela aplicação dos ensaios do cometa, do MN e de viabilidade celular em células de hepatoma humano (HepG2). Concentrações iguais ou maiores a 400 µg/mL levaram a um aumento na frequência de danos no DNA e na frequência de MN, além de diminuir a viabilidade celular. Os resultados deste estudo demonstraram que o corante CI Disperse Blue 291 apresenta efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos para células de mamíferos, servindo de alerta para o perigo potencial que os corantes azóicos representam para os seres humanos e para os organismos aquáticos, eventualmente, expostos a esta classe de poluentes.

O rio Songhua é um dos maiores rios da China e é a principal fonte de água para a indústria e a agricultura, bem como a fonte de água potável para milhões de habitantes que vivem ao longo dele. A alta contaminação deste rio é dada por esgotos domésticos e efluentes industriais. Liu et al. (2007) utilizaram o ensaio de transformação de células e SCE em cultura de células NIH3T3 e de linfócitos humanos, para verificar o potencial carcinogênico de amostras de águas deste rio. Tanto as amostras coletadas no verão como as no inverno induziram transformações celulares. As células NIH3T3 transformadas perderam a inibição de contato e a dependência de ancoragem, crescendo em aglomerados, de maneira muito rápida. As frequências de quebras observadas no ensaio de SCE, para as amostras de água avaliadas, foram estatisticamente significativas, indicando uma potencialidade genotóxica para as águas do rio Songhua.

Em outro estudo, Liu et al. (2009), compararam a atividade genotóxica de águas coletadas no rio Songhua, durante os anos de 2002 e 2003, com as coletas realizadas nos anos de 1994-1995 (LIU et al., 2007). O ensaio de SCE e o teste do MN foram realizados em cultura de linfócitos humanos. Os resultados obtidos no ensaio de SCE mostraram uma relação dose-dependente para todas as concentrações testadas (15, 30, 60, e 120 para a amostra do inverno e 12,5, 25, 50, e 100 mL de água/mL de meio para a amostra do verão), sendo as frequências de SCE registradas para os anos de 2002-2003 maiores do que as das amostras de 1994/1995, o que mostrou um comprometimento crescente deste rio ao longo do tempo. Os MNs resultantes dos testes realizados com as amostras de 2002/2003 também foram induzidos de forma dose-dependente, levando os autores a concluir que os contaminantes das águas do rio Songhua podem causar danos cromossômicos e instabilidade do genoma nos linfócitos humanos, e, conseqüentemente, riscos para os seres humanos que fazem uso das águas deste recurso hídrico.



Žegura et al. (2009) utilizaram o teste do MTT e do cometa em células de hepatoma humano (HepG2) para avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade de 51 amostras de águas de várias origens (residuais de hospitais, indústrias químicas, de estação de tratamento de efluentes, de superfície de rios e lagos e água potável). Os autores detectaram citotoxicidade em seis das amostras testadas. Pelos estudos realizados, foi concluído que a genotoxicidade das águas de rios e lagos parece estar ligada à presença de filtros UV presentes em protetores solares de banhistas, enquanto que a genotoxicidade de águas residuais de hospitais já tem uma associação tanto com a contaminação por medicamentos como por material de higiene, como detergentes, desinfetantes e halogênios, usados em grande quantidade nestes locais. Segundo os autores, os ensaios de MTT e cometa em células HepG2 se caracterizam em eficientes ferramentas na detecção da genotoxicidade e citotoxicidade de amostras de efluentes complexos e no monitoramento da qualidade da água superficial.

Ohe et al. (2009) avaliaram a genotoxicidade de dois derivados do diclorobifenil {o 3,3'-diclorobenzidina (DCB, 4,4'-diamina-3,3'-diclorobifenil) e o 4,4'-diamina-3,3'-dicloro-5-nitrobifenil (5-nitro-DCB)} e três congêneres do PBTA {o 2-[2-(acetilamina)-4-[bis(2-metoxietil)amina]-5-metoxifenil]-5-amina-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol (PBTA-1); o 2-[2-(acetilamina)-4-[N-(2-cianoetil)etilamina]-5-metoxifenil]-5-amina-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol (PBTA-2) e o 2-[2-(acetilamina)amina]-4-[bis(2-hidroxietil)amin]-5-metoxifenil]-5-amina-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol (PBTA-6)}, considerados os principais contaminantes do rio Waka, Japão, além de realizar testes com amostras da água do próprio rio. O composto 2-amino-3,8-dimetilimidazol[4,5-f]quinoxalina (MeIQx) foi utilizado como controle positivo, por ser considerado um carcinógeno humano pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) e por ser uma substância com característica química semelhante (amina aromática) aos químicos DCBs e PBTAs. Pelo teste SCE, houve um efeito dose-resposta positivo para todos os químicos avaliados (DCBs, PBTAs, MeIQx) e para as amostras de água do rio Waka, nas concentrações testadas (1,25 a 10 µg/mL de 5-nitro-DCB, PBTAs e MeIQx; 1 a 20 µg/mL de DCB; 6,25 a 25 mL equivalente de água/mL de meio). Segundo os resultados, a classificação para o potencial de indução de SCE seguiu a proporção: 5-nitro-DCB  $\approx$  MeIQx > PBTA6 > PBTA-1  $\approx$  PBTA-2 > DCB. As amostras de água coletadas no rio apresentaram uma concentração de 2,5 a 19,4 ng/L de 5-nitro-DCB e 4100 a 18900 ng/L de DCB, que, segundo os autores, são valores que contribuíram pouco na indução de SCE. Os autores concluem neste trabalho, que alguns

compostos desconhecidos podem estar contribuindo para a genotoxicidade das águas deste rio.

Rocha et al. (2009) verificaram a genotoxicidade de sedimentos coletados em vários pontos ao longo do Rio Tietê, utilizando cultura permanente de fibroblasto RTL-W1. Nesse estudo, amostras do sedimento foram coletadas em sete locais diferentes: nascente, reservatórios Ponte Nova e Billings (região de alta densidade populacional e grande deteriorização do rio), reservatórios Barra Bonita, Bariri, Promissão e Três Irmãos. Os dados do teste do cometa mostraram um grande aumento na genotoxicidade da nascente do Rio para a represa Billings (região da cidade de SP) e uma diminuição a jusante da Billings, evidenciando o grande impacto causado pela poluição desta região. Diluição por tributários, a jusante, resultou numa diminuição significativa da genotoxicidade dos contaminantes vinculados aos sedimentos.

#### **4. Efeitos da desinfecção de água poluída para o consumo humano**

A desinfecção das águas de reservatórios naturais destinadas ao consumo humano é considerada um dos grandes avanços da saúde pública (SHI, 2009). No entanto, quando agentes como o cloro, o ozônio, o dióxido de cloro ou as cloraminas são utilizados no processo, eles podem reagir com as substâncias naturalmente presentes na água ou introduzidas pela poluição, formando subprodutos de desinfecção denominados de DBPs (Disinfection By-Products) (LU et al., 2002; YUAN et al., 2005). A formação de DBPs depende do tipo e da qualidade dos reservatórios naturais de água e do tipo de desinfetante utilizado. O cloro ( $\text{Cl}_2$  – cloro gasoso), por exemplo, que é um dos desinfetantes primários de água mais utilizados em todo o mundo, produz compostos orgânicos halogenados voláteis e não voláteis (trihalometanos, ácidos haloacéticos) e hidroxifuranonas, que podem causar efeitos danosos ao material genético dos organismos, induzindo, inclusive, ao câncer (LU et al., 2002; SHI et al., 2009). Numerosos DBPs mutagênicos e carcinogênicos podem ser formados pelos processos de desinfecção da água potável e representar um perigo para a saúde humana, principalmente, por se caracterizar em uma via de exposição diária e crônica.

Desinfetantes primários podem ser substituídos pelos chamados desinfetantes alternativos, como o ozônio, o dióxido de cloro e as cloraminas. A desinfecção sequencial com ozônio ou dióxido de cloro, seguido por cloro, tem aumentado a eficiência da desinfecção (SHI et al., 2009).

Lu et al. (2002) utilizaram o teste do MN e o ensaio do cometa para verificar os danos genotóxicos e mutagênicos que a água clorada induz em células HepG2. Foram encontrados aumentos significativos da frequência de MN e de danos no DNA nas células tratadas, quando comparadas ao teste controle. Os resultados indicaram que as amostras de água potável clorada, obtidas a partir de água bruta poluída do lago D (China), foram capazes de induzir efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos, quebras na fita de DNA e/ou danos álcali lábeis em células de mamíferos, testadas *in vitro*. Frente a esses dados, os autores alertam para o perigo de consumo de água potável, obtida de água bruta poluída clorada, pela potencialidade de indução de danos ao material genético dos organismos, caracterizando-se em um potencial perigo para a saúde humana.

Células HepG2 foram utilizadas por Lu et al. (2004) para verificar os efeitos genotóxicos da água potável clorada proveniente do lago Dong e do rio Yangtze, na cidade de Wuhan, China, por meio do ensaio do cometa e do teste do MN. As culturas de células HepG2 foram expostas a várias concentrações de água (0,167, 1,67, 16,7 e 167 mL de água clorada/mL de meio de cultura). Todas as amostras, tanto do lago como do rio, causaram um aumento dose-dependente significativo na migração do DNA. Os resultados indicaram que as amostras de água coletadas durante o verão (agosto) causaram danos ao DNA significativamente maiores do que aquelas coletadas durante a estação fria (março). Além disso, foram registrados aumentos significativos na frequência de MN das células HepG2, após o tratamento com as amostras de água. No entanto, para este teste, as amostras coletadas no inverno apresentaram genotoxicidade maior do que aquelas coletas no verão. Mesmo não tendo explicações para estas diferenças nos resultados apresentados nos ensaio do cometa e teste do MN, os autores concluem que as células HepG2 constituem uma ferramenta útil para a detecção de efeitos genotóxicos de misturas ambientais complexas.

O lago Donghu e os rios Yangtze e Hanjiang são os três principais cursos de água potável da metrópole Wuhan, China. O principal problema desses recursos hídricos é a eutrofização provocada pela poluição orgânica doméstica, agrícola e industrial. Para verificar o potencial citotóxico e genotóxico de amostras de água provenientes desses três recursos hídricos, após a desinfecção com cloro, Yuan et al. (2005) realizaram os testes do cometa, estresse oxidativo, potencial antioxidante e citotoxicidade em células HepG2. Todas as amostras de água apresentaram genotoxicidade, verificada por meio da indução na migração de DNA no ensaio do cometa e também levaram a um aumento na formação de malondialdeído (MDA) em células HepG2, indicando estresse oxidativo causado pela água

clorada. O MDA é um aldeído formado por um processo de reações em cadeia, resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados da membrana celular (peroxidação lipídica - LPO), gerando, principalmente, radicais alquila, alcoxila e peroxila, que destroem a estrutura da membrana, promovem a falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, levam a célula à morte. O MDA pode se ligar a macromoléculas como o DNA e causar danos mutagênicos e carcinogênicos. A reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos que podem indicar níveis de estresse oxidativo sofridos por uma célula (LIMA; ABDALLA, 2001). Um aumento na permeabilidade da membrana celular, provocado pela LPO, pode causar perda de lactato desidrogenase (LDH) celular. Neste estudo, a perda de LDH celular aumentou proporcionalmente com o aumento de aldeídos TBA-reativos, mostrando uma correlação direta entre estresse oxidativo e citotoxicidade. Os resultados do teste de potencial antioxidante mostraram uma redução na concentração de glutathiona (GSH) nas células. Pela comparação dos níveis de aldeídos TBA-reativos com os níveis de GSH, os autores concluíram que a GSH foi consumida pelos subprodutos do processo de LPO e que esta diminuição levou a uma maior vulnerabilidade celular, por esta substância estar envolvida com a defesa preventiva contra o estresse oxidativo. Provavelmente, a interação de ambos os processos esteja envolvida com o aumento de MDA, com a diminuição de GSH e com a migração de DNA. Os autores afirmaram que as águas dos três recursos hídricos podem causar citotoxicidade, estresse oxidativo e danos ao material genético, quando submetidas à desinfecção por produtos a base de cloro.

Shi et al. (2009) avaliaram a toxicidade da água do rio Hanjiang (China), após a desinfecção por ozônio, dióxido de cloro ou cloro como desinfetante primário, seguido de cloro como desinfetante secundário, por meio do teste de viabilidade celular (MTT), teste do MN, ensaio do cometa e estresse oxidativo. As células HepG2 expostas a extratos da água bruta e da água tratada pelos vários processos citados, quando comparadas com o controle, apresentaram um aumento no nível de estresse oxidativo, de danos no DNA e de frequência de MN, diminuindo a viabilidade destas células, após 24 horas de exposição. Segundo os autores, tratamentos sequenciais com  $O_3$  ou  $ClO_2$  como desinfetante primário, seguidos de desinfecção com cloro, reduziram a formação de subprodutos, mas não reduziram a toxicidade da água do rio Hanjiang.

## 5. Outras fontes de contaminação

### 5. 1. Metais

O cromo hexavalente é um contaminante ambiental, cujas fontes antropogênicas incluem a queima de combustível, as emissões de indústrias metalúrgicas e as águas residuais de uma variedade de indústrias, tais como galvanoplastia, curtume e indústria têxtil (WISE et al., 2009). Matsumoto et al. (2003) utilizaram o ensaio do cometa em células CHO-K1 para verificar a contaminação ambiental por resíduos de cromo derivados de efluentes de curtume lançados no Córrego dos Bagres, município de Franca (SP/Brasil). As amostras foram coletadas durante as quatro estações do ano, em três locais diferentes: 200 m acima do descarte do efluente, no local de descarte e a 200 m abaixo do descarte. Todas as amostras apresentaram resultados positivos, sendo que as amostras do local do despejo e a jusante dele apresentaram as maiores taxas de quebra no material genético, sugerindo que a presença de níveis altos de cromo naquelas águas induziu um aumento na porcentagem de dano no DNA. Os resultados indicaram ainda, um maior comprometimento na qualidade da água no outono, caracterizada como uma estação quente e com baixos índices pluviométricos. Pelos resultados, os autores afirmam que o ensaio do cometa constitui uma ferramenta sensível para avaliação e monitoramento ambiental de águas contaminadas com efluentes contendo resíduos de metais, como o cromo.

O potencial genotóxico das águas do rio Sapucaizinho, Patrocínio Paulista (SP/Brasil), o qual recebe efluentes de curtume e, conseqüentemente, é contaminado com cromo, foi analisado por Matsumoto et al. (2005), por meio do ensaio do cometa em células CHO-K1. Os resultados indicaram alta genotoxicidade das águas coletadas à jusante do descarte do efluente, onde as concentrações de cromo foram elevadas. Durante o verão, os efeitos genotóxicos observados não foram significativos, quando comparados ao controle, resultados estes explicados pelos autores como decorrentes da alta pluviosidade registrada naquela estação do ano, o que pode ter diluído, consideravelmente, os contaminantes do rio.

A contaminação da água com íons metálicos, provenientes de águas subterrâneas, indústrias, curtumes e mineração, favorece a proliferação de algas marinhas, levando ao fenômeno de floração e a conseqüente produção de toxinas marinhas que contaminam bivalves das regiões costeiras de todo o mundo. Os bivalves contaminados pelas toxinas apresentam-se também contaminados por íons metálicos tóxicos. Quando estes moluscos são ingeridos pelo homem ou por outros animais, transferem os metais como cádmio, arsênico,

chumbo e cromo para estes organismos, colocando-os em risco pelas patologias que podem induzir como o câncer, por exemplo. Estudos realizados por Souid-Mensi et al. (2008) verificaram a presença de íons metálicos em bivalves coletados em Boughrara, Tunísia, em uma área de produção de mariscos, onde a pesca foi proibida por causa da poluição por metais. A presença de íons metálicos tóxicos, como cromo e cádmio na carne, na concha e na água liberada pelos moluscos, levou os autores a investigarem os efeitos tóxicos desses metais, quando combinados com o ácido ocadaico (toxina derivada da floração de algas), em cultura de células intestinais de mamíferos (Caco-2), por meio do ensaio de citotoxicidade (MTT), LPO, fragmentação do DNA e apoptose. Todos os testes mostraram resultados positivos para o ácido ocadaico, tendo efeitos danosos progressivos, conforme se aumentava a concentração de cromo e cádmio adicionado ao ácido. Os autores concluíram que os efeitos tóxicos do ácido ocadaico podem ser intensificados pela presença de íons metálicos nos mariscos, levando, pela magnificação, ao aumento de citotoxicidade e genotoxicidade nos organismos situados em níveis superiores da cadeia trófica.

O ambiente marinho é um local comum para deposição do cromo hexavalente, expondo as espécies marinhas continuamente a esse metal, o que pode contribuir para o declínio populacional de certos organismos como, por exemplo, o leão-marinho de Steller. Wise et al. (2009) realizaram ensaios de citotoxicidade e clastogenicidade com fibroblastos de pulmão do leão-marinho de Steller para avaliar os efeitos de várias concentrações de dois compostos: concentrações 1 a 25  $\mu\text{M}$  de cromato de sódio (solúvel) e concentrações de 0,1 a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de cromato de chumbo (insolúvel). Os resultados mostraram que os dois compostos apresentaram resposta dose-dependente de citotoxicidade e genotoxicidade, indicando que o cromo pode afetar negativamente a densidade populacional dos leões-marinhos de Steller.

## 5. 2. *Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)*

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos constituídos por dois ou mais anéis aromáticos condensados, que caracterizam uma classe de poluentes orgânicos comuns no ambiente. Estes compostos são produzidos, principalmente, pela queima de combustíveis fósseis, produção de carvão, refino e transporte de petróleo. Os HPAs podem ser introduzidos em águas de rios, lagos e mares, por meio de derrames acidentais de petróleo, descarte de operações industriais e esgoto urbano. Devido a sua ampla distribuição, os HPAs são um dos contaminantes ambientais mais perigosos, pelas suas

propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (AINA, et al., 2006). Segundo Leme e Marin-Morales (2008), águas contaminadas com HPAs podem levar a efeitos genotóxicos e mutagênicos em organismos expostos.

Os sedimentos tendem a apresentar concentrações mais elevadas de HPAs, devido a sua natureza hidrofóbica, o que aumenta a exposição de animais bentônicos a esses contaminantes (AOUADENE et al., 2008). Aouadene et al. (2008) avaliaram os sedimentos do rio Cadière, França, por meio de uma bateria de ensaios, dentre eles o teste do MN e ensaio do cometa em células CHO (com e sem ativação metabólica). Os autores verificaram que todas as cinco amostras coletadas no rio e testadas por meio do ensaio do cometa, apresentaram quebras de fita simples. Em relação aos efeitos clastogênicos, quatro das cinco amostras de sedimentos induziram aumento na frequência de MNs em células CHO com ativação metabólica, enquanto três amostras induziram aumento de MNs em células sem ativação metabólica. Este rio está exposto a diferentes fontes de poluição industrial e urbana e, neste caso, os autores sugerem que os efeitos genotóxicos e mutagênicos registrados para o rio podem estar relacionados à presença de nitroarenos, aminas aromáticas e HPAs, identificados nos seus sedimentos.

## **6. Conclusão**

Com base em todas as informações apresentadas nesta revisão, observa-se que os testes realizados com células de mamíferos são testes rápidos e sensíveis para a detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de efluentes, águas superficiais e sedimentos de rios e lagos, evidenciando a eficiência desses ensaios na avaliação e monitoramento da qualidade dos recursos hídricos impactados por efluentes industriais, domésticos e agrícolas.

**Tabela 1.** Resumo dos trabalhos relatados nessa revisão.

Amostra/recurso hídrico	Tipo celular/cultura	Ensaio	Supostos contaminantes	Referências
Rios Katsura, Nishitakase e Kamo (Kyoto/Japão)	CHL – pulmão de hamster	SCE	Efluente de indústria química	Ohe et al., 1993
Efluente de indústria de celulose (Ontário/Canadá)	V79 – pulmão de hamster			
Rio Salzach (Áustria)	TIB73/TIB75 – fígado de rato	Ensaio de precipitação de DNA	_____	Rao et al., 1995
Rio Labe e efluentes industriais (Bohemia/República Tcheca)	Hepatócito de rato	SCE, MN, AC	Efluente urbano e industrial	Eckl, 1995
Águas residuais de usina termelétrica e metalúrgica (Cracóvia/Polônia)	Linfócito humano	Ensaio de citotoxicidade AC	Efluente de indústria química	Černa et al., 1996
Lago Taihu e seus afluentes (China)	HepG2 – hepatoma humano	Ensaio do cometa	_____	Kosz-Vnenchak e Rokosz, 1997
Rio Caí (RS/Brasil)	Linfócito humano	MN	Efluente urbano	Kong et al., 1998
Córrego da Universidade de Connecticut (EUA)	Linfócito humano	MN	Efluente de indústria química	Lemos e Erdtmann, 2000
Lago D (China)	Célula fetal de rato	Teste de eficiência de clonagem	_____	Ierace e Dye, 2001
Córrego dos Bagres (SP/Brasil)	HepG2 – hepatoma humano	Ensaio do cometa, MN	_____	Lu et al., 2002
Lago Dong, Rio Yangtze (China)	CHOK1 – ovário de hamster	Ensaio do cometa	Efluente de curtume/metais	Matsumoto et al., 2003
Rio Sapucaizinho (SP/Brasil)	HepG2 – hepatoma humano	Ensaio do cometa, MN	_____	Lu et al., 2004
Lago Donghu, Rios Yangtze e Hanjiang (China)	CHOK1 – ovário de hamster	Ensaio do cometa	Efluente de curtume/metais	Matsumoto et al., 2005
		Ensaio do cometa, estresse oxidativo, potencial antioxidante, citotoxicidade	Efluente urbano e industrial, agricultura	Yuan et al., 2005



Rio Agronomia e Capivara (RS/Brasil)	V79 – pulmão de hamster	Teste de eficiência de clonagem, MN	_____	Cardozo et al., 2006
Corante Disperse blue (Brasil)	HepG2 – hepatoma humano	Ensaio do cometa, MN, viabilidade celular	_____	Tsuboy et al., 2007
Rio Songhua (China)	NIH3T3 – fibroblasto humano	Transformação celular, SCE	Efluente urbano e industrial	Liu et al., 2007
Rio Cadière (França)	CHO – ovário de hamster	Ensaio do cometa, MN	HPA's	Aouadene et al., 2008
Cromo, cádmio e ácido ocadaico	Caco-2 – células intestinais	MTT, LPO, fragmentação do DNA, apoptose	_____	Soud-Mensi et al., 2008
Rio Songhua (China)	Linfócito humano	SCE, MN	Efluente urbano e industrial	Liu et al., 2009
Efluente industrial, hospitalar, de estações de tratamento de efluentes e água de rios e lagos (Eslovênia)	HepG2 – hepatoma humano	Ensaio do cometa, viabilidade celular	_____	Žegura et al., 2009
Derivados de diclorobifenil e				
Rio Waka (Japão)	CHL – pulmão de hamster	SCE	BCD's	Ohe et al., 2009
Rio Tietê (SP/Brasil)	RTL-W1 – fibroblasto humano	Ensaio do cometa	Efluente urbano e industrial	Rocha et al., 2009
		Ensaio do cometa, MN, estresse		
Rio Hanjiang (China)	HepG2- hepatoma humano	oxidativo e MTT	_____	Shi et al., 2009
Cromato de sódio e cromato de chumbo	Fibroblasto de pulmão de leão marinho	Ensaio de citotoxicidade e clastogenicidade	_____	Wise et al., 2009

## 7. Referências

- AINA, R.; PALIN, L.; CITTERIO, S. Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L. **Chemosphere**, v.65, p.666–673, 2006.
- AOUADENE, A.; GIORGIO, C.D.; SARRAZIN, L.; MAREAU, X.; JONG, L.D.; GARCIA, F.; THIERY, A.; BOTTA, A.; MÉO, M.D. Evaluation of the Genotoxicity of River Sediments From Industrialized and Unaffected Areas Using a Battery of Short-Term Bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.49, p.283-299, 2008.
- AVISHAI, N.; RABINOWITZ, C.; MOISEEVA, E.; RINKEVICH, B. Genotoxicity of Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay. **Mutation Research**, v.518, p.21-37, 2002.
- CASTAÑO, A.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literature survey. **Toxicology in Vitro**, v.19, p.695–705, 2005.
- CARDOZO, T.R.; ROSA, D.P.; FEIDEN, I.R.; ROCHA, J.A.V.; OLIVEIRA, N.C.D.; PEREIRA, T.S.; PASTORIZA, T.F.; MARQUES, D.M.; LEMOS, C.T.; TERRA, N.R.; VARGAS, V.M.F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research**, v.603, p.83-96, 2006.
- ČERNÁ, M.; PASTORKOVÁ, A.; ŠMÍD, J.; BAVOROVÁ, H.; OČADLÍKOVÁ, D.; RÖSSNER, P.; ZAVADIL, J. Genotoxicity of industrial effluents, river waters, and their fractions using the Ames test and in vitro cytogenetic assay. **Toxicology Letters**, v.88, p.191-197, 1996.
- CLAXTON, L.D.; HOUK, V. S.; HUGHS, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, v.410, p.237-243, 1998.
- CLAXTON, L.D.; WOODALL, G.M. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. **Mutation Research**, v.636, p.36–94, 2007.
- COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principle, applications and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p.249-261, 2004.
- COTELLE, S.; FÉRARD, J.F. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, p.246-255, 1999.
- DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biol Toxicol**, v.25, p.5–32, 2009.
- ECKL, P.M. Aquatic genotoxicity testing with rat hepatocytes in primary culture. II. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations. **The Science of the Total Environment**, v.59, p.81-89, 1995.
- ERGENE, S.; ÇELİK, A.; ÇAVAŞ, T.; KAYA, F. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. **Environment International**, v.33, p. 877–885, 2007.

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

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

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

FRENZILLI, G.; BOSCO, E.; BARALE, R. Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. **Mutation Research**, v.468, p. 93–108, 2000.

GÁBELOVÁ, A.; VALOVIČOVÁ, Z.; HORVÁTHOVÁ, E.; SLAMEŇOVÁ, D.; BINKOVÁ, B.; ŠRÁMB, R.J.; FARMER, P.B. Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Košice and Sofia. **Mutation Research**, v.563, p.49–59, 2004.

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

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

IERACE, K.; DYE, F. Monitoring Stream Water Quality with Mouse Cell Culture and On-Site *Allium* Tests. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, v.66, p.470–475, 2001.

KONG, Z.M.; ZANG, Y.; WU, Q.L. Monitoring the genotoxicity of Lake Taihu, using two kinds of micronucleus tests. **Environmental Pollution**, v.99, p.279 283, 1998.

KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, K. The comet assay for detection of potencial genotoxicity of polluted water. **Folia Biologica**, v.45, p.153-156, 1997.

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

LEMOS, C.T.; ERDTMANN, B. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. **Mutation Research**, v.467, p.1–9, 2000.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p.293-303, 2001.

LIU, J.-R.; PANG, Y.-X.; TANG, X.-L.; DONG, H.-W.; CHEN, B.-Q.; SUN, C.-H. Genotoxic activity of organic contamination of the Songhua River in the north-eastern region of the People's Republic of China. **Mutation Research**, v.634, p.81–92, 2007.

LIU, J.-R.; DONG, H.-W.; TANG, X.-L.; SUN, X.-R.; HAN, X.-H.; CHEN, B.-Q.; SUN, C.-H.; YANG, B.-F. Genotoxicity of water from the Songhua River, China, in 1994–1995 and

2002–2003: Potential risks for human health. **Environmental Pollution**, v.157, p.357–364, 2009.

LU, W.Q.; CHEN, X.N.; YUE, F.; JENTER, C.; GMINSK, R.; LI, X.Y.; XIE, H.; Mersch-Sundermann, V. Studies on the in vivo and in vitro mutagenicity and the lipid peroxidation of chlorinated surface (drinking) water in rats and metabolically competent human cells. **Mutation Research**, v.513, p.151–157, 2002.

LU, W.-Q.; CHEN, D.; WU, X.-J.; LIU, A.-L.; LIU, H.; MERSCH-SUNDERMANN, V. DNA damage caused by extracts of chlorinated drinking water in human derived liver cells (HepG2). **Toxicology**, v.198, p.351–357, 2004.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALLAGUTI, M.I.; MARIN-MORALES, M.A. Investigation of the genotoxic potencial of the waters of a river receiving tannery effluents by means of the in vitro comet assay. **Cytologia**, v.68(4), p.395–401, 2003.

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

OLIVEIRA, R.J.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, A.F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of  $\beta$ -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, v.20, p.1225–1233, 2006.

OHE, T.; ITO, H.; KAWABUTI, M. Genotoxicity of blue rayon extracts from river waters using sister chromatid exchange in cultured mammalian cells. **Arch Environ Contam Toxicol**, v.25(3), p.293–297, 1993.

OHE, T.; SUZUKI, A.; WATANABE, T.; HASEI, T.; NUKAYA, H.; TOTSUKA, Y.; WAKABAYASHI, K. Induction of SCEs in CHL cells by dichlorobiphenyl derivative water pollutants, 2-phenylbenzotriazole (PBTA) congeners and river water concentrates. **Mutation Research**, v.678, p.38–42, 2009.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.123, p.291–298, 1984.

PARK, S.Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environment International**, v.33, p.817–822, 2007.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v.418, p.113–119, 1998.

RAO, S.S.; QUINN, B.A.; BURNISSON, B.K.; HAYES, M.A.; METCALFE, C.D. Assessment of the genotoxic potencial of pulp mill effluent using bacterial, fish and mammalian assays. **Chemosphere**, v.31, n.6, p.3553–3566, 1995.

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

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

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHEIDER, E.L. A simple technique for quantification of levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

SHI, Y.; CAO, X.-W.; TANG, F.; DU, H.-R.; WANG, Y.-Z.; QIU, X.-Q.; YU, H.-P.; LU, B. In vitro toxicity of surface water disinfected by different sequential treatments. **Water Research**, v.3, p.218–228, 2009.

SOUID-MENSI, A.; MOUKHA, S.; MAAROUFI, K.; CREPPY, E.E. Combined Cytotoxicity and Genotoxicity of a Marine Toxin and Seafood Contaminant Metal Ions (Chromium and Cadmium). **Environ Toxicol**, v.23, p.1–8, 2008.

SPEIT, G.; HAUPTER, S.; HARTMANN, A. Evaluation of the genotoxic properties of paraquat in V79 Chinese hamster cells. **Mutation Research**, v.412, p.187-193, 1998.

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.

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

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, V.79, P.201–204, 2006.

VEGA, M.M.; FERNÁNDEZ, C.; BLÁZQUEZ, T.; TARAZONA, J.V.; CASTAÑO, A. Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama River, Madrid, Spain. **Environmental pollution**, v.93 (2), p.135-139, 1996.

YUAN, J.; WU, X.-J.; LU, W.-Q.; CHENG, X.-L.; CHEN, D.; LI, X.-Y.; LIU, A.-L.; WU, J.-J.; XIE, H.; STHAL, T.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Chlorinated river and lake water extract caused oxidative damage, DNA migration and cytotoxicity in human cells. **Int. J. Hyg. Environ.-Health**, v.208, p.481–488, 2005.

WISE, S.S.; SHAFFIEY, F.; LACERTE, C.; GOERTZ, C.E.C.; DUNN, J.L.; GULLAND, F.M.D.; ABOUEISSA, A.M.; ZHENG, T.; WISE, J.P. Particulate and soluble hexavalent chromium are cytotoxic and genotoxic to Steller sea lion lung cells. **Aquatic Toxicology**, v.91, p.329–335, 2009.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, v.410, p.223-236.

ŽEGURA, B.; HEATH, E.; ČERNOŠA, A.; FILIPIČ, M. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, v.75, p.1453–1460, 2009.

**Avaliação da toxicidade das águas do ribeirão Tatu, região de Limeira/SP,  
por meio do sistema-teste *Allium cepa***

Bárbara Cassu Manzano<sup>1</sup>, Amauri Antônio Menegário<sup>2</sup>,  
Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup>Centro de Estudos Ambientais (CEA), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Autor correspondente: Tel.:(19) 3526-4143. Fax: (19) 3526-4136. E-mail: [mamm@rc.unesp.br](mailto:mamm@rc.unesp.br)

**Resumo**

O teste de aberrações cromossômicas (ACs) realizado com *Allium cepa* constitui um ensaio muito sensível e confiável para o biomonitoramento de recursos hídricos. O ribeirão Tatu é um importante recurso hídrico da cidade de Limeira/SP, Brasil, no entanto, recebe severas agressões, pelo despejo de efluentes domésticos sem tratamento, efluentes industriais e lixiviados da agricultura, o que vem comprometendo, substancialmente, a qualidade de suas águas. Este trabalho teve como objetivo avaliar os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas deste ribeirão, ao longo de todo o seu curso, por meio do teste de ACs e do micronúcleo (MN) em células meristemáticas e células F<sub>1</sub> da raiz de *A. cepa*. Foram realizadas coletas sazonais em cinco diferentes pontos do ribeirão, entre os anos de 2008 e 2009. Os dados referentes às análises físico-químicas e aos bioensaios realizados com as amostras de água mostram que os períodos de seca são os mais críticos, pois exibiram os maiores índices de contaminação química e levaram às respostas mais severas de indução de ACs e de MNs no organismo teste utilizado.

**Palavras-chave:** Aberrações cromossômicas, micronúcleo, células F<sub>1</sub>, células meristemáticas, genotoxicidade e mutagenicidade.



## 1. Introdução

O crescimento populacional nos centros urbanos tem gerado, ao longo dos anos, grandes impactos aos ecossistemas, em especial ao aquático, devido, principalmente, aos descartes de efluentes domésticos e industriais e à interferência de atividades agrícolas.

Efluentes domésticos e industriais, tratados de forma inadequada ou não tratados, contêm perigosos compostos químicos que podem induzir efeitos citotóxicos e genotóxicos à biota exposta (CLAXTON et al., 1998; RANK; NIELSEN, 1998). Tais efluentes contêm misturas complexas, formadas pela associação de agentes como pesticidas, metais, diferentes resíduos industriais, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), aminas heterocíclicas e uma variedade de outras substâncias (VEGA et al., 1996; DEARFIELD et al., 2002; OHE et al., 2004) que, em muitos casos, podem não levar a efeitos imediatos nos organismos expostos, mas, a longo prazo, podem diminuir a sobrevivência dos mesmos (WHITE; RASMUSSEN, 1998).

A grande preocupação com a qualidade dos recursos hídricos tem levado os pesquisadores a desenvolverem metodologias capazes de avaliar as reações dos organismos frente à poluição ambiental. Para os estudos de monitoramento da qualidade da água, os métodos *in vitro* apresentam vantagens, em relação aos *in vivo*, pela possibilidade de se limitar o número de variáveis experimentais; facilidade de obtenção de dados relevantes; e curto período necessário para o desenvolvimento dos testes, quando comparados com outras técnicas rotineiramente usadas (ROGERO et al., 2003).

O teste de aberrações cromossômicas (ACs) em *A. cepa* vem sendo mundialmente empregado em estudos de genotoxicidade ambiental (GRANT, 1994; RANK; NIELSEN, 1994). Por ser um teste muito sensível, de desenvolvimento rápido e confiável, tem sido usado, com sucesso, em monitoramento de recursos hídricos (MATSUMOTO et al., 2006; EGITO et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008; GANA et al., 2009; HOSHINA et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; RADIC' et al., 2010).

Este trabalho teve como objetivos avaliar, por meio do teste de ACs e do MN em células meristemáticas e F<sub>1</sub> de raízes de *A. cepa*, os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do ribeirão Tatu, região de Limeira/SP, que vem sendo, continuamente, impactadas por efluentes domésticos sem tratamento, efluentes industriais e lixiviados da agricultura.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Localização e caracterização da área de estudo

A bacia do ribeirão Tatu, um dos principais cursos d'água da cidade de Limeira/SP, Brasil (a 150 km de São Paulo), atravessa grande parte da área urbana do município. Nasce na zona rural do município de Cordeirópolis/SP e deságua no Rio Piracicaba (figura 1). Segundo a Resolução CONAMA 357/2005, o ribeirão é considerado, na área urbana, um rio de classe 4, ou seja, suas águas são destinadas apenas à navegação, à harmonia paisagística e aos usos menos exigentes (CETESB, 2009). Possui inúmeros problemas como o lançamento de efluentes domésticos e industriais sem tratamento, impacto por produtos agrícolas e ausência, quase total, de matas ciliares (MARRARA, 2008). Recebe 82% da carga poluidora de origem doméstica de Cordeirópolis, *in natura*, ou seja, sem tratamento, e 72% do esgoto doméstico de Limeira, sendo que somente 56% do total de esgoto coletado na cidade é tratado (CETESB, 2009).

### 2.2. Coleta das amostras de água

Foram coletadas amostras de água em cinco diferentes pontos do ribeirão Tatu, em três épocas distintas: novembro de 2008 (período quente e seco), fevereiro de 2009 (período quente e chuvoso) e agosto de 2009 (período frio e seco). Os locais de coleta foram: P1 – nascente do rio (23 K 247922 m E e 7511007 m N); P2 – após passar pelo perímetro urbano do município de Cordeirópolis e receber a carga de tributários domésticos da cidade (K 247922 m E e 7511007 m N); P3 – à montante do perímetro urbano da cidade de Limeira (23 K 251367 m E e 7507063 m N); P4 – dentro da zona urbana de Limeira (K 254682 m E e 7500823 m N); e P5 – após receber efluentes domésticos e industriais da cidade de Limeira, e situado na zona rural da cidade, a cerca de 2.630 m à montante do deságüe no Rio Piracicaba (23 K 258237 m E e 7492132 m N).

Para a realização dos ensaios, foram coletados, aproximadamente, dois litros de água de cada ponto de coleta, que foram transportados, imediatamente, para o Laboratório de Mutagênese da UNESP – Campus de Rio Claro, onde permaneceram sob refrigeração (4° C), até sua utilização nas análises.

Os dados meteorológicos da área de estudo foram fornecidos pelo Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Limnologia da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP – Campus de Limeira (tabela 1).

### 2.3. Material biológico

Neste trabalho, foram utilizadas sementes de *A. cepa*, variedade Baia piriforme, da mesma marca (Topseed®) e lote, a fim de evitar respostas diferentes nas diversas fases do estudo.

#### 2.4. Análise físico-química das amostras de água

A análise físico-química das amostras de água coletadas nos diferentes pontos do ribeirão foi realizada no Laboratório de Química e no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos Ambientais (CEA), da UNESP, Campus de Rio Claro. Foram avaliados os seguintes parâmetros: temperatura, condutividade, pH, cor aparente, turbidez, salinidade, STD (sólidos totais dissolvidos), OD (oxigênio dissolvido), amônia, nitrito, nitrato, fósforo total, DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e os metais alumínio, cádmio, chumbo, cobre, cromo, níquel e zinco.

#### 2.5. Teste de ACs e do MN em células meristemáticas e $F_1$ de *A. cepa*

Para a aplicação dos testes de ACs e do MN em células meristemáticas de raiz de cebola, foi adotado o protocolo descrito por Grant (1982), com algumas modificações padronizadas pelo Laboratório de Mutagênese da UNESP Campus de Rio Claro. Sementes de *A. cepa* foram colocadas para germinar em placas de Petri forradas com papel filtro, contendo, em cada placa, amostra de água coletada em um dos pontos (1 a 5). O controle negativo (CN) foi processado em água ultrapura e o controle positivo (CP) em metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3), na concentração de 10 mg/L. Quando as radículas atingiram cerca de dois centímetros de comprimento, foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1. Após a fixação, as raízes foram submetidas à Reação de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978), para coloração e seqüente confecção das lâminas. Os meristemas foram suavemente esmagados, em lâmina, em uma gota de carmim acético (2%), e recobertos com lamínula, que foram retiradas em nitrogênio líquido. As lâminas foram montadas, permanentemente, com resina sintética. Foram confeccionadas 10 lâminas para cada experimento, sendo contadas, aproximadamente, 500 células de cada lâmina, totalizando 5000 contagens por amostra de água. Nesta análise, foram contabilizadas as células portadoras de ACs (metáfases com aderências e perdas cromossômicas, anáfases com pontes, quebras e perdas cromossômicas e telófases com pontes, quebras e perdas cromossômicas) e de MN, em cada um dos testes realizados. A observação e a fotodocumentação foi feita em microscopia de luz, em aumento de 400 vezes.

Para o teste do MN em células F<sub>1</sub>, foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima, porém o material analisado foi a região F<sub>1</sub>, que se localiza 1 milímetro acima da região meristemática. A contagem de MNs também seguiu o descrito para as lâminas de células meristemáticas.

## 2.6. Indução de efeitos citotóxicos

Os efeitos citotóxicos foram determinados pelas análises do índice mitótico (IM), de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{I.M. (Índice Mitótico)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em divisão}}{\text{n}^\circ \text{ total de células observadas}} \times 100$$

## 2.7. Indução de efeitos genotóxicos

Para a análise da genotoxicidade, foram considerados os diferentes tipos de ACs (perdas, quebras, aderências e pontes cromossômicas) nas diferentes fases de divisão mitótica das células meristemáticas de *A. cepa*.

## 2.8. Indução de efeitos mutagênicos

A análise dos efeitos mutagênicos foi feita por meio da observação e contagem de células micronucleadas, da região meristemática e da região F<sub>1</sub>, das raízes de *A. cepa*.

## 2.9. Análises estatísticas

Após a obtenção dos resultados de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, foi realizada a análise estatística, pelo teste de Mann-Whitney, com  $p < 0,05$ , para verificar o nível de significância.

# 3. Resultados

Os resultados obtidos nas análises dos parâmetros físico-químicos realizadas nas amostras de água coletadas ao longo do ribeirão Tatu, nos três períodos descritos, estão reunidos na tabela 2.

Com exceção do P1, todos os pontos de coleta apresentaram altos índices de contaminação, evidenciados pelos resultados dos parâmetros físico-químicos, sendo que os maiores índices foram registrados para o P2 e P5.

Os resultados do IM, AC e MN, dos testes realizados em células meristemáticas e F<sub>1</sub> da raiz de *A. cepa*, estão apresentados na tabela 3 e nas figuras 2 a 10.

Não foi verificada nenhuma célula em processo de morte celular, tanto nos testes com as amostras de água como nos testes controle.

Verificou-se que houve uma diferença significativa entre os IMs das células submetidas a todas as amostras de águas coletadas em novembro de 2008 e o CN. As águas coletadas no P1 e P2 induziram um aumento do IM, enquanto que o P3, P4 e P5, levaram a uma diminuição desse índice, quando comparados ao CN (tabela 3, figura 2). Na coleta realizada em fevereiro, somente a amostra de água do P2 induziu um aumento significativo no IM (tabela 3, figura 5). Na coleta de agosto de 2009, verificou-se uma diminuição significativa do IM para o P2 e um aumento para o P4 (tabela 3, figura 8).

As amostras de águas coletadas em novembro de 2008 induziram um aumento significativo no índice de AC para o P4 e P5, quando comparados ao CN (tabela 3, figura 3). As amostras coletadas em fevereiro de 2009 e agosto de 2009 não apresentaram efeitos genotóxicos significativos, em relação aos resultados do teste CN (tabela 3, figuras 6 e 9). As ACs encontradas com maior frequência nesse estudo foram: metáfase com aderência, anáfases com quebra e com ponte (figura 11).

As células  $F_1$  são derivadas de divisões mitóticas de células meristemáticas (MA et al., 1995). Os MNs observados na região  $F_1$  (figura 11) são decorrentes de perdas de cromossomos inteiros e/ou de quebras cromossômicas que ocorreram nas células meristemáticas e que não foram incorporados a nenhum dos núcleos das células filhas, durante o processo de divisão.

Na tabela 3 também estão apresentados os resultados obtidos nas análises de efeitos mutagênicos realizadas em células meristemáticas e da região  $F_1$ . Foi observada uma diferença significativa da presença de MNs em células meristemáticas para o P3, e em células  $F_1$  para os P2, P4 e P5, na coleta de novembro de 2008 (figura 4). Para a coleta de agosto de 2009, foi observada diferença significativa de MNs em células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com águas coletadas nos P2, P3 e P5 e para as amostras do P2 e P4 testadas nas células  $F_1$  (figura 10). Não foram observadas diferenças significativas para indução de MNs em células meristemáticas e  $F_1$  submetidas às amostras de água coletadas no mês de fevereiro de 2009 (figura 7).

#### 4. Discussões

As análises físico-químicas, realizadas com as águas do ribeirão, indicaram que, no período definido como quente/seco (novembro de 2008), ocorreram altos índices de condutividade, STD, amônia, DBO, alumínio e zinco. O menor índice pluviométrico também

foi registrado em novembro de 2008 (32,2 mm), sugerindo uma maior concentração dos poluentes provenientes, principalmente, do descarte de esgotos domésticos sem tratamento e de efluentes industriais feitos neste recurso hídrico. Christofolletti (2008) obteve resultados semelhantes, em relação a esses parâmetros, ao estudar um ecossistema lântico da região (Lago Azul, Rio Claro/SP), confirmando que o índice pluviométrico influencia na disponibilidade e concentração de poluentes na água.

A baixa concentração de OD verificada nas amostras de água confirma a alta contaminação do ribeirão e a degradação que ele vem sofrendo, em quase todo o seu curso.

Nos últimos anos, vem aumentando as emissões de metais prejudiciais ao ambiente, em decorrência do aumento de atividades industriais e agrícolas. Estas substâncias apresentam uma potencialidade mutagênica e/ou carcinogênica tanto para o homem como para animais experimentais (EGITO et al., 2007).

As plantas são consideradas ferramentas úteis na investigação da toxicidade e genotoxicidade de metais (FISKESJÖ, 1988; STEINKELLNER et al., 1998; EVSEEVA et al., 2003; CHANDRA et al., 2005; MATSUMOTO et al., 2006; ÜNYAYAR et al., 2006; YILDIZ et al., 2009). Diversos estudos têm mostrado que os efeitos genotóxicos dos metais podem se manifestar como distúrbios no fuso mitótico e alterações na estrutura e no número cromossômico (FISKEJÖ, 1983). Os metais são conhecidos por induzir quebras e fragmentos cromossômicos e micronúcleos tanto em plantas (MATSUMOTO et al., 2006, KNASMÜLLER et al., 1998) como em mamíferos (KNASMÜLLER et al., 1998).

De acordo com Pejchar et al. (2008), o alumínio é altamente citotóxico para as plantas, inibindo a polimerização dos microtúbulos, podendo agir diretamente no citoesqueleto da célula e interferir no crescimento das raízes das plantas (VOUTSINAS et al., 1997; DOVGALUYK et al., 2003). Segundo Fiskesjö (1983; 1988), a genotoxicidade do alumínio se deve à fragmentação nuclear e à aderência cromossômica.

Os metais podem alcançar os ambientes aquáticos por meio de efluentes domésticos, agrícolas e industriais, e também em decorrência de processos naturais de lixiviação dos próprios constituintes do solo (CARITÁ, 2010). Como o P1, ponto localizado na nascente e que não sofre os impactos provocados pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais, apresentou um índice de alumínio bastante baixo, em comparação com os outros pontos, sugere-se que a ocorrência desses altos índices nas amostras de águas coletadas nos outros pontos, principalmente no P2 (0,43638 mg/L em novembro de 2008 e 0,72368 mg/L em fevereiro de 2009), decorre dos efluentes descartados nesse recurso hídrico.

A amostra de água coletada no P5, em novembro de 2008, apresentou índices altos para todos os metais avaliados, com exceção do cádmio. Devido a sua estabilidade e persistência, a presença destes contaminantes na água constitui uma séria ameaça para a saúde dos organismos expostos (BARBOSA et al., 2010).

De acordo com Radić et al. (2010), estudos combinados de análises físico-químicas com métodos citogenéticos são úteis para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dos químicos poluentes, sendo eficientes no monitoramento da qualidade de águas superficiais.

Alterações no IM podem indicar a presença de agentes com ação citotóxica, sendo um parâmetro confiável para a avaliação da citotoxicidade de amostras ambientais e, portanto, aplicáveis em monitoramento ambiental (FERNANDES et al., 2007). Segundo Hoshina (2002), IMs menores que o CN podem indicar alterações decorrentes da ação de um dado agente sobre o crescimento e desenvolvimento dos organismos expostos, enquanto que IMs superiores aos observados no CN são decorrentes de um aumento na divisão celular, que pode levar a uma proliferação desordenada de células e até mesmo à formação de tecidos tumorais. Portanto, tanto a redução como o aumento do IM são indicadores importantes a serem considerados nas avaliações de contaminação ambiental.

Segundo Smaka-Kincl et al. (1996), a diminuição do IM em células meristemáticas de *A. cepa* é um parâmetro rápido e confiável para a identificação e monitoramento dos níveis de substâncias com efeitos citotóxicos, na água de rios.

A água coletada no P1 (nascente do ribeirão), em novembro de 2008, apresentou o maior IM para essa coleta (44,12%). Apesar das análises físico-químicas sugerirem uma boa qualidade da água neste ponto (ausência de poluição orgânica), como mostrado pelo baixo índice de DBO (4,9 mg/L de O<sub>2</sub>) e elevado índice de OD (6,53 mg/L), este ponto pode ter sofrido a influência do escoamento de agrotóxicos aplicados nas culturas de cana-de-açúcar que margeiam a nascente.

As amostras de água do P2, coletadas nos três períodos de estudo, induziram alterações significativas no IM, em relação ao CN. Este índice foi maior em novembro de 2008 e em fevereiro de 2009 e menor em agosto de 2009. Este ponto localiza-se à jusante do lançamento de esgoto doméstico, *in natura*, da cidade de Cordeirópolis. Compostos presentes nestes efluentes podem ter interferido no ciclo de divisão celular e, assim, causado esse tipo de alteração. O mesmo pode ter acontecido com o P3, P4 e P5 para a coleta de novembro de 2008 e P4 para a coleta de agosto de 2009.

As ACs são alterações caracterizadas por uma mudança na estrutura ou no número normal de cromossomos de uma espécie, podendo ocorrer de maneira espontânea ou ainda como resultado da exposição a agentes químicos ou físicos (RUSSEL, 2002).

Verificou-se, pelos testes de ACs e MN em *A. cepa*, que todas as amostras coletadas em fevereiro de 2009 não apresentaram nem efeitos genotóxicos nem mutagênicos, confirmando a alta diluição dos poluentes, em decorrência da alta pluviosidade do período, conforme exposto para as análises físico-químicas. As águas das coletas de novembro de 2008 foram consideradas genotóxicas, para o P4 (área urbana da cidade de Limeira) e P5 (montante da área urbana de Limeira e região rural, com atividade agrícola). Como este período foi caracterizado por uma baixa pluviosidade, novamente pode-se relacionar a vazão do rio com o seu comprometimento tóxico, reforçando que uma maior concentração dos poluentes induz alterações significativas nos organismos eventualmente expostos, corroborando as citações de Christofolletti (2008).

As amostras coletadas em agosto de 2009 não induziram ACs, mesmo apresentando baixa qualidade como verificado pelas análises físico-químicas. Junior et al. (2007) e Barbosa et al. (2010) ao estudarem um córrego e um lago, respectivamente, verificaram que apesar destes recursos hídricos apresentarem contaminação principalmente por efluentes domésticos e industriais e por metais, as suas águas não induziram danos genotóxicos e mutagênicos significativos em células de *A. cepa*. Porém, os autores registraram efeitos tóxicos e citotóxicos significativos, como alterações no comprimento das raízes expostas às águas e aos sedimentos e diminuição do IM, que eles sugerem ser decorrentes das altas concentrações de metais.

Segundo Caritá (2010), a análise das frequências totais de ACs, indica a genotoxicidade dos compostos presentes nas amostras de água, mas não se seus efeitos são clastogênicos ou aneugênicos. Porém, a análise isolada de cada tipo de alteração induzida pode indicar os mecanismos de ação de um dado contaminante sobre o material genético da célula.

As aderências cromossômicas são sinais típicos da ação tóxica sobre o material genético, que podem causar efeitos irreversíveis para as células, inclusive a sua morte (FISKESJÖ e LEVAN, 1993; MARCANO e DEL CAMPO, 1995; MARCANO et al., 1999; TÜRKOGLU, 2007; FERNANDES et al., 2009). Segundo Marcano et al. (2004), a aderência cromossômica pode estar envolvida na formação de pontes cromossômicas e, posteriormente, em quebras cromossômicas. Portanto, as pontes anafásicas, ou seja, pontes cromatídicas entre



as porções cromossômicas que estão se separando, quando se quebram, podem resultar em perdas de material genético (LUO, 2004).

Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com aqueles relatados por Leme e Marin-Morales (2008) e Mazzeo (2009), onde as autoras, ao estudarem a ação de hidrocarbonetos de petróleo sobre o material genético de *A. cepa*, verificaram que a alta frequência de anáfases com pontes e quebras cromossômicas pode ser resultante de metáfases com aderência.

Segundo Yi e Meng (2003) a presença de fragmentos cromossômicos, derivados de quebras cromossômicas, indica uma ação clastogênica induzida por um químico. Assim, a alta frequência de quebras encontradas nas células meristemáticas de *A. cepa* submetidas às amostras de água coletadas no P4 e P5, em novembro de 2008, nos dão uma indicação da possível presença de compostos que induzem efeitos clastogênicos no material genético dos organismos expostos.

As análises do potencial mutagênico foram realizadas por meio da contabilização de MN em células meristemáticas e células F<sub>1</sub> de raiz de *A. cepa*, submetidas à germinação em amostras de água coletadas nos cinco pontos do ribeirão Tatu (figura 11).

Não houve resposta mutagênica significativa para as amostras de água coletadas no período de alta pluviosidade (fevereiro de 2009). Porém, foram verificados MNs nas células submetidas às amostras de água coletadas no P3, em novembro de 2008, e no P2, P3 e P5, em agosto de 2009, coincidentemente períodos estes de menor índice pluviométrico. Este resultado pode ser justificado, como já exposto para os outros parâmetros acima citados (análises físico-química e ACs), pela alta contaminação do rio, em decorrência do descarte de efluentes domésticos e industriais e pelo baixo volume deste corpo d'água nas estações secas (baixa pluviosidade). Estes fatores podem agravar a qualidade das águas deste rio, pela alta concentração dos poluentes, tornando-o, nestes períodos, mais impróprio à vida. Caritá (2010), ao estudar rios que recebem efluentes domésticos e industriais de um pólo ceramista no Estado de São Paulo, também verificou maiores induções de MN e ACs em *A. cepa* nas coletas realizadas nos meses de menor índice de chuva (agosto e novembro). Amostras de água coletadas no rio Pitimbu, Rio Grande do Norte/Brasil, em um ponto próximo a uma área industrial, apresentou danos genotóxicos e mutagênicos significativos em relação ao controle. Este rio, como o deste estudo, recebe efluentes urbanos e industriais e drenagem agrícola, fatores que contribuem para o seu potencial em induzir alterações genéticas (EGITO et al., 2007)

As ACs verificadas nas células meristemáticas de *A. cepa*, submetidas às amostras de água coletadas no P4 e P5, em novembro de 2008, mostram uma correlação com as frequências de MNs encontradas nas células F<sub>1</sub> correspondentes. Estes dados indicaram que algumas células meristemáticas portadoras de ACs, provavelmente, progrediram para células F<sub>1</sub> micronucleadas. Esses dados são coincidentes com as descrições de Leme e Marin-Morales (2008), onde as autoras mostram uma relação direta entre a indução de ACs em células meristemáticas com presença de MN em células F<sub>1</sub>, quando avaliaram o potencial genotóxico e mutagênico de um rio impactado por vazamento de petróleo.

Comparando-se a frequência de células portadoras de MNs, podemos notar que algumas amostras de água induziram MNs nas células meristemáticas e não nas células F<sub>1</sub> (P3 para a coleta de novembro de 2008 e P3 e P5 para a coleta de agosto de 2009). A presença de MNs na região meristemática e não na F<sub>1</sub> pode indicar que os danos induzidos nas células meristemáticas não foram transferidos e fixados nas células F<sub>1</sub>, conforme descrito por Bianchi (2008) e Mazzeo (2009). Esta baixa frequência de células F<sub>1</sub> micronucleadas, em relação às meristemáticas micronucleadas correspondentes, pode ser decorrente da inabilidade de divisão das células portadoras de MN. Segundo Ma et al. (1995), células com MNs podem apresentar uma diminuição do IM pela incapacidade de se dividirem, o que poderia levar a uma menor quantidade de células micronucleadas na região F<sub>1</sub>.

Células portadoras de MNs podem indicar a presença de substâncias clastogênicas e/ou aneugênicas na água do ribeirão. Por serem misturas complexas, essas amostras podem ter tanto químicos de ação clastogênica como aneugênica.

## 6. Conclusão

O estudo de amostras ambientais, como, por exemplo, água de rio, é um trabalho complexo, visto que nessas amostras ocorre a interação de vários fatores, como diluição ou concentração de contaminantes, alteração de pH e de temperatura, despejos pontuais de efluentes e escoamentos da agricultura, fatores estes que podem interferir nas respostas dos organismos expostos. Mesmo assim, pelos resultados encontrados nesse trabalho, pode-se inferir que as águas do ribeirão Tatu, impactado por despejos de efluentes domésticos, industriais e agrícolas, apresentam potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico para os organismos a elas expostos, como verificado nos testes realizados com *A. cepa*.

Com relação à sazonalidade, verificou-se que os períodos de cheia, aqui representados pelo mês de fevereiro, são menos impactantes à biota do ribeirão, uma vez que

a maior vazão pode diluir os contaminantes e, assim, diminuir o seu potencial tóxico. Por outro lado, os períodos de seca, representados pelos meses de agosto (seco/frio) e novembro (seco/quente), são os mais críticos, em relação à dinâmica dos poluentes, já que o menor volume de chuva pode levar a uma maior concentração dos poluentes, com correspondentes efeitos sobre a biota exposta.

O sistema-teste *A. cepa* se mostrou sensível para as avaliações dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do ribeirão Tatu, representando um organismo teste eficiente para detectar contaminações por efluentes domésticos, industriais e agrícolas.

## 7. Agradecimento

As autoras agradecem à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido para a realização desta pesquisa.

## 8. Referências Bibliográficas

BARBOSA, J.S.; CABRAL, T.M.; FERREIRA, D.N.; AGNEZ-LIMA, L.F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S.R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.320-325, 2010

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

CARITÁ, R. 2010. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de água de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes-SP**. 2010, 187f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v.72 (5), p.722-725, 2008.

CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo – 2008. **Cetesb**. São Paulo: Cetesb, 2009.

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

CHRISTOFOLETTI, C.A. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. 2008. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP

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

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v.521, p.121-135, 2002.

DOVGALYUK, A.; KALYNYAK, T.; BLUME, Ya.B. Heavy metals have a different action from aluminium in disrupting microtubules in *Allium cepa* meristematic cells. **Cell Biology International**, v.27, p.193-195, 2003.

EGITO, L.C.M.; MEDEIROS, M.G.; MEDEIROS, S.R.B.; AGNEZ-LIMA, L.F. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.2, p.435-441, 2007.

EVSEEVA, T.I.; GERASKIN, S.A.; SHUTOMOVA, I.I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, v.68, p.235-248, 2003.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, n.3, p.252-259, 2007.

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

FISKESJÖ, G. Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium*. **Physiologia Plantarum**, v.59, p.508-511, 1983.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test – An alternative in environmental studies – the relative toxicity of metal-ions. **Mutation Research**, v.197, p.243-260, 1988.

GANNA, J.M.; ORDÓÑEZ, R.; ZAMPINI, C.; HIDALGO, M.; MEONI, S.; ISLA, M.I. Industrial effluents and surface waters genotoxicity and mutagenicity evaluation of a river of Tucuman, Argentina. **Journal of Hazardous Materials**, v.155, p.403-406, 2008.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency. Gene-Tox program. **Mutation Research**, v.99 (3), p.273-291, 1982.

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

HOSHINA, M.M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro, município de Rio Claro, pertencente à Bacia do Rio Corumbataí, por meio de testes de**

**mutagenicidade em *Allium cepa*.** 2002. 52 f. Monografia. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

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

JUNIOR, H.M.; SILVA, J.; ARENZON, A.; PORTELA, C.S.; FERREIRA, I.C.F.S.; HENRIQUES, J.A.P. Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. **Chemosphere**, v.67, p.1211-1217, 2007.

KNASMÜLLER, S.; GOTTMANN, E.; STEINKELLNER, H.; FOMIN, A.; PICKL, C.; PASCHKE, A.; GÖD, R.; KUNDI, M. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. **Mutation Research**, v.420, p.37-48, 1998.

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

LUO, L.Z. **Chromosome segregational defects: their origin, fate and contribution to genomic instability.** 2004. Dissertation (Mastering), School of Arts and Sciences, 2004.

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

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; MONTIEL, X.; MORENO, P. Inhibición de la actividad biosintética nucleolar inducidas por el plomo en meristemos radiculares de cebolla (*Allium cepa*). **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia**, v.16, p.476-487, 1999.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, p. 221-226, 2004.

MARRARA, A.C.T. **Avaliação Físico-Química e Ecotoxicológica do Ribeirão Tatu no Município de Limeira-SP.** 2008. 122p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Campinas, SP

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 micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.148-158, 2006.

MAZZEO, D.E.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microorganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero.** 2009. 143f. Dissertação (Mestrado

em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

MELLO, M.L.S; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.30, p. 665-676, 1978.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 357/2005.

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

PEJCHAR, P.; PLESKOT, R.; SCHWARZEROVÁ, K.; MARTINEC, J.; VALENTOVÁ, O.; NOVOTNÁ, Z. Aluminum ions inhibit phospholipase D in a microtubule-dependent manner. **Cell Biology International**, v.32, p.554-556, 2008.

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

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

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

RUSSEL, P.J. Chromosomal mutation. In: CUMMINGS, B. (Org.), **Genetics**. San Francisco: Pearson Education Inc, 2002, p. 595-621.

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

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

TÜRKÖGLÜ, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v.626, p.4-14, 2007.

ÜNYAYAR, S.; ÇELİK, A.C.; ÇEKİÇ, F.Ö; GÖZEL, A. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutagenesis**, v.21, p.77-81, 2006

VEGA, M.M.; FERNÁNDEZ, C.; BLÁZQUEZ, T.; TARAZONA, J.V.; CASTAÑO, A. Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama River, Madrid, Spain. **Environmental pollution**, v.93 (2), p.135-139, 1996.

VOUTSINAS, G. ZARANI, F.E.; KAPPAS, A. The effect of environmental aneuploidy inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. **Cell Biology International**, v.21, n.7, p.411-418, 1997.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, v.410, p.223-236.

YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* e *Vicia faba*. **Mutation Research**, v.537, p.109-114, 2003.

YILDIZ, M.; CİĞERCI, I.H.; KONUK, M.; FIDAN, A.F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v.75, p.934-938, 2009.

**Tabela 1.** Dados meteorológicos referentes aos períodos de coleta das amostras de água no ribeirão Tatu, região de Limeira/SP.

Período de coleta	Temperatura máxima (° C)	Temperatura mínima (° C)	Temperatura média (° C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Precipitação pluviométrica (mm)
Novembro/2008	27,1	13,2	20,2	63	32,2
Fevereiro/2009	30,3	20,8	25,6	68	175,6
Agosto/2009	29,5	18,4	24,0	62	98,6

Nota: os valores foram obtidos por meio do cálculo das médias dos valores diários.

**Tabela 2.** Parâmetros físico-químicos das águas do ribeirão Tatu, região de Limeira/SP, coletadas em agosto de 2008, fevereiro de 2009 e agosto de 2009.

Parâmetros	Amostras														
	Novembro de 2008					Fevereiro de 2009					Agosto de 2009				
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
Temperatura (°C)	23,59	27,32	24,81	24,58	25,82	25,36	26,37	25,94	26,39	26,20	21,13	21,01	21,10	20,90	20,82
Condutividade (µS/cm)	17	977	732	476	1125	17	223	137	212	373	17	692	391	377	517
pH	3,7	7,42	7,34	7,18	7,76	4,59	6,92	6,77	7,23	7,23	4,91	7,08	6,97	6,91	7,17
Cor aparente (units PtCo)	8	2482	477	322	942	2	319	241	162	352	4	944	473	221	556
Turbidez (NTU)	1,6	402,0	37,6	22,8	56,0	1,4	42	21,6	20	29	1,39	110	59	22	51
Salinidade (sal)	0,01	0,48	0,36	0,23	0,56	0,01	0,10	0,06	0,10	0,18	0,01	0,34	0,19	0,18	0,25
STD (mg/L)	11	635	475	309	731	11	145	80	138	244	11	450	254	245	336
OD (mg/L)	6,53	0,82*	2,43	1,04*	1,58*	5,61	1,17*	5,31	4,11	1,38*	8,08	1,40*	2,83	2,20	0,69*
Amônia (mg/L de NH <sub>3</sub> )	0,08	10,76	6,64	2,31	26,60	0,08	2,28	0,60	1,62	4,88	0,08	5,50	3,34	4,72	13,04
Nitrito (mg/L de NO <sub>2</sub> )	0,002	0,082	0,034	0,042	0,075	0,001	0,092	0,292	0,308	0,007	0,000	0,036	0,018	0,004	0,039
Nitrato (mg/L de NO <sub>3</sub> )	0,2	2,8	1,3	0,8	3,30	0,2	0,9	1,1	1,5	0,3	1,9	2,8	2,3	1,9	3,0
Fósforo Total (mg/L)	4,271	1394	1045	171,75	413,9	10,65	602,5	155,4	329,5	789,5					
DBO (mg/L de O <sub>2</sub> )	4,9	266	78	80	176	20,8	238	178	148	210	7,5	90	92	98	120
Alumínio (mg/L)	0,04359	0,43638	0,39898	0,31568	0,23348	<0,013	0,72368	0,24058	0,36448	0,17328	0,09911	0,36568	<0,013	0,06543	0,21568
Cádmio (mg/L)	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Chumbo (mg/L)	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	0,48175	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035
Cobre (mg/L)	<0,006	<0,006	<0,006	0,01105	0,32091	<0,006	<0,006	<0,006	<0,006	0,03236	<0,006	<0,006	<0,006	0,01353	0,11151
Cromo (mg/L)	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	0,03453	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015
Níquel (mg/L)	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	0,01188	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	0,02555	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	0,06890
Zinco (mg/L)	0,02928	0,02392	0,01007	0,04102	0,11009	0,03734	0,01620	0,02689	0,04661	0,05966	0,02681	0,04072	<0,001	0,05532	0,05881

\* Valores inferiores ao exigido para águas doces de classe 4, segundo a RES. CONAMA 357/2005



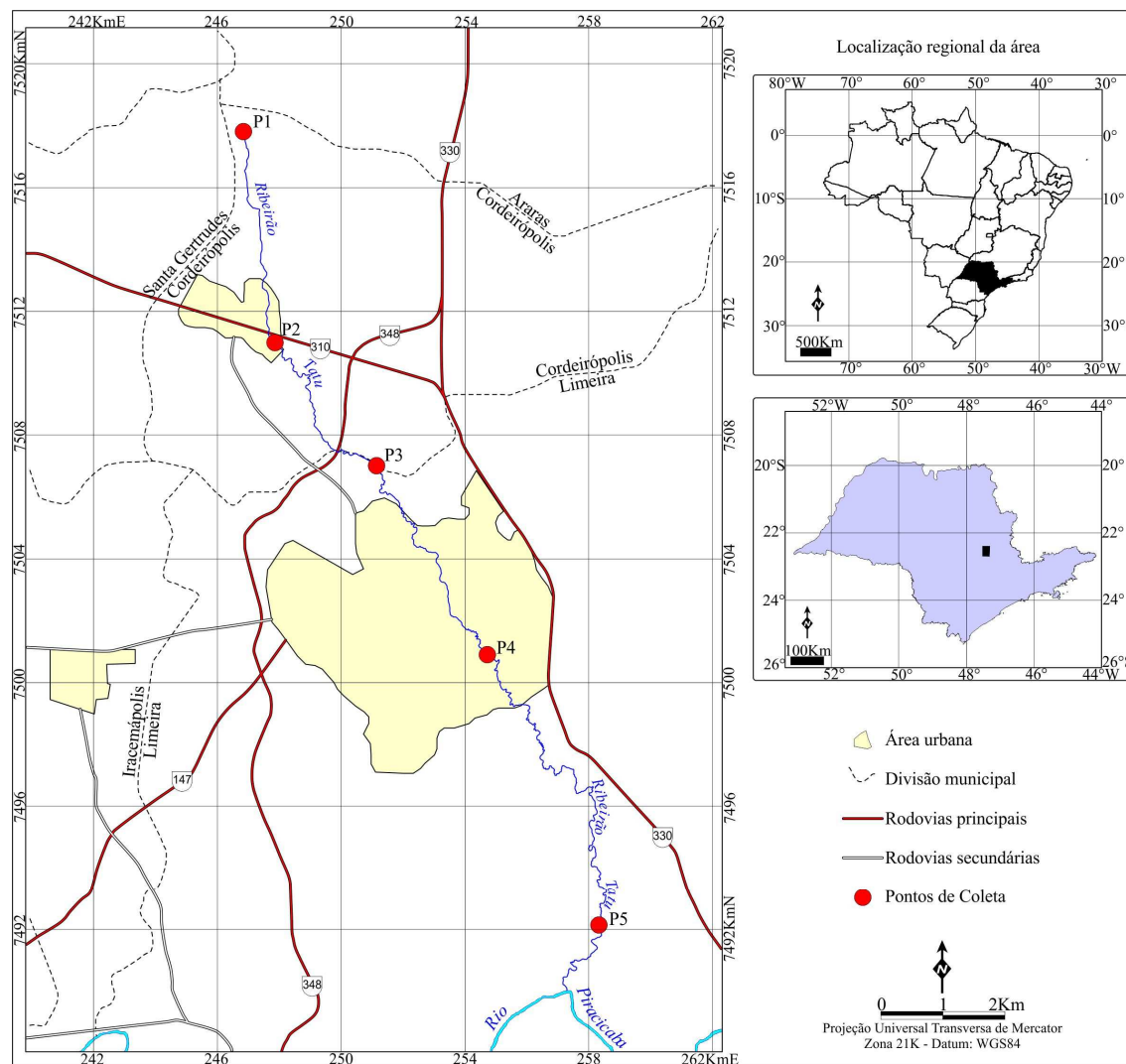
**Tabela 3.** Frequência dos efeitos citotóxicos (IM), genotóxicos (AC) e mutagênicos (MN e MN-F<sub>1</sub>) de células meristemáticas e F<sub>1</sub> de *A. cepa*, submetidas às amostras de água coletadas no ribeirão Tatu, região de Limeira – SP.

Amostras		IM	AC	MN	MN-F <sub>1</sub>
Novembro de 2008	CN	32,65±10,72	0,04±0,08	0,10±0,13	0,04±0,07
	CP	14,79±4,43*	0,33±0,21*	3,27±1,92*	0,88±0,72*
	P1	44,12±11,10*	0,09±0,20	0,16±0,23	0,22±0,35
	P2	43,02±5,64*	0,02±0,06	0,20±0,20	0,16±0,13*
	P3	17,77±6,76*	0,16±0,20	0,27±0,25*	0,02±0,05
	P4	19,97±4,01*	0,21±0,18*	0,18±0,23	0,15±0,12*
	P5	17,67±3,98*	0,16±0,14*	0,05±0,08	0,15±0,12*
Fevereiro de 2009	CN	14,50±3,46	0,04±0,07	0,06±0,09	0,12±0,17
	CP	14,14±4,04	0,33±0,27*	2,45±0,97*	2,33±2,20*
	P1	12,81±3,87	0,06±0,13	0,06±0,10	0,06±0,10
	P2	19,06±6,38*	0,13±0,24	0,13±0,13	0,13±0,13
	P3	14,11±2,68	0,09±0,13	0,04±0,08	0,20±0,30
	P4	15,45±4,11	0,06±0,13	0,02±0,06	0,02±0,06
	P5	12,82±3,77	0,02±0,06	0,10±0,14	0,08±0,14
Agosto de 2009	CN	12,20±4,19	0,06±0,10	0,04±0,08	0,10±0,19
	CP	11,91±3,08	0,66±0,42*	3,52±1,39*	1,63±2,08*
	P1	12,87±3,07	0,02±0,06	0,14±0,19	0,22±0,24
	P2	8,87±4,74*	0,02±0,06	0,49±0,41*	0,37±0,34*
	P3	12,34±3,92	0,04±0,08	0,38±0,36*	0,22±0,24
	P4	15,72±3,63*	0,06±0,14	0,22±0,29	0,28±0,27*
	P5	10,52±2,20	0,10±0,16	0,45±0,42*	0,26±0,34

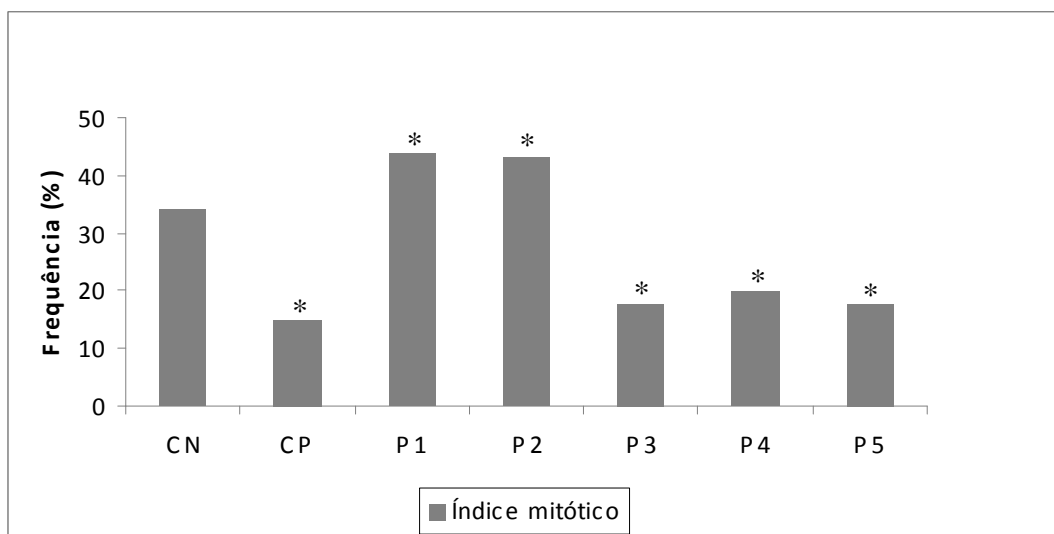
5000 células analisadas por ensaio.

CN: controle negativo; CP: controle positivo; P1: ponto 1; P2: ponto 2; P3: ponto 3; P4: ponto 4; P5: ponto 5.

\*Estatisticamente significativo, quando comparado ao CN (p<0,05) pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

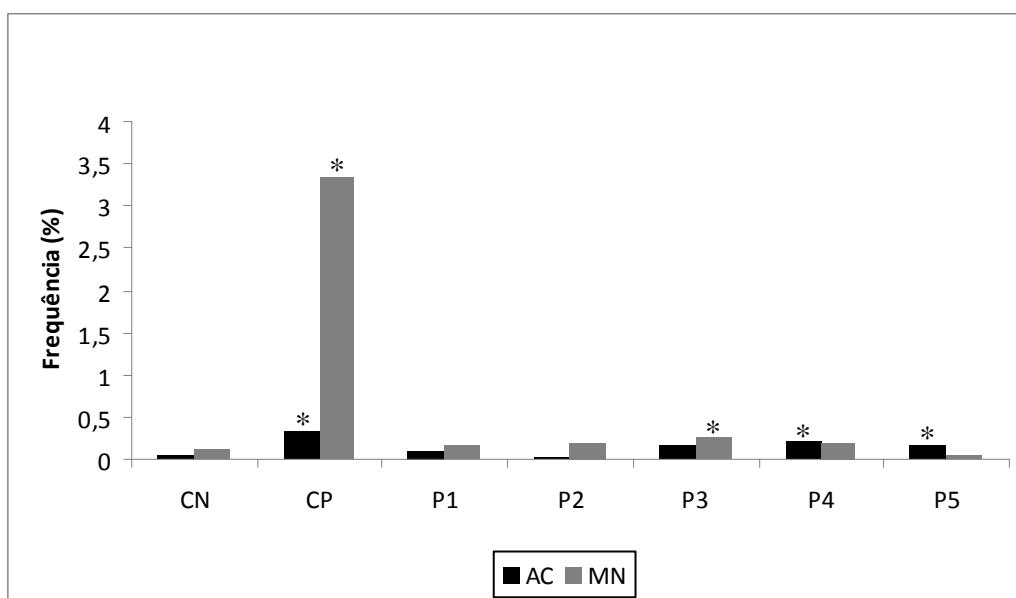


**Figura 1.** Mapa de localização dos municípios de Cordeirópolis e Limeira/SP e dos pontos de coleta ao longo do ribeirão Tatu (P1: ponto 1; P2: ponto 2; P3: ponto 3; P4: ponto 4; P5: ponto 5).



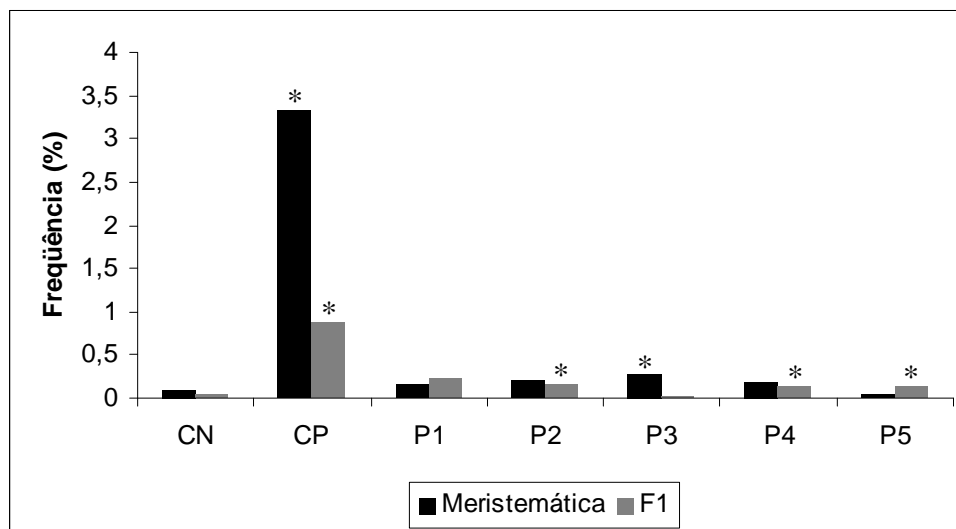
\*Estatisticamente significativo, quando comparado ao CN ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

**Figura 2.** Frequência do índice mitótico em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição às amostras de águas coletadas em novembro de 2008.



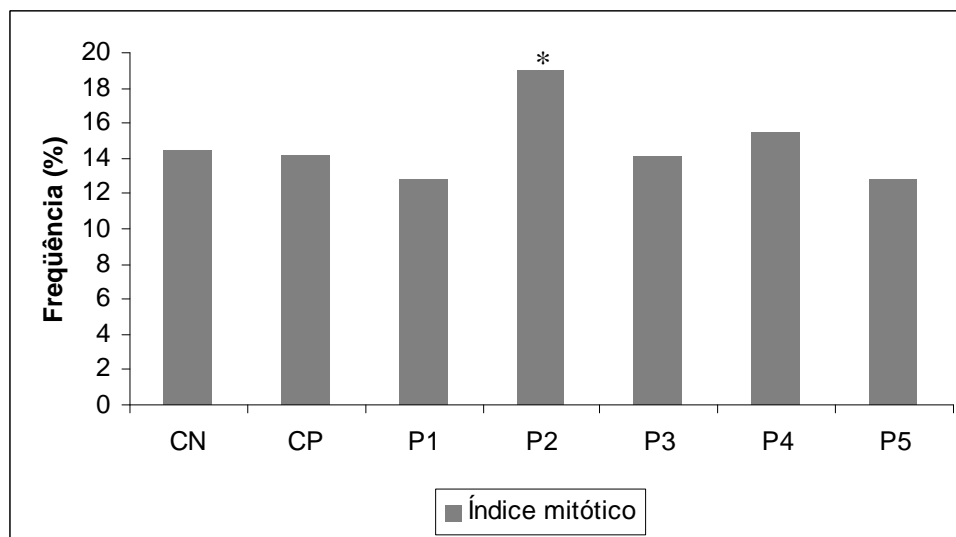
\*Estatisticamente significativo, quando comparado ao CN ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

**Figura 3.** Frequência de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN) em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição às amostras de águas coletadas em novembro de 2008.



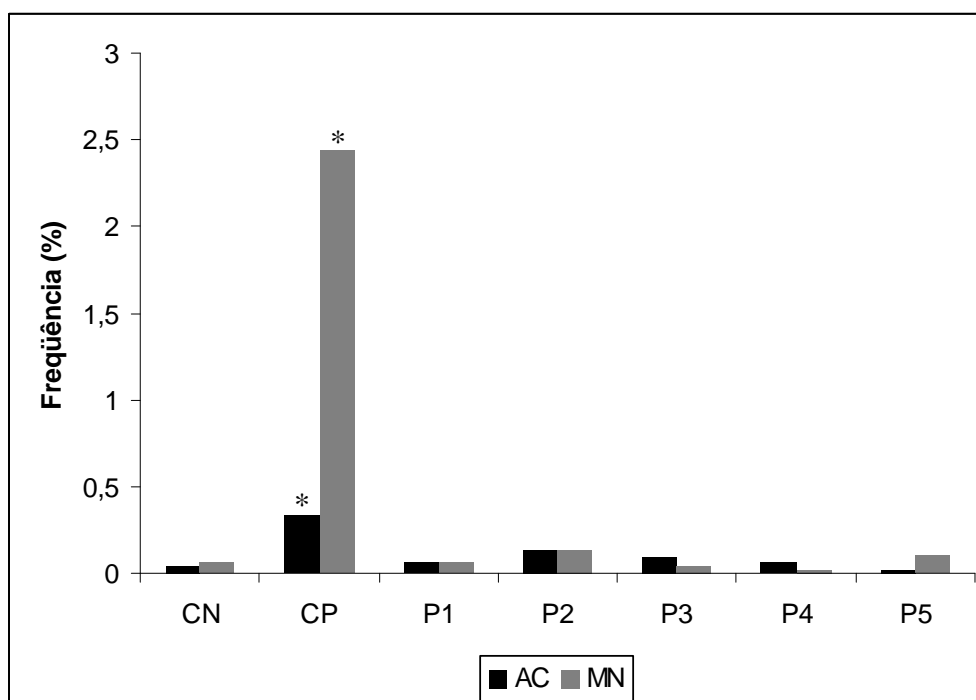
\*Estatisticamente significativo, quando comparado ao CN ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

**Figura 4.** Frequência de micronúcleos em células meristemáticas e F<sub>1</sub> de *A. cepa*, após exposição às amostras de águas coletadas em novembro de 2008.



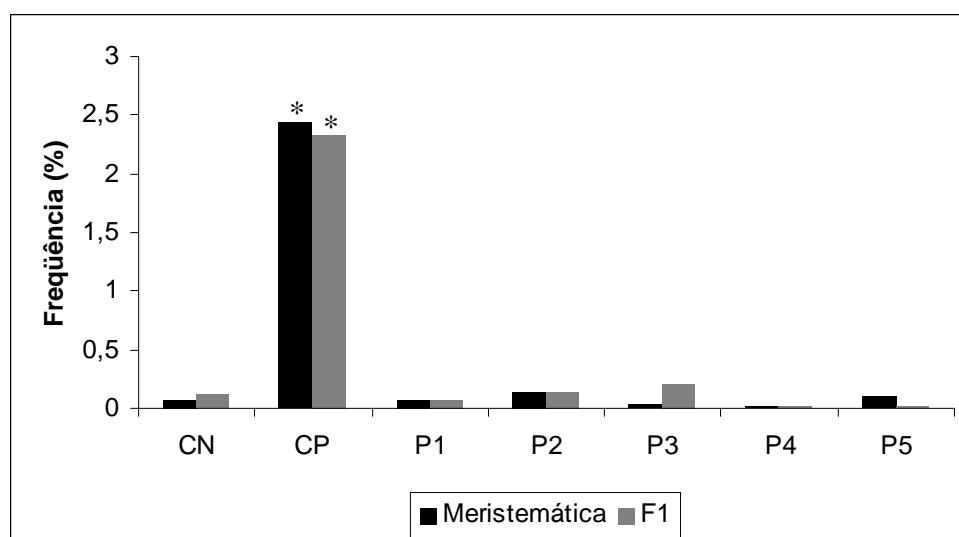
\*Estatisticamente significativo, quando comparado ao CN ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

**Figura 5.** Frequência do índice mitótico em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição às amostras de águas coletadas em fevereiro de 2009.



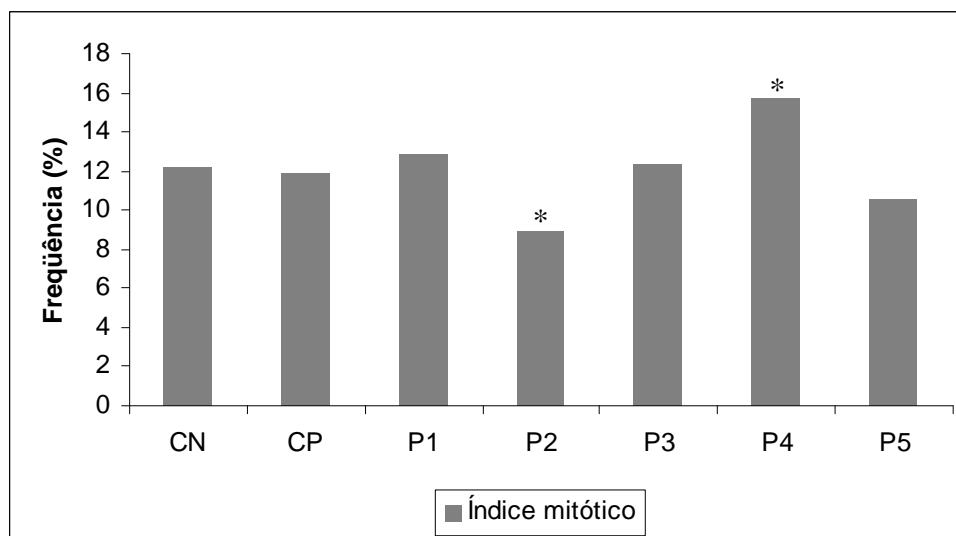
\*Estatisticamente significativo, quando comparado ao CN ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

**Figura 6.** Frequência de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN) em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição às amostras de águas coletadas em fevereiro de 2009.



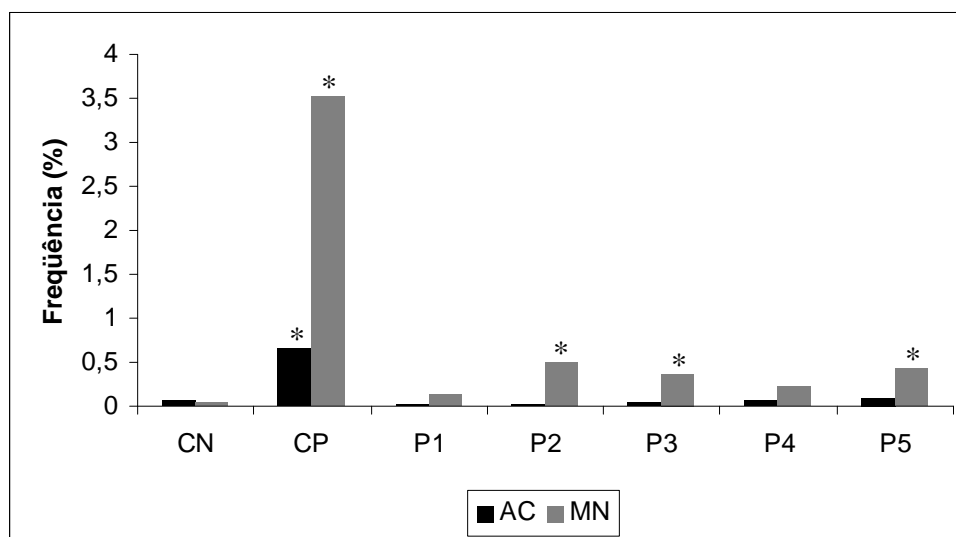
\*Estatisticamente significativo quando, comparado ao CN ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

**Figura 7.** Frequência de micronúcleos em células meristemáticas e  $F_1$  de *A. cepa*, após exposição às amostras de águas coletadas em fevereiro de 2009.



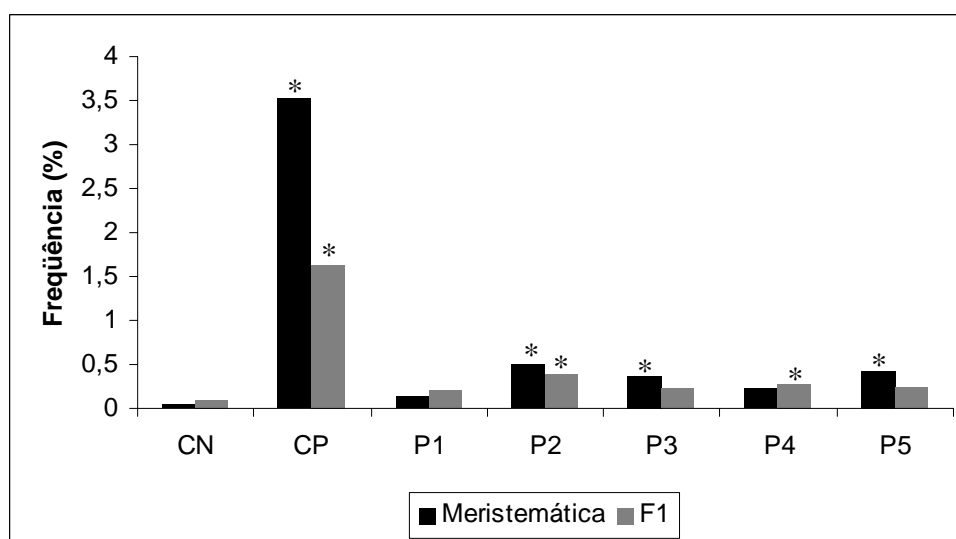
\*Estatisticamente significativo, quando comparado ao CN ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

**Figura 8.** Frequência do índice mitótico em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição às amostras de águas coletadas em agosto de 2009.



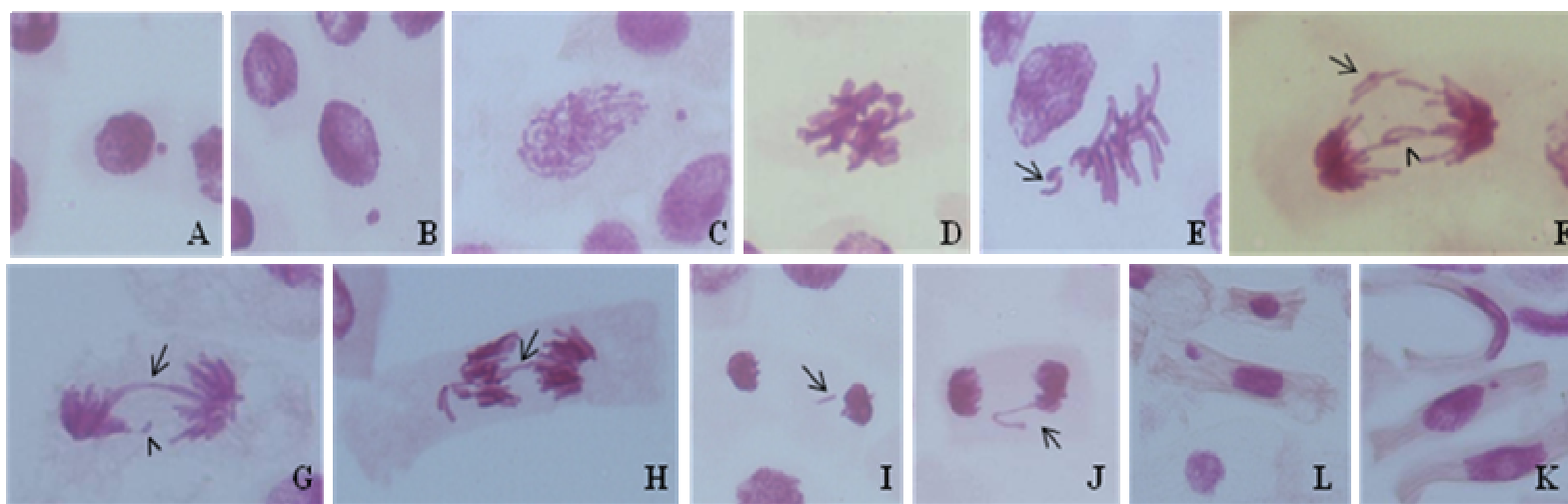
\*Estatisticamente significativo, quando comparado ao CN ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

**Figura 9.** Frequência de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN) em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição às amostras de águas coletadas em agosto de 2009.



\*Estatisticamente significativo, quando comparado ao CN ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

**Figura 10.** Frequência de micronúcleos em células meristemáticas e  $F_1$  de *A. cepa*, após exposição às amostras de águas coletadas em agosto de 2009.



**Figura 11.** Alterações genotóxicas e mutagênicas de células meristemáticas (A-J) e F<sub>1</sub> (L-K) de *A. cepa*, após exposição às águas do ribeirão Tatu. A e B. intérfase com MN; C. prófase com MN; D. metáfase com aderência; E. metáfase com perda cromossômica (seta); F. anáfase com perda (seta) e ponte cromossômica (cabeça de seta); G. anáfase com ponte (seta) e quebra cromossômica (cabeça de seta); H. anáfase com ponte cromossômica; I. telófase com quebra; J. telófase com perda; L e K. células F<sub>1</sub> com MN.



**Avaliação da genotoxicidade de águas impactadas por efluentes domésticos e industriais de uma região altamente industrializada do Estado de São Paulo-Brasil, por meio do ensaio do cometa em células HTC**

Bárbara Cassu Manzano<sup>1</sup>, Amauri Antônio Menegário<sup>2</sup>,  
Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup>Centro de Estudos Ambientais (CEA), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Autor correspondente: Tel.:(19) 3526-4143; Fax: (19) 3526-4136. E-mail: mamm@rc.unesp.br

**Resumo**

Os problemas que mais afetam a qualidade da água de rios e lagos estão associados com os descartes realizados nestes ambientes, principalmente, os de efluentes domésticos e industriais tratados de forma inadequada ou não tratados. O ensaio do cometa é uma ferramenta sensível e indicada para aplicação em estudos de biomonitoramento ambiental, que visam determinar o potencial de genotoxicidade de poluentes da água. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico das águas do ribeirão Tatu, região de Limeira/SP, por meio do ensaio do cometa em células de mamíferos (HTC). Os resultados mostram uma maior genotoxicidade para os pontos do ribeirão relacionados com maiores recebimentos de cargas tributárias de origem doméstica e industrial. Verificou-se também que as amostras de águas, coletadas no período de chuva intensa, apresentaram maior genotoxicidade, devido, possivelmente, ao carreamento de contaminantes para o leito do ribeirão, promovido pelo escoamento da água das chuvas. O ensaio do cometa mostrou ser uma ferramenta útil e sensível na avaliação de recursos hídricos impactados por poluentes de origens diversas.

**Palavras-chave:** contaminação de recursos hídricos, células HTC, biomonitoramento ambiental, efluentes domésticos, efluentes industriais.

## 1. Introdução

Dentre todos os ecossistemas, o aquático é o que tem sofrido os maiores impactos frente à poluição provocada pela ação humana, uma vez que a água acaba sendo o destino final de todo poluente. Os eventos que mais afetam a qualidade da água de rios e lagos são os descartes de efluentes domésticos e industriais, tratados de forma inadequada ou não tratados, a perda e destruição das bacias de captação, a localização errônea de unidades industriais, o desmatamento, a agricultura migratória sem controle, e as práticas agrícolas deficientes (MORAES; JORDÃO, 2002). No Estado de São Paulo, a principal causa da deterioração da qualidade da água dos rios e reservatórios é o lançamento de esgotos domésticos *in natura*, uma vez que estes são ricos em matéria orgânica biodegradável, micronutrientes, microorganismos e sólidos em suspensão. Contudo, lançamentos de efluentes industriais também contribuem, de forma significativa, para agravar a perda da qualidade dos recursos hídricos (CETESB, 2008).

A utilização de modelos *in vitro* ganhou, nos últimos anos, uma ampla aceitação na investigação ecotoxicológica, por proporcionar ferramentas avançadas, protocolos confiáveis e possuir diferentes aplicações, desde estudos de morte celular até a toxigenômica (MAZZEO, 2009). Para os estudos de monitoramento da qualidade da água, esse modelo apresenta vantagens, em relação aos *in vivo*, pela possibilidade de se limitar o número de variáveis experimentais, facilidade de obtenção de dados relevantes, e curto período necessário para o desenvolvimento dos testes, quando comparados com outras técnicas rotineiramente usadas (ROGERO et al., 2003). Ensaio *in vitro*, realizados com cultura de células, são empregados, com sucesso, em análises de genotoxicidade, por serem sensíveis a agentes químicos e físicos, apresentarem um ciclo de divisão celular curto e, por isso, responderem rapidamente aos efeitos dos agentes testados, serem financeiramente acessíveis e de fácil reprodutibilidade (SPEIT et al., 1998; ROGERO et al., 2003; CARDOZO et al., 2006); além de permitirem uma melhor padronização das etapas experimentais, possibilitando o controle físico-químico do ambiente experimental (pH, temperatura, concentração de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) e o controle das condições fisiológicas (BRUSICK, 1987; CARVALHO, 1996; FRESHNEY, 2005).

Várias linhagens celulares de mamíferos podem ser utilizadas em testes de genotoxicidade de amostras ambientais, como as células de hepatoma de camundongo (HTC), células de hepatoma humano (HepG2), células de carcinoma humano (HeLa), células de ovário de hamster (CHO), células de pulmão de hamster (V79 e CHL), células epiteliais de pulmão humano (L132 e A549), células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC),

fibroblastos de ratos (L929), fibroblastos humanos (RTL-W1 e NIH-3T3), leucócitos de ratos e camundongos e linfócitos humanos.

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

O ensaio do cometa ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) é uma técnica de eletroforese em microgel, realizada em células individuais, que permite a identificação de quebras de fita simples, quebras de fita dupla, ligações cruzadas, sítios álcali-lábeis e excisão de sítios incompletos de reparo (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000; COLLINS, 2004). Segundo Cotelle e Férard (1999), o ensaio do cometa é capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes ou oxidativos.

Estudos de genotoxicidade de ambientes aquáticos, realizados por Matsumoto et al. (2003, 2005), por meio do ensaio do cometa com células mantidas em cultura (CHO), comprovaram a eficiência deste teste na avaliação dos efeitos danosos aos seres vivos, provocados por poluentes lançados em recursos hídricos. Segundo Kosz-Vnenchak e Rokosz (1997), o ensaio do cometa é uma ferramenta sensível e indicada para aplicação em estudos de biomonitoramento ambiental, que visa determinar o potencial genotóxicos de poluentes aquáticos.

Este trabalho teve como objetivos verificar a possível presença de contaminantes genotóxicos nas águas do ribeirão Tatu, região de Limeira/SP, por meio do ensaio do cometa, aplicado em células HTC, e a influência da sazonalidade na ação genotóxica desses poluentes.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Localização e caracterização da área de estudo*

A cidade de Limeira, localizada na região leste do Estado de São Paulo (a 150 Km de São Paulo), pertence à Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) das Bacias do Piracicaba, Capivari e Jundiaí – PCJ (Lei Estadual n.º 9.034/94). Esta UGRHI,

composta por 57 municípios, tem uma densidade populacional superior a 11% da população do Estado e é classificada como de caráter agroindustrial, visto que as suas principais atividades econômicas são agroindústrias, indústrias químicas, têxteis, metalúrgicas e de eletrodomésticos (CETESB, 2008).

A bacia do ribeirão Tatu, um dos principais cursos d'água da cidade, atravessa grande parte da área urbana do município. Este ribeirão nasce na zona rural do município de Cordeirópolis/SP e deságua no rio Piracicaba (figura 1). Segundo a Resolução CONAMA 357/2005, o ribeirão Tatu é considerado, na área urbana de Limeira, um rio de classe 4, cujas águas são destinadas apenas à navegação, à harmonia paisagística e aos usos menos exigentes (CETESB, 2009). Este recurso hídrico possui inúmeros problemas como o lançamento de efluentes domésticos, industriais e agrícolas sem tratamento e ausência, quase total, de matas ciliares (MARRARA, 2008). Recebe 82% da carga poluidora *in natura* (ou seja, sem tratamento) de origem doméstica da cidade de Cordeirópolis e 72% do esgoto doméstico de Limeira, sendo que, deste, somente 56% é tratado (CETESB, 2009).

## 2.2. Coleta das amostras de água

As amostras de água foram coletadas ao longo do ribeirão Tatu, em três épocas distintas: novembro de 2008 (período quente e seco), fevereiro de 2009 (período quente e chuvoso) e agosto de 2009 (período frio e seco). Foram estabelecidos cinco pontos de coleta da água: P1 – nascente do ribeirão (23 K 247922 m E e 7511007 m N); P2 – local situado à jusante do perímetro urbano do município de Cordeirópolis e após receber a carga poluidora desta cidade (K 247922 m E e 7511007 m N); P3 – ponto de coleta à montante do perímetro urbano da cidade de Limeira (23 K 251367 m E e 7507063 m N); P4 – zona urbana de Limeira (K 254682 m E e 7500823 m N); P5 – zona rural de Limeira, à jusante dos lançamentos dos esgotos da cidade e geograficamente situado próximo ao local do deságüe no Rio Piracicaba (23 K 258237 m E e 7492132 m N). Foram coletados, para cada ponto amostrado, aproximadamente dois litros de água em garrafas plásticas, devidamente identificadas, que foram transferidas, imediatamente, para o Laboratório de Mutagênese da UNESP – Campus de Rio Claro, onde permaneceram sob refrigeração (4° C) até sua utilização nas análises.

Os dados meteorológicos da área de estudo foram fornecidos pelo Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Limnologia da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP – Campus de Limeira.

### 2.3. *Material biológico*

Neste trabalho foram utilizadas células HTC mantidas em cultura no Laboratório de Mutagênese do Departamento de Biologia da UNESP Campus de Rio Claro.

### 2.4. *Análise físico-química das amostras de água*

A análise físico-química das amostras de água coletadas nos diferentes pontos do ribeirão foi realizada no Laboratório de Química e no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos Ambientais (CEA) da UNESP, Campus de Rio Claro. Foram avaliados os seguintes parâmetros: temperatura, condutividade, pH, cor aparente, turbidez, salinidade, STD (sólidos totais dissolvidos), OD (oxigênio dissolvido), amônia, nitrito, nitrato, fósforo total, DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e os metais alumínio, cádmio, chumbo, cobre, cromo, níquel, zinco.

### 2.5. *Ensaio do Cometa em células HTC*

A linhagem celular de hepatócitos de camundongos (HTC) foi cultivada em 5 mL de meio de cultura D-MEM/F-12, suplementado com 10% de soro bovino fetal em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, com uma concentração inicial de  $1 \times 10^6$  células por frasco, mantidas em estufa a 37° C, por um ciclo celular completo (24 horas). Após esse período, foram adicionados aos frascos 5 mL das amostras de água do ribeirão (uma amostra para cada frasco), filtradas em membrana milipore 0.2 µm. O frasco referente ao controle negativo (CN) recebeu 50 µL de tampão fosfato – PBS (*phosphate buffered saline*). Para o controle positivo (CP), foi utilizado 50 µL de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3) na concentração de  $4 \times 10^{-2}$  M. Os frascos foram incubados, em estufa a 37° C, por 1 dia. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após o tratamento, foi descartado o meio de cultura dos frascos. As células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e tripsinizadas (0,5 mL de tripsina-EDTA 0,025%) por, no máximo, dois minutos. Decorrido este tempo, o processo foi interrompido pela adição de 5 mL de um novo meio de cultura suplementado com soro. O conteúdo foi homogeneizado e centrifugado por cinco minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, deixando-se apenas 0,5 mL de meio, onde o *pellet* foi ressuspendido.

Para o teste de viabilidade celular, foram misturados 20 µL de suspensão celular e 20 µL de Azul de Trypan. A análise foi feita em câmara de Neubauer, sob microscopia de luz. Para a determinação da citotoxicidade, pelo método da coloração com Azul de Trypan, foi quantificada a proporção de células vivas e de células mortas (coradas em azul), aceitando-se o limite mínimo de 80% de células viáveis, para o prosseguimento dos experimentos.

Para a montagem das lâminas (foram montadas duas lâminas por repetição, totalizando 6 lâminas por tratamento) foi seguido o protocolo descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações. As lâminas, previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), foram montadas com 20 µL de suspensão celular misturados a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Estas foram cobertas com lamínulas e levadas à geladeira (4°C), por 20 minutos. Decorrido este tempo, as lamínulas foram retiradas e as lâminas mantidas em cubetas (protegidas da luz) contendo solução de lise (1 mL de triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: 2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris, ~ 8,0 g de NaOH sólido, 10 g de lauryl sarcosinato sódico para 1 litro) gelada, e mantidas em geladeira, por 1 hora.

Após a lise, as lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (300 mM de NaOH, 1 mM de EDTA, pH>13) gelada e recém-preparada, por 20 minutos, para desnaturação do DNA. Após esse período, foi iniciada a corrida de eletroforese em corrente de 39 V (aproximadamente 1 V/cm) e amperagem de 300mA, por 20 minutos. As lâminas foram, então, neutralizadas com 5 mL de solução tampão neutralizadora (0,4 M de Tris-HCl, pH 7,5), em 3 séries de 5 minutos cada, secas na horizontal e fixadas com etanol 100%, por 10 minutos. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e estocadas em geladeira, para posterior análise.

#### *2.5.1. Análise das lâminas*

As lâminas preparadas, conforme descrito acima, foram coradas com 80 µL de solução de brometo de etídio (0,02 mg/mL) e cobertas com lamínula, uma por uma, sendo analisadas, imediatamente, após a sua preparação. Foram analisados 50 nucleóides por lâmina, totalizando 300 nucleóides por amostra. A análise foi feita em microscopia de epifluorescência (Leica) com filtro de excitação de 510-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm, em um aumento de 400X. Os nucleóides foram classificados, visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA, segundo Kobayashi et al. (1995), em: classe 0: nenhum dano; classe 1: pequeno dano; classe 2: médio dano; classe 3: grande dano. As células com os núcleos completamente fragmentados, ou seja, em processo de morte celular, não foram contabilizadas nesta análise.

#### *2.5.2. Análise estatística*

O escore de cada tratamento foi verificado, multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe de dano pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3) e submetidos

ao teste estatístico *t*-Student ( $p < 0,05$ ), para a comparação de danos entre as amostras das águas e o controle negativo.

### 3. Resultados

Os resultados obtidos nas análises dos parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas ao longo do ribeirão Tatu, nos três períodos descritos, estão reunidos na tabela 1. Com exceção do P1, todos os pontos de coleta apresentaram amostras com alterações nos parâmetros físico-químicos, sendo que o P2 e P5 foram os que mais se destacaram.

Os dados meteorológicos, referentes ao período de estudo, demonstraram uma pequena variação nas médias mensais de temperatura (máxima e mínima) e de umidade relativa do ar, e uma grande variação no índice pluviométrico, o que caracterizou bem a estação chuvosa e a seca, na cidade de Limeira/SP (tabela 2).

A viabilidade celular, avaliada pelo método da coloração exclusiva com Azul de Trypan, confirmou que as amostras de água do ribeirão não foram citotóxicas para as células HTC, permitindo a realização do ensaio do cometa, que exige um mínimo de 80% de células viáveis para a sua realização.

A genotoxicidade das águas, avaliada por meio do ensaio do cometa, mostrou resultados significativos para o P1 na amostra coletada em novembro de 2008, para o P1, P2, P3 e P5 nas amostras de fevereiro de 2009 e para o P5 na amostra de agosto de 2009, quando comparados ao resultado do CN (tabela 3, 4 e 5 e figura 2). O CP induziu danos de classe 1 e 2, enquanto que os resultados obtidos com as amostras de águas coletadas ao longo do rio apresentaram efeitos genotóxicos significativos, na grande maioria, por indução de cometas de classe 1 (figura 3).

### 4. Discussões

A utilização integrada de análises químicas, bioquímicas e celulares é considerada um dos procedimentos mais indicados para detectar os impactos de contaminantes sobre sistemas aquáticos (OHE et al., 2004). Barata et al. (2005) declara que a avaliação ecológica da qualidade da água é fundamental para a gestão das águas superficiais e proteção dos ecossistemas aquáticos. Seu status ecológico é definido por critérios biológicos, químicos, morfológicos e hidrológicos (EISELE, 2003). Assim, para se avaliar, eficientemente, a presença de agentes genotóxicos na água, além da análise química, ensaios de mutagenicidade/genotoxicidade devem ser incluídos como parâmetros adicionais em programas de monitoramento de sua qualidade (OHE et al., 2004).



Neste trabalho, as análises físico-químicas indicaram que, no período definido como quente/seco (novembro 2008), ocorreram altos índices de condutividade, STD, amônia, DBO, alumínio e zinco, nas águas do ribeirão Tatu. O menor índice pluviométrico, também encontrado nessa época, sugere uma maior concentração de poluentes provenientes, principalmente, do descarte de esgotos domésticos sem tratamento e de efluentes industriais. Christofolletti (2008) obteve resultados semelhantes em relação a esses parâmetros, ao estudar um ecossistema lântico (Lago Azul – Rio Claro/SP), evidenciando que o índice pluviométrico influencia na disponibilidade e concentração de poluentes na água.

A baixa concentração de OD encontrada nas amostras de água é extremamente preocupante, uma vez que pode comprometer a manutenção e sobrevivência da biota aquática deste corpo d'água. Esses dados confirmam a contaminação e a degradação que o ribeirão vem sofrendo, em quase todo o seu curso, devido aos impactos decorrentes dos descartes de efluentes.

Diversos autores utilizam o ensaio do cometa em estudos de genotoxicidade do meio aquático, pela eficiente aplicabilidade deste teste na avaliação dos efeitos danosos que poluentes ambientais promovem sobre os seres vivos (AVISHAI et al., 2002; RAJAGURU et al., 2002; LU et al., 2002; 2004;; MATSUMOTO et al., 2003, 2005; AOUADENE et al., 2008; CHRISTOFOLETTI et al., 2009). Segundo Žegura et al. (2009) e Rocha et al. (2009), o ensaio do cometa, realizado com células de mamíferos, é uma eficiente ferramenta na detecção da genotoxicidade e, conseqüentemente, indicado para monitoramentos da qualidade de águas superficiais.

No presente estudo verificou-se que as amostras de água coletadas no ribeirão Tatu induziram efeitos genotóxicos em células de hepatoma de rato (HTC), principalmente as de fevereiro de 2009. Para esta coleta, apesar do P4 apresentar algum dano genotóxico, este resultado foi o único considerado não significativo (*t*-Student -  $p < 0,05$ ), em relação ao CN. Para a coleta de novembro de 2008, somente o P1 mostrou ser genotóxico, enquanto que para a coleta de agosto de 2009, apenas o P5 apresentou genotoxicidade para as células HTC.

A genotoxicidade observada para o P1 pode estar relacionada a uma contaminação por agrotóxicos, já que este ponto é margeado por culturas de cana-de-açúcar. Lemos e Erdtmman (2000) também verificaram resultados semelhantes ao estudar o potencial mutagênico de um rio, nas proximidades de uma área agrícola, sugerindo uma possível contaminação pelos agrotóxicos utilizados nas culturas próximas ao ponto de coleta da água.

Em relação à coleta de agosto de 2009, as análises físico-químicas da amostra de água do P5 revelaram a presença de metais, como alumínio, cobre, níquel e zinco, em níveis

maiores que os registrados nos outros pontos amostrados, nesse mesmo período. O efeito sinérgico dessas substâncias com outros compostos presentes nos efluentes lançados no ribeirão podem ser a causa dos efeitos genotóxicos verificados, por meio do ensaio do cometa, nas células HTC.

O maior potencial genotóxico detectado para a coleta de fevereiro de 2009, infere que a pluviosidade sazonal, observada para esta estação do ano, provavelmente, influenciou nos resultados obtidos, diferentemente dos resultados observados por Matsumoto et al. (2003, 2005), que utilizaram o ensaio do cometa em células de mamífero para avaliar o potencial genotóxico de um rio impactado por efluentes de curtume (ricos em cromo). Estes autores verificaram que as amostras de água coletadas no período de seca foram mais genotóxicas, quando comparadas àquelas coletadas no período de cheia. Diferentemente dos resultados de Matsumoto et al. (2003, 2005) e concordantes com os aqui descritos, Christofolletti (2008), estudando um lago que recebe efluentes domésticos e industriais, obteve, pelo ensaio do cometa, uma maior frequência de danos na estação chuvosa, uma vez que foram contabilizados um maior número de cometas de classe 2 para essa estação. Nossos resultados, assim como aqueles obtidos por Christofolletti (2008), sugerem que um maior volume de água das chuvas, possivelmente aumentou o carreamento de substâncias genotóxicas para o leito do ribeirão, tendo, como consequência, um maior comprometimento das suas águas por agentes genotóxicos atuantes no material genético de mamíferos.

## **5. Conclusão**

Ao se avaliar as águas do ribeirão Tatu, verificou-se que o ensaio do cometa em células HTC foi sensível na detecção de agentes genotóxicos presentes neste recurso hídrico. Foi registrada uma maior genotoxicidade para a estação chuvosa do ribeirão, visto que foi observada uma maior indução de nucleóides de classe 1 e 2 nas células expostas às águas coletadas neste período do ano, indicando a sua potencialidade em promover quebras no material genético de células de mamíferos.

## **6. Agradecimento**

As autoras agradecem à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

## 7. Referências bibliográficas

- AOUADENE, A.; GIORGIO, C.D.; SARRAZIN, L.; MAREAU, X.; JONG, L.D.; GARCIA, F.; THIERY, A.; BOTTA, A.; MÉO, M.D. Evaluation of the Genotoxicity of River Sediments From Industrialized and Unaffected Areas Using a Battery of Short-Term Bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.49, p.283-299, 2008.
- AVISHAI, N.; RABINOWITZ, C.; MOISEEVA, E.; RINKEVICH, B. Genotoxicity of Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay. **Mutation Research**, v.518, p.21-37, 2002.
- BARATA, C.; LEKUMBERRI, I.; VILA-ESCALÉ, M.; PRAT, N. & PORTE, C. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from Llobregat river basin (NE Spain). **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 3-19, 2005.
- BRUSICK, D.J. **Principles of Genetic Toxicology**. New York: Plenum Press, 1987, 284 p.
- CARDOZO, T.R.; ROSA, D.P.; FEIDEN, I.R.; ROCHA, J.A.V.; OLIVEIRA, N.C.D.; PEREIRA, T.S.; PASTORIZA, T.F.; MARQUES, D.M.; LEMOS, C.T.; TERRA, N.R.; VARGAS, V.M.F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research**, v.603, p.83-96, 2006.
- CARVALHO, T.U. **Cultura de Células Animais**. In: BENCHIMOL, M. (Org.). Metodos de Estudo da Célula. Rio de Janeiro: FENORTE/UENF, cap.2, 1996, p. 45-58.
- CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo – 2007. **Cetesb**. São Paulo: Cetesb, 2008.
- CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo – 2008. **Cetesb**. São Paulo: Cetesb, 2009.
- COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principle, applications and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p.249-261, 2004.
- COTELLE, S.; FÉRARD, J.F. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, p.246-255, 1999.
- EISELE, M.; STEINBRICH, A.; HILDEBRAND, A. & LEIBUNDGUT, C. The significance of hydrological criteria for the assessment of the ecological quality in river basins. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 28, p. 529-536, 2003.
- FRESHNEY, I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**, John Wiley & Sons, 5ª Ed., 2005.
- GÁBELOVÁ, A.; VALOVIČOVÁ, Z.; HORVÁTHOVÁ, E.; SLAMEŇOVÁ, D.; BINKOVÁ, B.; ŠRÁMB, R.J.; FARMER, P.B. Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Košice and Sofia. **Mutation Research**, v.563, p.49–59, 2004.

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

KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, K. The comet assay for detection of potencial genotoxicity of polluted water. **Folia Biologica**, v.45, p. 153-156, 1997.

LEMOS, C.T.; ERDTMANN, B. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. **Mutation Research**, v.467, p.1–9, 2000.

LU, W.Q.; CHEN, X.N.; YUE, F.; JENTER, C.; GMINSK, R.; LI, X.Y.; XIE, H.; Mersch-Sundermann, V. Studies on the in vivo and in vitro mutagenicity and the lipid peroxidation of chlorinated surface (drinking) water in rats and metabolically competent human cells. **Mutation Research**, v.513, p.151–157, 2002.

LU, W.-Q.; CHEN, D.; WU, X.-J.; LIU, A.-L.; LIU, H.; MERSCH-SUNDERMANN, V. DNA damage caused by extracts of chlorinated drinking water in human derived liver cells (HepG2). **Toxicology**, v.198, p.351–357, 2004.

MARRARA, A.C.T. **Avaliação Físico-Química e Ecotoxicológica do Ribeirão Tatu no Município de Limeira-SP**. 2008. 122p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Campinas, SP

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

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

MAZZEO, D.E.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microorganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero**. 2009. 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 357/2005.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v.36, p.370-374, 2002.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 357/2005.

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

PARK, S.Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environment International**, v.33, p.817–822, 2007.

RAJAGURU, P.; VIDYA, L.; BASKARASETHUPATHI, B.; KUMAR, P.A.; PALANIVEL, M.; KALAISELVI, K. Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. **Mutation Research**, v.517, p.29-37, 2002.

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

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

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHEIDER, E.L. A simple technique for quantification of levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

SPEIT, G.; HAUPTER, S.; HARTMANN, A. Evaluation of the genotoxic properties of paraquat in V79 Chinese hamster cells. **Mutation Research**, v.412, p.187-193, 1998.

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.

ŽEGURA, B.; HEATH, E.; ČERNOŠA, A.; FILIPIČ, M. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, v.75, p.1453–1460, 2009.

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos das águas do ribeirão Tatu, região de Limeira/SP, coletadas em agosto de 2008, fevereiro de 2009 e agosto de 2009.

Parâmetros	Amostras														
	Novembro de 2008					Fevereiro de 2009					Agosto de 2009				
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
Temperatura (°C)	23,59	27,32	24,81	24,58	25,82	25,36	26,37	25,94	26,39	26,20	21,13	21,01	21,10	20,90	20,82
Condutividade (µS/cm)	17	977	732	476	1125	17	223	137	212	373	17	692	391	377	517
pH	3,7	7,42	7,34	7,18	7,76	4,59	6,92	6,77	7,23	7,23	4,91	7,08	6,97	6,91	7,17
Cor aparente (units PtCo)	8	2482	477	322	942	2	319	241	162	352	4	944	473	221	556
Turbidez (NTU)	1,6	402,0	37,6	22,8	56,0	1,4	42	21,6	20	29	1,39	110	59	22	51
Salinidade (sal)	0,01	0,48	0,36	0,23	0,56	0,01	0,10	0,06	0,10	0,18	0,01	0,34	0,19	0,18	0,25
STD (mg/L)	11	635	475	309	731	11	145	80	138	244	11	450	254	245	336
OD (mg/L)	6,53	0,82*	2,43	1,04*	1,58*	5,61	1,17*	5,31	4,11	1,38*	8,08	1,40*	2,83	2,20	0,69*
Amônia (mg/L de NH <sub>3</sub> )	0,08	10,76	6,64	2,31	26,60	0,08	2,28	0,60	1,62	4,88	0,08	5,50	3,34	4,72	13,04
Nitrito (mg/L de NO <sub>2</sub> )	0,002	0,082	0,034	0,042	0,075	0,001	0,092	0,292	0,308	0,007	0,000	0,036	0,018	0,004	0,039
Nitrato (mg/L de NO <sub>3</sub> )	0,2	2,8	1,3	0,8	3,30	0,2	0,9	1,1	1,5	0,3	1,9	2,8	2,3	1,9	3,0
Fósforo Total	4,271	1394	1045	171,75	413,9	10,65	602,5	155,4	329,5	789,5					
DBO (mg/L de O <sub>2</sub> )	4,9	266	78	80	176	20,8	238	178	148	210	7,5	90	92	98	120
Alumínio (mg/L)	0,04359	0,43638	0,39898	0,31568	0,23348	<0,013	0,72368	0,24058	0,36448	0,17328	0,09911	0,36568	<0,013	0,06543	0,21568
Cádmio (mg/L)	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Chumbo (mg/L)	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	0,48175	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035
Cobre (mg/L)	<0,006	<0,006	<0,006	0,01105	0,32091	<0,006	<0,006	<0,006	<0,006	0,03236	<0,006	<0,006	<0,006	0,01353	0,11151
Cromo (mg/L)	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	0,03453	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015
Níquel (mg/L)	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	0,01188	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	0,02555	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	0,06890
Zinco (mg/L)	0,02928	0,02392	0,01007	0,04102	0,11009	0,03734	0,01620	0,02689	0,04661	0,05966	0,02681	0,04072	<0,001	0,05532	0,05881

\* Valores inferiores ao exigido para águas doces de classe 4, segundo a RES. CONAMA 357/2005

**Tabela 2.** Dados meteorológicos referentes aos períodos de coleta das amostras de água no ribeirão Tatu, região de Limeira/SP.

Período de coleta	Temperatura máxima (° C)	Temperatura mínima (° C)	Temperatura média (° C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Precipitação pluviométrica (mm)
Novembro/2008	27,1	13,2	20,2	63	32,2
Fevereiro/2009	30,3	20,8	25,6	68	175,6
Agosto/2009	29,5	18,4	24,0	62	98,6

Nota: os valores foram obtidos por meio do cálculo das médias dos valores diários.

**Tabela 3.** Danos genotóxicos, observados por meio do ensaio do cometa em células HTC tratadas com as amostras de água do ribeirão Tatu, região de Limeira – SP, coletadas em novembro de 2008.

Amostras	Classes				Escores
	0	1	2	3	
<b>CN</b>	100	0	0	0	0
	100	0	0	0	0
	99	1	0	0	1
Média±DP	99,67±0,58	0,33±0,58	0	0	0,33±0,58
<b>CP</b>	0	13	86	1	188
	0	15	89	2	199
	0	4	89	6	200
Média±DP	0	10,67±5,86	88,00±1,73	3,00±2,65	195,67±6,66*
<b>P1</b>	98	1	0	1	4
	98	0	2	0	4
	99	1	0	0	1
Média±DP	98,33±0,58	0,67±0,58	0,67±1,15	0,33±0,58	3,00±1,73*
<b>P2</b>	96	4	0	0	4
	100	0	0	0	0
	100	0	0	0	0
Média±DP	98,67±2,31	1,33±2,31	0	0	1,33±2,31
<b>P3</b>	100	0	0	0	0
	99	1	0	0	1
	100	0	0	0	0
Média±DP	99,67±0,58	0,33±0,58	0	0	0,33±0,58
<b>P4</b>	100	0	0	0	0
	98	2	0	0	2
	97	3	0	0	3
Média±DP	98,33±1,53	1,67±1,53	0	0	1,67±1,53
<b>P5</b>	100	0	0	0	0
	97	3	0	0	3
	100	0	0	0	0
Média±DP	99,00±1,73	1,00±1,73	0	0	1,00±1,73

300 nucleóides analisados por ensaio.

CN: controle negativo; CP: controle positivo; P1: ponto 1; P2: ponto 2; P3: ponto 3; P4: ponto 4; P5: ponto 5.

\*Estatisticamente significativo, quando comparado ao CN ( $p < 0,05$ ), pelo teste estatístico *t*-Student.

**Tabela 4.** Danos genotóxicos, observados por meio do ensaio do cometa em células HTC tratadas com as amostras de água do ribeirão Tatu, região de Limeira – SP, coletadas em fevereiro de 2009.

Amostras	Classes				Escores
	0	1	2	3	
<b>CN</b>	100	0	0	0	0
	95	5	1	0	5
	100	0	0	0	0
Média±DP	96,00±6,93	3,67±6,35	0,33±0,58	0	1,67±2,89
<b>CP</b>	0	14	85	1	187
	0	26	72	2	176
	0	44	62	0	168
Média±DP	0	28,00±15,10	73,00±11,53	1,00±1,00	177,00±9,54*
<b>P1</b>	83	15	2	0	19
	74	25	1	0	27
	76	21	3	0	27
Média±DP	77,67±4,73	20,33±5,03	2,00±1,00	0	24,33±4,62*
<b>P2</b>	84	12	4	0	20
	84	15	1	0	17
	87	12	1	0	14
Média±DP	85,00±1,73	13,00±1,73	2,00±1,73	0	17,00±3,00*
<b>P3</b>	95	4	1	0	6
	94	5	0	1	8
	92	7	1	1	12
Média±DP	93,67±1,53	5,33±1,53	0,67±0,58	0,67±0,58	8,67±3,06*
<b>P4</b>	97	3	0	0	3
	84	14	1	1	16
	96	3	1	0	5
Média±DP	92,33±7,23	6,67±6,35	0,67±0,58	0,33±0,58	8,00±7,00
<b>P5</b>	96	3	1	0	5
	91	9	0	0	9
	91	7	2	0	11
Média±DP	92,67±2,89	6,33±3,06	1,00±1,00	0	8,33±3,06*

300 nucleóides analisados por ensaio.

CN: controle negativo; CP: controle positivo; P1: ponto 1; P2: ponto 2; P3: ponto 3; P4: ponto 4; P5: ponto 5.

\*Estatisticamente significativo, quando comparado ao CN ( $p < 0,05$ ), pelo teste estatístico *t*-Student.



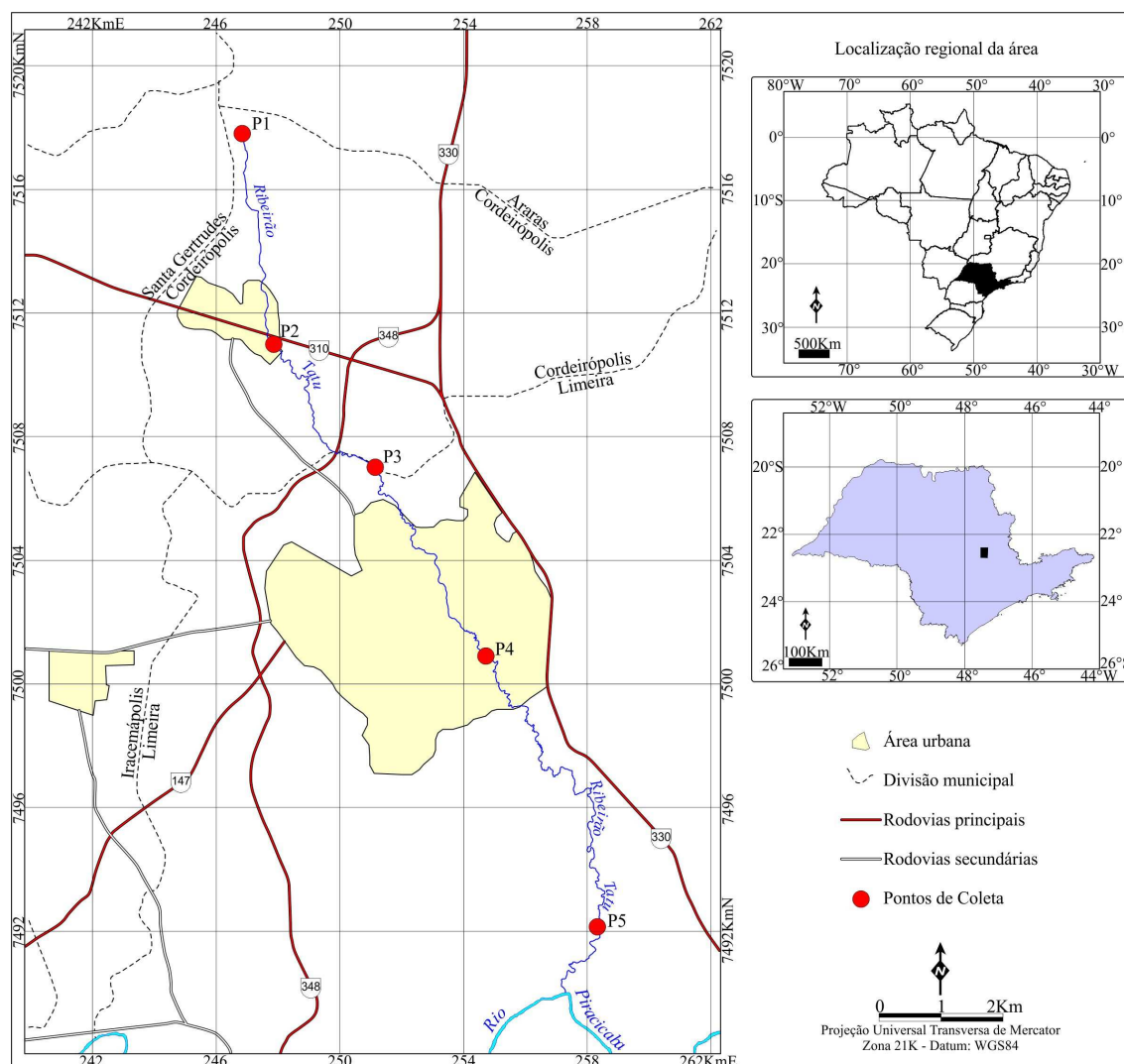
**Tabela 5.** Danos genotóxicos, observados por meio do ensaio do cometa em células HTC tratadas com as amostras de água do ribeirão Tatu, região de Limeira – SP, coletadas em agosto de 2009.

Amostras	Classes				Escores
	0	1	2	3	
CN	100	0	0	0	0
	97	3	0	0	3
	98	2	0	0	2
Média±DP	98,33±1,53	1,67±1,53	0	0	1,67±1,53
CP	0	50	48	2	152
	0	52	48	0	148
	0	42	48	10	168
Média±DP	0	48,00±5,29	48,00±0,00	4,00±5,29	156,00±10,58*
P1	99	1	0	0	1
	99	1	0	0	1
	99	0	1	0	2
Média±DP	99,00±0,00	0,67±0,58	0,33±0,58	0	1,33±0,58
P2	99	1	0	0	1
	100	0	0	0	0
	100	0	0	0	0
Média±DP	99,67±0,58	0,33±0,58	0	0	0,33±0,58
P3	100	0	0	0	0
	96	3	1	0	5
	100	0	0	0	0
Média±DP	98,67±2,31	1,00±1,73	0,33±0,58	0	1,67±2,89
P4	78	18	4	0	26
	92	8	0	0	8
	94	4	2	0	8
Média±DP	88,00±8,72	10,00±7,21	2,00±2,00	0	14,00±10,39
P5	74	24	2	0	28
	42	58	0	0	58
	62	38	0	0	38
Média±DP	59,33±16,17	40,00±17,09	0,67±1,15	0	41,33±15,28*

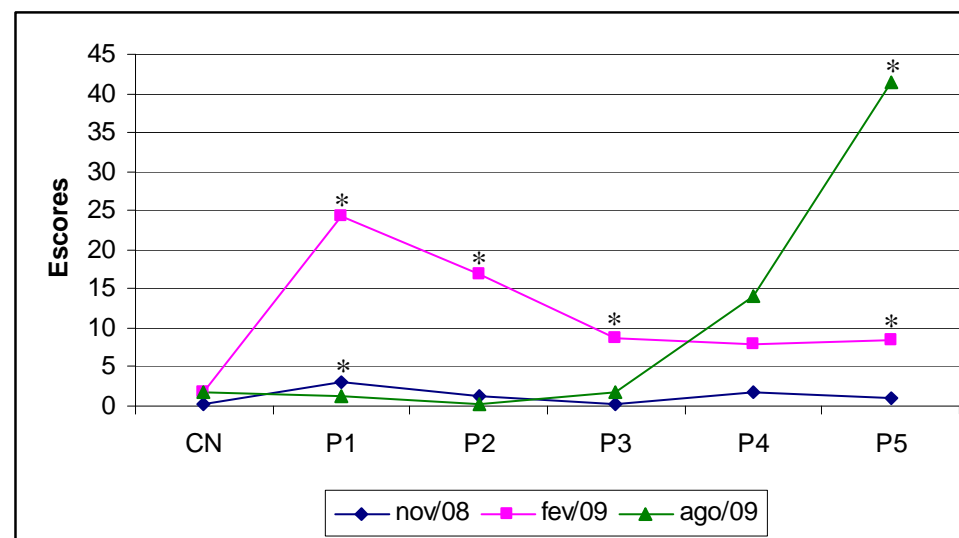
300 nucleóides analisados por ensaio.

CN: controle negativo; CP: controle positivo; P1: ponto 1; P2: ponto 2; P3: ponto 3; P4: ponto 4; P5: ponto 5.

\*Estatisticamente significativo, quando comparado ao CN ( $p<0,05$ ), pelo teste estatístico *t*-Student.

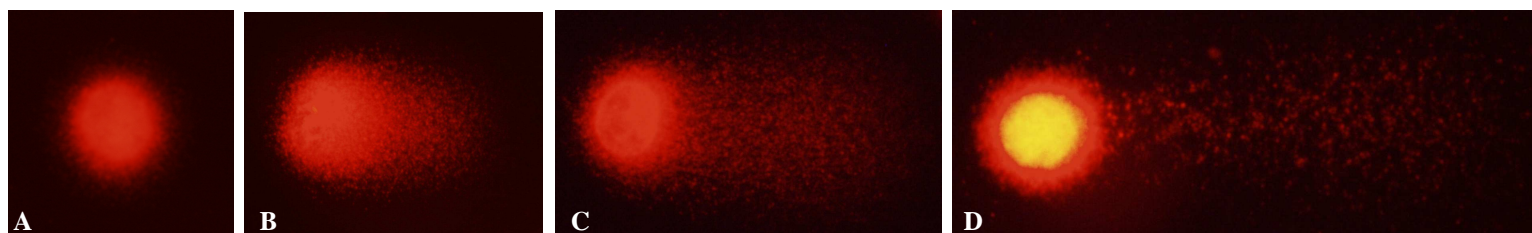


**Figura 1.** Mapa de localização dos municípios de Cordeirópolis e Limeira/SP e dos pontos de coleta ao longo do ribeirão Tatu (P1: ponto 1; P2: ponto 2; P3: ponto 3; P4: ponto 4; P5: ponto 5).



\*Estatisticamente significativo, quando comparado ao CN ( $p < 0,05$ ), pelo teste estatístico *t*-Student.

**Figura 2.** Comparação entre a média de danos genotóxicos em células HTC expostas às amostras de água do ribeirão Tatu, região de Limeira /SP.



**Figura 3.** Classes de danos, observadas no ensaio do cometa em células HTC, expostas às amostras de água coletadas nos diferentes pontos do ribeirão Tatu, região de Limeira/SP. **A.** Classe 0: nucleóide sem dano; **B.** Classe 1: nucleóide com pouco dano; **C.** Classe 2: nucleóide com médio dano; **D.** Classe 3: nucleóide com grande dano.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que:

- As análises físico-químicas mostraram uma grande degradação na qualidade da água do ribeirão Tatu, decorrente de descartes de efluentes domésticos, industriais, de escoamento da agricultura e de águas pluviais contaminadas;
- Foi observado, para a nascente do rio, um pH muito ácido, mostrando um possível impacto nesse ponto, provavelmente por agrotóxicos, por ser este local uma área rural com forte atividade agrícola;
- Altos índices de cor aparente da água, turbidez, condutividade e sólidos totais dissolvidos (STD) estão associados com poluição ambiental. Os resultados encontrados no ribeirão Tatu, para estes parâmetros, indicam os sérios impactos antropogênicos que este recurso hídrico vem sofrendo, decorrentes de descarte de efluentes domésticos e industriais. Os pontos mais comprometidos do rio foram o P2 e P5, pontos estes situados após os descartes dos efluentes das cidades de Cordeirópolis e Limeira, respectivamente, o que comprova que as atividades desenvolvidas nestas cidades geram resíduos tóxicos, que, sem tratamento adequado, acabam comprometendo e deteriorando as águas deste rio.
- A grande quantidade de matéria orgânica presente em um rio pode levar a uma alta atividade da microbiota desta água, incorrendo em uma alta demanda biológica de oxigênio (DBO), decorrente das necessidades de  $O_2$  para a realização das atividades biológicas. Estas atividades promovem uma conseqüente redução de  $O_2$  dissolvido na água. As águas do ribeirão Tatu, exceto para a nascente, apresentaram baixos valores de  $O_2$  dissolvido e alta DBO, indicando um comprometimento acentuado deste rio, decorrente da poluição antrópica que vem recebendo.
- Poluição aquática por compostos nitrogenados pode comprometer a vida de peixes, pela sua própria toxicidade, além de provocar um aumento na demanda de oxigênio na água, pelo consumo das reações de oxidação destes compostos. A contaminação por nitrogenados pode ser devido à presença de efluentes industriais, lixiviados de áreas agrícolas e drenagem das águas pluviais. Os altos níveis de amônia registrados para as amostras de água do Ribeirão Tatu, principalmente para o P2 e P5, indicam a presença de poluentes urbanos e industriais neste rio.
- A sazonalidade, representada principalmente pelos períodos de seca e cheia, influenciou o potencial de indução de danos ao material genético dos organismos

expostos. Para o sistema-teste *A. cepa*, os períodos de seca, representados pelos meses de agosto (seco/frio) e novembro (seco/quente), foram os mais críticos, já que o menor volume de chuva deve ter elevado a concentração dos poluentes e, assim, induzido maiores danos ao sistema-teste. Por outro lado, a estação chuvosa foi a mais problemática para as células HTC, visto que, com exceção de um ponto (P4) que não apresentou genotoxicidade estatisticamente significativa, todos os outros causaram quebras no material genético, sugerindo que um maior volume de água das chuvas, possivelmente aumentou o carreamento de substâncias genotóxicas para as águas do ribeirão;

- O sistema-teste *A. cepa* mostrou-se sensível para as avaliações dos potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das águas do ribeirão Tatu, representando um modelo eficiente para detectar contaminação por efluentes domésticos e industriais em águas de rios. Com o teste de ACs e de MNs pode-se observar um efeito genotóxico e mutagênico para as águas coletadas em diversos pontos do ribeirão, principalmente relacionado com a maior concentração de poluentes, observados em períodos de estiagem;
- O ensaio do cometa em células HTC foi sensível na detecção de agentes genotóxicos presentes nas águas do ribeirão Tatu.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINK, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.; TICE, R.; WATER, M.D.; AITIO, A. IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, v.463, p.111-172, 2000.

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

ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, M.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, v.514, p.105-113. 2002.

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

BARATA, C.; LEKUMBERRI, I.; VILA-ESCALÉ, M.; PRAT, N. & PORTE, C. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from Llobregat river basin (NE Spain). **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 3-19, 2005.

BARBOSA, J.S.; CABRAL, T.M.; FERREIRA, D.N.; AGNEZ-LIMA, L.F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S.R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.320-325, 2010

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

BOSCO, A.A.; CAMUSSI, J.M.; SILVA, R.N.; LOPES, T.A.; BARROS, R.M.; CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO, N.N.; SOBRINHO, G.D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. Efluentes derivados dos processos de galvanoplastia. Disponível em: <<http://www.ceset.unicamp.br/It/Artigos/3fec2409.pdf>>. Acesso em: 02 de outubro de 2007.

BRUSICK, D.J. **Principles of Genetic Toxicology**. New York: Plenum Press, 1987, 284 p.

CASTAÑO, A.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literature survey. **Toxicology in Vitro**, v.19, p.695–705, 2005.

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

CARITÁ, R. 2010. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de água de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes-SP. 2010**, 187f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v.72 (5), p.722-725, 2008.

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

CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo – 2007. **Cetesb**. São Paulo: Cetesb, 2008.

CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo – 2008. **Cetesb**. São Paulo: Cetesb, 2009.

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

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

CHRISTOFOLETTI, C.A. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. 2008. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP

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

CLAXTON, L.D.; WOODALL, G.M. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. **Mutation Research**, v.636, p.36–94, 2007.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principle, applications and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p.249-261, 2004.

COTELLE, S.; FÉRARD, J.F. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, p.246-255, 1999.

ČERNÁ, M.; PASTORKOVÁ, A.; ŠMÍD, J.; BAVOROVÁ, H.; OČADLÍKOVÁ, D.; RÖSSNER, P.; ZAVADIL, J. Genotoxicity of industrial effluents, river waters, and their fractions using the Ames test and in vitro cytogenetic assay. **Toxicology Letters**, v.88, p.191-197, 1996.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v.521, p.121-135, 2002.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biol Toxicol**, v.25, p.5–32, 2009.

DOVGALYUK, A.; KALYNYAK, T.; BLUME, Ya.B. Heavy metals have a different action from aluminium in disrupting microtubules in *Allium cepa* meristematic cells. **Cell Biology International**, v.27, p.193-195, 2003.

ECKL, P.M. Aquatic genotoxicity testing with rat hepatocytes in primary culture. II. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations. **The Science of the Total Environment**, v.59, p.81-89, 1995.

EGITO, L.C.M.; MEDEIROS, M.G.; MEDEIROS, S.R.B.; AGNEZ-LIMA, L.F. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.2, p.435-441, 2007.

EISELE, M.; STEINBRICH, A.; HILDEBRAND, A. & LEIBUNDGUT, C. The significance of hydrological criteria for the assessment of the ecological quality in river basins. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 28, p. 529-536, 2003.



ERGENE, S.; ÇELİK, A.; ÇAVAŞ, T.; KAYA, F. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. **Environment International**, v.33, p. 877–885, 2007.

ESTEVEZ, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2ed., 1998. p.602.

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

EVSEEVA, T.I.; GERAS'KIN, S.A.; SHUKTOMOVA, I.I.; TASKAEV, A.I. Genotoxicity and cytotoxicity assay of water sampled from the underground nuclear explosion site in the north of the Perm region (Russia). **Journal of Environmental Radioactivity**, v.80, p.59-74, 2005.

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

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

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

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

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, n.3, p.252-259, 2007.

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

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

FISKESJÖ, G. Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium*. **Physiologia Plantarum**, v.59, p.508-511, 1983.

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

FISKESJÖ, G. The *Allium* test – An alternative in environmental studies – the relative toxicity of metal-ions. **Mutation Research**, v.197, p.243-260, 1988.

FREITAS, V.P.S.; BRÍGIDO, B.M.; BADOLATO, M.I.C.; ALABURDA, J. Padrão físico-químico da água de abastecimento público da região de Campinas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.61, n.1, p.51-58, 2002.

FRENZILLI, G.; BOSCO, E.; BARALE, R. Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. **Mutation Research**, v.468, p. 93–108, 2000.

FRESHNEY, I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**, John Wiley & Sons, 5<sup>a</sup> Ed., 2005.

GÁBELOVÁ, A.; VALOVIČOVÁ, Z.; HORVÁTHOVÁ, E.; SLAMENŇOVÁ, D.; BINKOVÁ, B.; ŠRÁMB, R.J.; FARMER, P.B. Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Košice and Sofia. **Mutation Research**, v.563, p.49–59, 2004.

GANÁ, J.M.; ORDÓÑEZ, R.; ZAMPINI, C.; HIDALGO, M.; MEONI, S.; ISLA, M.I. Industrial effluents and surface waters genotoxicity and mutagenicity evaluation of a river of Tucuman, Argentina. **Journal of Hazardous Materials**, v.155, p.403-406, 2008.

GERTEL, P.; TAU-K-TORNISIELO, S.M.; MALAGUTTI, E.N. Water quality evaluation on São Joaquim and Ribeirão Claro stream, microbasin of Corumbataí River, São Paulo State, Brazil. **Holos Environment**, v.3, n.2, p.103-119, 2003.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency. Gene-Tox program. **Mutation Research**, v.99 (3), p.273-291, 1982.

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

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

HAGMAR, L.; STROMBERG, U.; BONASSI, S.; HANSTEEN, I.-L.; KNUDSEN, L.E.; LINDHOLM, C.; NORPPA, H. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: result from Nordic and Italian cohorts. **Cancer Research**, v.64, p.2258-2263, 2004.

HOSHINA, M.M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro, município de Rio Claro, pertencente à Bacia do Rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***. 2002. 52 f. Monografia. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

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

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

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

IERACE, K.; DYE, F. Monitoring Stream Water Quality with Mouse Cell Culture and On-Site *Allium* Tests. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, v.66, p.470-475, 2001.

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

INZUNZA, B.; ORREGO, R.; PEÑALOSA, M.; GAVILÁN, J.F.; BARRA, R. Analysis of CYP4501A1, PAHs metabolites in bile, and genotóxico damage in *Oncorhynchus mykiss* exposed to Biobío River sediments, Central Chile. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 65, p.242-251, 2006.

JUNIOR, H.M.; SILVA, J.; ARENZON, A.; PORTELA, C.S.; FERREIRA, I.C.F.S.; HENRIQUES, J.A.P. Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. **Chemosphere**, v.67, p.1211-1217, 2007.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v.504, p.137-148, 2002.

KNASMÜLLER, S.; GOTTMANN, E.; STEINKELLNER, H.; FOMIN, A.; PICKL, C.; PASCHKE, A.; GÖD, R.; KUNDI, M. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. **Mutation Research**, v.420, p.37-48, 1998.

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

KONG, Z.M.; ZANG, Y.; WU, Q.L. Monitoring the genotoxicity of Lake Taihu, using two kinds of micronucleus tests. **Environmental Pollution**, v.99, p.279-283, 1998.

KOPPEN, G.; TONCELLI, L.M.; TRIEST, L.; VERSCHAEVE, L. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.110, p.13-24, 1999.

KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, K. The comet assay for detection of potencial genotoxicity of polluted water. **Folia Biologica**, v.45, p.153-156, 1997.

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

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

LEMO, C.T.; ERDTMANN, B. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. **Mutation Research**, v.467, p.1-9, 2000.

LEVAN, A. The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v.24, p.471-486, 1938.

LEWINSKA, A.; WNUK, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Carlton, v.34, p.781-786, 2007.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p.293-303, 2001.

LIU, J.-R.; PANG, Y.-X.; TANG, X.-L.; DONG, H.-W.; CHEN, B.-Q.; SUN, C.-H. Genotoxic activity of organic contamination of the Songhua River in the north-eastern region of the People's Republic of China. **Mutation Research**, v.634, p.81-92, 2007.

LIU, J.-R.; DONG, H.-W.; TANG, X.-L.; SUN, X.-R.; HAN, X.-H.; CHEN, B.-Q.; SUN, C.-H.; YANG, B.-F. Genotoxicity of water from the Songhua River, China, in 1994-1995 and 2002-2003: Potential risks for human health. **Environmental Pollution**, v.157, p.357-364, 2009.

LU, W.Q.; CHEN, X.N.; YUE, F.; JENTER, C.; GMINSK, R.; LI, X.Y.; XIE, H.; Mersch-Sundermann, V. Studies on the in vivo and in vitro mutagenicity and the lipid peroxidation of chlorinated surface (drinking) water in rats and metabolically competent human cells. **Mutation Research**, v.513, p.151-157, 2002.

LU, W.-Q.; CHEN, D.; WU, X.-J.; LIU, A.-L.; LIU, H.; MERSCH-SUNDERMANN, V. DNA damage caused by extracts of chlorinated drinking water in human derived liver cells (HepG2). **Toxicology**, v.198, p.351-357, 2004.

LUO, L.Z. **Chromosome segregational defects: their origin, fate and contribution to genomic instability**. 2004. Dissertation (Mastering), School of Arts and Sciences, 2004.

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

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; MONTIEL, X.; MORENO, P. Inhibición de la actividad biosintética nucleolar inducidas por el plomo en meristemos radiculares de cebolla (*Allium cepa*). **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidade del Zulia**, v.16, p.476-487, 1999.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, p. 221-226, 2004.

MARRARA, A.C.T. **Avaliação Físico-Química e Ecotoxicológica do Ribeirão Tatu no Município de Limeira-SP**. 2008. 122p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Campinas, SP.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KRISCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v.88, p.1515-1531, 2006.

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

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

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

MAZZEO, D.E.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microorganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero**. 2009. 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

MELLO, M.L.S; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.30, p. 665-676, 1978.

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

MINISSI, S.; CACCESE, D.; PASSAFIUME, F.; GRELLA, A.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Mutagenicity (micronucleus test in *Vicia faba* root tips), polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber river and its tributaries within the urban area of Rome. **Mutation Research**, v.420, p.77-84, 1998.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 357/2005.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v.36, p.370-374, 2002.

MORALES, M.M. Metodos alternativos a utilizacao de animais em pesquisa cientifica: mito ou realidade? **Ciencia e Cultura**, Sao Paulo, v.60, n.2, p.33-36, 2008.

NATARAJAN AT. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research**. v.504, p.3-16. 2002.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, v.504, p.17-36, 2002.

OHE, T.; ITO, H.; KAWABUTI, M. Genotoxicity of blue rayon extracts from river waters using sister chromatid exchange in cultured mammalian cells. **Arch Environ Contam Toxicol**, v.25(3), p.293-297, 1993.

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

OHE, T.; SUZUKI, A.; WATANABE, T.; HASEI, T.; NUKAYA, H.; TOTSUKA, Y.; WAKABAYASHI, K. Induction of SCEs in CHL cells by dichlorobiphenyl derivative water pollutants, 2-phenylbenzotriazole (PBTA) congeners and river water concentrates. **Mutation Research**, v.678, p.38–42, 2009.

OLIVEIRA, R.J.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, A.F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of  $\beta$ -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, v.20, p.1225-1233, 2006.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.123, p.291–298, 1984.

PARK, S.Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environment International**, v.33, p.817–822, 2007.

PEJCHAR, P.; PLESKOT, R.; SCHWARZEROVÁ, K.; MARTINEC, J.; VALENTOVÁ, O.; NOVOTNÁ, Z. Aluminum ions inhibit phospholipase D in a microtubule-dependent manner. **Cell Biology International**, v.32, p.554-556, 2008.

PREFEITURA MUNICIPAL DE LIMEIRA (Site oficial). Disponível em: <www.limeira.sp.gov.br>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2010.

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

RAJAGURU, P.; VIDYA, L.; BASKARASETHUPATHI, B.; KUMAR, P.A.; PALANIVEL, M.; KALAISELVI, K. Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. **Mutation Research**, v.517, p.29-37, 2002.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v.18, p.49-53, 1993.

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

RANK, J.; NIELSEN, M.H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, v.390, p.121-127, 1997.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v.418, p.113-119, 1998.

RAO, S.S.; QUINN, B.A.; BURNISSON, B.K.; HAYES, M.A.; METCALFE, C.D. Assessment of the genotoxic potential of pulp mill effluent using bacterial, fish and mammalian assays. **Chemosphere**, v.31, n.6, p.3553-3566, 1995.

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

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



RUSSEL, P.J. Chromosomal mutation. In: CUMMINGS, B. (Org.), **Genetics**. San Francisco: Pearson Education Inc, 2002, p. 595-621.

SAGHIRZADEH, M.; GHARAATI, M.R.; MOHAMMADI, Sh.; GHIASSI-NEJAD, M. Evaluation of DNA damage in the root cells of *Allium cepa* seeds growing in soil of high background radiation areas of Ramsar – Iran. **Journal of Environmental Radioactivity**, v.99, p.1698–1702, 2008.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHEIDER, E.L. A simple technique for quantification of levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

SHI, Y.; CAO, X.-W.; TANG, F.; DU, H.-R.; WANG, Y.-Z.; QIU, X.-Q.; YU, H.-P.; LU, B. In vitro toxicity of surface water disinfected by different sequential treatments. **Water Research**, v.3, p.218–228, 2009.

SETH, C.S.; MISRA, V.; SINGH, R.R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicological Environmental Safety**, v.71, p.711-716, 2008.

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

SOUID-MENSI, A.; MOUKHA, S.; MAAROUFI, K.; CREPPY, E.E. Combined Cytotoxicity and Genotoxicity of a Marine Toxin and Seafood Contaminant Metal Ions (Chromium and Cadmium). **Environ Toxicol**, v.23, p.1–8, 2008.

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

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. **4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás-PDPETRO**, Campinas, p. 1-10, 2007.

SPEIT, G.; HAUPTER, S.; HARTMANN, A. Evaluation of the genotoxic properties of paraquat in V79 Chinese hamster cells. **Mutation Research**, v.412, p.187-193, 1998.

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

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.

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

TÜRKÖGLÜ, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v.626, p.4-14, 2007.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, V.79, P.201–204, 2006.

ÜNYAYAR, S.; ÇELİK, A.C.; ÇEKİÇ, F.Ö; GÖZEL, A. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutagenesis**, v.21, p.77-81, 2006

VEGA, M.M.; FERNÁNDEZ, C.; BLÁZQUEZ, T.; TARAZONA, J.V.; CASTAÑO, A. Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama River, Madrid, Spain. **Environmental pollution**, v.93 (2), p.135-139, 1996.

VENTURA, B.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistema-teste**. 2004. 133 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotóxico effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.90, p.42–51, 2008.

VOUTSINAS, G. ZARANI, F.E.; KAPPAS, A. The effect of environmental aneuploidy inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. **Cell Biology International**, v.21, n.7, p.411-418, 1997.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, v.410, p.223-236.

YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* e *Vicia faba*. **Mutation Research**, v.537, p.109-114, 2003.

YILDIZ, M.; CİĞERCI, I.H.; KONUK, M.; FIDAN, A.F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v.75, p.934-938, 2009.

YUAN, J.; WU, X.-J.; LU, W.-Q.; CHENG, X.-L.; CHEN, D.; LI, X.-Y.; LIU, A.-L.; WU, J.-J.; XIE, H.; STHAL, T.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Chlorinated river and lake water extract caused oxidative damage, DNA migration and cytotoxicity in human cells. **Int. J. Hyg. Environ.-Health**, v.208, p.481-488, 2005.

WISE, S.S.; SHAFFIEY, F.; LACERTE, C.; GOERTZ, C.E.C.; DUNN, J.L.; GULLAND, F.M.D.; ABOUEISSA, A.M.; ZHENG, T.; WISE, J.P. Particulate and soluble hexavalent chromium are cytotoxic and genotoxic to Steller sea lion lung cells. **Aquatic Toxicology**, v.91, p.329-335, 2009.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, v.410, p.223-236.

ŽEGURA, B.; HEATH, E.; ČERNOŠA, A.; FILIPIČ, M. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, v.75, p.1453-1460, 2009.

---

Barbara Cassu Manzano

Aluna

---

Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales

Orientadora

# 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](#)